

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ABEL BARBOSA LIRA NETO

Prevalência do polimorfismo G894T do gene da óxido nítrico sintase endotelial e sua associação com hipertensão arterial sistêmica: estudo de base populacional em mulheres do Nordeste Brasileiro

MACEIÓ
2017

ABEL BARBOSA LIRA NETO

Prevalência do polimorfismo G894T do gene da óxido nítrico sintase endotelial e sua associação com hipertensão arterial sistêmica: estudo de base populacional em mulheres do Nordeste Brasileiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Haroldo da Silva Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade

MACEIÓ

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

L768p Lira Neto, Abel Barbosa.
Prevalência do polimorfismo G894T do gene da óxido nítrico sintase endotelial e sua associação com hipertensão arterial : estudo de base populacional em mulheres do estado de Alagoas / Fabiana Andréa Moura. – 2018.
51 f. : il.

Orientador: Haroldo da Silva Ferreira.

Coorientador: Tiago Gomes de Andrade.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 34-41.

Apêndices: f. 42-46.

Anexos: f. 47-51.

1. Óxido nítrico sintase. 3. Hipertensão arterial sistêmica. 4. Polimorfismo (Genética).
I. Título.

CDU: 616.12-008.331.1



Folha de Aprovação

Abel Barbosa Lira Neto

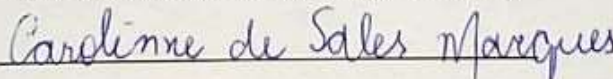
Prevalência do polimorfismo G894T para o gene da oxido nítrico sintase endotelial e sua associação com a hipertensão arterial sistêmica: estudo de base populacional em mulheres do Nordeste Brasileiro

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 07 de dezembro de 2017.


Banca Examinadora



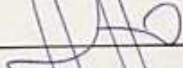
Prof. Dr. Haroldo da Silva Ferreira (Orientador)



Profa. Dra. Carolinne de Sales Marques - (UFAL)



Prof. Dr. Jose Claudio da Silva - (UNCISAL)



Prof. Dr. Jonnas Augusto Cardoso da Silveira - (UFAL)

AGRADECIMENTOS

Chegado ao final de mais uma etapa importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização desse trabalho.

À Deus, por me sustentar nos momentos difíceis. Agradeço também pelo dom da vida e do trabalho onde com sabedoria e discernimento me instrumentalizou para cumprir as lutas com responsabilidade.

A minha mãe Estela, por ser uma mãe gigantesca, que quando se viu viúva e mãe de quatro filhos soube educar e formar.

A minha esposa Luana, companheira e o amor de minha vida, pessoa mais doce que já conheci. Muito obrigado por ter segurado a barra em minhas ausências!

E com a mesma importância e grandeza do amor que nos une, aos nossos filhos: Gabriel e Arthur, nossos tesouros.

A minha tia Neriza por ser uma segunda mãe sempre presente nos momentos difíceis e também nos momentos de alegria

Aos meus irmãos de sangue e coração André, Alexandre e Luciana pelo incentivo e companheirismo nesta jornada, como também aos meus cunhados Lucas e Guilherme.

A minha sogra Luciene e meu sogro Gilvan o meu muito obrigado por tudo!

Aos que já não estão mais presentes, Meu Pai Paulo, Minha Tia Salete, Minha Vó e meu grande amigo Denílson sei que vocês estão em outro plano, mandando boas energias e cuidando da gente por aqui.

Ao Professor Haroldo, que acreditou neste aluno que já não tem a mesma idade que seus alunos de graduação. Muito obrigado pela sua atenção, compreensão, disposição na orientação desta dissertação e na transmissão de seus conhecimentos. PS: Não é uma despedida. Se possível quero que o senhor me oriente para o doutorado!!!

A professora Mônica que sempre foi muito atenciosa e prestativa!

Por fim aos meus companheiros de LNBA, em especial a Andressa, Antônio, Laise, Myrla, Regina e Riquelane muito obrigado pela ajuda e compreensão amo vocês!!!

Finalmente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Agradeço também à UFAL por ser literalmente a minha segunda casa e as agências de fomento CAPES, FAPEAL e CNPq.

Epígrafe

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece”
(Benjamin Disraeli)

Resumo

Introdução: A hipertensão é uma das doenças mais prevalentes no mundo e responsável por milhões de mortes anuais. A redução na concentração de óxido nítrico, produzido sob catálise da oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tem sido associada a maiores níveis pressóricos. Essa redução pode ser influenciada por polimorfismos genéticos. Este estudo objetivou investigar a prevalência do polimorfismo G894T do gene da eNOS em mulheres do Nordeste Brasileiro e sua associação com a hipertensão.

Metodos e Resultados : Trata-se de um estudo transversal com amostra probabilística de 810 mulheres (20 a 49 anos). Foram coletados dados sociodemográficos, de saúde, antropométricos e de pressão arterial (PA). A hipertensão foi admitida segundo os seguintes critérios (mmHg): pressão sistólica ≥ 140 e/ou pressão diastólica ≥ 90 e/ou uso regular de anti-hipertensivos. Foram obtidas células epiteliais da mucosa da bochecha para extração do DNA. A genotipagem foi realizada por PCR *em tempo real*. A medida de associação foi a razão de prevalência (RP) e seu IC95%, calculados por regressão de Poisson. As frequências dos genótipos GG, GT e TT foram, respectivamente: 57,1%, 35,7% e 7,2%. Para cada um desses genótipos, as prevalências de hipertensão foram 17,9%, 23,6% e 34,4%, respectivamente. Em relação ao genótipo GG, as RPs ajustadas para fatores de confundimento foram 1,24 (IC95%=0,95-1,61; p=0,11) para GT e 1,76 (IC95%=1,16-2,67; p<0,01) para TT.

Conclusão: Mulheres com o alelo T são mais susceptíveis à hipertensão, possivelmente como consequência de menor produção metabólica de óxido nítrico. Estes achados evidenciam a necessidade de maior atenção na prevenção da hipertensão em indivíduos com esse padrão genético.

Palavras Chave: Oxido Nítrico; Óxido Nítrico Sintase; Hipertensão Arterial Sistêmica.

Abstract

Background: Hypertension is one of the most prevalent diseases in the world, accounting for millions of deaths each year. The reduction in the concentration of nitric oxide (NO) produced by the catalysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is associated with higher blood pressure (BP) levels. This reduction might be because of genetic polymorphisms. This study investigated the prevalence of the eNOS gene G894T polymorphism in women from northeast Brazil and its association with hypertension.

Methods: This cross-sectional study included 810 women (aged 20-49 years). Sociodemographic, health, anthropometric, and BP data were collected. Hypertension was defined according to the following criteria: systolic BP \geq 140 mmHg, diastolic BP \geq 90 mmHg, the regular use of antihypertensive medication, or some combination therein. Epithelial cells from the cheek mucosa were obtained for DNA extraction. Genotyping was performed via real-time PCR. The measure of association was the prevalence ratio (PR) and its 95% CI as calculated via Poisson regression.

Results: The frequencies of the GG, GT, and TT genotypes were 57.1%, 35.7%, and 7.2%, respectively. For each of these genotypes, the prevalence of hypertension in women was 17.9%, 23.6%, and 34.4%, respectively. Relative to the GG genotype, the PRs after adjusting for confounds were 1.24 (95%CI=0.95-1.61, p=0.11) for GT and 1.76 (95%CI=1.16-2.67, p<0.01) for TT.

Conclusions: Women with the T allele are more susceptible to hypertension, possibly as a consequence of the lower metabolic production of NO. These findings highlight the need for greater care in the prevention of hypertension among individuals with this genetic polymorphism.

Keywords: Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Hypertension.

Lista de Ilustrações

FIGURA 1: ISOFORMAS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE.	18
FIGURA 2 - MODELO CONCEITUAL HIERÁRQUICO EXPLICATIVO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (ADAPTADO DE STURMER ET AL., 2006).	32

Lista de Tabelas

TABELA 1- DISTRIBUIÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS) SEGUNDO VARIÁVEIS SOCIOECONÔMICAS, DEMOGRÁFICAS, ESTILO DE VIDA, ANTROPOMÉTRICAS, BIOQUÍMICAS E VARIÁVEIS GENÉTICAS: MULHERES DO ESTADO DE ALAGOAS, (N = 851) 2015.	32
TABELA 2 – RAZÕES DE PREVALÊNCIAS (RP) E RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95% (IC95%) AJUSTADAS POR REGRESSÃO DE POISSON MULTIVARIÁVEL, SEGUNDO MODELO TEÓRICO HIERÁRQUICO DE DETERMINAÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL. MULHERES DO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL.	35
TABELA 3 – COEFICIENTES ANGULARES PADRONIZADOS (CAP) AJUSTADOS POR REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIÁVEL, RELATIVOS AOS NÍVEIS DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E DIASTÓLICA (PAD), SEGUNDO MODELO TEÓRICO HIERÁRQUICO DE DETERMINAÇÃO. MULHERES DO ESTADO DE ALAGOAS	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

AL: Alagoas.

AT1: Receptor da angiotensina II

AVC: Acidente Vascular Cerebral.

AMPK: proteína quinase ativada por AMP.

BH4: Tetra-Hidrobiopterina.

B2: Bradicinina.

CAV-1: Caveolina-1.

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

COL: Colesterol Total.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ADMA: Dimetil arginina assimétrica.

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

ETb: Receptor da endotelina-1.

eNOS: Enzima Oxido Nítrico Sintase Endotelial.

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo.

FAPEAL: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas.

GTP: Guanosina trifosfato.

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica.

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica.

HDL: High Density Lipoprotein.

HSP (heat shock protein, Hsp90)

HWE: Hardy-Weinberg.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IMC: Índice de Massa Corporal.

LDL: Low Density Lipoprotein.

NG-hidroxi-L-arginina: NHA

NO: Oxido Nítrico.

O₂: Oxigênio

O₂⁻: Anión Superóxido.

ONOO⁻: Peroxinitrito.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PA: Pressão Arterial

PAS: Pressão Arterial Sistólica.

PAD: Pressão Arterial Diastólica.

PKA: Proteína Quinase A.

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinase.

PSF: Programa de Saúde da Família.

RNAm: RNA mensageiro.

SNP: *Single nucleotide polymorphism*.

TRIG: Triglicerídeos.

UFAL: Universidade Federal de Alagoas.

VNTR: *Variable number tandem repeats*.

Sumário

1.	14	
2.	15	
3.	OBJETIVOS	24
4.	Erro! Indicador não definido.	
5.	33	
6.	40	
7.	42	
8.	43	
	APÊNDICES	50
	ANEXOS	55

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada uma das doenças mais prevalentes no mundo, sendo responsável por 9,4 milhões de mortes anuais (LIM et al., 2013). Frequentemente se associa a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo agravada pela presença de outros fatores de risco, como dislipidemia, obesidade abdominal, intolerância à glicose e diabetes (WEBER et al., 2014).

