RAFAEL DE OLIVEIRA ALVIM

**Impacto de marcadores genéticos no fenótipo de
rigidez arterial em uma população geral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alvim, Rafael de Oliveira

Impacto de marcadores genéticos no fenótipo de rigidez arterial em uma população geral / Rafael de Oliveira Alvim. -- São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Rigidez Arterial 2.Velocidade de Onda de Pulso 3.Polimorfismo genético 4.Fenótipo

USP/FM/DBD-051/12

Dedico esta dissertação

Primeiramente a Deus, que é a razão de tudo.

Aos meus pais, Roberto e Edina, e padrinhos, Renato e Maria José, que sempre foram exemplos irretocáveis de honestidade, hombridade e respeito ao próximo. Sem eles... nada disso seria possível!

Ao meu irmão, Vinícius, pelas brincadeiras, discussões e companheirismo durante todo esse tempo.

Aos meus avôs paternos, Aparecida e José Maria, e maternos, Célia e Antônio, pelos momentos de carinho, "mimo" e amor dispensados.

Aos meus tios e primos por dividirem comigo diversos momentos felizes durante toda minha vida.

À minha namorada, Mariane, que através de seu amor, paciência e companheirismo tornou os meus dias muito mais prazerosos e harmoniosos durante esse momento tão conturbado da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. José Eduardo Krieger, pela oportunidade de fazer parte desse grupo vitorioso e me ensinar, entre inúmeras coisas, como administrar diversas situações dentro de um projeto de pesquisa.

Ao amigo e mestre Alexandre Pereira, pelos momentos de trabalho intenso, pelo aprendizado e principalmente por acreditar em meu potencial e contribuir de maneira especial para realização desse sonho.

Ao amigo Paulo Caleb, pelos momentos de aprendizado, trabalho nos finais de semana, experiências pouco qualificadas no futebol e, acima de tudo, pela amizade e lealdade dispensadas durante todo esse tempo em que trabalhamos juntos.

Ao amigo e mestre Henrique Mansur, por me mostrar uma área fascinante dentro da educação física e ser determinante na minha escolha profissional.

Ao Prof. Luiz Bortolotto, pelas dicas e ensinamentos prático-teóricos nos tópicos referentes à velocidade de onda de pulso e rigidez arterial.

Aos meus amigos de infância, Bruno Miranda, Eder Baiano, Paulo China, Felipe Homem, Douglas, Rafael Miranda etc., pelas brincadeiras,

amizade, futebol de final de semana e, acima de tudo, por fazerem parte do meu núcleo de amizade até os dias de hoje.

Aos meus colegas da FAEFID, em especial, aos integrantes do "Cachorrão Bolado", pelos "interplanetários" de futebol de mesa, churrascos e por compartilharem comigo o rótulo de nunca terem conseguido passar de fase nos interperíodos de futsal.

Aos amigos de República, Marcel, Eduardo Alves, Juninho, Natan, Marcus Cobal, Paulo e Jone Loures pelas pizzas de quarta-feira, futebol do meio de semana, discussões científicas e, acima de tudo, pela amizade, companheirismo e lealdade durante todo o tempo que moramos juntos.

Aos Colegas de Laboratório, Noely, Alessandra Medeiros, Amanda, Alessandro Betito, Arruda, Maúde, Silvana, Andréa, Diogo, Júlia, "Lívias", "Andrés" etc., pelas conversas e fofocas na "salinha de computador", por aturarem minha irritação diária, pelos almoços no "Paletão" e pelas trocas de conhecimentos nas reuniões científicas do grupo.

Aos colegas da Reabilitação Cardiovascular do InCor, Newton Nunes, Cristiane Nunes, Christian Aline, Marcelo Coelho, Paula, Maíta, Luciano, Otávio Brogin, Guilherme Barreto, Raffael Fraga, Rodrigo Dias etc., por contribuírem na minha formação profissional e, acima de tudo, por tornarem minha adaptação a "nova vida" mais suave e prazerosa.

Aos amigos de Baependi, Marli Alves, Jacyara, Roberto Sidinei, Célia Maura e Camila Maciel, e minha nova família, Eder, Maurília, Camila e Murilo, pela recepção, amizade, carinho, apoio e, acima de tudo, por acreditarem no meu trabalho e fazer dele um momento muito mais prazeroso.

Aos colegas de trabalho do projeto Corações de Baependi, Letícia, Rerisson, Andréia, Ana Cláudia, Érika, Thalita, Taciana e Ulissiana, pela amizade, respeito e companheirismo, por aguentarem minhas "chatices" e "distúrbios de humor", e mais importante, por contribuírem de forma importante no grande desafio da minha vida.

À CAPES e à FAPESP que contribuíram no financiamento do presente trabalho.

O revolucionário deve sempre ser integral. Ele deverá trabalhar todas as horas, todos os minutos de sua vida, com um interesse sempre renovado e sempre crescente. Esta é uma qualidade fundamental.

Che Guevara

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Listas

Resumo

1.0 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Impacto das Doenças Cardiovasculares.....	01
1.2 Aspectos Gerais da Rigidez Arterial	02
1.3 Marcadores Genéticos e Rigidez Arterial.....	06
1.4 Hipóteses	10
1.4.1 Polimorfismo C242T da Subunidade p22phox	11
1.4.2 Polimorfismo G1036C da TXNIP	12
1.4.3 Polimorfismo C609T/T471C da APOE	14
1.4.4 Polimorfismo G1355A da Elastina	15
1.4.5 Polimorfismo I/D da ECA.....	16
1.4.6 Polimorfismo A855G da MMP-9	17
1.5 Objetivo	18
1.5.1 Objetivo Geral.....	18
1.5.2 Objetivos Específicos	19
2.0 MÉTODOS.....	20
2.1 População Estudada.....	20
2.2 Mensuração de Dados Antropométricos	22
2.3 Mensuração de Dados Bioquímicos	22
2.4 Mensuração de Dados Hemodinâmicos	23
2.5 Mensuração da Velocidade de Onda de Pulso	23
2.6 Extração de DNA	24
2.7 Genotipagem	25
2.7.1 Polimorfismo C242T da Subunidade p22phox	26
2.7.2 Polimorfismo G1036C da TXNIP	27
2.7.3 Polimorfismo C609T/T471C da APOE	27
2.7.4 Polimorfismo I/D da ECA.....	28
2.7.5 Polimorfismo G1355A da Elastina e A855G da MMP-9	29
2.8 Ética.....	30
2.9 Análise Estatística.....	30

3.0	RESULTADOS	32
3.1	Polimorfismo C242T da Subunidade <i>p22phox</i>	32
3.1.1	<i>Dados Antropométricos e Metabólicos</i>	32
3.1.2	<i>Dados Hemodinâmicos</i>	33
3.2	Polimorfismo G1036C da <i>TXNIP</i>	34
3.2.1	<i>Dados Antropométricos e Metabólicos</i>	35
3.2.2	<i>Dados Hemodinâmicos</i>	36
3.3	Polimorfismo C609T/T471C da <i>APOE</i>	37
3.3.1	<i>Dados Antropométricos e Metabólicos</i>	38
3.3.2	<i>Dados Hemodinâmicos</i>	39
3.4	Polimorfismo G1355A da <i>Elastina</i>	40
3.4.1	<i>Dados Antropométricos e Metabólicos</i>	41
3.4.2	<i>Dados Hemodinâmicos</i>	41
3.5	Polimorfismo I/D da <i>ECA</i>	42
3.5.1	<i>Dados Antropométricos e Metabólicos</i>	43
3.5.2	<i>Dados Hemodinâmicos</i>	44
3.6	Polimorfismo A855G da <i>MMP-9</i>	44
3.6.1	<i>Dados Antropométricos e Metabólicos</i>	45
3.6.2	<i>Dados Hemodinâmicos</i>	46
3.7	Análise da Estimativa do Risco para Rigidez Arterial	47
4.0	DISCUSSÃO.....	49
4.1	Polimorfismo C242T da Subunidade <i>p22phox</i>	49
4.2	Polimorfismo G1036C da <i>TXNIP</i>	51
4.3	Polimorfismo C609T/T471C da <i>APOE</i>	53
4.4	Polimorfismo G1355A da <i>Elastina</i>	56
4.5	Polimorfismo I/D da <i>ECA</i>	58
4.6	Polimorfismo A855G da <i>MMP-9</i>	60
5.0	CONCLUSÃO	63
6.0	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE SIGLAS

DCV	Doenças Cardiovasculares
OMS	Organização Mundial de Saúde
PP	Pressão de Pulso
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
VOP	Velocidade de Onda de Pulso
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
AGT	Angiotensinogênio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
PCR	Proteína C-Reativa
VCAM-1	Molécula de Adesão de Célula Vascular
MMP-9	Metaloproteinase da Matriz 9
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P
TXNIP	Proteína que Interage com a Tiorredoxina
APOE	Apolipoproteína E
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
Ang-II	Angiotensina II
TRX	Tiorredoxina
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
IMC	Índice de Massa Corporal
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
PAM	Pressão Arterial Média
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
HRM	Análise da Curva de <i>Melting</i>
NO	Óxido Nítrico
Ang-I	Angiotensina I

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genes candidatos e polimorfismos associados à rigidez arterial	Pg 07
Tabela 2- Relação dos <i>primers</i> utilizados para cada variante genética	Pg 26
Tabela 3- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo C242T da subunidade <i>p22phox</i>	Pg 33
Tabela 4- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo C242T da subunidade <i>p22phox</i>	Pg 34
Tabela 5- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1036C da <i>TXNIP</i>	Pg 36
Tabela 6- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1036C da <i>TXNIP</i>	Pg 37
Tabela 7- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos alélicos do polimorfismo C609T/T471C da <i>APOE</i>	Pg 39
Tabela 8- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos alélicos do polimorfismo C609T/T471C da <i>APOE</i>	Pg 40
Tabela 9- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1355A da <i>elastina</i>	Pg 41
Tabela 10- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1355A da <i>elastina</i>	Pg 42
Tabela 11- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo I/D da <i>ECA</i>	Pg 43
Tabela 12- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo I/D da <i>ECA</i>	Pg 44
Tabela 13- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo A855G da <i>MMP-9</i>	Pg 46
Tabela 14- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo A855G da <i>MMP-9</i>	Pg 47
Tabela 15- Análise da Estimativa do Risco para o fenótipo de rigidez arterial	Pg 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático referente aos principais efetores do processo de rigidez arterial.....	Pg 03
Figura 2- Desenho esquemático referente à descrição metodológica da velocidade de onda de pulso.....	Pg 04
Figura 3- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do sistema NADPH oxidase com o fenótipo de rigidez arterial	Pg 11
Figura 4- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do sistema tioredoxina com o fenótipo de rigidez arterial	Pg 13
Figura 5- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do polimorfismo da <i>APOE</i> com o fenótipo de rigidez arterial	Pg 14
Figura 6- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação de fatores genéticos e ambientais no desbalanço da produção colágeno/elastina	Pg 15
Figura 7- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do polimorfismo I/D da <i>ECA</i> com o fenótipo de rigidez arterial	Pg 17
Figura 8- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do polimorfismo A855G da <i>TXNIP</i> com o fenótipo de rigidez arterial.....	Pg 18
Figura 9- Fluxograma referente ao número de participantes estratificados para cada variante genética	Pg 21
Figura 10- Desenho esquemático referente à determinação de alelos, genótipos e grupos alélicos para o polimorfismo da <i>APOE</i>	Pg 28

RESUMO

Alvim RO. *Impacto de marcadores genéticos no fenótipo de rigidez arterial em uma população geral* [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 74p.

Introdução: A rigidez arterial é um fenômeno complexo caracterizado pela diminuição da complacência vascular frente aos estímulos fisiológicos e patológicos. Semelhantemente a outros fenótipos cardiovasculares, a etiologia da rigidez arterial é modulada por fatores ambientais e genéticos. Levando em consideração a moderada herdabilidade e a característica poligênica do presente fenótipo, torna-se interessante a investigação de marcadores genéticos referentes aos diferentes sistemas envolvidos no remodelamento vascular. **Objetivo:** Avaliar o impacto dos polimorfismos C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase, G1036C da *TXNIP*, C609T/T471C da *APOE*, G1355A da *elastina*, I/D da *ECA* e A855G da *MMP-9* no fenótipo de rigidez arterial em uma população geral. **Métodos:** Participaram do estudo 1.663 indivíduos da população geral da cidade de Vitória-ES. O DNA foi extraído a partir de uma amostra de sangue venoso. Posteriormente foram realizadas as genotipagens para as variantes genéticas supracitadas. A rigidez arterial foi avaliada por meio do método da velocidade de onda de pulso (VOP). **Resultados:** Em relação à VOP, os polimorfismos C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase e G1036C da *TXNIP* foram significativamente associados. Os indivíduos portadores do genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* (CC+TC=9,8 m/s versus TT=10,1 m/s, $p=0,02$) e do alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP* (CC=9,8 m/s versus CG+GG=10,0 m/s, $p=0,03$) apresentaram maiores valores da VOP. Entretanto os polimorfismos C609T/T471C da *APOE* ($\epsilon 2=10,0$ m/s, $\epsilon 3=9,8$ m/s, $\epsilon 4=9,8$ m/s, $p=0,60$), G1355A da *elastina* (AA=9,8 m/s, GA=9,9 m/s, GG=9,8 m/s, $p=0,92$), I/D da *ECA* (DD=9,8 m/s, DI=9,8 m/s, II=9,9 m/s, $p=0,53$) e A855G da *MMP-9* (AA=9,8 m/s, GA=9,8 m/s, GG=9,8 m/s, $p=0,60$) não demonstraram tal associação. Somente o genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* (OR=1,93, $p=0,002$) apresentou um risco significativamente aumentado para o fenótipo de rigidez arterial. Já os polimorfismos G1036C da *TXNIP* (OR=1,19, $p=0,19$), C609T/T471C da *APOE* (OR=1,14, $p=0,33$), G1355A da *elastina* (OR=0,81, $p=0,28$), I/D da *ECA* (OR=0,91, $p=0,48$) e A855G da *MMP-9* (OR=1,01, $p=0,95$) não apresentaram risco. **Conclusão:** Os polimorfismos C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase e G1036C da *TXNIP* podem contribuir como moduladores genéticos no enrijecimento vascular.

Descritores: 1.Rigidez Arterial 2.Velocidade de Onda de Pulso 3.Polimorfismo genético 4.Fenótipo

SUMMARY

Alvim RO. *Impact of genetic markers on arterial stiffness phenotype in a general population* [Dissertation] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 74p.

Introduction: Arterial stiffness is a complex phenomenon characterized by decreased vascular compliance during physiological and pathological stimuli. Similar to other cardiovascular phenotypes, arterial stiffness etiology is modulated by environmental and genetic factors. Considering the moderate heritability and its polygenic phenotype, genetic markers investigations related to different systems involved in vascular remodeling are interesting. **Objectives:** To assess the impact of the *p22phox* C242T, *TXNIP* G1036C, *APOE* C609T/T471C, *elastin* G1355A, *ACE* I/D and *MMP-9* A855G polymorphisms on arterial stiffness phenotype in a general population. **Methods:** This study included 1,663 individuals of the general population from Vitória-ES. DNA was extracted from a venous blood sample and genotyping assays were performed for the genetic variants described above. Arterial stiffness was evaluated by pulse wave velocity (PWV). **Results:** Regarding PWV, *p22phox* C242T and *TXNIP* G1036C polymorphisms were significantly associated. Individuals carrying TT genotype of the *p22phox* C242T (CC + CT vs TT = 9.8 m/s vs 10.1 m/s, $p = 0.02$) and individuals carrying G allele of the *TXNIP* G1036C polymorphisms (CG + CC = 9.8 m/s vs GG = 10.0 m/s, $p = 0.03$) had higher PWV values. However, *APOE* C609T/T471C ($\epsilon_2=10.0$ m/s, $\epsilon_3=9.8$ m/s, $\epsilon_4=9.8$ m/s, $p=0.60$), *elastin* G1355A (AA=9.8 m/s, GA=9.9 m/s, GG=9.8 m/s, $p=0.92$), *ACE* I/D (DD=9.8 m/s, DI=9.8 m/s, II=9.9 m/s, $p=0.53$) and *MMP-9* A855G (AA=9.8 m/s, GA=9.8 m/s, GG= 9.8 m/s, $p=0.60$) polymorphisms did not present association. Only the TT genotype of the *p22phox* C242T polymorphism (OR = 1.93, $p = 0.002$) presented an increased risk for the arterial stiffness phenotype. Already *TXNIP* G1036C (OR=1.19, $p=0.19$), *APOE* C609T/T471C (OR=1.14, $p=0.33$), *elastin* G1355A (OR=0.81, $p=0.28$), *ACE* I/D (OR=0.91, $p=0.48$) and *MMP-9* A855G (OR=1.01, $p=0.95$) polymorphisms did not present risk. **Conclusion:** The *p22phox* C242T and the *TXNIP* G1036C polymorphisms may contribute to genetic modulators in vascular stiffening.

Descriptors: 1.Arterial Stiffness 2.Pulse Wave Velocity 3.Genetic Polymorphism 4.Phenotype

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Impacto das Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade e incapacidade no Brasil e no mundo^{1, 2}. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2005 aproximadamente 17,5 milhões de pessoas morreram vítimas de DCV, o que representa cerca de 30% da mortalidade total na população mundial. A previsão da OMS para o ano de 2020 é que esse número possa se elevar a valores entre 35 e 40 milhões³. No Brasil, os dados referentes à morbimortalidade por DCV são semelhantes aos descritos em países desenvolvidos. Além disso, doenças provenientes do aparelho circulatório são responsáveis por cerca de 10% das internações hospitalares, ficando em 3º lugar, atrás de parto, problemas a ele relacionados (22,6%) e doenças do aparelho respiratório (15,5%)⁴.

Além do impacto social, as DCV vêm sendo responsabilizadas por grandes déficits econômicos nos sistemas de saúde em todo o mundo. Nos países da União Europeia, os custos diretos e indiretos das doenças cardiovasculares foram da ordem de €104,5 bilhões/ano e € 64,2 bilhões/ano, respectivamente⁵. Nos Estados Unidos os custos médico e social decorrentes de doença arterial coronariana ultrapassam os 90 bilhões de dólares/ano⁶. No Brasil, o total aproximado de gastos anuais com saúde fica em torno de R\$ 142 bilhões, sendo o mercado de saúde privada estimado em R\$ 78,1 bilhões. Grande parte deste valor é direta ou indiretamente associado à prevalência e à incidência das DCV⁴.

Levando em consideração os prejuízos socioeconômicos decorrentes das DCV, torna-se importante implementar novas estratégias com o intuito de minimizar os efeitos deletérios provocados por essas enfermidades. Para isso, é necessário combater enfaticamente os fatores de risco associados (hipertensão arterial, sedentarismo, diabetes *mellitus*, obesidade, dislipidemia etc.) e investir em novas estratégias (marcadores genéticos), objetivando maiores benefícios na prevenção e tratamento das doenças relacionadas ao sistema cardiovascular.

1.2. Aspectos Gerais da Rigidez Arterial

A rigidez arterial é um fenômeno complexo caracterizado pela diminuição da complacência (distensibilidade) dos grandes vasos em decorrência do envelhecimento, ou de doenças associadas ao sistema cardiovascular, como diabetes, aterosclerose e doença renal crônica. Clinicamente o fenótipo de rigidez arterial pode se manifestar, principalmente, através da pressão de pulso (PP) elevada e hipertensão sistólica isolada⁷⁻¹². No sistema cardiovascular, o enrijecimento da aorta resulta em elevação da pressão arterial sistólica (PAS) e diminuição da pressão arterial diastólica (PAD), que, por conseguinte, aumenta a pós-carga ventricular e altera a perfusão das artérias coronárias¹³. Essas mudanças podem resultar em hipertrofia do ventrículo esquerdo¹⁴, agravamento da isquemia coronária^{15, 16} e aumento do estresse na parede do vaso¹⁷, o qual por sua vez pode levar à ruptura de placas ateroscleróticas¹⁸.

O enrijecimento da parede vascular se dá através de uma complexa interação entre adaptações dinâmicas e estáveis, envolvendo elementos celulares e estruturais da parede do vaso. Essas alterações vasculares são influenciadas

por forças hemodinâmicas¹⁹ e fatores extrínsecos, como hormônios, processo de regulação do sal e da glicose²⁰. A modulação fisiopatológica da rigidez arterial é mediada através do fino balanço entre a produção e a degradação de elastina e colágeno. Portanto, o desbalanço desse sistema causado por estímulo de substâncias pró-inflamatórias, ação descompensada de metaloproteinases e sobrecarga de pressão, leva a uma superprodução de colágeno e uma redução da elastina, contribuindo assim para a diminuição da distensibilidade vascular frente aos estímulos fisiológicos²¹ (Figura 1).

Figura 1- Desenho esquemático referente aos principais efetores do processo de rigidez arterial (Adaptado de Zieman et al.²⁰). NaCl, cloreto de sódio; CMLV, célula muscular lisa vascular; AGE's, produto final de glicação avançada; MMP, metaloproteinases da matriz; I-CAM, molécula de adesão intercelular; TGF-β, fator de crescimento transformador-beta.

A avaliação da rigidez arterial pode ser realizada por meio de métodos invasivos e não-invasivos. Estes são divididos em 3 grupos: avaliação da distensibilidade, análise do formato de onda de pulso arterial e medida da

velocidade de onda de pulso (VOP), que, segundo consensos, é o método padrão ouro para avaliação da rigidez arterial²². A VOP é definida como a velocidade de deslocamento da onda de pressão no segmento arterial. A determinação da VOP carótida-femoral, que expressa propriedades elásticas da aorta e vasos centrais, se dá através do posicionamento de dois transdutores, sensíveis à onda de pressão, sobre a parte mais proeminente da artéria carótida comum direita e femoral direita. Em seguida, o sistema mensura o intervalo de tempo entre o início da onda carotídea e femoral. Após esse processo, é medida a distância entre os transdutores (realizada por meio de uma fita métrica), para que o *software* possa calcular a VOP aórtica, que nada mais é que a razão da distância entre os dois transdutores e o intervalo de tempo entre as tangentes das duas ondas de pulso (carótida e femoral)²³ (figura 2).

$$VOP = \frac{L}{\Delta t}$$

L: distância de mensuração carótida/femoral
 Δt : diferença de t entre o início das ondas carótida/femoral

Figura 2- Desenho esquemático referente a descrição metodológica da velocidade de onda de pulso (adaptado Bortolotto L.²⁴).

Nos últimos anos, com a consolidação do método da VOP na avaliação da rigidez arterial, diversos estudos vêm demonstrando a associação positiva do

presente fenótipo com diversas condições patológicas. Blacher et al.²⁵, estudando indivíduos portadores de aterosclerose, demonstraram que a VOP está associada à presença e à extensão do processo aterosclerótico. Em outro estudo envolvendo pacientes com doença renal crônica em estágio terminal, London et al.²⁶ demonstraram que esses indivíduos apresentavam maiores valores da VOP quando comparados aos indivíduos controles saudáveis. Toto Moukhou et al.²⁷, avaliando propriedades das grandes artérias de indivíduos obesos e não obesos com hipertensão essencial, demonstraram que a VOP era significativamente maior em indivíduos obesos. Além disso, inúmeros estudos epidemiológicos vêm reportando o papel da rigidez arterial aumentada na predição de morbidade e mortalidade, independentemente de outros fatores de risco cardiovascular. Recentemente, Vlachopoulos et al.²⁸ demonstraram através de uma meta-análise envolvendo 17 estudos, que valores elevados da VOP ($>12\text{m/s}$) prediziam um aumento de 102% no risco de mortalidade decorrentes de eventos cardiovasculares. O mesmo estudo demonstrou ainda que o aumento de 1m/s na VOP correspondia ao incremento de 15% no risco.

Devido ao comprovado impacto da rigidez arterial aumentada no risco de morbidade e mortalidade cardiovascular e total, diversas formas de tratamento vêm sendo propostas com objetivo de diminuir os números supracitados. Levando em consideração que a degeneração estrutural de componentes elásticos das grandes artérias é pouco reversível frente a terapias farmacológicas²⁹, torna-se importante focar nas intervenções de cunho preventivo, como restrição de sódio na alimentação³⁰, treinamento físico regular³¹, diminuição do tabagismo³², estímulo ao consumo moderado de álcool³³, uso de óleos derivados de peixe³⁴ e

priorizar alimentos que contenham isoflavonóides³⁵. Contudo, apesar das controvérsias em relação a contribuição dos fármacos na diminuição da rigidez arterial, alguns estudos têm demonstrado resultados positivos mediante a utilização de drogas anti-hipertensivas³⁶⁻³⁸. Sendo assim, pode-se considerar que o tratamento farmacológico associado à medidas preventivas pode ter um efeito adicional no controle da rigidez arterial.

1.3. Marcadores Genéticos e Rigidez Arterial

Nos últimos anos, diversos estudos vêm mostrando a influência de fatores genéticos na modulação de fenótipos relacionados à rigidez arterial^{39, 40}. Concomitantemente, inúmeras investigações abordando núcleos familiares têm demonstrado uma herdabilidade moderada (21 - 66%) para traços associados à rigidez arterial^{41, 42}. Além disso, estudos de varredura de genoma inteiro vêm apontando que o fenótipo de rigidez arterial pode ser modulado por diferentes regiões cromossômicas^{43, 44}. Apesar do crescente investimento em métodos mais sofisticados de avaliação genética, os estudos de associação com genes candidatos continuam sendo os mais abundantes na literatura. Tendo em vista o fenótipo de rigidez arterial, os polimorfismos mais investigados são provenientes de sistemas, que de forma direta ou indireta, interagem na fisiopatologia do enrijecimento vascular, como integrantes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), proteínas associadas à estrutura vascular, efetores relacionados à função endotelial e agentes inflamatórios (tabela 1).

Tabela 1- Genes candidatos e polimorfismos associados à rigidez arterial

Gene	Polimorfismo	Expressão de RNA e/ou proteína	Fenótipo de Rigidez Arterial
Enzima conversora de angiotensina (ECA) , cromossomo 17; localização 17q23.3	rs4340: I/D (inserção no intron 16)	Alelo D: aumento da atividade da ECA	Alelo I: aumento do VOP ⁴⁵
Angiotensinogênio (AGT) , cromossomo 1: localização 1q42-q43	rs699: 704 T/C (éxon 2, Met235Thr)	Alelo C: aumento do AGT plasmático	Alelo C: redução da distensibilidade carotídea ⁴⁶
Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) , cromossomo 7; localização 7q36	rs1799983: 894G/T (éxon 7, Glu298Asp)	Inconclusivo	Genótipo GG: PP central elevada; mas não mostrou associação com VOP ^{48,49}
Receptor β de endotelina , cromossomo 13; localização 12q22	rs5351: 831 A/G (éxon 5, Leu277Leu)	Inconclusivo	Alelo G: aumento de VOP, somente em mulheres ⁵⁰
Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) , cromossomo 6; localização 6p21.3	rs1800629: -308 A/G (região promotora)	Aumenta a produção de TNF-α via estimulação	Alelo A: aumento do índice de rigidez da carótida em pacientes com doença de Kawasaki ⁵²
Proteína C-reativa (PCR) , cromossomo 1; localização 1q22-q25	rs 1130864: 1444C/T (éxon 2)	Alelo T: aumento da PCR via estimulação	Alelo T: aumento do índice de rigidez da carótida em pacientes com doença de Kawasaki ⁵²
Molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1) , cromossomo 1; localização 1p32-p31	rs3176878: 2079 T/C (éxon 9, Asp693Asp)	Inconclusivo	Genótipo CC: aumento do VOP ⁵³
Metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9) , cromossomo 20; localização 20q11.2-q13.1	rs17576: 855A/G (éxon 6, Arg279Gln)	Alelo A: aumento da expressão sérica e aórtica de MMP-9	Alelo A: aumento do VOP ⁵⁵
Elastina , cromossomo 7; localização 7q11.23	-/A (região não traduzida)	Inconclusivo	Alelo A: aumento do VOP ⁵⁴

Conhecidamente, o SRAA, além de seu importante papel na regulação da pressão arterial, exerce função de destaque no processo de remodelamento vascular. Portanto, torna-se evidente que qualquer variante genética capaz de afetar a atividade de seus efetores (angiotensina, enzima conversora de angiotensina, angiotensinogênio e renina), poderia sim, ter um papel importante na fisiologia vascular. Dessa forma, diversos estudos vêm demonstrando a associação de polimorfismos genéticos de determinados efetores do SRAA com fenótipos de rigidez arterial. Benetos et al.⁴⁵, estudando indivíduos saudáveis e hipertensos, demonstraram que a presença do alelo I do polimorfismo I/D da *enzima conversora de angiotensina (ECA)* estava associado ao aumento da rigidez arterial em ambos os grupos. Além disso, têm sido propostos ensaios testando a associação de variantes genéticas do *angiotensinogênio (AGT)* com traços associados à elasticidade vascular. Bozec et al.⁴⁶, estudando pacientes hipertensos, demonstraram que a presença do genótipo TT do polimorfismo

M235T do *AGT* estava associado a menor distensibilidade e maior rigidez de parede da artéria carótida.

Assim como o SRAA, o endotélio tem um papel fundamental na fisiologia vascular, atuando principalmente no controle do tono e do fluxo vascular, através da liberação de óxido nítrico e outros peptídeos com interações vasoativas⁴⁷. Comprovada a importância da integridade endotelial na fisiopatologia vascular, diversos estudos têm avaliado o impacto de variantes genéticas ligadas à fisiologia endotelial com fenótipos de rigidez arterial. Mitchell et al.⁴⁸, estudando a população do *Framingham Heart Study*, demonstraram que o genótipo GG do polimorfismo Glu298Asp da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) estava associado com elevada PP central principalmente em mulheres. Contudo, os dados não foram reproduzidos para o fenótipo da VOP. Corroborando com os dados acima, Lacolley et al.⁴⁹ também não encontraram associação do presente polimorfismo com o fenótipo da VOP em indivíduos saudáveis e hipertensos. Adicionalmente, têm sido realizados alguns estudos focando variantes genéticas da endotelina e seus receptores, devido ao seu importante efeito vasoconstrictor. Lajemi et al.⁵⁰, estudando pacientes hipertensos não-tratados, demonstraram a associação do alelo G do polimorfismo *do receptor β da endotelina* com maiores valores da VOP somente em mulheres, o que sugere um impacto restrito ao gênero.

O processo de remodelamento vascular é consequência da interação de diversos mecanismos, dentre eles, o processo inflamatório. Inúmeros estudos vêm demonstrando o papel de agentes inflamatórios na disfunção endotelial e na aterosclerose⁵¹. Sendo assim, diversos pesquisadores têm se interessado na

avaliação do possível impacto de polimorfismos genéticos de agentes pró-inflamatórios nos fenótipos de rigidez arterial. Cheung et al.⁵², estudando pacientes com histórico de doença de Kawasaki, demonstraram o efeito sinérgico do alelo A do polimorfismo -308 A/G do *fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)* e o alelo T do polimorfismo 1444 C/T da *proteína C-reativa (PCR)* com elevado índice de rigidez arterial em artéria carótida. Além disso, considerando as moléculas de adesão, Zhu et al.⁵³ demonstraram em indivíduos jovens e saudáveis, a associação do genótipo CC do polimorfismo Asp693Asp das *moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1)* com maiores valores da VOP.

Em adição aos fatores endócrinos, inflamatórios e vasoativos derivados do endotélio, os componentes estruturais da parede do vaso também são protagonistas no processo de enrijecimento vascular, visto que o desbalanço desses componentes pode resultar em uma desproporção na síntese de colágeno e elastina, contribuindo assim para a diminuição da distensibilidade vascular²¹. Dessa forma, têm sido realizados diversos estudos genéticos englobando proteínas estruturais. Iwai et al.⁵⁴, estudando indivíduos da população japonesa, demonstraram a associação do alelo A do polimorfismo (-/A) da *elastina* com maiores valores da VOP. A associação de polimorfismos do gene de algumas metaloproteinases também tem sido investigada. Yasmin et al.⁵⁵, estudando indivíduos saudáveis de ambos os gêneros, demonstraram a associação do alelo G do polimorfismo A855G da *metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9)* com valores aumentados da VOP.