Devido à sua alta prevalência e multifatorialidade etiológica, torna-se importante compreender a dinâmica dos fatores de risco associados à HAS, dentre os quais destaca-se o componente genético, o qual explicaria aproximadamente 45% dos casos de pressão arterial elevada (SURENDRAN et al., 2016). Diante disso, tem crescido o interesse por investigações voltadas à identificação de polimorfismos genéticos associados à HAS (EHRET et al., 2016). Entre estes constam as alterações polimórficas no gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), envolvida na produção de óxido nítrico (NO) a partir da oxidação da L-arginina. O NO é um radical livre que atua no processo de vasodilatação e regulação do tônus vascular (OTANI, 2009) (GAMBOA et al., 2007).

Em modelos animais nocaute, nos quais houve manipulação genética para inibição da expressão do gene da eNOS (eNOS-KO), verificou-se elevação dos níveis pressóricos arterial, evidenciando a importância do NO na regulação da pressão arterial sistêmica (THOMAS; ZHANG; VICTOR, 2001) (HUANG et al., 1995).

Adicionalmente ao controle dos níveis pressóricos, o NO também está relacionado ao metabolismo lipídico por inibir a oxidação da LDL e a agregação plaquetária resultante desta oxidação (QIAN; FULTON, 2013). Assim, o NO é um importante fator de proteção contra a progressão das doenças cardiovasculares (IGNARO, 2007).

Dentre os polimorfismos associados ao gene da eNOS, o G894T é o de maior relevância científica, pois tem sido reconhecido como um importante fator de risco para elevação dos níveis pressóricos e ocorrência de outros agravos, como a doença arterial coronariana, doenças vasculares, infarto agudo do miocárdio, síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (MIYAMOTO et al., 1998). Estudo recente com indivíduos da península Ibérica verificou associação dessa variante polimórfica com a HAS (GONI et al., 2016).

Diante disso, o polimorfismo G894T, ao influenciar diretamente a expressão do gene da eNOS, se caracteriza como um importante biomarcador para o desenvolvimento da hipertensão arterial (QIAN; FULTON, 2013). No entanto, não existem estudos que descrevam sua distribuição e sua associação com a HAS em mulheres do Nordeste Brasileiro, uma região

caracterizada por maior vulnerabilidade social, concentrando, em relação às regiões Sul/Sudeste, os piores indicadores sociais do País. Isso é importante pois se reconhece que a expressão gênica pode ser fortemente influenciada por fatores ambientais (SOUSA et al., 2017). Além da questão ambiental, a hipertensão parece incidir de forma diferente conforme o sexo, tal como evidenciado na Pesquisa Nacional de Saúde - 2013, na qual se observou maior prevalência de HAS entre as mulheres (24,2% vs. 18,3%) (ANDRADE et al., 2015)

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão é considerada uma das doenças mais prevalentes no mundo, sendo esta responsável por 7,64 milhões de mortes anuais, onde 80% ocorrem em países em desenvolvimento como o Brasil, onde aproximadamente 54% e 47% dos casos de AVC e infarto agudo do miocárdio estão associados a hipertensão arterial (LAWES; VANDER HOORN; RODGERS, 2008).

No Brasil as doenças cardiovasculares são responsáveis por 33% dos óbitos registrados, além disso essas doenças são responsáveis por 45% das internações de pessoas em fase adulta (LIMA E COSTA et al., 2000). Existe um grande aumento na expectativa de vida da população de países em desenvolvimento como o Brasil, bem como mudanças nos padrões alimentares e no estilo de vida, tendo como consequência o aumento das prevalências de doenças crônicas, entre elas a hipertensão (MOBLEY et al., 2006).

Inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30%. Considerando-se valores de PA \geq 140/90 mmHg, 22 estudos encontraram prevalências entre 22,3% e 43,9%, (média de 32,5%), com mais de 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos (CESARINO et al., 2008) (DO ROSÁRIO et al., 2009).

2.2 FATORES DE RISCO PARA HAS

Idade: Existe relação direta e linear da PA com a idade, sendo a prevalência de HAS superior a 60% na faixa etária acima de 65 anos (CESARINO et al., 2008).

Sexo e etnia: A prevalência global de HAS entre homens e mulheres é semelhante, embora seja mais elevada nos homens até os 50 anos, invertendo-se a partir da 5ª década. Em relação à cor, a HAS é duas vezes mais prevalente em indivíduos afrodescendentes (CESARINO et al., 2008) (LESSA, 2001). Estudos brasileiros com abordagem simultânea de

gênero e cor demonstraram predomínio de mulheres negras com excesso de HAS de até 130% em relação às brancas (LESSA, 2001).

Excesso de peso e obesidade: O excesso de peso se associa com maior prevalência de HAS desde idades jovens. Na vida adulta, mesmo entre indivíduos fisicamente ativos, incremento de 2,4 kg/m² no índice de massa corporal (IMC) acarreta maior risco de desenvolver hipertensão (BRANDÃO et al., 2004).

Ingestão de sal: Ingestão excessiva de sódio tem sido correlacionada com elevação da PA. A população brasileira apresenta um padrão alimentar rico em sal, açúcar e gorduras. Em contrapartida, em populações com dieta pobre em sal, como os índios brasileiros Yanomami, não foram encontrados casos de HAS (APPEL et al., 1997) (HE; MACGREGOR, 2009).

Ingestão de álcool: A ingestão de álcool por períodos prolongados de tempo pode aumentar a PA e a mortalidade cardiovascular em geral (MARTINEZ; LATORRE, 2006). Em populações brasileiras o consumo excessivo de etanol se associa com a ocorrência de HAS de forma independente das características demográficas (SCHERR; RIBEIRO, 2009).

Fatores socioeconômicos: A influência do nível socioeconômico na ocorrência da HAS é complexa e difícil de ser estabelecida (CONEN et al., 2009).

Genética: A contribuição de fatores genéticos para a gênese da HAS está bem estabelecida na população (DE OLIVEIRA et al., 2008).

2.3 PREVENÇÃO E CONTROLE

A prevenção e o controle da HAS deve ser feita através de diversas abordagens, uma delas é a mudança no estilo de vida como melhorar a alimentação, evitar o uso de bebidas alcoólicas, controle do tabagismo, controle de peso e a prática de atividade física regular (LESSA, 2001) Se não tratada adequadamente a HAS pode causar alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (BRANDÃO et al., 2004).

2.4 FUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio recobre todos os vasos sanguíneos do organismo, desde o coração, grandes, médias e pequenas artérias e capilares, bem como toda a árvore venosa, veias pós-capilares, pequenas, médias e grandes veias que conduzem o sangue de volta ao coração e os vasos linfáticos. Para que ocorra um adequado suprimento de sangue aos tecidos é necessário que o

endotélio esteja íntegro, sendo assim, em qualquer situação de rompimento na continuidade de suas células, as mesmas se reorganizam para refazer a conexão intercelular (PICCOLI et al., 2012).

A célula endotelial é capaz de, através de uma extensa rede de transmissão de dados, detectar mínimas alterações na pressão arterial, no fluxo sanguíneo, no balanço oxidativo, na coagulação, no sinal de inflamação e na ativação do sistema imune (PICCOLI et al., 2012). A necessidade de uma rede integrada se deve ao fato de que o principal produto liberado pelo endotélio, o óxido nítrico (NO), possui uma meia-vida menor do que 50 segundos e, portanto, não consegue atingir vários diâmetros celulares livremente pela circulação (PICCOLI et al., 2012).

Evidências apontam que, desarranjos no metabolismo ou nas funções regulatórias do endotélio estão associados à fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares. A função endotelial é dinamicamente regulada e suas propriedades, vasodilatadora, antiinflamatória e antitrombótica são reduzidas por uma série de doenças, incluindo aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, inflamação e envelhecimento (PICCOLI et al., 2012).

Fatores de risco como tabagismo, hipertensão vascular, hiperglicemia ou dislipidemia podem levar o endotélio a uma geração excessiva de superóxidos (O_2^-), que, envolvidos no estresse oxidativo, podem levar a um ciclo bioquímico “vicioso” gerando disfunção endotelial (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006). O O_2^- reage avidamente com o NO vascular para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Esta transformação da eNOS de enzima protetora para enzima favorecedora do estresse oxidativo, tem sido observada em modelos in vitro, em modelos animais de doença cardiovascular, assim como em pacientes com hipertensão arterial (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006).

2.5 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Em 1980, Furchgott e Zawadzki conseguiram demonstrar que a ação de alguns vasodilatadores era totalmente dependente da presença do endotélio sendo necessário que o tecido estivesse intacto, envolvendo a liberação do fator necessário para a redução do tônus vascular, nomeado de Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (*Endothelial-derived relaxing factor; EDRF*) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Após sete anos da descoberta do EDRF, estudos detalhados da sua ação biológica nos vasos e plaquetas pode demonstrar que o EDRF e óxido nítrico eram indistinguíveis na atividade biológica, estabilidade química e susceptibilidade à inibidores e que ambos tinham

sua ação inibida pela hemoglobina e potencializada por superóxido dismutase (IGNARRO et al., 1987; MONCADA; RADOMSKI; PALMER, 1988).

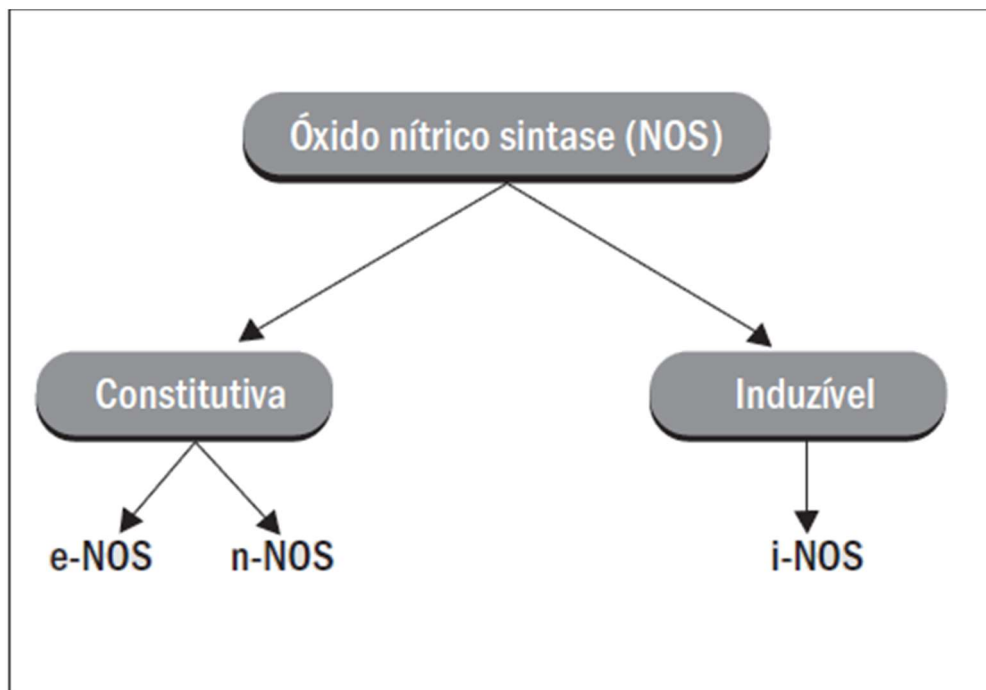
2.6 SÍNTESE E INIBIÇÃO DO NO

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (eNOS) (MARLETTA, 1993; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Existem várias isoformas de NOS em diferentes tecidos de mamíferos, contudo análises sequenciais de aminoácidos puderam demonstrar que estas isoformas representam uma família de proteínas que são produtos de três genes distintos. Com base nesse contexto os pesquisadores dividiram as isoformas da NOS em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARIETTA, 1994).