Concluindo, os estudos acima corroboram com a hipótese de que variantes genéticas localizadas em diferentes genes, podem sim, contribuir com a ideia de que a modulação do fenótipo de rigidez arterial envolve diversos genes.

1.4. Hipóteses

Semelhantemente aos demais fenótipos do sistema cardiovascular, o processo de enrijecimento dos grandes vasos é resultado da interação de diversas vias biológicas, as quais sabidamente são moduladas por fatores ambientais e genéticos. Tendo em vista que o fenótipo de rigidez arterial apresenta um caráter poligênico, torna-se relevante investigar o impacto de variantes genéticas, que de forma direta ou indireta, possam influenciar na expressão de proteínas importantes na fisiopatologia vascular. Como descrito no tópico anterior, inúmeros estudos têm demonstrado a associação de polimorfismos genéticos, de diferentes vias biológicas, com fenótipos de rigidez arterial. Partindo desse princípio, o presente estudo investigou a associação do fenótipo de rigidez arterial, avaliado pela VOP, com as seguintes variantes genéticas: C242T da subunidade *p22phox* da nicotinamida adenina dinucleotídeo-P (NADPH) oxidase; G1036C da *proteína que interage com a tiorredoxina (TXNIP)*; C609T/T471C da *apolipoproteína E (ApoE)*; G1355A da *elastina*; I/D da *ECA*; A855G da *MMP-9*.

Para o melhor entendimento serão apresentadas a seguir as hipóteses detalhadas para todas as variantes genéticas supracitadas.

1.4.1. Polimorfismo C242T da Subunidade p22phox

O estresse oxidativo é definido como um desbalanço do estado redox, no qual substâncias pró-oxidantes sobrepõem-se à capacidade oxidante resultando na produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs), que recentemente vêm sendo associadas à patogênese vascular⁵⁶. As EROs são produzidas por inúmeras enzimas especializadas, como xantina oxidase, ciclo-oxigenase, óxido nítrico sintase e oxidases mitocondriais. No entanto, a principal fonte produtora de EROs no tecido vascular é a NADPH oxidase, cuja ativação é mediada através da sua interação com diversos peptídeos e agentes pró-inflamatórios, como angiotensina II (Ang-II), endotelina I, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), TNF- α e condições hiperlipídicas⁵⁷ (Figura 3).

Figura 3- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do sistema NADPH oxidase com o fenótipo de rigidez arterial. END-1, endotelina 1; ANG-II, angiotensina II; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial.

O sistema NADPH oxidase é composto por múltiplas subunidades localizadas na membrana (p22phox e gp91phox) e no citoplasma (gp40 phox, gp47 phox, gp67 phox e rac1)⁵⁸, sendo a atividade dessas, intimamente

associadas à doença arterial coronária e acidente vascular cerebral^{59, 60}. Justificado o importante papel do complexo NADPH oxidase na fisiopatologia cardiovascular, inúmeros estudos vêm tentando demonstrar a associação de variantes genéticas das diversas subunidades do sistema NADPH oxidase (p22phox, gp91phox e p47phox) com fenótipos cardiovasculares. Embasando a hipótese do presente estudo, investigações anteriores demonstraram a associação do alelo T do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* com maior produção de EROs⁶¹ e elevado índice de infarto agudo do miocárdio⁶². Sendo assim, o presente estudo defendeu a hipótese de que os indivíduos portadores do genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase apresentariam maior rigidez arterial quando comparado aos seus pares em uma população geral.

1.4.2. Polimorfismo G1036C da TXNIP

O sistema tiorredoxina (TRX) está envolvido em importantes mecanismos da homeostase cardiovascular. Em especial, a interação de seus principais integrantes (TRX e TRX redutase) com a proteína TXNIP tem um papel central na sinalização e regulação do estado redox⁶³ (Figura 4).

Figura 4- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do sistema tiorredoxina com o fenótipo de rigidez arterial. TXNIP, proteína que interage com a tiorredoxina; TRX, tiorredoxina; NFκβ, fator nuclear-kappaβ; MnSOD, manganês superóxido dismutase; ASK, quinase reguladora do sinal de apoptose 1; VCAM, molécula de adesão de célula vascular.

Dentre as principais ações do complexo TRX no sistema cardiovascular, destaca-se a inibição da apoptose e do estresse oxidativo, os quais sabidamente têm um papel fundamental no processo aterosclerótico⁶⁴. O presente sistema é contra-regulado pela proteína TXNIP, que reconhecidamente é um inibidor das ações biológicas da TRX. Além disso, estudo recente demonstrou que o alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP* estava associado à maior expressão gênica⁶⁵, o que poderia resultar em maior síntese protéica e, consequentemente, maior inibição do sistema TRX. Levando em consideração os fatos supracitados, o presente estudo defendeu a hipótese de que os indivíduos portadores do alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP* apresentariam maior rigidez arterial quando comparado aos seus pares em uma população geral.

1.4.3. Polimorfismo C609T/T471C da APOE

A APOE é uma glicoproteína fundamental no metabolismo lipídico, no qual participa da metabolização das partículas remanescentes de quilomícron e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)⁶⁶. Além disso, alguns estudos têm demonstrado seu importante papel na absorção intestinal de colesterol⁶⁷ e manutenção de lípidos plasmáticos⁶⁸.

Figura 5- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do polimorfismo da APOE com o fenótipo de rigidez arterial. CT, colesterol total; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; APOE, apolipoproteína E.

Justificada a importância da APOE no metabolismo lipídico, inúmeros estudos têm investigado o impacto de variantes genéticas do gene da APOE no perfil lipídico e em inúmeros fenótipos do sistema cardiovascular. Resultados consistentes têm demonstrado a associação do alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da APOE com maiores níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL)⁶⁹ e doença arterial coronária⁷⁰. Finalmente, considerando a relação entre

perfil lipídico inadequado e a fisiopatologia vascular, o presente estudo defendeu a hipótese de que os indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* apresentariam maior rigidez arterial quando comparado aos seus pares em uma população geral.

1.4.4. Polimorfismo G1355A da Elastina

As alterações vasculares são influenciadas por fatores hemodinâmicos¹⁹ e extrínsecos, como hormônios, peptídeos vasoativos e metabolismo do sal e da glicose²⁰ (Figura 6).

Figura 6- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação de fatores genéticos e ambientais no desbalanço da produção colágeno/elastina. MMP, metaloproteinase de matriz; AngII, angiotensina II; AGE's, produto final de glicação avançada.

A modulação fisiopatológica da rigidez arterial é mediada através do fino balanço entre a produção e a degradação de elastina e colágeno. Dessa forma, o

desbalanço do presente sistema resulta na superprodução de colágeno e redução de elastina, que, por conseguinte, culminaria no aumento da rigidez arterial²¹. Levando em consideração a moderada influência genética e a presença de alguns estudos investigando associações de variantes genéticas da elastina com fenótipos de rigidez arterial^{54, 71}, o presente estudo defendeu a hipótese de que os indivíduos portadores do genótipo AA do polimorfismo G1355A da *elastina* apresentariam maior rigidez arterial quando comparado aos seus pares em uma população geral.

1.4.5. Polimorfismo I/D da ECA

O SRAA é tradicionalmente citado como um dos principais efetores vasoconstrictores no leito arterial. Sua ação moduladora se dá, principalmente, através da ligação do peptídeo vasoativo Ang-II ao seu receptor AT1 presente no endotélio vascular. Recentemente, estudos funcionais vêm demonstrando que a infusão de Ang-II, em indivíduos saudáveis, leva ao aumento da rigidez arterial⁷². Além disso, estudos associando o polimorfismo I/D da *ECA* com sua respectiva atividade enzimática têm demonstrado que os indivíduos portadores do genótipo DD apresentaram maior atividade da *ECA*⁷³. Sendo assim, podemos hipotetizar que os portadores do genótipo DD apresentariam ações exacerbadas do SRAA no sistema cardiovascular (Figura 7).

Figura 7- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do polimorfismo I/D da ECA com o fenótipo de Rigidez Arterial.

Considerando os fatos supracitados, o presente estudo defendeu a hipótese de que os indivíduos portadores do genótipo DD do polimorfismo I/D da ECA apresentariam maior rigidez arterial quando comparado aos seus pares em uma população geral.

1.4.6. Polimorfismo A855G da MMP-9

As MMPs são enzimas que apresentam atividade proteolítica contra diversas proteínas do tecido conjuntivo, como colágeno, proteoglicanos e elastina⁷⁴. Dentre os integrantes da super família das MMPs, destaca-se a gelatinase MMP-9, que reconhecidamente apresenta um papel importante no remodelamento vascular⁷⁵ (Figura 8).

Figura 8- Desenho esquemático que sugere a hipótese da possível interação do polimorfismo A855G da TXNIP com o fenótipo de Rigidez Arterial. MMP-9, metaloproteinase de matriz 9.

Tendo em vista a correlação positiva entre os níveis séricos da MMP-9 com a VOP⁷⁶, a associação do genótipo GG do polimorfismo A855G da MMP-9 com os elevados níveis circulantes de MMP-9 e maior rigidez arterial⁵⁵, o presente estudo defendeu a hipótese de que os indivíduos portadores do genótipo GG do polimorfismo A855G da MMP-9 apresentariam maior rigidez arterial quando comparado aos seus pares em uma população geral.

1.5. Objetivo

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto dos polimorfismos C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase, G1036C da TXNIP, C609T/T471C da APOE, G1355A da elastina, I/D da ECA, A855G da MMP-9 no fenótipo de rigidez arterial em uma população geral.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Testar a hipótese de que os indivíduos portadores do genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox*, alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP*, alelo ε4 do polimorfismo C609T/T471C da *APOE*, genótipo AA do polimorfismo G1355A da *elastina*, genótipo DD do polimorfismo I/D da *ECA* e genótipo GG do polimorfismo A855G da *MMP-9* apresentariam maiores valores de VOP quando comparados aos seus respectivos pares.
- Testar a hipótese de que o genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox*, alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP*, alelo ε4 do polimorfismo C609T/T471C da *APOE*, genótipo AA do polimorfismo G1355A da *elastina*, genótipo DD do polimorfismo I/D da *ECA* e genótipo GG do polimorfismo A855G da *MMP-9* estariam associados a um maior risco para rigidez arterial quando comparado aos seus respectivos pares.

2.0. MÉTODOS

2.1. População Estudada

Os indivíduos investigados pertencem a um estudo observacional e transversal, cuja base populacional foi constituída pelos moradores do Município de Vitória (Espírito Santo, Brasil), com idades entre 25 e 64 anos, que fizeram parte de um estudo para determinar a prevalência e gravidade dos fatores de risco cardiovascular (Projeto MONICA-OMS/Vitória). Os dados foram coletados de abril de 1999 a novembro de 2000. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram selecionados 2.268 moradores de Vitória-ES a partir de uma amostra aleatória de igual número de domicílios. A amostragem foi programada de modo a cobrir proporcionalmente todas as sete regiões administrativas da cidade de Vitória⁷⁷. Foram inicialmente sorteados bairros e, dentro destes, setores censitários. O sorteio dos domicílios dentro de cada setor foi realizado por mecanismo de randomização. Caso não houvesse nenhum morador no domicílio sorteado, era selecionado o domicílio imediatamente seguinte, até se completar a cota de indivíduos de cada setor censitário. Em cada domicílio foi sorteado apenas um indivíduo, situado na faixa etária do estudo, para fazer parte da pesquisa. Após a escolha do indivíduo (data de aniversário mais próxima ao dia da visita), este era convidado a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para sua participação no estudo. A coleta de dados era iniciada no próprio domicílio por meio de levantamento de dados socioeconômicos e de saúde. A seguir, era agendado o dia para que o participante comparecesse à

Clínica de Investigação Cardiovascular do Centro de Ciências da Saúde da UFES para realização de exames clínicos e laboratoriais necessários à determinação da presença de fatores de risco cardiovascular. Dos 2.268 indivíduos incluídos na pesquisa durante a visita domiciliar, 1.663 (73,3%) compareceram ao local de exames para a coleta de sangue em jejum de 12 horas, medida da pressão arterial, avaliação da rigidez arterial, registro do eletrocardiograma e obtenção de medidas antropométricas, além de outros dados incluídos no protocolo de pesquisa.

Em relação aos estudos de associação genética com o fenótipo de rigidez arterial, o número de participantes genotipados para cada marcador foi bastante variado, pois as amostras biológicas (DNA) de alguns indivíduos não apresentaram boas condições quando submetidas ao processo de genotipagem. Além disso, só foram selecionados para o presente estudo os indivíduos que apresentaram valores válidos para a determinação da VOP. Essas e outras condições culminaram na diferença do número de participantes para cada polimorfismo investigado. Finalmente, segue apresentado na figura 9 o fluxograma referente ao número de indivíduos incluídos para cada variante genética.

Figura 9- Fluxograma referente ao número de participantes estratificados para cada variante genética.

A classificação étnico-racial de cada indivíduo foi feita a partir da análise de características fenotípicas e informações obtidas por um questionário validado para população brasileira⁷⁸. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos: brancos, negros, mulatos e outros mestiços. Foram classificados como mulatos os indivíduos mestiços com uma ascendência negra predominante em vista dos dados fenotípicos. No último grupo foram incluídos mestiços não enquadráveis na categoria de mulato (asiáticos, índios e outros).

2.2. Mensuração dos Dados Antropométricos

O peso corporal foi obtido em balança eletrônica (precisão de 0,1 kg) com a bexiga vazia e com o indivíduo portando apenas roupas íntimas. A estatura foi obtida em estadiômetro de parede com o indivíduo descalço e com precisão de 0,5 cm. Desta forma, calculou-se o índice de massa corporal ($IMC = \text{Peso}/\text{Estatura}^2$), conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde para avaliação do estado nutricional⁷⁹.

2.3. Mensuração dos Dados Bioquímicos

Os exames bioquímicos foram feitos em um único local (Laboratório Central do Sesi/Vitória) com kits comerciais conforme protocolo padrão⁸⁰. Foram medidos os níveis de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), VLDL-c, triglicerídeos e ácido úrico. A concentração de LDL-c foi calculada pela fórmula de Friedwald. O diabetes foi definido como glicose de jejum ≥ 126 mg/dL ou uso de fármacos hipoglicemiantes.

2.4. Mensuração de Dados Hemodinâmicos

A pressão arterial foi medida no braço não dominante com esfigmomanômetro de mercúrio, com precisão de 2 mmHg, com o indivíduo sentado e em repouso de, pelo menos, 5 minutos. A primeira e a quinta fase dos sons de Korotkoff foram usadas para identificação da PAS e PAD, respectivamente. A hipertensão foi definida como PAS $\geq$ 140 mmHg e/ou PAD $\geq$ 90 mmHg ou uso de drogas anti-hipertensivas. A PP foi calculada através da diferença entre a PAS e PAD. A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir da fórmula: $PAM = PAD + 1/3 PP$.

2.5. Mensuração da Velocidade de Onda de Pulso

A determinação da velocidade de onda de pulso (VOP) foi realizada por um investigador experiente por meio da utilização do Complior® (Colson, Garges les Gonesses, France). O equipamento determina a VOP carótido-femoral através do posicionamento de dois sensores mecânicos automáticos e não invasivos (TY-306-Fukuda; Fukuda, Tóquio, Japão) acoplados a um programa de computador que calcula o tempo e detecta as ondas de pulso das artérias carótida e femoral ipsilateral. Conhecendo-se a distância entre os dois locais, é possível calcular a VOP com base no tempo que a onda de pressão leva para percorrer de um ponto ao outro. O resultado final da VOP foi dado pela média de 10 (dez) medidas válidas. Devido à influência direta da pressão arterial sobre a VOP, a mesma também foi ajustada para pressão arterial média em todos os grupos. A validação do presente método automático e sua reprodutibilidade foram previamente

descritos⁸¹. O fenótipo de rigidez arterial aumentada foi definido a partir da mediana (9,5 m/s) dos valores da VOP.

2.6. Extração de DNA

O DNA foi extraído de sangue colhido com EDTA. O experimento foi realizado segundo o protocolo descrito abaixo. Oito (8) ml de sangue foram transferidos para um tubo de 50 ml e o volume completado para 30ml com tampão A (1mM NH_4HCO_3 + 144mM NH_4Cl). A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e deixada a 4°C por 10 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima. O sedimento leucocitário foi finalmente ressuspensão em 3 ml de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8 + 400 mM NaCl + 2 mM Na_2EDTA pH 8) + 200 μl de SDS 10% + 500 μl de tampão C (50 μl de SDS 10% + 2 μl de Na_2EDTA 0,5 M pH 8 + 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 μl de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e deixado a 37°C por aproximadamente 12-18 horas. A segunda parte do protocolo começa com a adição de 1 mL de solução D (NaCl 6 M), vigorosamente agitada em vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL e a ele foi adicionado 10 mL de etanol absoluto gelado. Com uma leve agitação já se nota a precipitação do DNA que pode ser “pescado” e transferido para um eppendorf de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O eppendorf foi então centrifugado a 4°C por 15 minutos a 13500 rpm, o etanol descartado e o sedimento (DNA) deixado a temperatura ambiente até ser totalmente seco. Em seguida, este pellet é ressuspensão em 1 ml de TE (10 mM

Tris- HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8). Após a completa diluição, a determinação da concentração do DNA foi realizada diluindo-se 20 µl do material em 980 µl de TE e, em seguida, a mistura foi submetida à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A concentração final foi corrigida para 100 ng/µl.

2.7. Genotipagem

Para determinação genotípica das seis variantes genéticas englobadas no presente estudo, diferentes métodos foram utilizados. Os genótipos dos polimorfismos C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase, G1036C da *TXNIP*, C609T/T471C da *APOE* e I/D da *ECA* foram determinados através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Já as genotipagens dos polimorfismos G1355A da *elastina* e A855G da *MMP-9* foram determinadas por meio do método de análise da curva de *melting* (HRM). Os primers foram elaborados a partir da numeração *rs* já descrita para cada polimorfismo e desenhados no programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

Abaixo, segue a descrição de todos os primers usados para determinação dos genótipos de cada variante genética (Tabela 2). Em seguida, serão relatadas de forma detalhada as especificações técnicas das genotipagens para cada marcador.

Tabela 2- Relação dos primers utilizados para cada variante genética.

Gene	Polimorfismo	Localização	Sentido	Primer
<i>P22phox</i>	C242T	Éxon 4	F	5'-TGCTTGTGGGTAAACCAAGGCCGGTG-3'
			R	5'-AACACTGAGGTAAGTGGGGGTGGCTCCTGT-3'
<i>APOE</i>	C609T	Éxon 4	F	5'-GCCGATGACCTGCAGAAG-3'
			R	5'-CACGCGGCCCTGTTCCAC-3'
	T471C	Éxon 4	F	5'-GCGGACATGGAGGACGTG-3'
			R	5'-AGCTCCTCGGTGCTCTGG-3'
<i>Elastina</i>	G1355A	Éxon 1	F	5'-CGCTCTAGACAAGGCCTGGGGAAATTACATCC-3'
			R	5'-CGCAAGCTTCTGGAGGCCTGGGAGCCAGTTTG-3'
<i>MMP-9</i>	A855G	Éxon 6	F	5'-CTCGCCCCAGGACTCTACAC-3'
			R	5'-GTGGAGGTACCTCGGGTCGGG-3'
<i>ECA</i>	I/D de 287pb	Íntron 16	F	5'-CTGGAGACCACTCCCATCC1TTCT-3'
			R	5'-GATGTGCCATCACATTCGTCAGAT-3'
<i>TXNIP</i>	G1036C	Íntron 9	F	5'-ACCCAAGGAGGAACCTTGATCAAGATGGC-3'
			R	5'-CTCCTAACACAGGGCAGGAA3'

2.7.1 Polimorfismo C242T da Subunidade *p22phox* da NADPH Oxidase

Após extração de DNA genômico, os genótipos do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* foram determinados através de análise de restrição alelo-específica, como previamente descrito na literatura. Resumidamente, o genótipo do polimorfismo C242T foi determinado através da avaliação do nucleotídeo C ou T na posição 242 da sequência codificante do gene da subunidade *p22phox* através da reação de PCR, seguida da reação de digestão por endonuclease de restrição (RFLP) utilizando oligonucleotídeos específicos flanqueando a sequência polimórfica. A reação de PCR foi realizada após etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos caracterizados pelas seguintes temperaturas: 95°C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos utilizou-se 7 minutos de extensão a 72°C. Após amplificação, a digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição *RsaI* foi realizada no material amplificado. O genótipo na posição C242T foi identificado através da observação de padrão de digestão específico para cada genótipo em

gel de agarose na concentração de 2,5%, corado em brometo de etídio na concentração de 50µg/mL.

2.7.2 Polimorfismo G1036C da *TXNIP*

Os genótipos do polimorfismo C1036G do gene da *TXNIP* foram determinados por meio do método de PCR. A amplificação do produto da PCR foi realizada em termociclador da marca PTC-DNA Engine Tetrad₂ com 30 ciclos completos em um produto final de 10 µL de reação, contendo 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 100µM de cada dNTP, 0,3 U *Taq polimerase*, 5 pmol de cada primer e 1µL de DNA genômico. O produto de PCR foi digerido com 1U de enzima de restrição seguida de eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo a 5% e visualizado em transiluminador (EAGLE EYE™ - Stratagene) sob o efeito do feixe de luz ultravioleta. Objetivando avaliar o padrão de qualidade, 40 amostras foram aleatoriamente selecionadas e posteriormente genotipadas, para o mesmo marcador, por outro observador experiente.

2.7.3 Polimorfismo C609T/T471C da *APOE*

A amplificação do éxon 4 do gene da *APOE* foi realizada por meio da reação de PCR contendo 100ng de DNA, 2,5nM de desoxinucleotídeo, 10mM Tris-HCl (pH 9,5), 1,5mM MgCl₂, 0,25mM de dimetilsulfóxido, 6 pmol de primers e 1,5 U de *Taq polimerase*. A presente reação foi iniciada com desnaturação a 94°C por 4 minutos seguida por 35 ciclos constituídos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e concluída por extensão final a 70°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição específica e

posteriormente separados por tamanho de fragmento por meio de eletroforese em gel de poliácridamida. Os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene da *APOE*, que codificam as isoformas E2, E3 e E4 da proteína APOE, distinguem-se por variações nos cóndons 112 e 158, que determinam a presença de cisteína (Cys) ou arginina (Arg) nessas posições. A partir disso, os grupos alélicos são convencionalmente formados por meio da união dos genótipos semelhantes quanto ao impacto no metabolismo dos lípidos (Figura 9). Para evitar fatores de confusão, os indivíduos portadores do genótipo E2/E4 foram excluídos da amostra.

Figura 10- Desenho esquemático referente à determinação de alelos, genótipos e grupos alélicos para o polimorfismo da *APOE*.

2.7.4 Polimorfismo I/D da ECA

Os alelos D e I foram identificados por meio da reação de PCR dos respectivos fragmentos provenientes do íntron 16 do gene da *ECA* e visualizados em gel de eletroforese. Após a extração do DNA, uma solução contendo 1 μ M de primers, 200 μ M desoxinucleotídeo trifosfato, 1,3 mM cloreto de magnésio, 50 mM cloreto de potássio, 10 mM Tris-HCl (ph 8.4), 0,1% Triton X-100 e 0,35 U de *Taq* polimerase. Foi usado um par de primer para amplificar os alelos D e I, resultando em 319 e 597 pares de base, respectivamente. O procedimento termocíclico consistia na desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 45

segundos e extensão a 72°C por 7 minutos. Após a adição de 5 µl de tampão, 7 µl da mistura foi adicionado em gel de agarose a 1% contendo 40mM Tris acetato, 2mM EDTA e 1 micrograma de brometo de etídeo por mililitro de solução. O produto da amplificação dos alelos I e D foram identificados por 300nm de transiluminação ultravioleta. Devido ao fato do alelo D em amostras heterozigotas ser preferencialmente amplificado, cada amostra inicialmente genotipada como DD era comumente submetida a uma segunda e independente amplificação com um par de primers que reconhece uma sequência específica de inserção com idênticas condições de PCR, exceto para temperatura de anelamento 67°C.

2.7.5 Polimorfismo G1355A da Elastina e A855G da MMP-9

As análises dos genótipos para os polimorfismos dos genes da *MMP-9* e *elastina* foram realizadas por amplificação do DNA genômico através da reação de PCR seguida por análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*). Para este procedimento, as reações são otimizadas no aparelho Rotor Gene 6000® (Qiagen, Courtaboeuf, France), utilizando o reagente fluorescente DNA-intercalante SYTO9® (Invitrogen, Carlsbad, USA). A reação é constituída por 1µL (10ng) de DNA genômico, 2 µL de tampão de reação (MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200mM), 0,4 µL de cada *primer* (200 nM), 0,6 µL de SYTO9® (1,5 mM), 0,5 U de BioTaq polimerase (Bio-Química, Brasil) e água para PCR completando para 10 µL.

Na fase da análise da curva de *melting* (HRM), o aparelho mensura a fluorescência emitida pela reação a cada aumento de 0,1°C de temperatura na

faixa de 70-94°C. A curva de *melting* é gerada pela diminuição da fluorescência com o aumento da temperatura, e na análise, os nucleotídeos polimórficos geram padrões de curva diferenciados em relação aos nucleotídeos selvagem.

Amostras de três curvas observadas são submetidas ao sequenciamento direto (ABI Terminator Sequencing Kit® e sequenciador ABI 3500® - Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.) para a confirmação dos genótipos indicados pelo HRM.

2.8 Ética

O projeto (protocolo de pesquisa nº 0005/10) intitulado *“Impacto de Marcadores Genéticos no Fenótipo de Rigidez Arterial em uma População Geral”* foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.9 Análise Estatística

O banco de dados foi criado inicialmente no Microsoft Excel® e posteriormente compartilhado ao programa SPSS v16.0 (SPSS Inc, IL, USA), adotando nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). As variáveis contínuas foram expressas como média $\pm$ desvio padrão, enquanto as variáveis categóricas foram expressas como porcentagem. Os valores da VOP foram devidamente ajustados para idade, PAM e etnia, enquanto as demais variáveis foram ajustadas para idade, gênero e etnia. A distribuição dos genótipos para cada variante genética estava de acordo com equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Levando em consideração a normalidade dos dados, para comparar as variáveis contínuas referentes às características metabólicas, antropométricas e hemodinâmicas foram utilizados os testes de análise de variância simples (*Oneway* ANOVA) e *t* de *student* para comparação de três e dois grupos genotípicos, respectivamente. As correções para potenciais variáveis de confusão foram realizadas por meio da análise de covariância (ANCOVA). Para comparar as variáveis categóricas referentes às características metabólicas, antropométricas e hemodinâmicas foi utilizado o teste de Qui-Quadrado. Para estimativa do risco para rigidez arterial, em cada variante genética, foi utilizada a análise de regressão logística, na qual se determinou o *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%.

3.0. RESULTADOS

3.1 Polimorfismo C242T da Subunidade *p22phox*

As frequências genóticas para o polimorfismo da subunidade *p22phox* foram: CC = 42,5%; CT = 45,9% e TT = 11,6%. O alelo T apresentou uma frequência de 34,6%. A distribuição genotípica se apresenta em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2=0,02$; $p=0,88$). Todos os dados apresentados abaixo são oriundos da comparação entre os grupos genotípicos CC+CT vs TT.

As variáveis referentes à idade ($p=0,87$), gênero ($p=0,50$) e etnia ($p=0,80$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 3).

3.1.1 Dados Antropométricos e Metabólicos

Em relação às variáveis metabólicas e antropométricas, os dados referentes ao IMC ($p=0,96$), triglicérides ($p=0,54$), colesterol total ($p=0,75$), LDL-c ($p=0,91$), HDL-c ($p=0,56$) e glicose ($p=0,23$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 3).

Tabela 3- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox*.

Características N, (%)	CC+CT 1041 (88,0%)	TT 137 (12,0%)	p
Idade, anos	45,0 ± 10,6	45,4 ± 10,6	0,87
Gênero, homens (n)%	437 (42,1%)	58 (41,6%)	0,50
Etnia, n (%)			
Brancos	386 (87,3%)	56 (12,7%)	0,80
Mulatos	510 (89,0%)	63 (11,0%)	
Negros	62 (87,3%)	9 (12,7%)	
Outros	83 (90,2%)	9 (9,8%)	
IMC, kg/m ² †	26,4 ± 5,0	26,4 ± 5,6	0,96
Triglicérides, mg/dL	132,7 ± 94,3	127,6 ± 101,8	0,54
Colesterol Total, mg/dL	217,7 ± 45,3	216,5 ± 42,5	0,75
HDL- Colesterol, mg/dL	45,9 ± 12,3	45,2 ± 11,3	0,56
LDL – Colesterol, mg/dL	145,7 ± 39,8	146,1 ± 36,2	0,91
Glicose, mg/dL	105,6 ± 31,8	102,2 ± 20,9	0,23

IMC: Índice de massa corporal; HDL, colesterol de alta densidade; LDL, colesterol de baixa densidade.

Diabetes foi definida com glicose de jejum ≥ 126 mg/dL ou diagnóstico prévio.

† valor corrigido para idade, sexo, etnia.

3.1.2 Dados Hemodinâmicos

Considerando a hipótese do possível impacto do genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* na rigidez arterial, por intermédio da exacerbada atividade da NADPH oxidase e consequente aumento do estresse oxidativo vascular, os dados do presente estudo demonstraram que os indivíduos portadores do genótipo TT apresentaram maiores valores da VOP quando comparados ao grupo CC+CT ($p=0,02$). Além disso, o grupo TT apresentou uma frequência maior de indivíduos com rigidez arterial mais acentuada quando comparado ao grupo CC+CT ($p=0,001$). Entretanto, os dados referentes à

frequência de indivíduos hipertensos ($p=0,79$), PAS ($p=0,31$), PAD ($p=0,07$), PAM ($p=0,11$) e PP ($p=0,82$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 4).

Tabela 4- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox*.

Características N, (%)	CC+CT 1041 (88,0%)	TT 137 (12,0%)	<i>p</i>
Hipertensão, (n) %	445 (42,7%)	60 (43,8%)	0,79
Rigidez Arterial, (n) %	493 (47,4%)	85 (62,0%)	0,001
VOP [†] , m/s	9,8 ± 2,1	10,1 ± 2,1	0,02
PAS [‡] , mmHg	127,0 ± 21,3	128,8 ± 22,0	0,31
PAD [‡] , mmHg	82,4 ± 13,2	84,5 ± 12,9	0,07
PAM [‡] , mmHg	97,2 ± 15,0	99,2 ± 15,3	0,11
PP [‡] , mmHg	44,7 ± 14,3	44,4 ± 13,1	0,82

Rigidez Arterial (VOP > 9.5 m/s); Hipertensos (PAS $\geq$ 140 ou PAD $\geq$ 90 ou uso de fármaco hipotensor)

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PP, pressão de pulso; VOP, velocidade de onda de pulso.

[‡] valor corrigido para idade, sexo, etnia.

[†] valor corrigido para PAM, etnia e idade.

3.2 Polimorfismo G1036C da *TXNIP*

As frequências genotípicas para o polimorfismo da *TXNIP* foram: CC = 69,0%; CG = 28,0% e GG = 3,0%. A frequência do alelo G foi de 17,5%. A distribuição genotípica se apresenta em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2=2,9$; $p=0,09$). Todos os dados apresentados abaixo são oriundos da comparação entre os grupos genotípicos CC vs CG+GG.

A distribuição étnica se mostrou diferente dentro dos grupos genotípicos. O grupo CG+GG apresentou um maior percentual de indivíduos brancos quando comparado a negros e mulatos ($p<0,001$). Contudo, as variáveis idade ($p=0,07$) e gênero ($p=0,27$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 5).