A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (BREDT; SNYDER, 1989; KNOWLES et al., 1989).

A produção de NO na isoforma constitutiva c-NOS é relativamente pequena na ordem de nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de Ca^{++} (MARLETTA et al., 1988). Já a i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Figura 1: Isoformas da Óxido Nítrico Sintase.



A síntese de NO, envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O₂) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH₄) são utilizados como co-fatores na reação (MARLETTA; MARIETTA, 1994).

2.7 NO PRODUZIDO PELA ENZIMA ÓXIDO NITRICO SÍNTASE

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da e-NOS presente nestas células e à consequente produção de NO (VÁSQUEZ-VIVAR et al., 1998).

A e-NOS está estrategicamente ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às

células sanguíneas circulantes. Em resposta a agonistas como a bradicina, ocorre a fosforilação da e-NOS, determinando sua translocação para o citosol. Este mecanismo provavelmente tem um papel na regulação da produção de NO *in situ* e na sua atividade biológica (MICHEL; LI; BUSCONI, 1993). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (SNYDER; BREDET, 1992).

O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de Ca^{++} para a célula, a inibição da liberação de Ca^{++} do retículo endoplasmático e o aumento do seqüestro de Ca^{++} para o retículo endoplasmático (GEWALTIG; KOJDA, 2002).

O NO que deixa a célula endotelial em direção à corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento de GMPc e a conseqüente diminuição do Ca^{++} livre (WOLIN, 2000). As plaquetas humanas possuem e-NOS e são também produtoras de NO. Tanto o NO oriundo das células endoteliais quanto o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetaria (VASTA et al., 1995).

2.8 ÓXIDO NÍTRICO E VASOPROTEÇÃO

Atualmente, está bem estabelecido que o NO resultante da e-NOS tem um papel crucial na manutenção do tônus vascular, além disso a pressão sanguínea e o fluxo pulsátil contribuem para regular a liberação de NO em condições fisiológicas (WENNMALM, 1994). Experimentos com modelos animais comprovam que a inibição de NO resulta em um aumento drástico da pressão arterial (NAVA; LÜSCHER, 1995).

O NO derivado das células endoteliais é atualmente considerado essencial para a homeostase vascular e tem sido o alvo para a prevenção de doenças cardiovasculares. Tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o seu desequilíbrio provoca estresse oxidativo aumentando assim o estado redox fator

desencadeante de várias patologias dentre elas a hipertensão arterial (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

2.9 ATIVIDADE DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SÍNTASE

A atividade, da eNOS é regulada por diferentes substâncias e cofatores envolvidos em seu mecanismo de sinalização intracelular como: o complexo cálcio calmodulina (Ca_2^+/CaM), caveolina-1 (CAV-1), dimetil arginina assimétrica (*Asymmetric Dimethylarginine*, ADMA) e a HSP (heat shock protein, Hsp90), fosforilação de proteínas quinases ou fosfatases (Fosfatidilinositol-3 quinase [*Phosphoinositide-3 kinases* - PI3K], proteína quinase B ou Akt [*Protein Kinase B or Akt*], proteína quinase A [*Protein Kinase A* – PKA], proteína quinase ativada por AMP [*AMP-actived protein kinase* - AMPK], proteína quinase ativada por mitógeno [*Mitogen-Activated Protein Kinase* - MAP], sendo estas proteínas fosforiladas em resíduos proteicos Serina/Treonina); através da acilação dos cofatores e substratos celulares como a BH₄, Fe⁺, FAD, FMN e NADPH e, por fim, através da localização subcelular (caveolina, Golgi e elementos citosólicos), (BERNIER; HALDAR; MICHEL, 2000).

Em condições basais, a eNOS é mantida em estado inativo por diversos mecanismos independentes, os quais podemos destacar: a CAV-1 (considerada o principal regulador que interage com a eNOS reprimindo a sua atividade), um elemento autoinibitório presente no domínio de ligação para a FNM o qual impede a interação da CaM com a eNOS, algumas proteínas G ligadas a receptores como o receptor de bradicinina (B2), o receptor da angiotensina II (AT1) e o receptor da endotelina-1 (ETb). A bradicinina estimula a fosforilação do receptor B2, promovendo uma dissociação da eNOS com este receptor, aumentando assim a produção do NO (BOO; JO, 2003).

2.10 BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO

As espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres de oxigênio, são átomos, íons ou moléculas que contém oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. Estes são caracterizados por grande instabilidade e, por isso, apresentam elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidante) ou como doadores (redutores) de elétrons. As principais espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o peroxinitrito (ONOO^-). (CERIELLO; TESTA; GENOVESE, 2016).

A reação do O_2^- com o NO, considerado fator fundamental na redução da biodisponibilidade do NO, resulta na formação de uma molécula altamente instável, o $OONO^-$, capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, provocando danos celulares por meio da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), fatores de crescimento e de citocinas, que por sua vez desencadeiam alterações estruturais e funcionais, como o remodelamento vascular, aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular, aumento do processo inflamatório e da permeabilidade endotelial nos tecidos envolvidos (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

O NO é conhecido por sua importante capacidade vasodilatadora, mesmo não sendo essa sua exclusiva potencialidade. A molécula de NO em estado gasoso é um radical livre, de fácil difusão e que cruza membranas celulares. Esta natureza confere ao NO uma capacidade de reagir com outros radicais livres ou com o oxigênio molecular (que é um di-radical). Dentre os produtos de oxidação do NO, o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-) são seus principais metabólitos fisiológicos em meio aquoso e que podem ser mensurados como índices da produção de NO em um determinado sistema biológico (LAURINDO et al., 2003a).

2.11 GENE DA ENZIMA ÓXIDO NITRICO SÍNTASE

O gene da eNOS está localizado no cromossomo 7, mais especificamente no longo braço do cromossomo, na região 7q35-36, apresentando um comprimento genômico de 4.4kb compreendendo 25 íntrons e 26 éxons, responsável pela síntese de um RNA mensageiro (RNAm) de 4052 nucleotídeos. A codificação do gene da eNOS leva à formação de uma enzima de cadeia polipeptídica contendo 1203 aminoácidos e um peso molecular de 135-kD (MARSDEN et al., 1993). Em relação à região promotora, foi observada a ausência da região regulatória "TATA box" e verificado a presença de um sítio de ligação rico em CG localizado próximo ao sítio inicial da transcrição chamado de SP1 (SEARLES, 2006).

A enzima eNOS consiste-se em um dímero, formado por dois monômeros idênticos, que podem ser funcional e estruturalmente divididos em dois domínios: um domínio redutase C-terminal (*Carboxy-terminal reductase*) e um domínio oxigenase N terminal (*amino-terminal oxygenase*). O domínio C-terminal contém sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN, e o domínio N-terminal para a L-arginina e BH₄. Além disso, entre esses domínios é observado o sítio de ligação para a calmodulina, que apresenta papel fundamental na regulação da enzima (STUEHR, 1997).

2.12 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Durante o a replicação do DNA, alguns "erros" podem ocorrer mutações. Tais como: a substituição de uma base por outra, a inserção de uma base ou a remoção de uma base. Esta

pequena variação genética pontual pode ser passada para os descendentes do indivíduo no qual ela ocorreu, fazendo com que este genótipo se torne presente em uma pequena parcela da população. De fato, para ser considerado polimorfismo, a variante menos comum deve ser observada em pelo menos 1% da população, porém este conceito está sofrendo modificações, em vista que já existem SNPs catalogados em bases de dados que não cumprem exatamente esse critério (CHAKRAVARTI, 2001).

Os polimorfismos apresentam-se normalmente em: i) polimorfismos de único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism - SNP*), caracterizados por inserções ou deleções de únicos ou múltiplos nucleotídeos, ii) um variável número de repetições em tandem (*variable number tandem repeats - VNTR*) caracterizados por pequenas sequências de nucleotídeos (10 a 100 pb) que se repetem até centenas de vezes em uma sequência de DNA (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Os polimorfismos podem se localizar nas mais diversas regiões do genoma humano como, a) regiões regulatórias (controle da atividade e expressão gênica); b) regiões codificantes (codificadoras de proteínas) regiões dos introns (separam regiões codificantes ou éxons em um gene) ou c) regiões inter-genes, sendo normalmente classificados como selvagens (*wild type*) quando apresentam uma sequência comum, ou raro (*rare*) quando apresentam variância alélica rara (CHAKRAVARTI, 2001).

2.13 POLIMORFISMOS NO GENE DA ENZIMA ÓXIDO NITRICO SÍNTASE

Atualmente tem-se conhecimento de mais de 100 polimorfismos para o gene da eNOS e sua vizinhança (NCBI SNP database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Na região promotora foram detectados três distintos SNP: substituição do nucleotídeo timina para adenina na região promotora posição -1468 (-1468T>A); substituição do nucleotídeo adenina para guanina na posição -922 (-922A>G) e substituição do nucleotídeo timina para citosina para a posição -786 (-786T>C), sendo este último o mais estudado e clinicamente relevante SNP da região promotora. Estudo prévio demonstrou que a sequência funcional da região promotora estende-se somente até -144bp (KARANTZOULIS-FEGARAS et al., 1999).

Outros SNPs observados para os introns do gene da eNOS são: para o intron 2 - IVS2 + 42G>A (G561A); intron 11- IVS11 +174A>G (A3185G); intron 12 - IVS12 +52G>T (G3411T); intron 18 - IVS18 +27A>C (A27C); intron 22 - IVS22 +15A>G (A6007G) e intron 23 - IVS23 + 11G>T (G6247T). VNTR foram encontrados no intron 2 e 8 (32-bp repetidos); intron 4 (27bp repetidos) e intron 13 (IVS13 +81(CA)17-44. E por fim, os SNP nos éxons:

5557G>T (G894T) no éxon 7 (E298D, uma substituição do aminoácido Glutamato para o Aspartato, normalmente conhecido como Glu298Asp) e 5172C>T (C74T) no éxon 6 (uma substituição sem alteração na sequência dos aminoácidos) (WANG; WANG, 2000).