3.2.1 Dados Antropométricos e Metabólicos

Em relação às variáveis metabólicas e antropométricas, os indivíduos portadores do alelo G (CG+GG) apresentaram maiores valores de glicemia de jejum quando comparados ao grupo CC ($p=0,02$). Além disso, o grupo CG+GG apresentou uma maior frequência de indivíduos diabéticos quando comparado ao grupo CC ($p<0,001$). Entretanto, os dados referentes ao IMC ($p=0,15$), triglicérides ($p=0,14$), colesterol total ($p=0,62$), LDL-c ($p=0,81$) e HDL-c ($p=0,88$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 5).

Tabela 5- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1036C da *TXNIP*.

Características N, (%)	CC 1043 (69,0%)	CG+GG 475 (31,0%)	p
Idade, anos	45,2 ± 10,7	44,1 ± 10,9	0,07
Gênero, homens (n)%	459 (44,2%)	219 (46,1%)	0,27
Etnia, n (%)			
Brancos	208 (50,5%)	204 (49,5%)	<0,001
Mulatos	637 (74,4%)	219 (25,6%)	
Negros	135 (84,9%)	24 (15,1%)	
Outros	63 (69,2%)	28 (30,8%)	
IMC ^{††} , kg/m ²	26,1 ± 4,8	26,5 ± 4,9	0,15
Diabetes ^{††} , (n)%	63 (6,1%)	57 (11,5%)	<0,001
Triglicérides ^{††} , mg/dL	140,5 ± 143,4	129,1 ± 87,5	0,14
Colesterol Total ^{††} , mg/dL	215,3 ± 47,9	214,0 ± 47,7	0,62
HDL- Colesterol ^{††} , mg/dL	45,4 ± 12,5	45,6 ± 12,2	0,88
LDL – Colesterol ^{††} , mg/dL	142,9 ± 38,5	142,4 ± 41,2	0,81
Glicose ^{††} , mg/dL	103,6 ± 28,3	107,8 ± 38,4	0,02

IMC: Índice de massa corporal; HDL, colesterol de alta densidade; LDL, colesterol de baixa densidade.

Diabetes foi definida com glicose de jejum ≥ 126 mg/dL ou diagnóstico prévio.

^{††} valor corrigido para idade, sexo, etnia.

3.2.2 Dados Hemodinâmicos

Considerando a hipótese do possível impacto do alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP* na rigidez arterial, por intermédio do estresse oxidativo exacerbado, os dados do presente estudo demonstraram que os indivíduos portadores do alelo G (CG+GG) apresentaram maiores valores da VOP quando comparados ao grupo CC (p=0,03). Além disso, o grupo CG+GG apresentou uma maior frequência de indivíduos hipertensos (p=0,02). Entretanto, os dados referentes à frequência de indivíduos com rigidez arterial mais acentuada

($p=0,08$), PAS ($p=0,10$), PAD ($p=0,26$), PAM ($p=0,14$) e PP ($p=0,20$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 6).

Tabela 6- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1036C da *TXNIP*.

Características N, (%)	CC 1043 (69,0%)	CG+GG 475 (31,0%)	<i>p</i>
Rigidez Arterial, n(%)	483 (46,3%)	239 (50,3%)	0,08
Hipertensão, n(%)	457 (43,9%)	237 (49,9%)	0,02
VOP [†] , m/s	9,8 ± 1,9	10,0 ± 2,2	0,03
PAS [¶] , mmHg	127,0 ± 21,1	128,9 ± 22,0	0,10
PAD [¶] , mmHg	83,8 ± 13,9	84,8 ± 13,9	0,26
PAM [¶] , mmHg	98,2 ± 15,6	99,4 ± 15,7	0,14
PP [¶] , mmHg	43,3 ± 13,3	44,3 ± 13,7	0,20

Rigidez Arterial (VOP > 9.5 m/s); Hipertensos (PAS ≥ 140 ou PAD ≥ 90 ou uso de fármaco hipotensor).

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PP, pressão de pulso; VOP, velocidade de onda de pulso.

¶ valor corrigido para idade, sexo, etnia.

† valor corrigido para PAM, etnia e idade.

3.3 Polimorfismo C609T/T471C da *APOE*

As frequências genotípicas para o polimorfismo da *APOE* foram: E2/E2 = 0,4%; E2/E3 = 9,7%; E2/E4 = 2,3%; E3/E3 = 61,0%; E3/E4 = 24,4%; E4/E4 = 2,2%. As frequências dos 3 grupos alélicos foram: ε2 = 12,3%; ε3 = 61,1%; ε4 = 26,6%. A distribuição genotípica se apresenta em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p>0,05$). Todos os dados apresentados abaixo são oriundos da comparação entre os grupos alélicos ε2, ε3 e ε4 .

A distribuição étnica se mostrou diferente dentro dos grupos alélicos, visto que, no grupo $\epsilon 4$ o percentual de indivíduos negros é superior ao de brancos ($p < 0,001$). Contudo, as variáveis idade ($p = 0,28$) e gênero ($p = 0,13$) não se mostraram diferentes entre os grupos alélicos (Tabela 7).

3.3.1 Dados Antropométricos e Metabólicos

Corroborando com inúmeros trabalhos na literatura, o polimorfismo da *APOE* demonstrou-se fortemente associado ao perfil lipídico no presente estudo. Assim, os valores de colesterol total ($p < 0,001$), LDL-c ($p < 0,001$), taxa colesterol total/HDL-c ($p < 0,001$) e taxa LDL/HDL-c ($p < 0,001$) foram maiores nos grupos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ quando comparado ao grupo $\epsilon 2$. Entretanto, o colesterol total, LDL-c e taxa colesterol total/ HDL-c não se mostraram diferentes entre os grupos alélicos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$ ($p > 0,05$). Os valores de HDL-c ($p < 0,001$) foram menores nos grupos alélicos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ quando comparados ao grupo $\epsilon 2$. Além disso, os valores de HDL-c ($p < 0,05$) foram maiores no grupo $\epsilon 3$ quando comparado ao grupo $\epsilon 4$. Adicionalmente, os valores de ácido úrico ($p = 0,04$) se mostraram maiores no grupo $\epsilon 4$ quando comparado ao grupo $\epsilon 2$. Contudo, as variáveis IMC ($p = 0,27$), triglicérides ($p = 0,28$) e glicose ($p = 0,64$) não foram diferentes entre os grupos alélicos (Tabela 7).

Tabela 7- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos alélicos do polimorfismo C609T/T471C da *APOE*.

Características N, (%)	ε2 180 (12,3%)	ε3 893 (61,1%)	ε4 388 (26,6%)	p
Idade, anos	43,8 ± 10,6	45,1 ± 10,9	44,5 ± 10,8	0,28
Gênero, homens (n) %	76 (42,2%)	433 (48,5%)	169 (43,6%)	0,13
Etnia, n (%)				
Branços	50(9,1%)	367 (67,0%)	131 (23,9%)	< 0,002
Negros	19 (15,6%)	63 (51,6%)	40 (32,8%)	
Mulatos	111 (14,1%)	463 (58,5%)	217 (27,4%)	
IMC [¶] , kg/m ²	25,8 ± 4,7	26,3 ± 4,9	26,4 ± 4,9	0,27
Triglicérides [¶] , mg/dL	133,7 ± 99,1	133,9 ± 124,4	145,9 ± 148,6	0,28
Colesterol Total [¶] , mg/dL	201,4 ± 50,6	215,2 ± 48,3 [*]	218,6 ± 44,6 [†]	<0,001
HDL- Colesterol [¶] , mg/dL	48,8 ± 14,6	45,5 ± 12,7 [*]	43,2 ± 10,1 ^{†‡}	<0,001
LDL – Colesterol [¶] , mg/dL	125,3 ± 35,8	143,1 ± 38,9 [*]	147,9 ± 39,6 [†]	<0,001
Colesterol Total/HDL-c taxa [¶]	4,3±1,4	5,0±1,5 [*]	5,3±1,5 [†]	<0,001
LDL/HDL-c taxa [¶]	2,8±1,0	3,4±1,2 [*]	3,6±1,3 ^{†‡}	<0,001
Glicose [¶] , mg/dL	103,9 ± 30,1	105,8 ± 33,0	104,4 ± 31,0	0,64
Ácido Úrico [¶] , mg/dL	4,7±1,4	4,8±1,5	5,0±1,6 [†]	0,04

IMC: Índice de massa corporal

¶ valor corrigido para idade, sexo, etnia.

HDL, colesterol de alta densidade; LDL, colesterol de baixa densidade.

*ε2 vs ε3, p<0,05; †ε2 vs ε4, p<0,05; ‡ε3 vs ε4, p<0,05.

3.3.2 Dados Hemodinâmicos

A despeito da hipótese do possível impacto do alelo ε4 do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* na rigidez arterial, por intermédio do perfil lipídico desfavorável, os dados do presente estudo não demonstraram associação da variante genética da *APOE* com a VOP (p=0,66) e a frequência de rigidez arterial mais acentuada (p=0,42). De forma semelhante, as características hemodinâmicas referentes à frequência de hipertensos (p=0,42), PAS (p=0,15), PAD (p=0,34), PAM (p=0,21) e PP (p=0,34) não foram associadas ao polimorfismo da *APOE* (Tabela 8).

Tabela 8- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos alélicos do polimorfismo C609T/T471C da *APOE*.

Características N, (%)	ε2 180 (12,3%)	ε3 893 (61,1%)	ε4 388 (26,6%)	P
Rigidez Arterial, (n)%	88 (48,9%)	414 (46,4%)	195 (50,4%)	0,42
Hipertensos, (n)%	80 (44,3%)	410 (45,9%)	191 (49,3%)	0,42
VOP†, m/s	10,0 ± 2,1	9,8 ± 2,2	9,8 ± 2,1	0,66
PAS‡, mmHg	125,9 ± 19,7	128,1 ± 21,5	129,4 ± 22,6	0,15
PAD‡, mmHg	83,3 ± 13,9	84,5 ± 14,1	85,1 ± 14,1	0,34
PAM‡, mmHg	97,5 ± 15,2	99,0 ± 15,8	99,8 ± 16,1	0,21
PP‡, mmHg	42,6 ± 11,4	43,7 ± 13,7	44,3 ± 14,3	0,34

Rigidez Arterial (VOP > 9.5 m/s); Hipertensos (PAS ≥ 140 ou PAD ≥ 90 ou uso de fármaco hipotensor); PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PP, pressão de pulso; VOP, velocidade de onda de pulso.

‡ valor corrigido para idade, sexo, etnia.

† valor corrigido para PAM, etnia e idade.

3.4 Polimorfismo G1355A da *Elastina*

As frequências genotípicas para o polimorfismo da *elastina* foram: AA = 10,5%; GA = 43,6%; GG = 45,9%. A frequência do alelo A foi de 32%. A distribuição genotípica se apresenta em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2 = 0,0009$; $p=0,98$). Todos os dados apresentados abaixo são oriundos da comparação entre os grupos genotípicos AA, GA e GG.

A distribuição étnica se mostrou diferente dentro dos grupos genotípicos. No grupo AA, o percentual de indivíduos brancos é superior ao de negros ($p<0,001$). Contudo, as variáveis idade ($p=0,08$) e gênero ($p=0,55$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 9).

3.4.1 Dados Antropométricos e Metabólicos

Em relação às variáveis metabólicas e antropométricas, os dados referentes ao IMC ($p=0,54$), triglicérides ($p=0,88$), colesterol total ($p=0,47$), LDL-c ($p=0,19$), HDL-c ($p=0,36$) e glicose ($p=0,88$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 9).

Tabela 9- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1355A da *elastina*.

Características N, (%)	AA 158 (10,5%)	GA 653 (43,6%)	GG 687 (45,9%)	<i>p</i>
Idade, anos	45,7 ± 10,8	45,4 ± 10,9	44,2 ± 10,7	0,08
Gênero, homens (n) %	77 (48,7%)	289 (44,3%)	317 (46,1%)	0,55
Etnia, n (%)				
Brancos	67(12,6%)	283 (53,1%)	183 (34,3%)	< 0,001
Mulatos	75 (9,8%)	300 (39,4%)	387 (50,8%)	
Negros	3 (2,8%)	31 (28,7%)	74 (68,5%)	
Outros	13 (13,7%)	39 (41,0%)	43 (45,3%)	
IMC [†] , kg/m ²	26,6 ± 5,2	26,2 ± 4,7	26,2 ± 4,9	0,54
Triglicérides [†] , mg/dL	140,7 ± 125,6	135,5 ± 90,9	137,3 ± 157,8	0,88
Colesterol Total [†] , mg/dL	218,2 ± 43,6	215,7 ± 45,2	213,7 ± 51,4	0,47
HDL- Colesterol [†] , mg/dL	46,1 ± 14,2	45,0 ± 12,1	45,8 ± 12,4	0,36
LDL – Colesterol [†] , mg/dL	146,2 ± 40,7	144,1 ± 39,5	141,1 ± 39,5	0,19
Glicose [†] , mg/dL	103,8 ± 28,8	105,2 ± 32,4	104,9 ± 31,9	0,88

HDL, colesterol de alta densidade; LDL, colesterol de baixa densidade; IMC: Índice de massa corporal
[†] valor corrigido para idade, sexo, etnia.

3.4.2 Dados Hemodinâmicos

A despeito da hipótese do possível impacto do genótipo AA do polimorfismo G1355A da *elastina* na rigidez arterial, por intermédio do provável desbalanço na relação elastina/colágeno, os dados do presente estudo não demonstraram associação da variante genética da *elastina* com a VOP ($p=0,92$) e

a frequência de rigidez arterial mais acentuada ($p=0,46$). De forma semelhante, as características hemodinâmicas referentes à frequência de hipertensos ($p=0,86$), PAS ($p=0,70$), PAD ($p=0,83$), PAM ($p=0,88$) e PP ($p=0,25$) não foram associadas ao polimorfismo da *elastina* (Tabela 10).

Tabela 10- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo G1355A da *elastina*.

Características N, (%)	AA 158 (10,5%)	GA 653 (43,6%)	GG 687 (45,9%)	<i>p</i>
Rigidez Arterial, (n)%	72 (45,6%)	323 (49,5%)	319 (46,4%)	0,46
Hipertensos, (n)%	72 (45,6%)	292 (44,8%)	318 (46,3%)	0,86
VOP [†] , m/s	9,8 ± 2,1	9,9 ± 2,2	9,8 ± 2,2	0,92
PAS [‡] , mmHg	128,8 ± 21,7	127,3 ± 21,9	127,3 ± 21,9	0,70
PAD [‡] , mmHg	84,1 ± 13,8	84,2 ± 14,1	83,7 ± 13,7	0,83
PAM [‡] , mmHg	99,0 ± 15,5	98,5 ± 15,8	98,4 ± 15,6	0,88
PP [‡] , mmHg	44,7 ± 14,3	43,1 ± 14,0	44,1 ± 13,5	0,25

Rigidez Arterial (VOP > 9.5 m/s); Hipertensos (PAS ≥ 140 ou PAD ≥ 90 ou uso de fármaco hipotensor); PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PP, pressão de pulso; VOP, velocidade de onda de pulso.

[‡] valor corrigido para idade, sexo, etnia.

[†] valor corrigido para PAM, etnia e idade.

3.5 Polimorfismo I/D da *ECA*

As frequências genotípicas para o polimorfismo da *ECA* foram: DD = 29,0%; DI = 54,6% e II = 16,4%. A frequência do alelo I foi de 44,0%. A distribuição genotípica se apresenta em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2 = 1,20$; $p=0,27$). Todos os dados apresentados abaixo são oriundos da comparação entre os grupos genotípicos DD, DI e II.

A distribuição étnica se mostrou diferente dentro dos grupos genotípicos. No grupo DD, o percentual de indivíduos brancos é superior ao de negros

($p=0,002$). Em relação à distribuição do gênero, o grupo DD apresenta maior frequência de homens quando comparado ao grupo II ($p=0,03$). Contudo, a idade ($p=0,90$) não se mostrou diferente entre os grupos genotípicos (Tabela 11).

3.5.1 Dados Antropométricos e Metabólicos

Em relação às variáveis metabólicas e antropométricas, os dados referentes ao IMC ($p=0,34$), triglicérides ($p=0,06$), colesterol total ($p=0,43$), LDL-c ($p=0,26$), HDL-c ($p=0,08$) e glicose ($p=0,53$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 11).

Tabela 11- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo I/D da ECA.

Características N, (%)	DD 439 (29,0%)	DI 828 (54,6%)	II 248 (16,4%)	<i>p</i>
Idade, anos	45,0 ± 10,8	44,8 ± 10,8	45,1 ± 10,6	0,90
Gênero, homens (n)%	207 (47,2%)	385 (46,5%)	93 (37,7%)	0,03
Etnia, n (%)				
Branços	171 (31,8%)	301 (56,1%)	65 (12,1%)	0,002
Mulatos	224 (29,2%)	403 (52,6%)	139 (18,2%)	
Negros	21 (18,4%)	65 (57,0%)	28 (24,6%)	
Outros	23 (23,5%)	59 (60,2%)	16 (16,3%)	
IMC [¶] , kg/m ²	26,5 ± 5,0	26,3 ± 4,9	26,0 ± 4,8	0,34
Triglicérides [¶] , mg/dL	144,5 ± 159,6	130,1 ± 89,5	148,9 ± 170,7	0,06
Colesterol Total [¶] , mg/dL	215,9 ± 55,1	213,8 ± 44,3	217,8 ± 46,3	0,43
HDL- Colesterol [¶] , mg/dL	46,5 ± 13,9	45,0 ± 11,2	45,0 ± 12,7	0,08
LDL – Colesterol [¶] , mg/dL	140,4 ± 39,2	143,6 ± 40,1	144,8 ± 38,4	0,26
Glicose [¶] , mg/dL	106,2 ± 36,2	104,2 ± 28,9	105,1 ± 32,3	0,53

IMC: Índice de massa corporal

¶ valor corrigido para idade, sexo, etnia.

HDL, colesterol de alta densidade; LDL, colesterol de baixa densidade.

3.5.2 Dados Hemodinâmicos

A despeito da hipótese do possível impacto do genótipo DD do polimorfismo I/D da *ECA* na rigidez arterial, por intermédio do efeito exacerbado do SRAA nos grandes vasos, os dados do presente estudo não demonstraram associação da variante genética da *ECA* com a VOP ($p=0,53$) e a frequência de rigidez arterial mais acentuada ($p=0,35$). De forma semelhante, as características hemodinâmicas referentes à frequência de hipertensos ($p=0,52$), PAS ($p=0,65$), PAD ($p=0,96$), PAM ($p=0,87$) e PP ($p=0,45$) não foram associadas ao polimorfismo da *ECA* (Tabela 12).

Tabela 12- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo I/D da *ECA*.

Características N, (%)	DD 439 (29,0%)	DI 828 (54,6%)	II 248 (16,4%)	<i>p</i>
Rigidez Arterial, (n) %	203 (46,2%)	388 (46,9%)	128 (51,6%)	0,35
Hipertensos, (n)%	209 (47,6%)	367 (44,3%)	115 (46,4%)	0,52
VOP [†] , m/s	9,8 ± 2,1	9,8 ± 2,1	9,9 ± 2,1	0,53
PAS [¶] , mmHg	127,1 ± 19,9	128,1 ± 22,2	127,1 ± 22,4	0,65
PAD [¶] , mmHg	83,9 ± 13,5	84,1 ± 14,2	83,9 ± 13,2	0,96
PAM [¶] , mmHg	98,3 ± 14,8	98,7 ± 16,1	98,3 ± 15,6	0,87
PP [¶] , mmHg	43,3 ± 12,5	44,1 ± 14,5	43,2 ± 13,7	0,45

Rigidez Arterial (VOP > 9,5 m/s); Hipertensos (PAS ≥ 140 ou PAD ≥ 90 ou uso de fármaco hipotensor)

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PP, pressão de pulso;

VOP, velocidade de onda de pulso.

¶ valor corrigido para idade, sexo, etnia.

† valor corrigido para PAM, etnia e idade.

3.6 Polimorfismo A855G da *MMP-9*

As frequências genotípicas para o polimorfismo da *MMP-9* foram: AA = 46,2%; GA = 42,2%; GG = 11,6%. A frequência do alelo G foi de 33%. A

distribuição genotípica se apresenta em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2 = 1,69$; $p=0,68$). Todos os dados apresentados abaixo são oriundos da comparação entre os grupos genotípicos AA, GA e GG.

A idade ($p=0,05$) foi menor no grupo GG quando comparado ao GA e AA. Entretanto, a distribuição étnica ($p=0,76$) e de gênero ($p=0,68$) foram semelhantes entre os grupos genotípicos (Tabela 13).

3.6.1 Dados Antropométricos e Metabólicos

Em relação às variáveis metabólicas e antropométricas, os dados referentes ao IMC ($p=0,63$), triglicérides ($p=0,52$), colesterol total ($p=0,23$), LDL-c ($p=0,41$), HDL-c ($p=0,65$) e glicose ($p=0,78$) não foram diferentes entre os grupos genotípicos (Tabela 13).

Tabela 13- Características antropométricas e metabólicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo A855G da *MMP-9*.

Características N, (%)	AA 686 (46,2%)	GA 626 (42,2%)	GG 172 (11,6%)	p
Idade, anos	45,1 ± 10,9	45,1 ± 10,7	42,9 ± 10,7	0,05
Gênero, homens (n) %	308 (45,6%)	293 (43,3%)	75 (11,1%)	0,68
Etnia, n (%)				
Brancos	246(46,6%)	220 (41,7%)	62 (11,7%)	0,76
Negros	48 (44,0%)	51 (46,8%)	40 (32,8%)	
Mulatos	343 (45,4%)	322 (42,6%)	10 (9,2%)	
Outros	49 (53,3%)	33 (35,9%)	10 (10,9%)	
IMC [¶] , kg/m ²	26,3 ± 4,9	26,4 ± 4,9	26,0 ± 4,5	0,63
Triglicérides [¶] , mg/dL	140,9 ± 155,2	133,4 ± 101,4	133,2 ± 101,2	0,52
Colesterol Total [¶] , mg/dL	215,8 ± 50,8	215,5 ± 46,1	209,4 ± 41,9	0,23
HDL- Colesterol [¶] , mg/dL	45,4 ± 12,5	45,7 ± 12,4	44,8 ± 12,1	0,65
LDL – Colesterol [¶] , mg/dL	143,2 ± 40,1	143,3 ± 39,1	139,1 ± 37,8	0,41
Glicose [¶] , mg/dL	104,8 ± 30,2	105,3 ± 33,8	103,5 ± 20,9	0,78

HDL, colesterol de alta densidade; LDL, colesterol de baixa densidade; IMC: Índice de massa corporal
[¶] valor corrigido para idade, sexo, etnia.

3.6.2 Dados Hemodinâmicos

A despeito da hipótese do possível impacto do genótipo GG do polimorfismo A855G da *MMP-9* na rigidez arterial, por intermédio do processo de remodelamento vascular e degradação da elastina, os dados do presente estudo não demonstraram associação da variante genética da *MMP-9* com a VOP (p=0,60) e a frequência de rigidez arterial mais acentuada (p=0,56). De forma semelhante, as características hemodinâmicas referentes à frequência de hipertensos (p=0,06), PAS (p=0,96), PAD (p=0,87), PAM (p=0,97) e PP (p=0,97) não foram associadas ao polimorfismo da *MMP-9* (Tabela 14).

Tabela 14- Características hemodinâmicas estratificadas para os grupos genotípicos do polimorfismo A855G da *MMP-9*.

Características N, (%)	AA 686 (46,2%)	GA 626 (42,2%)	GG 172 (11,6%)	<i>p</i>
Rigidez Arterial, n (%)	323 (47,1%)	302 (48,2%)	75 (43,6%)	0,56
Hipertensão, n (%)	322 (46,9%)	292 (46,7%)	64 (37,2%)	0,06
VOP [†] , m/s	9,8 ± 2,0	9,8 ± 2,2	9,8 ± 2,1	0,60
PAS [‡] , mmHg	127,6 ± 21,0	127,7 ± 22,1	127,2 ± 21,1	0,96
PAD [‡] , mmHg	83,1 ± 13,7	84,2 ± 13,7	83,7 ± 14,2	0,87
PAM [‡] , mmHg	98,4 ± 15,3	98,6 ± 15,7	97,4 ± 15,9	0,97
PP [‡] , mmHg	43,8 ± 13,1	43,7 ± 14,7	43,5 ± 12,9	0,97

Rigidez Arterial (VOP > 9.5 m/s); Hipertensos (PAS ≥ 140 ou PAD ≥ 90 ou uso de fármaco hipotensor); PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PP, pressão de pulso; VOP, velocidade de onda de pulso.

‡ valor corrigido para idade, sexo, etnia.

† valor corrigido para PAM, etnia e idade.

3.7 Análise da Estimativa do Risco para Rigidez Arterial

A estimativa do risco para o fenótipo de rigidez arterial foi baseado na hipótese proposta para cada variante genética. Sendo assim, foi estimado o risco para o genótipo GG do polimorfismo A855G da *MMP-9*, genótipo TT do polimorfismo C242T da *p22phox*, alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP*, genótipo DD do polimorfismo I/D da *ECA*, alelo ε4 do polimorfismo da *APOE* e genótipo AA do polimorfismo G1355A da *elastina* para o fenótipo de rigidez arterial (Tabela 15).

Tabela 15- Análise da estimativa do risco para o fenótipo de rigidez arterial.

Gene	Variante Genética	OR	95% IC	p
<i>MMP-9</i>	Genótipo GG vs Alelo A (AA+GA)	1,01	0,70 - 1,46	0,95
<i>p22phox</i>	Genótipo TT vs Alelo C (CC+TC)	1,93	1,27 - 2,92	0,002
<i>TXNIP</i>	Alelo G (CG+GG) vs Genótipo CC	1,19	0,92 - 1,52	0,19
<i>ECA</i>	Genótipo DD vs Alelo I (DI+II)	0,91	0,71 - 1,18	0,48
<i>APOE</i>	Alelo ε4 vs Alelos ε2+ε3	1,14	0,87 - 1,49	0,33
<i>ELN</i>	Genótipo AA vs Alelo G (GA+GG)	0,81	0,56 - 1,18	0,28

OR:odds ratio, 95% IC: intervalo de confiança 95%

Todos os valores foram ajustados para idade, PAM e etnia

Considerando todas as variantes genéticas supracitadas, somente o genótipo TT do polimorfismo C242T da *p22phox* (OR = 1,93, 95% IC = 1,27 - 2,92) apresentou um elevado risco para rigidez arterial. Os polimorfismos do gene da *ECA* (OR = 0,91, 95% IC = 0,71 - 1,18), *TXNIP* (OR = 1,19, 95% IC = 0,92 - 1,52), *APOE* (OR = 1,14, 95% IC = 0,87 - 1,49), *MMP-9* (OR = 1,01, 95% IC = 0,70 - 1,46) e *elastina* (OR = 0,81, 95% IC = 0,56 - 1,18) não apresentaram risco significativo para o presente fenótipo (Tabela 15).

4.0. DISCUSSÃO

O processo de enrijecimento dos grandes vasos é influenciado por fatores ambientais e genéticos. Com base nessa perspectiva, o presente estudo objetivou investigar o impacto de algumas variantes genéticas, cujas proteínas sintetizadas pudessem ter um papel protagonista na fisiopatologia vascular. Finalmente, considerando os resultados apresentados na sessão anterior, segue abaixo a discussão estratificada para os seguintes marcadores: C242T da subunidade *p22phox*; G1036C da *TXNIP*; C609T/T471C da *APOE*; G1355A da *elastina*; I/D da *ECA*; A855G da *MMP-9*.

4.1 Polimorfismo C242T da Subunidade *p22phox*

No presente estudo, o polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase se mostrou associado ao fenótipo de rigidez arterial, na qual o genótipo TT associou-se a maiores valores da VOP, frequência de rigidez arterial mais acentuada e maior risco para tal fenótipo.

Corroborando com a nossa hipótese, Shimo-Nakanishi et al.⁶¹ demonstraram a associação do alelo T do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* com maior atividade da NADPH oxidase, o que poderia sugerir uma elevada produção de EROs nos portadores desse alelo. Além disso, Castejón et al.⁸² reportaram menores níveis de metabólitos de óxido nítrico (NO) em indivíduos portadores do genótipo TT, o que os fez concluir que o aumento da produção de EROs, dependente da NADPH oxidase, poderia afetar a biodisponibilidade de NO. Adicionalmente, Kals et al.⁸³ demonstraram a relação

entre o alto grau de estresse oxidativo e rigidez arterial elevada. Finalmente, considerando o risco para rigidez arterial, Kuznetsova et al.⁸⁴ reportaram a associação do alelo T do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* com o elevado risco para modificações patológicas em artéria carótida (OR=1,70; p=0,04). Embora o presente estudo não tenha mensurado a atividade da NADPH oxidase e os níveis de EROs, os nossos achados poderiam ser explicados, pelo menos em parte, pelos estudos supracitados.

Em contrapartida aos estudos apresentados anteriormente, inúmeras investigações falharam em demonstrar tal associação. Além disso, alguns trabalhos reportaram o efeito protetor do alelo T do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* para doenças cardiovasculares⁸⁵⁻⁹¹. Objetivando esclarecer essas controvérsias, Fang et al.⁹², em recente meta-análise, investigaram 15 estudos envolvendo 11.318 indivíduos casos e controles para doença arterial coronária. Por meio dessa investigação, ficou concluído que o alelo T do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* tinha um significativo efeito protetor na população asiática. No entanto, os resultados não foram replicados para populações caucasianas, o que sugere uma heterogeneidade na modulação fenotípica entre os grupos étnicos.

O método da VOP é amplamente aceito e validado para acessar o risco cardiovascular por meio da distensibilidade e rigidez arterial. No presente estudo, foram demonstradas diferenças significantes tanto nos dados contínuos, como nos categóricos, referentes ao fenótipo de rigidez arterial. Conhecidamente, o processo de enrijecimento vascular pode ser influenciado por diversos fatores, como idade, gênero, pressão sanguínea e etnia⁹³⁻⁹⁶. Contudo, cabe ressaltar que

nossas análises permaneceram significantes após os ajustes para as possíveis variáveis de confusão.

Nossos dados e alguns outros estudos reportaram a existência de significativa contribuição genética no fenótipo de rigidez arterial. Entretanto, ainda não se sabe a via de sinalização associada a esse fenótipo de natureza poligênica^{55, 97-99}. Contudo, diante desse cenário, nossa investigação encoraja novos estudos de replicação e, acima de tudo, evidencia que o polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* da NADPH oxidase pode ter um papel importante no desenvolvimento da rigidez arterial.

4.2 Polimorfismo G1036C da *TXNIP*

No presente estudo, o polimorfismo G1036C da *TXNIP* se mostrou associado às variáveis relacionadas ao metabolismo da glicose e rigidez arterial. Os indivíduos portadores do alelo G apresentaram maiores valores de glicose de jejum e VOP quando comparados ao grupo CC. Além disso, o grupo CG+GG apresentou maiores frequências de diabéticos e hipertensos.

Corroborando com a nossa hipótese, alguns estudos funcionais vêm demonstrando o importante papel da proteína *TXNIP* na regulação e sinalização do estado redox, visto que sua interação com o sistema TRX pode ativar várias moléculas de sinalização celular envolvidas na fisiologia vascular e no metabolismo da glicose^{64, 100}. Além disso, Minn et al.¹⁰¹, estudando cultura de células β de ratos diabéticos, demonstraram que a expressão de *TXNIP* encontrava-se aumentada, fato que estava intimamente associado a apoptose de células β nesses animais. No sistema vascular, Yamawaki et al.¹⁰², usando tecido

de aorta, reportaram que a expressão da TXNIP encontrava-se diminuída nas regiões onde a força de cisalhamento do sangue eram maiores. Levando em consideração que a TXNIP é uma proteína inibidora do sistema TRX e que o mesmo tem um papel fundamental na redução da apoptose e estresse oxidativo⁶³, podemos hipotetizar que níveis elevados de TXNIP poderiam culminar no desbalanço de sistemas relacionados a fisiologia vascular e ao metabolismo da glicose.