2.14 POLIMORFISMO 894G>T, rs1799983

A variante polimórfica 894G>T localiza-se, dentro do éxon 7 do gene eNOS, de uma guanina (G) para uma timina (T) na base 894 que leva à modificação do resíduo conservado de ácido glutâmico para um ácido aspártico no aminoácido 298 da sequência protética (Glu298Asp) do domínio da estrutura extracelular do eNOS (HINGORANI et al., 1999). O genótipo 894TT (298Asp) de 894G>T tem sido associado com baixa disponibilidade de NO, causada, principalmente, por uma redução basal na produção de NO (TESAURO et al., 2000). A eNOS 298Asp está sujeita a clivagem proteolítica nas células endoteliais e nos tecidos vasculares, o que pode levar a uma menor geração de NO vascular (TESAURO et al., 2000).

Estudos demonstram que a variante polimórfica 894G>T está associada a HAS. Foi evidenciado que a variante polimórfica 894G>T do gene eNOS pode estar associada com hipertensão e pressão arterial diastólica entre os europeus da Península Ibérica (GONI et al., 2016).

No *Bogalusa Heart Study* (estudo populacional da história natural da aterosclerose em crianças e jovens adultos de uma comunidade semi-rural, bi-étnica – 65% caucasoides; 35% afro-americanos - de Bogalusa, Louisiana) (CHEN et al., 2004), foi verificada diferença estatisticamente significativa relativa à frequência do alelo 894T e etnia, sendo esta menor entre afro-americanos do que em caucasoides. Além disso, afro-americanos portadores do alelo 894T também tiveram menor pressão sistólica o que não ocorreu entre os caucasoides. O polimorfismo 894G>T também esteve associado com medidas de rigidez da parede arterial em afro-americanos (CHEN et al., 2004). Ainda, em outros estudos, 894G>T também esteve associado a: espasmo coronário difuso (CHANG et al., 2003), risco de infarto agudo do miocárdio e morte um ano após colocação de stent (GORCHAKOVA et al., 2003), reestenose em stent, ao potencial aterogênico em pacientes com diabetes (ZHANG et al., 2006).

Diante disso, o polimorfismo G894T, ao influenciar diretamente a expressão do gene da eNOS, se caracteriza como um importante biomarcador para o desenvolvimento da hipertensão arterial (Qian, Jin e Fulton, David, 2013). No entanto, não existem estudos que descrevam sua distribuição e sua associação com a HAS em mulheres do Nordeste Brasileiro, uma região caracterizada por maior vulnerabilidade social, concentrando, em relação às regiões Sul/Sudeste, os piores indicadores sociais do País. Isso é importante pois se reconhece que a

expressão gênica pode ser fortemente influenciada por fatores ambientais (Sousa, Ana Célia *et al.*, 2017)

Além da questão ambiental, a hipertensão parece incidir de forma diferente conforme o sexo, tal como evidenciado na Pesquisa Nacional de Saúde - 2013, na qual se observou maior prevalência de HAS entre as mulheres (24,2% vs. 18,3%) (Andrade, S. S. D. A. *et al.*, 2015)

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a distribuição do polimorfismo G894T para o gene eNOS numa população de mulheres do Nordeste do Brasil e investigar sua associação com a hipertensão arterial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a distribuição do polimorfismo G894T para o gene eNOS numa população de mulheres do Nordeste do Brasil e investigar sua associação com a hipertensão arterial.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Genotipar os indivíduos quanto ao polimorfismo 894G>T do gene eNOS.
- b) Descrever as frequências alélicas e genotípicas desse polimorfismo.
- c) Investigar a associação entre as diferentes formas alélicas e genotípicas do polimorfismo estudado e hipertensão arterial.

4. MÉTODOS

Este estudo é parte constituinte do projeto denominado “*II Diagnóstico de saúde da população materno-infantil do Estado de Alagoas*”, que tinha como objetivo principal diagnosticar a situação atual e a tendência temporal dos principais indicadores de nutrição e saúde da população materno-infantil do estado de Alagoas e identificar os possíveis fatores associados, possibilitando o planejamento de ações de promoção da saúde e avaliação do impacto de projetos de segurança alimentar implantados. O estudo foi realizado pelo Laboratório de Nutrição Básica e Aplicada, alocado na Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas e pelo Laboratório de Genética e expressão Gênica, localizado na UFAL Campus Arapiraca.

4.1 DELINEAMENTO

Estudo de base populacional, observacional, analítico e de desenho transversal, com coleta de dados baseada em inquérito domiciliar.

4.2 POPULAÇÃO ALVO

Mulheres de 20 a 49 anos residentes nas zonas urbana e rural do estado de Alagoas.

4.3 TAMANHO DA AMOSTRA

No cálculo do tamanho amostral, a variável de interesse foi a hipertensão, cuja prevalência para adultos no Brasil foi estimada em 23,3% (MARÇAL PIMENTA; GAZZINELLI; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2011). Para uma população de 718.493 mulheres (IBGE, 2010), um erro amostral de 3,0% e um intervalo de confiança de 95% seriam necessárias 762 mulheres. Para cobrir eventuais perdas amostrais, a esse número acrescentou-se mais 10%. Assim, a amostra planejada foi de 838 mulheres. Os cálculos foram realizados no módulo StatCalc do *software* Epi-info, versão 7.1.4.

4.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram consideradas elegíveis todas as mulheres da faixa etária dos 20 aos 49 anos.

4.5 AMOSTRAGEM

Para compor a amostra, adotou-se um processo de estágios múltiplos com três etapas:

1ª) sorteio de 30 dentre os 102 municípios do Estado, por meio de amostragem sistemática com probabilidade proporcional ao tamanho; 2ª) sorteio de quatro setores censitários dentro de cada município; 3ª) um ponto inicial dentro de cada setor, a partir do qual realizou-se visita de vinte e oito domicílios consecutivos. Maceió, por agregar 1/3 da população estadual, foi sorteada 10 vezes, enquanto que Arapiraca, segundo maior município alagoano, foi sorteada duas vezes. Os municípios sorteados foram os seguintes:

1. Anadia
2. Arapiraca (sorteada 2 vezes)
3. Atalaia
4. Coité do Nória
5. Colônia Leopoldina
6. Coruripe
7. Delmiro Gouveia
8. Junqueiro
9. Lagoa da Canoa
10. Maceió (sorteada 10 vezes)
11. Maravilha
12. Messias
13. Palmeira dos Índios
14. Passo de Camaragibe
15. Penedo
16. Piranhas
17. Rio Largo
18. Santana do Ipanema
19. São José da Laje
20. Taquarana

Para a identificação e sorteio dos setores censitários, utilizaram-se mapas produzidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

4.6 VARIÁVEIS EM ESTUDO

A coleta de dados foi realizada de abril de 2014 a março de 2015, por entrevistadores devidamente treinados e supervisionados. Todas as informações coletadas foram registradas em formulário semiestruturado testado em estudo piloto.

4.6.1 Variável dependente

A variável dependente foi a hipertensão arterial. A aferição da pressão arterial foi realizada em duplicata, com o indivíduo sentado e após 15 minutos de repouso, utilizando-se aparelhos digitais da marca Omron® (modelo HEM-7113). Quando ocorria diferença superior a 5 mmHg entre as duas medidas, uma terceira era realizada. Para cálculo da média foi desconsiderada a medida mais discrepante (CHOBANIAN et al., 2003). A hipertensão foi definida por PAS \geq 130mmHg e/ou PAD \geq 90mmHg e/ou quando a paciente referiu uso regular de fármacos anti-hipertensivos. Mulheres que relataram o uso regular de medicamentos anti-hipertensivos foram categorizadas como hipertensas.

4.6.2 Variáveis independentes

A variável independente foi o polimorfismo G894T do gene da enzima eNOS, conforme os genótipos GG, GT e TT.

Por ocasião das visitas domiciliares, as mulheres eram convidadas a comparecer no dia seguinte em um local pré-determinado próximo à sua residência, onde, além dos exames bioquímicos, eram colhidas células da mucosa oral. Os pacientes foram orientados a bochechar previamente com 100ml de água destilada e a coleta foi realizada raspando a face interna das bochechas com pequenas escovas citológicas estéreis, fazendo movimentos circulares por aproximadamente 30 vezes. As escovas tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos de 2ml. As amostras colhidas assim obtidas foram armazenadas em geladeira para posterior extração do DNA com NaCl (ABRÃO et al., 2005). Em seguida, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro. Após a extração e quantificação, as amostras de DNA foram armazenadas a -24°C até a realização da genotipagem.

A sequência que flanqueia o polimorfismo rs1799983 é; TTCCTGCTGCAGGCCAGTGA[G/T]CCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCC foi genotipado utilizando o método Taqman Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de PCR foram realizadas com 5.0µL de 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 0,125µL de TaqMan 40X Assay e 4.87µL de DNA normalizado para 4ng/µl, para um volume final de 10µL. Os parâmetros de amplificação consistiram em 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto usando o equipamento Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A discriminação genotípica individual foi feita com auxílio do *software Step One Plus™*, versão

2.3, ao final de cada reação. Em todas as reações foram utilizados controles positivos e controles negativos a fim de evitar possíveis contaminações.

4.6.3 Covariáveis (variáveis analisadas para controle de fatores de confusão e/ou para caracterização da amostra).

Variáveis demográficas: Idade (analisada como variável contínua por meio de Regressão linear ou como variável categórica quando utilizada a regressão de Poisson: 19 a 30, 30,1 a 40 e 40,1 a 50 anos).

Variáveis socioeconômicas: Situação do domicílio (rural ou urbana); Inserção no mercado formal de trabalho (emprego com carteira assinada, funcionário público, aposentado ou pensionista); Escolaridade (≤ 8 anos; \bullet 8 anos); Cor da pele/etnia auto referida (branca, parda, amarela, preta ou indígena. Na análise estatística foi dicotomizada em negros/pardos e não negros/pardos, devido ao reduzido número de indivíduos amarelos e indígenas e pelas iniquidades sociais que afetam negros/pardos quando comparados aos brancos) (BATISTA; WERNECK; LOPES, 2012); Paridade (número de nascidos vivos ≤ 2 ; \bullet 2 filhos); Usuária do Programa Bolsa família (sim ou não); Acesso a serviços de saúde (Público; Privado); Condição de segurança alimentar.

A condição de segurança alimentar foi classificada de acordo com a Escala Brasileira de insegurança alimentar (EBIA), uma escala psicométrica dotada de 14 perguntas, a qual foi validada no Brasil a partir de escalas internacionais. Sua utilização visa identificar e classificar as famílias de acordo com a condição de segurança alimentar, ou seja, se existe uma situação de garantia de acesso a uma alimentação saudável ou há preocupação ou mesmo a experiência da falta de comida no domicílio. A escala prevê quatro categorias. A segurança alimentar se aplica a domicílios que têm acesso regular e permanente a alimentos de qualidade em quantidade suficiente. A insegurança alimentar leve é atribuída quando há preocupação ou incerteza quanto ao acesso aos alimentos num momento futuro. A insegurança alimentar moderada é caracterizada quando ocorre redução quantitativa de alimentos entre adultos. Já a insegurança alimentar grave é constatada com a redução quantitativa de alimentos entre crianças ou quando alguém fica o dia inteiro sem comer por falta de alimentos. Na análise estatística foram consideradas apenas duas categorias: segurança alimentar e insegurança alimentar, está definida a partir da observação de pelo menos uma resposta positiva dentre as 14 questões constantes da EBIA (SEGALL-CORRÊA et al., 2014).