Em relação à parte genética, estudos focando a associação de variantes genéticas do gene da *TXNIP* com fenótipos vasculares ainda permanecem ausentes na literatura. Entretanto, Ferreira et al.⁶⁵, estudando artérias mamárias humanas, demonstraram que o alelo G (grupo CG) do polimorfismo G1036C da *TXNIP* estava associado a uma maior expressão gênica do gene da *TXNIP*. Dessa forma, os dados do presente estudo nos remete a pensar que a associação do grupo CG+GG do polimorfismo da *TXNIP* com maiores valores da VOP, frequência aumentada de hipertensão e diabetes e maiores níveis de glicose de jejum são resultados de um incremento na apoptose de células β e um possível desbalanço no sistema redox. Entretanto, cabe ressaltar que, por se tratar de fenótipos poligênicos, não se pode descartar a influência de outros genes.

Com a finalidade de avaliar a rigidez arterial tem sido utilizado o método da VOP, que recentemente, se mostrou ferramenta importante para predizer o risco cardiovascular. Contudo, sabe-se que o processo de enrijecimento dos grandes vasos é influenciado por diversos fatores, como idade, gênero, pressão sanguínea

e etnia⁹³⁻⁹⁶. No presente estudo, as variáveis referentes à VOP e à glicose de jejum foram devidamente ajustadas para os potenciais fatores de confusão.

Considerando o caráter poligênico dos fenótipos cardiometabólicos, torna-se necessário a realização de novos estudos de replicação, a fim de esclarecer as possíveis vias implicadas na fisiopatologia de doenças afins. Finalmente, o presente estudo traz evidências de que o polimorfismo G1036C da TXNIP pode ter um papel importante no desenvolvimento do diabetes e da rigidez arterial.

4.3 Polimorfismo C609T/T471C da *APOE*

No presente estudo, o polimorfismo C609T/T471C da *APOE* se mostrou associado ao perfil lipídico e aos níveis de ácido úrico. Os indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentaram maiores valores de LDL-c, colesterol total, taxa colesterol total/HDL-c, taxa LDL-c/HDL-c, ácido úrico e menores níveis de HDL-c. Entretanto, a variante genética da *APOE* não se mostrou associada ao fenótipo de rigidez arterial.

Corroborando com nossos achados, Medina-Urrutia et al.⁶⁹, estudando adolescentes mexicanos, demonstraram a associação do alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* com elevadas concentrações de colesterol total, LDL-c e menores níveis de HDL-c quando comparado aos portadores do alelo $\epsilon 2$. De forma semelhante, Shu Liang et al.¹⁰³, estudando 168 indivíduos chineses saudáveis, demonstraram a associação do alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* com maiores valores de colesterol total e LDL-c. Entretanto, o HDL-c não se mostrou associado a variante genética da *APOE*. Focando estudos realizados com a população brasileira, de-Andrade et al.¹⁰⁴ descreveram a associação do

alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* com maiores valores de triglicérides e colesterol não HDL somente em mulheres. Finalmente, embora grande parte dos estudos demonstrem associação do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* com o perfil lipídico e outros fatores de risco cardiovasculares^{105, 106}, alguns trabalhos falharam em demonstrar tal associação^{107, 108}.

Os resultados referentes à associação do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* com o perfil lipídico podem ser explicados por meio de alguns estudos funcionais. Miettinen et al.¹⁰⁹, estudando metabolismo lipídico durante dieta normal, demonstraram significativo aumento da absorção de colesterol em indivíduos portadores dos alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ quando comparados ao alelo $\epsilon 2$. Além disso, Weintraub et al.¹¹⁰ demonstraram que os indivíduos portadores dos alelos $\epsilon 2/\epsilon 3$, quando submetidos a dieta hiperlipídica, apresentaram um *clearance* hepático mais lento, o que poderia resultar em um aumento da expressão de receptores de LDL-c e subsequente diminuição dos níveis de LDL-c no plasma.

Conhecidamente, a hiperuricemia tem um importante papel no desenvolvimento das doenças cardiometabólicas¹¹¹. No presente estudo, o alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* se mostrou associado a maiores níveis de ácido úrico quando comparado ao alelo $\epsilon 2$. Diferentemente dos nossos achados, Liberopoulos et al.¹¹², estudando indivíduos saudáveis, demonstraram a associação do alelo $\epsilon 4$ com menores níveis de ácido úrico quando comparado ao alelo $\epsilon 2$. No entanto, de forma similar ao nosso estudo, os indivíduos portadores do alelo $\epsilon 2$ apresentaram menores valores de colesterol total quando comparado ao alelo $\epsilon 4$. Fisiologicamente, um dos mecanismos que poderiam explicar nossos achados seria a hiperinsulinemia, secundária ao perfil lipídico desfavorável,

apresentada pelos portadores do alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE*. Quinones et al.¹¹³ demonstraram que a insulina diminui a absorção do ácido úrico no trato urinário tubular. Sendo assim, pode-se hipotetizar que a hiperinsulinemia secundária à dislipidemia poderia reduzir agudamente a excreção de ácido úrico pela urina e culminar na elevação dessa proteína na corrente sanguínea. Contudo, devido às controvérsias apresentadas pelos trabalhos acima, novos estudos focando o papel do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* no metabolismo do ácido úrico se fazem necessários.

O fenótipo de rigidez arterial tem sido amplamente associado ao perfil metabólico¹¹⁴. Objetivando esclarecer os mecanismos fisiológicos determinantes para tal associação, Vogel et al.¹¹⁵ demonstraram que a relação do perfil lipídico desfavorável com a menor complacência arterial poderia ser explicada pela menor disponibilidade de NO apresentada pelos indivíduos dislipidêmicos. Dessa forma, nós esperávamos que os indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* apresentassem maior rigidez arterial quando comparados aos portadores do alelo $\epsilon 2$. Entretanto, nossa hipótese não foi confirmada e uma das possíveis explicações para o presente fato é a pequena diferença clínica do perfil lipídico dentro dos grupos alélicos e a baixa média de idade apresentada pelos participantes do estudo.

O método da VOP, enquanto importante ferramenta na predição do risco cardiovascular, é usado de forma ampla na avaliação da rigidez arterial. Sabe-se que o processo de enrijecimento dos grandes vasos sofre influência de diversos fatores, como idade, gênero, pressão sanguínea e etnia⁹³⁻⁹⁶. Portanto, neste

estudo, ajustamos as variáveis referentes ao perfil lipídico e à VOP para os potenciais fatores de confusão.

A presente investigação traz evidências de que o polimorfismo C609T/T471C da *APOE* tem um papel importante no metabolismo lipídico. Entretanto, a variante genética da *APOE* não se mostrou associada ao fenótipo de rigidez arterial. Finalmente, tendo em vista o número inexpressivo de trabalhos avaliando o impacto do polimorfismo C609T/T471C da *APOE* no fenótipo de rigidez arterial, e as possíveis limitações do presente estudo, tornam-se necessárias novas investigações objetivando ratificar os dados aqui apresentados.

4.4 Polimorfismo G1355A da *Elastina*

Contrariando a hipótese proposta anteriormente, o polimorfismo G1355A da *elastina* não se mostrou associado ao fenótipo de rigidez arterial em uma população geral brasileira.

A elastina é o principal componente do complexo de fibras elásticas presente na camada média dos grandes vasos e tem sido postulada como uma das mais importantes proteínas relacionadas à distensibilidade arterial¹¹⁶. De maneira simplificada e objetiva, alguns autores vêm propondo que a modulação do fenótipo de rigidez arterial é mediada pelo fino balanço entre a produção e degradação de elastina e colágeno²¹. O desbalanço do presente sistema pode ser consequência de diversos fatores como envelhecimento, diabetes, aterosclerose, hipertensão e doença renal crônica²⁰. Além disso, estudos vêm demonstrando o

impacto de fatores genéticos no processo de enrijecimento arterial em diversas populações^{46, 48-50, 52}.

Em contrapartida ao importante papel da elastina na distensibilidade arterial, poucos estudos investigaram a possível influência de variantes genéticas do gene da *elastina* com fenótipos associados à rigidez arterial^{54, 74}. Em um dos raros estudos populacionais, Iwai et al.⁵⁴, estudando 3.654 indivíduos da população japonesa, demonstraram a associação do alelo A do polimorfismo (-/A) da *elastina* com maiores valores da VOP. Adicionalmente, Deng et al.¹¹⁷, estudando indivíduos chineses hipertensos e controles, demonstraram que o alelo A do polimorfismo G1355A da *elastina* apresentava maior frequência de indivíduos hipertensos quando comparado ao grupo controle. Além disso, o alelo A se mostrou associado a maiores valores da VOP radial-tornozelo. Corroborando parcialmente com os dados apresentados acima, Hanon et al.⁷¹, estudando 320 indivíduos com idade superior a 50 anos e sem evidências de doenças cardiovasculares, demonstraram que o alelo A do polimorfismo G1355A da *elastina* estava associado a menor distensibilidade da artéria carótida. Diferentemente dos resultados apresentados anteriormente, o presente estudo falhou em demonstrar a associação do polimorfismo G1355A da *elastina* com o fenótipo de rigidez arterial, avaliado pela VOP carótida-femural. Grande parte das divergências entre os resultados aqui apresentados podem ser decorrentes das diferenças metodológicas referentes à população estudada, média de idade dos participantes, métodos de avaliação da rigidez arterial e variante genética investigada. Visto isso, podemos afirmar que essas peculiaridades metodológicas, inerentes a cada estudo, certamente dificultam bastante uma possível conclusão

a cerca do impacto do polimorfismo G1355A da *elastina* no fenótipo de rigidez arterial.

O processo de enrijecimentos dos grandes vasos é influenciado por fatores diversos, incluindo idade, gênero, pressão sanguínea e etnia⁹³⁻⁹⁶. Contudo, cabe ressaltar que nossas análises permaneceram significantes após os ajustes para as possíveis variáveis de confusão.

O presente estudo não demonstrou evidências da possível associação do polimorfismo G1355A da *elastina* com o fenótipo de rigidez arterial. Novos estudos se fazem necessários para que tenhamos um parecer mais consistente sobre o tema, uma vez que os já realizados utilizam diferentes metodologias, tornando difíceis conclusões referentes ao real impacto do polimorfismo G1355A da *elastina* no fenótipo de rigidez arterial.

4.5 Polimorfismo I/D da ECA

Contrariando a hipótese proposta anteriormente, o polimorfismo I/D da ECA não se mostrou associado ao fenótipo de rigidez arterial em uma população geral brasileira.

O SRAA é um importante regulador das funções cardiovasculares e renais¹¹⁸. Simplificadamente, a cascata de ativação se dá por meio da conversão da angiotensina I (Ang-I), catalisada pela ECA, em Ang-II, cujas principais ações no sistema vascular são: mediação e proliferação de células de crescimento, catabolismo da bradicinina, redução da biodisponibilidade de NO, as quais resultam em disfunção endotelial^{119, 120}. Além disso, estudos funcionais vêm

demonstrando que a infusão de Ang-II em indivíduos saudáveis leva ao aumento da rigidez arterial⁷².

Considerando-se o importante papel da ECA no SRAA, inúmeros estudos abordando variantes genéticas da mesma vêm sendo realizados. Rigat et al.⁷³, associando o polimorfismo I/D da ECA com sua respectiva atividade enzimática, demonstraram que os indivíduos portadores do genótipo DD apresentaram maior atividade da ECA quando comparado aos seus pares. Sendo assim, pode-se hipotetizar que os portadores do genótipo DD apresentariam ações exacerbadas do SRAA no sistema cardiovascular. Corroborando com a hipótese acima, Ruiz et al.¹²¹, estudando pacientes diabéticos e ateroscleróticos, encontraram uma forte associação do genótipo DD do polimorfismo I/D da ECA com elevada prevalência de placas de ateroma. No que tange a rigidez arterial, Taniwaki et al.¹²², estudando pacientes portadores de diabetes tipo II, concluíram que o genótipo II do polimorfismo I/D da ECA estava associado a maiores valores da VOP. Semelhantemente, Benetos et al.⁴⁵, englobando indivíduos hipertensos e normotensos, demonstraram a associação do genótipo II do polimorfismo I/D da ECA com maiores valores da VOP em hipertensos. O presente estudo, entretanto, falhou em demonstrar a associação do polimorfismo I/D da ECA com o fenótipo de rigidez arterial. As divergências dos resultados apresentados podem ser decorrentes das diferenças metodológicas referentes à condição clínica e aos parâmetros étnicos das populações investigadas.

O método da VOP é amplamente utilizado na avaliação da rigidez arterial e recentemente tem sido uma ferramenta importante para predizer o risco cardiovascular. O processo de enrijecimento dos grandes vasos é influenciado por

fatores como idade, gênero, pressão sanguínea e etnia⁹³⁻⁹⁶. Ressalta-se, entretanto, que nossas análises permaneceram significantes após os ajustes para as possíveis variáveis de confusão.

Não foi possível evidenciar a associação do polimorfismo I/D da *ECA* com o fenótipo de rigidez arterial a partir de nosso estudo. Os trabalhos realizados até o momento trazem diferenças metodológicas, de modo a dificultar quaisquer conclusões referentes ao impacto do polimorfismo I/D da *ECA* no fenótipo de rigidez arterial. São necessários, portanto, novos estudos sobre o presente tema para que tenhamos conclusões mais fidedignas.

4.6 Polimorfismo A855G da *MMP-9*

Contrariando a hipótese proposta anteriormente, o polimorfismo A855G da *MMP-9* não se mostrou associado ao fenótipo de rigidez arterial em uma população geral brasileira.

As MMPs são uma família de enzimas especializadas na degradação de proteínas estruturais (elastina, colágeno e proteoglicanos), que integram a matriz extracelular¹²³. Dentre os vários componentes dessa família, destaca-se a *MMP-9*, que reconhecidamente apresenta um papel protagonista no processo de remodelamento vascular⁷⁵. Recentemente diversos estudos vêm demonstrando a associação dos níveis elevados de *MMP-9* circulante com hipertensão¹²⁴, diabetes¹²⁵, doença arterial periférica¹²⁶, doença arterial coronária¹²⁷ e rigidez arterial⁷⁶.

Levando em consideração o impacto da *MMP-9* na fisiopatologia cardiovascular e sua possível intervenção no processo de enrijecimento vascular,

alguns estudos vêm tentando estabelecer uma ligação entre variantes genéticas do gene da *MMP-9* e o fenótipo de rigidez arterial. Zhou et al.¹²⁴, estudando indivíduos hipertensos não tratados, demonstraram a associação do alelo T do polimorfismo C1562T da *MMP-9* com maiores valores da VOP. Em outra importante investigação, Yasmin et al.⁵⁵, estudando indivíduos saudáveis de ambos os gêneros, demonstraram a associação do alelo G do polimorfismo A855G da *MMP-9* com valores aumentados da VOP. Além disso, o genótipo GG se mostrou associado a elevados níveis circulantes de MMP-9 quando comparado aos seus pares. Corroborando parcialmente com o estudo supracitado, Blankenberg et al.¹²⁸, estudando 1127 pacientes com história de doença arterial coronária, demonstraram a associação do alelo G do polimorfismo A855G da *MMP-9* com maior risco de eventos cardiovasculares futuros. Diferentemente dos estudos apresentados anteriormente, a presente investigação falhou em demonstrar a associação do polimorfismo A855G da *MMP-9* com o fenótipo de rigidez arterial em uma população geral brasileira. Parte das divergências pode ser explicada pelas diferenças étnicas e epigenéticas existentes entre as populações estudadas. Adicionalmente, o critério de inclusão utilizado pelo presente estudo fez com que as características populacionais fossem distintas dos trabalhos supracitados e o insuficiente número de estudos não nos permite ter um posicionamento enfático sobre o tema.

Conforme citado anteriormente, o método da VOP, utilizado na avaliação da rigidez arterial, tem importância na predição do risco cardiovascular. Sabidamente, o processo de enrijecimento dos grandes vasos é influenciado por diversos fatores, como idade, gênero, pressão sanguínea e etnia⁹³⁻⁹⁶. Contudo,

cabe ressaltar que nossas análises permaneceram significantes após os ajustes para as possíveis variáveis de confusão.

A presente investigação falhou em prover evidências da possível associação do polimorfismo A855G da *MMP-9* com o fenótipo de rigidez arterial. Entretanto, as diferenças metodológicas apresentadas pelos trabalhos até agora realizados e o insuficiente número de estudos tornam difíceis quaisquer conclusões referentes ao impacto do polimorfismo A855G da *MMP-9* no fenótipo de rigidez arterial. Sendo assim, são necessários novos estudos para que tenhamos um parecer mais consistente sobre o presente tema.

5.0 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo envolvendo a associação de marcadores genéticos com o fenótipo de rigidez arterial em uma população geral brasileira nos permitiram as seguintes conclusões:

1- Em relação à variável contínua referente à VOP, os polimorfismos C242T da subunidade *p22phox* e G1036C da *TXNIP* se mostraram associados. Os indivíduos portadores do genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* e do alelo G do polimorfismo G1036C da *TXNIP* apresentaram maiores valores da VOP quando comparado aos seus pares.

2- Em relação à análise da estimativa do risco, somente o genótipo TT do polimorfismo C242T da subunidade *p22phox* apresentou um risco significativamente aumentado para o fenótipo de rigidez arterial.

6.0. REFERÊNCIAS

1. Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge: Harvard University Press; 1996.
2. Lopez AD. Assessing the burden of mortality from cardiovascular diseases. *World Health Stat Q* 1993; 46: 91-96.
3. OMS. 2008 [atualizado em 2008; acessado em 16/05/2011]; web URL: www.who.int/healthinfo/mortables/en/index.html.
4. Ministério da Saúde. 2001. [acessado em 28/04/2008]; web URL: www.ministeriodasaude/epidemio.html.
5. Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, Petersen S, Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J* 2006; 27: 1610-1619.
6. Thom T, Haase N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006; 113: 85-151.
7. American Heart Association. Heart and Stroke Statistics - 2003 Update. Dallas TX : American Heart Association; 2002.
8. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
9. Scuteri A, Najjar SS, Muller DC, et al. Metabolic syndrome amplifies the age-associated increases in vascular thickness and stiffness. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1388-1395.
10. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure--a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 975-984.
11. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 2003; 107: 139-146.
12. Collins AJ, Li S, Gilbertson DT, Liu J, Chen SC, Herzog CA. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int Suppl* 2003: S24-31.

13. Nichols WW, O'Rourke MF. McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles. 5^o ed. Edward Arnold Publishers: London; 1998.
14. Girerd X, Laurent S, Pannier B, Asmar R, Safar M. Arterial distensibility and left ventricular hypertrophy in patients with sustained essential hypertension. *Am Heart J* 1991; 122: 1210-1214.
15. Fukuda D, Yoshiyama M, Shimada K, et al. Relation between aortic stiffness and coronary flow reserve in patients with coronary artery disease. *Heart* 2006; 92: 759-762.
16. Leung MC, Meredith IT, Cameron JD. Aortic stiffness affects the coronary blood flow response to percutaneous coronary intervention. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 624-630.
17. O'Rourke MF. Basic concepts for the understanding of large arteries in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 Suppl 2: S14-21.
18. Van Bortel L. Focus on small artery stiffness. *J Hypertens* 2002; 20: 1707-1709.
19. Wolinsky H, Glagov S. Structural Basis for the Static Mechanical Properties of the Aortic Media. *Circ Res* 1964; 14: 400-413.
20. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 932-943.
21. Johnson CP, Baugh R, Wilson CA, Burns J. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 139-145.
22. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 554-566.
23. Pizzi O BAA, Magalhães M E C, Pozzan R, Brandão A P. Pulse wave velocity : methodology and prognostic implications in hypertension. *Rev Bras Hipertens* 2006; 13: 59-62.
24. Bortolotto LA. [Modifications of structural and functional properties of large arteries in diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51: 176-184.
25. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension* 1999; 33: 1111-1117.

26. London GM, Marchais SJ, Safar ME, et al. Aortic and large artery compliance in end-stage renal failure. *Kidney Int* 1990; 37: 137-142.
27. Toto-Moukoko JJ, Achimastos A, Asmar RG, Hugues CJ, Safar ME. Pulse wave velocity in patients with obesity and hypertension. *Am Heart J* 1986; 112: 136-140.
28. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 1318-1327.
29. Sakuragi S, Abhayaratna WP. Arterial stiffness: methods of measurement, physiologic determinants and prediction of cardiovascular outcomes. *Int J Cardiol* 2010; 138: 112-118.
30. Gates PE, Tanaka H, Hiatt WR, Seals DR. Dietary sodium restriction rapidly improves large elastic artery compliance in older adults with systolic hypertension. *Hypertension* 2004; 44: 35-41.
31. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 2000; 102: 1270-1275.
32. Jatoi NA, Jerrard-Dunne P, Feely J, Mahmud A. Impact of smoking and smoking cessation on arterial stiffness and aortic wave reflection in hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 981-985.
33. Sierksma A, Lebrun CE, van der Schouw YT, et al. Alcohol consumption in relation to aortic stiffness and aortic wave reflections: a cross-sectional study in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 342-348.
34. Nestel P, Shige H, Pomeroy S, Cehun M, Abbey M, Raederstorff D. The n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 326-330.
35. Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ. Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1066-1071.
36. Mahmud A, Feely J. Antihypertensive drugs and arterial stiffness. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003; 1: 65-78.
37. Morgan T, Lauri J, Bertram D, Anderson A. Effect of different antihypertensive drug classes on central aortic pressure. *Am J Hypertens* 2004; 17: 118-123.

38. Kim JH, Oh SJ, Lee JM, et al. The effect of an Angiotensin receptor blocker on arterial stiffness in type 2 diabetes mellitus patients with hypertension. *Diabetes Metab J*; 35: 236-242.
39. Camp NJ, Hopkins PN, Hasstedt SJ, et al. Genome-wide multipoint parametric linkage analysis of pulse pressure in large, extended utah pedigrees. *Hypertension* 2003; 42: 322-328.
40. DeStefano AL, Larson MG, Mitchell GF, et al. Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 44: 152-155.
41. Atwood LD, Samollow PB, Hixson JE, Stern MP, MacCluer JW. Genome-wide linkage analysis of pulse pressure in Mexican Americans. *Hypertension* 2001; 37: 425-428.
42. Levy D, Larson MG, Benjamin EJ, et al. Framingham Heart Study 100K Project: genome-wide associations for blood pressure and arterial stiffness. *BMC Med Genet* 2007; 8 Suppl 1: S3.
43. Turner ST, Fornage M, Jack CR, Jr., et al. Genomic susceptibility loci for brain atrophy in hypertensive sibships from the GENOA study. *Hypertension* 2005; 45: 793-798.
44. Mitchell GF, DeStefano AL, Larson MG, et al. Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection, and mean arterial pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005; 112: 194-199.
45. Benetos A, Gautier S, Ricard S, et al. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 698-703.
46. Bozec E, Lacolley P, Bergaya S, et al. Arterial stiffness and angiotensinogen gene in hypertensive patients and mutant mice. *J Hypertens* 2004; 22: 1299-1307.
47. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium* 2006; 13: 423-429.
48. Mitchell GF, Guo CY, Kathiresan S, et al. Vascular stiffness and genetic variation at the endothelial nitric oxide synthase locus: the Framingham Heart study. *Hypertension* 2007; 49: 1285-1290.
49. Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 1998; 16: 31-35.

50. Lajemi M, Gautier S, Poirier O, et al. Endothelin gene variants and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensives. *Am J Hypertens* 2001; 14: 755-760.
51. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
52. Cheung YF, Huang GY, Chen SB, et al. Inflammatory gene polymorphisms and susceptibility to kawasaki disease and its arterial sequelae. *Pediatrics* 2008; 122: e608-614.
53. Zhu H, Yan W, Tan Y, et al. Adhesion molecule polymorphisms and pulse wave velocity in American youth. *Twin Res Hum Genet* 2008; 11: 517-523.
54. Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, Tomoike H. Extensive genetic analysis of 10 candidate genes for hypertension in Japanese. *Hypertension* 2006; 48: 901-907.
55. Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, et al. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1799-1805.
56. Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Diez J, Zalba G. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol* 2005; 90: 457-462.
57. Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 21-28.
58. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 691-728.
59. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 274-278.
60. Genius J, Grau AJ, Lichy C. The C242T polymorphism of the NAD(P)H oxidase p22phox subunit is associated with an enhanced risk for cerebrovascular disease at a young age. *Cerebrovasc Dis* 2008; 26: 430-433.
61. Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A, et al. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis* 2004; 175: 109-115.

62. Pereira AC. Estudo do polimorfismo genético C242T no gene da p22phox e a incidência de eventos cardiovasculares na doença arterial coronária [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
63. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-1312.
64. World CJ, Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84: 997-1003.
65. Ferreira NE, Omae S, Pereira A, et al. Thioredoxin interacting protein genetic variation is associated with diabetes and hypertension in the Brazilian general population. *Atherosclerosis* 2011; 22 de dezembro [Epub ahead of print].
66. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25: 1277-1294.
67. Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 578-581.
68. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
69. Medina-Urrutia AX, Cardoso-Saldana GC, Zamora-Gonzalez J, Liria YK, Posadas-Romero C. Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoproteins in Mexican adolescents. *Hum Biol* 2004; 76: 605-614.
70. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-1255.
71. Hanon O, Luong V, Mourad JJ, Bortolotto LA, Jeunemaitre X, Girerd X. Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans. *Hypertension* 2001; 38: 1185-1189.
72. Rehman A, Rahman AR, Rasool AH, Naing NN. The effects of angiotensin II on pulse wave velocity in healthy humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001; 39: 423-430.
73. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.

74. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 851-859.
75. Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000; 102: 2861-2866.
76. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 372.
77. Bisi Molina Mdel C, Cunha Rde S, Herkenhoff LF, Mill JG. [Hypertension and salt intake in an urban population]. *Rev Saude Publica* 2003; 37: 743-750.
78. Lessa I, Fonseca J. [Race, compliance to treatment and/or consultation and control of arterial hypertension]. *Arq Bras Cardiol* 1997; 68: 443-449.
79. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894: i-xii, 1-253.
80. Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis* 2006; 184: 193-200.
81. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995; 26: 485-490.
82. Castejon AM, Bracero J, Hoffmann IS, Alfieri AB, Cubeddu LX. NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 772-779.
83. Kals J, Kampus P, Kals M, et al. Inflammation and oxidative stress are associated differently with endothelial function and arterial stiffness in healthy subjects and in patients with atherosclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 594-601.
84. Kuznetsova T, Gavrilov DV, Samokhodskaja LM, Postnov A, Boitsov SA. [Influence of genetic factors on the development of target organ lesions in relation to age in diagnosis of arterial hypertension]. *Ter Arkh* 2010; 82: 30-37.

85. Di Castelnuovo A, Soccio M, Iacoviello L, et al. The C242T polymorphism of the p22phox component of NAD(P)H oxidase and vascular risk. Two case-control studies and a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 594-601.
86. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, et al. Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 458-463.
87. He MA, Cheng LX, Jiang CZ, et al. Associations of polymorphism of P22(phox) C242T, plasma levels of vitamin E, and smoking with coronary heart disease in China. *Am Heart J* 2007; 153: 641-646.
88. Katakami N, Kaneto H, Matsuoka TA, et al. Accumulation of gene polymorphisms related to oxidative stress is associated with myocardial infarction in Japanese type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2010; 212: 534-538.
89. Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, et al. Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27: 303-307.
90. Tang FY, Zhu Y, Wang GH, Xie XW. Relation between development of cardiovascular disease and the C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase in ESRD patients. *Dis Markers* 2010; 29: 89-93.
91. Xaplanteris P, Vlachopoulos C, Baou K, et al. The effect of p22(phox) - 930A/G, A640G and C242T polymorphisms of NADPH oxidase on peripheral and central pressures in healthy, normotensive individuals. *Hypertens Res* 2010; 33: 814-818.
92. Fang S, Wang L, Jia C. Association of p22phox gene C242T polymorphism with coronary artery disease: a meta-analysis. *Thromb Res* 2010; 125: e197-201.
93. Gunarathne A, Patel JV, Gammon B, Hughes EA, Lip GY. Impact of mean arterial blood pressure on higher arterial stiffness indices in South Asians compared to white Europeans. *J Hypertens* 2008; 26: 1420-1426.
94. Hlaing WM, Koutoubi S, Huffman FG. Differences in arterial stiffness and its correlates in tri-ethnic young men and women. *Ethn Dis* 2006; 16: 837-843.
95. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, et al. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 43: 1239-1245.
96. Santos PC, Alvim Rde O, Ferreira NE, et al. Ethnicity and arterial stiffness in Brazil. *Am J Hypertens* 2010; 24: 278-284.

97. Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS. Beta-adrenergic receptor genes are associated with arterial stiffness in black and white adults: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens* 2007; 20: 1251-1257.
98. Iemitsu M, Murakami H, Sanada K, et al. Lack of carotid stiffening associated with MTHFR 677TT genotype in cardiorespiratory fit adults. *Physiol Genomics* 2010; 42: 259-265.
99. Lacolley P, Challande P, Osborne-Pellegrin M, Regnault V. Genetics and pathophysiology of arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 2009; 81: 637-648.
100. Mochizuki M, Kwon YW, Yodoi J, Masutani H. Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-cyclin D1 pathway. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2957-2971.
101. Minn AH, Hafele C, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 2005; 146: 2397-2405.
102. Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 149-153.
103. Liang S, Pan M, Geng HH, et al. Apolipoprotein E polymorphism in normal Han Chinese population: frequency and effect on lipid parameters. *Mol Biol Rep* 2009; 36: 1251-1256.
104. de-Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 529-537.
105. Saidi S, Slamia LB, Ammou SB, Mahjoub T, Almawi WY. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with ischemic stroke involving large-vessel disease and its relation to serum lipid levels. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2007; 16: 160-166.
106. Kumar P, Luthra K, Dwivedi M, Behl VK, Pandey RM, Misra A. Apolipoprotein E gene polymorphisms in patients with premature myocardial infarction: a case-controlled study in Asian Indians in North India. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 382-387.
107. Pitsavos C, Choumerianou DM, Skoumas J, et al. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with lipid levels and coronary artery disease in Greek patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Exp Med* 2005; 5: 196-201.

108. Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Mussel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005; 4: 691-703.
109. Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H, Ollus A. Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1044-1052.
110. Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987; 80: 1571-1577.
111. Li NF, Wang HM, Yang J, Zhou L, Yao XG, Hong J. Serum uric acid is associated with metabolic risk factors for cardiovascular disease in the Uyghur population. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009; 34: 1032-1039.
112. Liberopoulos EN, Miltiadows GA, Athyros VG, et al. Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum uric acid levels in healthy subjects. *J Investig Med* 2005; 53: 116-122.
113. Quinones Galvan A, Natali A, Baldi S, et al. Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol* 1995; 268: E1-5.
114. Pannier BM, Cambillau MS, Vellaud V, Atger V, Moatti N, Safar ME. Abnormalities of lipid metabolism and arterial rigidity in young subjects with borderline hypertension. *Clin Invest Med* 1994; 17: 42-51.
115. Vogel RA, Corretti MC, Gellman J. Cholesterol, cholesterol lowering, and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 41: 117-136.
116. Nichols WW, O'Rourke MF. McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles. 3^o ed. Edward Arnold Publishers: London; 1990.
117. Deng L, Huang R, Chen Z, Wu L, Xu DL. A study on polymorphisms of elastin gene in Chinese Han patients with isolated systolic hypertension. *Am J Hypertens* 2009; 22: 656-662.
118. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007; 369: 1208-1219.
119. Arcaro G, Solini A, Monauni T, et al. ACE genotype and endothelium-dependent vasodilation of conduit arteries and forearm microcirculation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1313-1319.

120. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res* 2006; 98: 1123-1133.
121. Ruiz J, Blanche H, Cohen N, et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3662-3665.
122. Taniwaki H, Kawagishi T, Emoto M, et al. Association of ACE gene polymorphism with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1858-1864.
123. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90: 520-530.
124. Zhou S, Feely J, Spiers JP, Mahmud A. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 861-867.
125. Maxwell PR, Timms PM, Chandran S, Gordon D. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2001; 18: 777-780.
126. Tayebjee MH, Tan KT, MacFadyen RJ, Lip GY. Abnormal circulating levels of metalloprotease 9 and its tissue inhibitor 1 in angiographically proven peripheral arterial disease: relationship to disease severity. *J Intern Med* 2005; 257: 110-116.
127. Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005; 96: 339-345.
128. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-1585.