Variáveis relacionadas à saúde e ao estilo de vida: Prevalência de doenças nos últimos 15 dias (Sim; Não); Consumo habitual de bebida alcoólica (Sim; Não); Tabagismo (Sim; Não); Padrão de atividade física.

O padrão de atividade física foi mensurado por meio da aplicação do International Physical Activity Questionnaires (IPAQ). As mulheres foram classificadas como sedentárias ou ativas, conforme tenham obtido escores de atividade leve menor ou maior que 150 minutos/semana, respectivamente (MATSUDO et al., 2012).

Variáveis relacionadas a fatores dietéticos: Consumo habitual de pele de frango (Sim; Não); Consumo habitual de carne gorda (Sim; Não); Consumo de sal adicionado ao prato (Sim; Não) (RODRIGUES et al., 2017).

Indicadores antropométricos: Foram utilizados o Índice de Massa Corporal (IMC; kg/m^2) e o perímetro da cintura. Para o cálculo do IMC, os indivíduos tiveram seu peso e estatura verificados. Para medir o peso corporal foram utilizadas balanças digitais portáteis (modelo MS6121R Charder®), com capacidade de 250 kg e precisão de 100 g, aferidas semanalmente contra peso padrão. A estatura foi verificada em estadiômetro (modelo 213, Seca®) dotado de fita métrica inextensível de 205 cm e subdivisões em mm. Na análise de regressão linear o IMC foi considerado como variável contínua. Já para a regressão de Poisson foi considerada a seguinte classificação (kg/m^2): baixo peso ($< 18,5$), eutrofia (18,5 a 24,9), sobrepeso (25,0 a 29,9) e obesidade ($\geq 30,0$) (WHO, 2000).

A medida do perímetro da cintura foi realizada com a mulher em pé, utilizando uma fita métrica não extensível, a qual era posicionada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Utilizou-se o ponto de corte ≥ 80 cm para definir a condição de risco de complicações metabólicas associadas a obesidade (CAMINHA et al., 2017).

Variáveis bioquímicas: Foram realizadas dosagens de colesterol total e frações, triglicerídeos e glicose. Os testes foram feitos na condição de jejum, utilizando gota de sangue obtida por punção da polpa digital com auxílio de lancetas descartáveis. As determinações foram procedidas em aparelhos Alere Cholestech LDX® System e seus respectivos cassetes de análise. Na classificação, foram utilizados os seguintes pontos de corte para designar alteração: colesterol: ≥ 190 mg/dL; LDL: ≥ 130 mg/dL; HDL: < 40 mg/dL; triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; glicose ≥ 100 mg/dL (MARTIN et al., 2013).

Processamento e análise dos dados

Os dados foram digitados em dupla entrada independentes em formulário eletrônico

gerado com o software Epi-Infotm, versão 7.1.3.10, possibilitando a identificação e correção de possíveis erros de digitação.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi analisado com o teste χ^2 ($p > 0,05$). Esse procedimento se faz necessário visando certificar que a população estudada obedece aos princípios da genética de populações e, adicionalmente, como medida de controle da acurácia obtida nas análises dos genótipos.

A análise foi procedida segundo um modelo teórico adaptado de Sturmer (STURMER et al., 2006) (Figura 1) por meio de duas abordagens. Na primeira a variável dependente foi a hipertensão arterial (variável categórica). Na segunda, as variáveis dependentes foram a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica, analisadas como variáveis contínuas. Nas duas situações, a análise hierárquica foi composta por quatro níveis: O primeiro contemplou as variáveis demográficas e socioeconômicas; no nível 2, as variáveis relacionadas ao estilo de vida e a fatores dietéticos; Já o nível 3 incluiu os indicadores antropométricos e bioquímicos; finalmente, no nível 4 foram analisadas as associações com os polimorfismos do gene da eNOS. O nível 2 foi ajustado pelas variáveis com $p < 0,05$ no nível 1; O nível 3 foi ajustado pelas variáveis com $p < 0,05$ nos níveis 1 e 2; O nível 4 foi ajustado por todas as variáveis com $p < 0,05$ nos níveis precedentes.

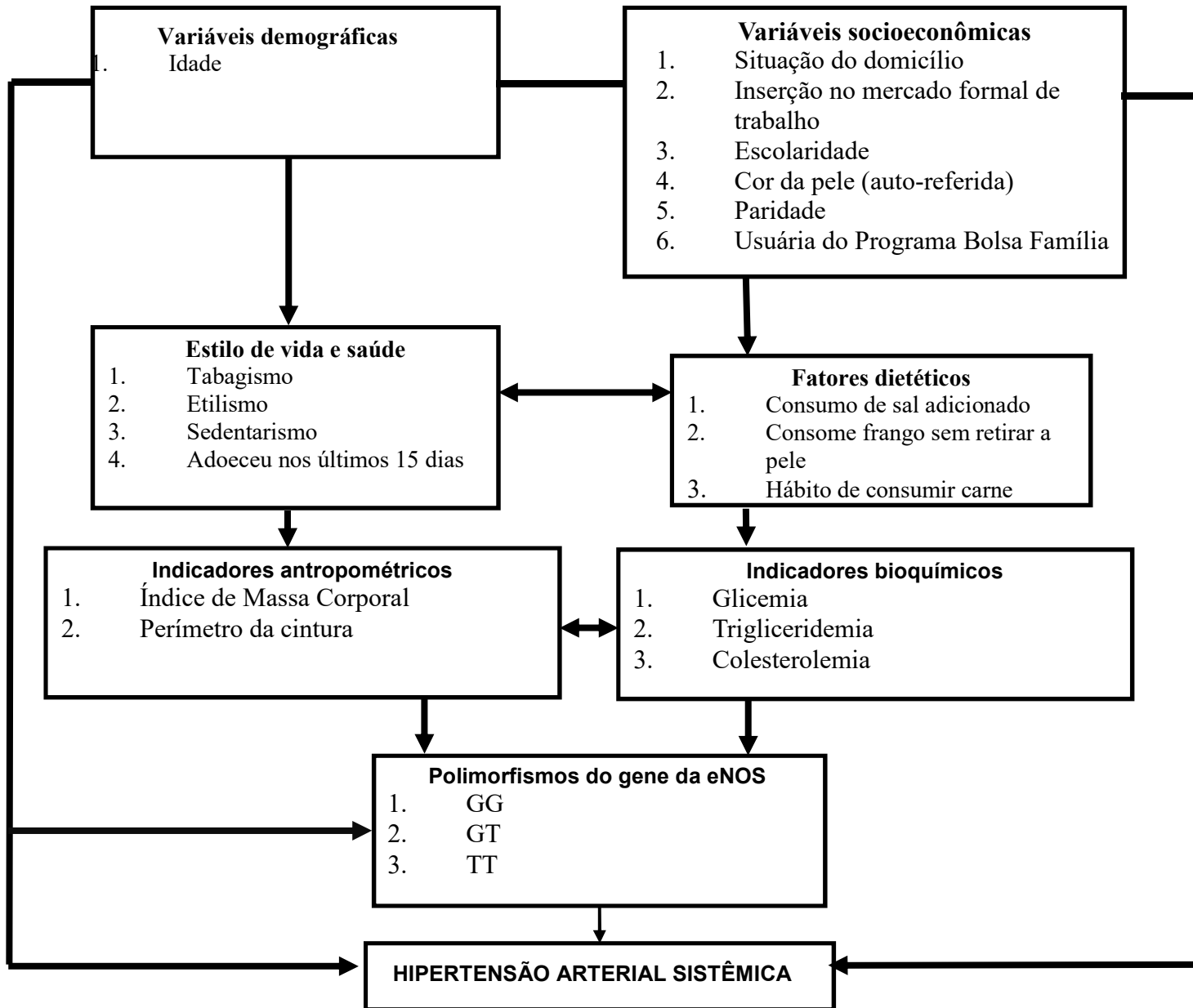
Para identificar associação entre a hipertensão e os genótipos GG, GT e TT do polimorfismo G894T do gene eNOS, usou-se a razão de prevalência (RP) e respectivo IC95% calculados por regressão de Poisson.

Foram elegíveis para a análise hierárquica todas as covariáveis que, na análise bruta, se associaram com a hipertensão arterial em um nível de significância de até 20% ($p < 0,2$). Para cada um dos quatro níveis de análise hierárquica houve eliminação sucessiva das variáveis não significantes (*backward stepwise elimination*), permanecendo apenas aquelas com $p < 0,05$. A partir dessa definição, todas essas variáveis permaneceram no modelo ajustado final, mesmo que tenham perdido significância estatística nos níveis seguintes ao seu nível original, isso com a finalidade de garantir o controle para possíveis fatores de confundimento.

Para verificar a associação entre os níveis pressóricos e os genótipos GG, GT e TT utilizou-se a análise de regressão linear múltipla, seguindo o modelo teórico definido para a análise hierárquica. Os procedimentos de inclusão e exclusão de variáveis foram idênticos aos descritos acima para a análise por regressão de Poisson.

Para realização das análises estatísticas utilizou-se o software Stata/SE 12.1 for Windows (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Figura 1 - Modelo conceitual hierárquico explicativo da hipertensão arterial sistêmica (Adaptado de Sturmer et al., 2006).



Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (Processo nº 09093012.0.0000.5013). Todas as mulheres investigadas foram devidamente informadas sobre os objetivos do estudo, bem como seus riscos e benefícios. Só foram investigadas aquelas que concordaram em participar do estudo e, para isso, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5 RESULTADOS

Foram identificadas 887 mulheres elegíveis para o estudo. Destas, 40 (4,5%) não estavam em casa no momento da entrevista ou se recusaram a participar da pesquisa. Além disso, foram excluídas das análises as mulheres sem registro de idade (n=4; 0,9%), de dados antropométricos (n=7; 0,8%), das medidas de pressão arterial (n=7; 0,8%) e que para as quais não foi possível extrair o DNA (n=19; 2,1%). Portanto, a amostra final analisada foi composta por 810 mulheres (35,8 ± 8,4 anos).

A caracterização das variáveis socioeconômicas, demográficas, estilo de vida, antropométricas, bioquímicas e variáveis genéticas da amostra encontram-se descritas na Tabela 1. A maioria se autodeclarou da cor/raça negra ou parda (75,9%), tinha até 8 anos de estudo (58,2%) e não possuía vínculo empregatício formal (74,5%) no momento da entrevista. Mais da metade (52,5%) era dependente de programas do governo para complementação de renda (Programa Bolsa Família).

Em relação às condições de saúde, 65,1% das mulheres afirmaram não ter adoecido nos últimos quinze dias. Quando doentes, 91,2% alegaram buscar atenção em serviços públicos de saúde. A prevalência para a HAS foi de 21,1%. Apenas 8,9% das mulheres eram fumantes, mas 68,4% referiram ingestão habitual de bebida alcoólica. Conforme a classificação pelo IMC, 66,1% tinham excesso de peso (sobrepeso + obesidade), sendo que 29,7% encontravam-se obesas.

Tabela 1- Distribuição da hipertensão arterial sistêmica (HAS) segundo variáveis socioeconômicas, demográficas, estilo de vida, antropométricas, bioquímicas e variáveis genéticas: Mulheres do estado de Alagoas, (n = 851) 2015.

<i>VARIÁVEIS</i>	<i>n (%)</i>	<i>HAS (%)</i>	<i>P valor</i>
<i>Faixa etária (anos)</i>			
<i>19 a 30</i>	257 (31,7)	7,7	-

30,1 a 40	274 (33,8)	17,1	<0,01
40,1 a 50	277 (33,5)	37,5	<0,01
Situação do domicílio			
Urbano	639 (78,8)	19,7	-
Rural	171 (21,2)	26,3	0,05
Desempregada			
Não	207 (25,5)	17,9	-
Sim	603 (74,5)	22,2	0,2
Escolaridade			
• 8 anos	340 (41,8)	14,7	-
≤ 8 anos	470 (58,2)	25,8	<0,01
Cor da pele (autodeclarada)			
Não negra	193 (24,1)	19,1	-
Negra e parda	608 (75,9)	22,1,9	0,39
Paridade			
Um ou dois filhos	430 (59,5)	18,8	-
Três ou mais	292 (40,5)	27,4	<0,01
Acesso a serviços de saúde			
Sistema privado	68 (8,7)	13,4	-
Sistema Único de Saúde	708 (91,2)	22,4	0,08
Complementação de renda			
Sim	461 (56,8)	21,7	
Não	348 (43,2)	20,4	0,67
Segurança Alimentar			
Segurança alimentar (0)	254 (33,4)	17,3	
Insegurança alimentar (≥ 1)	505 (66,6)	23,1	0,06
Adoeceu nos últimos 15 dias			
Não	283 (34,9)	19,6	-
Sim	526 (65,1)	24,1	0,14
Etilismo			
Não	554 (68,4)	20,5,	-
Sim	256 (31,6)	23,5	0,31
Tabagismo			
Não	738 (91,1)	20,2	
Sim	72 (8,90)	30,5	0,03
Atividade física			
Ativo >150min/semanal	541 (68,7)	18,7	
Sedentário ≤150 min/semanal	246 (31,3)	22,4	0,23
Consumo de sal adicionado			
Não	684 (84,4)	22,5	
Sim	126 (15,6)	13,4	0,02
Retira pele do frango			
Sim	728 (89,9)	21,1	
Não	81 (10,1)	19,7	0,76
Come carne com gordura			
Não	553 (68,2)	20,9	
Sim	257 (31,8)	21,4	0,86
Classificação do IMC (kg/m²)			
Eutrofia (18,5 a <25)	255 (31,6)	9,4	-
Sobrepeso (≥25 a <30)	293 (36,4)	20,4	<0,01
Obesidade (≥30)	243 (29,7)	35,4	<0,01
Circunferência da cintura			
Normal (<0.80)	320 (40,6)	10,9	
Aumentado (≥0.80)	467(59,4)	29,1	<0,01
Glicose (mg/dL)			
Normal (≤99)	549 (83,6)	19,8	
Elevado (≥100)	107(16,4)	30,8	<0,01
Triglicerídeos(mg/dL)			
Normal (<150)	454 (69,1)	18,2	

<i>Elevado (≥ 150)</i>	203(30,9)	29,7	<0,01
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>			
<i>Normal (<190)</i>	342 (52,1)	17,8	
<i>Elevado (≥ 190)</i>	315 (47,9)	20,6	0,01
<i>LDL-c (mg/dL)</i>			
<i>Normal (<130)</i>	390 (62,9)	21,8	
<i>Elevado (≥ 130)</i>	230 (37,1)	23,4	0,56
<i>HDL-c (mg/dL)</i>			
<i>Normal (≥ 40)</i>	357 (54,4)	19,3	
<i>Baixo (<40)</i>	299(45,6)	24,5	0,1
<i>Alelos</i>			
<i>G</i>	1215 (75,1)	14,8	
<i>T</i>	405 (24,9)	22,7	<0,01
<i>Genótipo</i>			
<i>GG</i>	463 (57,1)	13,4	-
<i>GT</i>	289 (35,7)	19,1	0,36
<i>TT</i>	58 (7,2)	32,7	<0,01

O alelo de menor frequência foi o T (24,9%) e as frequências genotípicas para o polimorfismo G894T foram: GG=57,1% (n=463), GT=35,7% (n=289) e TT=7,2% (n=58) (Tabela 1). A distribuição do polimorfismo no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) obteve um ($p = 0,16$) indicando que a população estudada apresenta uma situação de equilíbrio para o gene da eNOS.

Quando comparados os genótipos GG, GT e TT, as prevalências de HAS foram de, respectivamente, 13,4%, 19,1% e 32,7%. Em relação à prevalência verificada para o genótipo GG (13,4%), verificaram-se as seguintes razões de prevalência: 1,24 (0,95-1,61; $p=0,11$) para GT e 1,76 (IC95%: 1,16 – 2,67; $p<0,01$) para o genótipo TT (Tabela 2).

As alterações lipídicas e glicêmicas não se constituíram em fatores de risco significantes para a HAS. Após análise ajustada, os fatores que se associaram de forma significativa à hipertensão foram faixa etária ≥ 30 anos, residir em zona rural, escolaridade menor ou igual que oito anos, ter 3 ou mais filhos, apresentar excesso de peso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e perímetro da cintura elevado. Em relação ao genótipo GG, as RPs ajustadas para essas variáveis foram 1,24 (IC95%=0,95-1,61; $p=0,11$) para GT e 1,76 (IC95%=1,16-2,67; $p<0,01$) para TT.

Embora a razão de prevalência de hipertensão entre as mulheres portadoras do genótipo GT não tenha atingido significância estatística, condição verificada apenas para aquelas com genótipo TT, foi verificado por meio da análise de regressão múltipla que tanto mulheres com genótipo GT como as com genótipo TT tinham níveis pressóricos significativamente superiores aos observados nas mulheres de genótipo GG, mesmo após ajuste para fatores de confundimento.

Especificadamente, em relação ao genótipo GG, as mulheres que possuíam os genótipos de risco GT e TT tiveram aumentos na PAS de, respectivamente, 2,72 mmHg ($p = 0,02$) e 8,32 mmHg ($p < 0,01$). No caso da PAD esses aumentos foram de 1,79 mmHg ($p = 0,03$) para o genótipo GT e de 4,69 mmHg ($p < 0,01$) para o genótipo TT (Tabela 3)

Tabela 2 – Razões de prevalências (RP) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) ajustadas por regressão de Poisson multivariável, segundo modelo teórico hierárquico de determinação da hipertensão arterial. Mulheres do estado de Alagoas, Brasil.

VARIÁVEIS	Nível 1 RP (IC95%)	P valor	Nível 2 RP (IC95%)	P valor	Nível 3 RP (IC95%)	P valor	Nível 4 RP (IC95%)	P valor
Nível 1								
Faixa etária: ≥30 anos	2,21 (1,82 – 2,68)	<0,01	2,19 (1,80 - 2,66)	<0,01	1,91 (1,56 – 2,35)	<0,01	1,58 (1,68 – 2,51)	<0,01
Residir em zona rural	1,57 (1,18 – 2,08)	<0,01	1,58 (1,19 – 2,09)	<0,01	1,45 (1,11 – 1,93)	<0,01	1,42 (1,07 – 1,90)	0,02
Escolaridade: ≤ 8 anos	1,35 (1,01 – 1,82)	0,04	1,34 (1,01 – 1,810)	0,04	1,29 (0,97 – 1,73)	0,08	1,29 (0,97 – 1,75)	0,08
Paridade: <i>mais de três filhos</i>	0,94 (0,71 – 1,24)	0,69	*	*	*	*	*	*
Acesso a serviços de saúde: <i>SUS</i>	1,61 (0,83 – 3,11)	0,15	*	*	*	*	*	*
Insegurança alimentar	1,13 (0,83 – 1,53)	0,41	*	*	*	*	*	*
Nível 2								
Adoeceu nos últimos 15 dias	-	-	1,08 (0,84 – 1,39)	0,51	*	*	*	*
Consumo de sal adicionado	-	-	0,66 (0,42 – 1,03)	0,07	*	*	*	*
Tabagismo	-	-	1,17 (0,81 – 1,69)	0,38	*	*	*	*
Nível 3								
Excesso de peso (IMC ≥25 kg/m ²)	-	-	-	-	1,37 (1,10 – 1,71)	<0,01	1,37 (1,10 – 1,71)	<0,01
Circunferência da cintura ≥80cm	-	-	-	-	1,80 (1,08 – 2,99)	0,02	1,79 (1,07 - 2,98)	0,02
Glicose ≥ 100 mg/dL	-	-	-	-	0,92 (0,67 – 1,28)	0,64	*	*
Triglicerídeos ≥150 mg/dL	-	-	-	-	1,16 (0,88 – 1,54)	0,28	*	*
Colesterol total ≥ 190 mg/dL	-	-	-	-	0,91 (0,68 - 1,23)	0,55	*	*
Nível 4								
Genótipo								
GG	-	-	-	-	-	-	1	-
GT	-	-	-	-	-	-	1,24 (0,95 – 1,61)	0,11
TT	-	-	-	-	-	-	1,76 (1,16 – 2,67)	<0,01

Tabela 3 – Coeficientes angulares padronizados (CAP) ajustados por regressão linear multivariável, relativos aos níveis de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), segundo modelo teórico hierárquico de determinação. Mulheres do estado de Alagoas

VARIÁVEIS	Nível 1 CAP	P valor	Nível 2 CAP	P valor	Nível 3 CAP	P valor	Nível 4 CAP	P valor
PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA								
NÍVEL 1								
Faixa etária ≥30 (anos).	6,601	<0,01	6,669	<0,01	4,418	<0,01	4,744	<0,01
Residir em zona rural.	4,173	<0,01	5,001	<0,01	3,395	<0,01	4,014	<0,01
Escolaridade: ≤ 8 anos.	0,828	0,574	*	*	*	*	*	*
Paridade: <i>mais de três filhos</i> .	1,534	0,311	*	*	*	*	*	*
Acesso a serviços de saúde SUS.	2,790	0,298	*	*	*	*	*	*
Insegurança alimentar: ≥ 1.	0,136	0,928	*	*	*	*	*	*
NÍVEL 2								
Adoeceu nos últimos 15 dias	-	-	0,061	0,960	*	*	*	*
Consumo de sal adicionado	-	-	-3,123	0,051	*	*	*	*
Tabagismo	-	-	0,550	-0,202	*	*	*	*
NÍVEL 3								
Excesso de peso (IMC ≥25 kg/m ²)	-	-	-	-	3,991	<0,01	4,171	<0,01
Circunferência da cintura ≥80cm	-	-	-	-	4,681	<0,01	3,466	0,011
Glicose ≥ 100 mg/dL	-	-	-	-	2,533	0,146	*	*
Triglicerídeos ≥150 mg/dL	-	-	-	-	1,696	0,251	*	*
Colesterol total ≥ 190 mg/dL	-	-	-	-	-2,271	0,096	*	*
NÍVEL 4								
Genótipos								
GT	-	-	-	-	-	-	2,726	0,026
TT	-	-	-	-	-	-	8,320	<0,01
PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA								
NÍVEL 1								
Faixa etária ≥30 (anos).	3,413	<0,01	3,248	<0,01	1,981	<0,01	2,049	<0,01
Residir em zona rural.	3,727	0,014	2,420	0,019	1,548	0,149	1,714	0,088
Escolaridade: ≤ 8 anos.	0,607	0,530	*	*	*	*	*	*
Paridade: <i>mais de três filhos</i> .	2,026	0,041	1,950	0,028	2,368	0,016	1,659	0,054
Acesso a serviços de saúde SUS.	0,657	0,709	*	*	*	*	*	*
Insegurança alimentar: ≥ 1.	0,114	0,909	*	*	*	*	*	*
NÍVEL 2								
Adoeceu nos últimos 15 dias	-	-	0,025	0,976	*	*	*	*
Consumo de sal adicionado	-	-	-1,752	0,119	*	*	*	*
Tabagismo	-	-	-2,135	0,130	*	*	*	*
NÍVEL 3								
Excesso de peso (IMC ≥25 kg/m ²)	-	-	-	-	3,002	<0,01	2,797	<0,01
Circunferência da cintura ≥80cm	-	-	-	-	2,177	0,040	2,123	0,023
Glicose ≥ 100 mg/dL	-	-	-	-	-0,290	0,840	*	*

Triglicéridos ≥ 150 mg/dL	-	-	-	-	1,936	0,066	*	*
Colesterol total ≥ 190 mg/dL	-	-	-	-	-1,293	0,188	*	*
NÍVEL 4								
Genótipos								
GT	-	-	-	-	-	-	1,797	0,034
TT	-	-	-	-	-	-	4,694	<0,01

6 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências de que a variante polimórfica G894T do gene da eNOS está associado com maiores níveis pressóricos na população em estudo e, consequentemente, com maior prevalência de hipertensão arterial.

Desde os primeiros relatos na literatura, o NO é considerado de fundamental importância no processo regulatório da homeostasia vascular, estando os seus níveis regulados pelo gene *eNOS*. diversos polimorfismos foram estudados na tentativa de conhecer a suscetibilidade genética às doenças cardiovasculares (SAINI; BHATNAGAR; BHATTACHARJEE, 2011).

Em nosso estudo foi evidente a presença de um maior número de indivíduos homocigotos (GG) (57,2 %). Corroborando com nossos resultados, estudo realizado com a população egípcia encontrou uma maior frequência do genótipo GG (70%), em relação aos polimorfismos GT(22,9%) e TT (7,1%). Resultados semelhantes foram encontrados em populações africanas (HILLERMANN; CARELSE; GEBHARDT, 2005) (LI et al., 2004) (GAD et al., 2012).

Estudos conduzidos em população asiáticas também verificaram predominância do genótipo GG, contudo, houve quase ou, em alguns dos estudos, total ausência do genótipo TT: Coreia ($n=411$; GG: 97,6%, GT: 19,5% e TT: 0,9%)(MOON et al., 2002); Japão ($n=513$; GG: 84,4%, GT: 17,4% e TT: 0,0%) (MOON et al., 2002); Índia ($n=105$; GG: 74,3%, GT: 25,7% e TT 0%) (NISHEVITHA; ANGELINE; JEYARAJ, 2009).

Em nosso estudo encontramos associação da HAS com fatores de riscos tais como faixa etária, situação do domicílio, excesso de peso e circunferência abdominal. Diversos estudos têm evidenciado que, além de fatores hereditários, a hipertensão arterial é influenciada por diversos fatores de risco, tais como idade, sexo e etnia, excesso de peso e obesidade, consumo de álcool, sedentarismo e fatores socioeconômicos (ANDRADE et al., 2015) (PICON et al., 2013) (MALTA et al., 2015).

A prevalência de hipertensão em mulheres do estado de Alagoas foi de (21,1%) semelhante ao valor estimado para a região Nordeste (19,4%) e (24,2%) para o Brasil (IBGE—INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

Na população ora estudada foi observada que a presença do genótipo TT se associou com maior predisposição para HAS. Contudo, essas mulheres também apresentam níveis pressóricos superiores ao de mulheres com genótipo GG. No caso daquelas com genótipo GT,

a magnitude das diferenças entre as prevalências de hipertensão não atingiu diferença significativa. Contudo, tal como no genótipo TT, estas também apresentaram níveis pressóricos superiores ao genótipo de referência. Portanto, esses dados evidenciam que a presença do alelo T constitui-se em importante fator de risco para a hipertensão arterial.

Em uma recente meta-análise, envolvendo 63.258 indivíduos, ficou demonstrado que os indivíduos portadores do alelo T para o polimorfismo (G894T) do gene da eNOS possuíam risco significativo para HAS quando comparados com indivíduos portadores do alelo G (G versus T, $P < 0.00001$, OR = 0.82, 95% IC 0.76–0.89) (XIE et al., 2017).

Em outra meta-análise envolvendo 45.287 indivíduos, verificou-se que o alelo T do polimorfismo (G894T) se associou positivamente à hipertensão (odds ratio=1,20; $p=0,015$) (NIU; QI, 2011). Além da hipertensão arterial, há relatos ligando o polimorfismo (G894T) do gene da eNOS à maior ocorrência de agravos tais como hipertrofia ventricular, doença arterial coronariana e trombose venosa (RAI et al., 2014) (QIN et al., 2013).

Conforme já referido, na regressão linear verificou-se que os genótipos TT e GT se associaram a aumentos significantes nos níveis pressóricos (PAS e PAD), mesmo a após controle para vários fatores de confundimento.

Goni e colaboradores (2016) em um estudo envolvendo indivíduos caucasianos da península ibérica encontraram aumento significativo de 1.99 mmHg na PAD de indivíduos com os genótipos GT e TT quando comparados a indivíduos do genótipo GG (GONI et al., 2016).

A análise ajustada demonstrou uma interação relevante entre o IMC e o polimorfismo (G894T) investigado na modulação dos níveis das PAS e PAD. Esta observação coincide com os resultados encontrados por Abdel-Aziz et al (ABDEL-AZIZ; MOHAMED, 2013), que descreveram a associação entre a obesidade com o genótipo TT do polimorfismo (G894T), aumentando o risco de desenvolver doença arterial coronariana em população Egípcia.

Diferentes artigos revelaram que na presença de timina (T) em vez de guanina (G) na posição 894 no nucleotídeo do gene responsável pela produção da eNOS, altera uma ou mais propriedades funcionais da enzima diminuindo sua atividade catalítica e comprometendo assim a produção de NO (PERSU et al., 2002) (TESAURO et al., 2000).

Adicionalmente, foi relatado que os transportadores de alelos T têm menos eNOS ligados à caveolina-1, proteína essa essencial para a ativação da enzima e, por conseguinte, na produção de NO em células endoteliais (JOSHI et al., 2007).

Os efeitos da eNOS associados a hipertensão foram estudados em pacientes turcos por Kayhan et al. Verificou-se que o polimorfismo do gene eNOS G894T pode aumentar o risco

de hipertensão quando associado a altos níveis séricos de colesterol total (KAYHAN et al., 2013). O aumento dos níveis séricos de colesterol no sistema circulatório leva ao aumento da oxidação lipídica, resultando na elevação da pressão arterial e aumentando a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS), reduzindo a expressão da eNOS e diminuindo a produção de NO (SAWADA et al., 2008). Além disso, estresse oxidativo é um processo comum na obesidade e tem sido associado ao gene da eNOS. Estudo em modelo animal sugeriu que a redução na produção de NO leva ao aumento da EROS, contribuindo para hipertensão em ratos obesos (DA CUNHA et al., 2014).

A amostra do presente estudo corresponde a uma população etnicamente heterogênea, miscigenada a partir de indivíduos provenientes do continente europeu e africano, além dos indígenas e, portanto, com diferentes backgrounds genéticos. Desta forma, a aplicabilidade destes resultados a outras populações deve ser realizada com cautela, ou seja, definindo em até que ponto a referida população se assemelha ao perfil daquela envolvida no presente estudo.

Uma limitação deste estudo foi a não inclusão de indivíduos do sexo masculino na composição da amostra, o que impede uma compreensão mais abrangente da dinâmica da distribuição populacional do polimorfismo analisado. Nessa população, é muito difícil encontrar os homens no domicílio durante o horário comercial (8:00h às 18:00h), tornando complicado obter uma amostra representativa desses indivíduos em um estudo epidemiológico de base populacional.

7 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o genótipo TT do polimorfismo (G894T) do gene da eNOS está significativamente associado à maior prevalência de hipertensão arterial, sendo um importante fator de risco para esse agravo, principalmente quando associado a faixas etárias mais elevadas e ao excesso de peso corporal.

Considerando que o mecanismo de ação que faria com que mulheres com o genótipo GT e TT apresentem níveis pressóricos superiores envolve menor produção metabólica de óxido nítrico, os achados ora apresentados sugerem que esse polimorfismo está ligado diretamente na regulação da pressão arterial podendo o mesmo ser um importante marcador no diagnóstico da hipertensão arterial sistêmica.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, T. A.; MOHAMED, R. H. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with classical risk factors in development of premature coronary artery disease. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 4, p. 3065–3071, 2013.

ABRÃO, M. G. et al. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–982, 2005.

ANDRADE, S. S. DE A. et al. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 297–304, 2015.

APPEL, L. J. et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 16, p. 1117–1124, 1997.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 6, p. 593–601, 2004.

BATISTA, L. E.; WERNECK, J.; LOPES, F. **Saúde da População Negra**. 2. ed. rev ed. Brasília - DF: Associação Brasileira de Pesquisadores Negros, 2012.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. C1424–C1437, 1996.

BERNIER, S. G.; HALDAR, S.; MICHEL, T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 30707–30715, 2000.

BOO, Y. C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 285, n. 3, p. C499–C508, 2003.

BRANDÃO, A. A. et al. BLOOD PRESSURE AND OVERWEIGHT IN ADOLESCENCE AND THEIR ASSOCIATION WITH INSULIN RESISTANCE AND METABOLIC SYNDROME AFTER A 10 YEARS-PERIOD IN A BRAZILIAN YOUNG POPULATION. THE RIO DE JANEIRO STUDY: OP 099. **Journal of Hypertension**, v. 22, p. S111, 2004.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 22, p. 9030–9033, 1989.

CAMINHA, T. C. S. et al. Waist-to-height ratio is the best anthropometric predictor of hypertension: A population-based study with women from a state of northeast of Brazil. **Medicine**, v. 96, n. 2, 2017.

CERIELLO, A.; TESTA, R.; GENOVESE, S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 4, p. 285–292, 2016.

CESARINO, C. B. et al. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto-SP. **Arq Bras Cardiol**, v. 91, n. 1, p. 31–35, 2008.

CHAKRAVARTI, A. Single nucleotide polymorphisms:... to a future of genetic medicine. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 822–823, 2001.

CHANG, K. et al. The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm. **Coronary artery disease**, v. 14, n. 4, p. 293–299, 2003.

CHEN, W. et al. Nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) influences arterial stiffness in adults: the Bogalusa Heart Study. **American journal of hypertension**, v. 17, n. 7, p. 553–559, 2004.

CHOBANIAN, A. V et al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206–

1252, 2003.

CONEN, D. et al. Socioeconomic status, blood pressure progression, and incident hypertension in a prospective cohort of female health professionals. **European heart journal**, p. ehp072, 2009.

DA CUNHA, N. V. et al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 10, p. H1472-80, 2014.

DE OLIVEIRA, C. M. et al. Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study. **BMC medical genetics**, v. 9, n. 1, p. 1, 2008.

DO ROSÁRIO, T. M. et al. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres-MT. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 6, p. 672–678, 2009.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435–450, 2003.

EHRET, G. B. et al. **The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals**. NIH Public Access, , 2016.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708–1714, 2006.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GAD, M. Z. et al. Endothelial nitric oxide synthase (G894T) gene polymorphism in a random sample of the Egyptian population: comparison with myocardial infarction patients. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 16, n. 7, p. 695–700, 2012.

GAMBOA, A. et al. Contribution of endothelial nitric oxide to blood pressure in humans. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 170–177, 2007.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular research**, v. 55, n. 2, p. 250–260, 2002.

GONI, L. et al. Influence of fat intake and BMI on the association of rs1799983 NOS3 polymorphism with blood pressure levels in an Iberian population. **European journal of nutrition**, p. 1–8, 2016.

GORCHAKOVA, O. et al. Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement. **European heart journal**, v. 24, n. 9, p. 820–827, 2003.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. **Journal of human hypertension**, v. 23, n. 6, p. 363–384, 2009.

HILLERMANN, R.; CARELSE, K.; GEBHARDT, G. S. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. **Journal of human genetics**, v. 50, n. 8, p. 415–419, 2005.

HINGORANI, A. D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation**, v. 100, n. 14, p. 1515–1520, 1999.

HUANG, P. L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 377, n. 6546, p. 239–242, 1995.

IBGE. **Censo Demográfico**, 2010.

IBGE—INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Sa_ude 2013 [Health National Survey 2013]. Prcepção do estado de sa_ude, estilos de vida e doenças crônicas**. [s.l: s.n.].

IGNARO, L. J. **Role of nitric oxide in cardiovascular dis eases**. 5th International Meeting on Nitric Oxide «Nitric Oxide and its role in cardiovascular diseases»—Paris. **Anais...**2007

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

JOSHI, M. S. et al. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 11, p. 2655–2663, 2007.

KARANTZOULIS-FEGARAS, F. et al. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 3076–3093, 1999.

KAYHAN, F. E. et al. Prevalence of endothelial nitric oxide synthase E298D polymorphism in Turkish patients with essential hypertension. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 7, n. 1, p. 12–16, 2013.

KNOWLES, R. G. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 13, p. 5159–5162, 1989.

LAWES, C. M. M.; VANDER HOORN, S.; RODGERS, A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. **The Lancet**, v. 371, n. 9623, p. 1513–1518, 2008.

LESSA, I. Epidemiologia insuficiência cardíaca e da hipertensão arterial sistêmica no Brasil. **Rev Bras de Hipertensão**, v. 8, p. 383–392, 2001.

LI, R. et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. **American journal of hypertension**, v. 17, n. 7, p. 560–567, 2004.

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2224–2260, 2013.

LIMA E COSTA, M. F. F. et al. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira:

um estudo da mortalidade e das internações hospitalares públicas. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 9, n. 1, p. 43–50, 2000.

MALTA, D. C. et al. Brazilian lifestyles: National Health Survey results, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 217–226, 2015.

MARÇAL PIMENTA, A.; GAZZINELLI, A.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalência da síndrome metabólica e seus fatores associados em área rural de Minas Gerais (MG, Brasil). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 7, 2011.

MARIETTA, M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927–930, 1994.

MARLETTA, M. A. et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, n. 24, p. 8706–8711, 1988.

MARLETTA, M. A. **Nitric oxide synthase structure and mechanism**. [s.l.] ASBMB, 1993.

MARLETTA, M. A.; MARIETTA, M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927–930, 1994.

MARSDEN, P. A. et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 23, p. 17478–17488, 1993.

MARTIN, S. S. et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. **Jama**, v. 310, n. 19, p. 2061–2068, 2013.

MARTINEZ, M. C.; LATORRE, M. DO R. D. DE. Fatores de risco para hipertensão arterial e diabete melito em trabalhadores de empresa metalúrgica e siderúrgica. **Arq. bras. cardiol**, v. 87, n. 4, p. 471–479, 2006.

MATSUDO, S. et al. Questionário Internacional De Atividade Física (Ipaq): Estupo De Validade E Reprodutibilidade No Brasil. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v.

6, n. 2, p. 5–18, 2012.

MICHEL, T.; LI, G. K.; BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 13, p. 6252–6256, 1993.

MIYAMOTO, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 3–8, 1998.

MOBLEY, L. R. et al. Environment, obesity, and cardiovascular disease risk in low-income women. **American journal of preventive medicine**, v. 30, n. 4, p. 327–332, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2495–2501, 1988.

MOON, J. et al. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. **Thrombosis research**, v. 107, n. 3, p. 129–134, 2002.

NAVA, E.; LÜSCHER, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **Journal of Hypertension**, v. 13, p. S39–S48, 1995.

NISHEVITHA, N. S.; ANGELINE, T.; JEYARAJ, N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298→ Asp polymorphism (G894T) among south Indians. **Indian J Med Res**, v. 129, n. 1, p. 68–71, 2009.

NIU, W.; QI, Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24266, 2011.

OTANI, H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 8, p. 1913–1928, 2009.

PERSU, A. et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease.

Human molecular genetics, v. 11, n. 3, p. 229–241, 2002.

PICCOLI, J. DA C. E. et al. Interaction between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (– 786T> C, 894G> T and intron 4 a/b) and cardiovascular risk factors in acute coronary syndromes. **Archives of medical research**, v. 43, n. 3, p. 205–211, 2012.

PICON, R. V et al. Prevalence of hypertension among elderly persons in urban Brazil: a systematic review with meta-analysis. **American journal of hypertension**, v. 26, n. 4, p. 541–548, 2013.

QIAN, J.; FULTON, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 347, 2013.

QIN, J. et al. Genetic polymorphism of NOS3 with susceptibility to deep vein thrombosis after orthopedic surgery: a case-control study in Chinese Han population. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e70033, 2013.

RAI, H. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e113363, 2014.

RODRIGUES, P. R. M. et al. Viabilidade do uso de pergunta simplificada na avaliação da qualidade da dieta de adolescentes. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1565–1578, 2017.

SAINI, V.; BHATNAGAR, M. K.; BHATTACHARJEE, J. Association of endothelial dysfunction with endothelin, nitric oxide and eNOS Glu298Asp gene polymorphism in coronary artery disease. **Disease markers**, v. 31, n. 4, p. 215–222, 2011.

SAWADA, T. et al. Relation of the Glu298Asp polymorphism of the nitric oxide synthase gene to hypertension and serum cholesterol in Japanese workers. **Preventive medicine**, v. 47, n. 2, p. 167–171, 2008.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Gênero, idade, nível social e fatores de risco cardiovascular:

considerações sobre a realidade brasileira. **Diabetes**, v. 24, n. 20, p. 0–26, 2009.

SEARLES, C. D. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 291, n. 5, p. C803–C816, 2006.

SEGALL-CORRÊA, A. M. et al. Refinement of the Brazilian Household Food Insecurity Measurement Scale: Recommendation for a 14-item EBIA. **Revista de Nutrição**, v. 27, n. 2, p. 241–251, 2014.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Sci Am**, v. 266, n. 5, p. 68–71, 1992.

SOUSA, A. C. et al. Synergistic Association of Genetic Variants with Environmental Risk Factors in Susceptibility to Essential Hypertension. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, 2017.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 37, n. 1, p. 339–359, 1997.

STURMER, G. et al. Non-pharmacological management of hypertension in Southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1727–1737, 2006.

SURENDRAN, P. et al. **Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension.** Europe PMC Funders, , 2016.

TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2832–2835, 2000.

THOMAS, G. D.; ZHANG, W.; VICTOR, R. G. Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. **Jama**, v. 285, n. 16, p. 2055–2057, 2001.

VÁSQUEZ-VIVAR, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9220–9225, 1998.

VASTA, V. et al. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 206, n. 3, p. 878–884, 1995.

WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Molecular genetics and metabolism**, v. 70, n. 4, p. 241–251, 2000.

WEBER, M. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community. **The journal of clinical hypertension**, v. 16, n. 1, p. 14–26, 2014.

WENNMALM, Å. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **Journal of internal medicine**, v. 235, n. 4, p. 317–327, 1994.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organization technical report series**, v. 894, p. i–xii, 1–253, 2000.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1430–1442, 2000.

XIE, X. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene single nucleotide polymorphisms and the risk of hypertension : A meta-analysis involving 63 , 258 subjects. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 175–182, 2017.

ZHANG, C. et al. Common variants of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary heart disease among US diabetic men. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2140–2147, 2006.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde).

Eu, _____, tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa **2º DIAGNÓSTICO DE SAÚDE DA POPULAÇÃO MATERNO-INFANTIL DE ALAGOAS**, recebi do Prof. HAROLDO DA SILVA FERREIRA, da Faculdade de Nutrição da

UFAL, responsável por sua execução, ou por alguém de sua equipe, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a investigar as condições de nutrição e saúde de mães e crianças residentes no estado de Alagoas, visando possibilitar o planejamento de ações de promoção da saúde;
- Que os principais resultados que se desejam alcançar são os seguintes:
 - Conhecer o estado nutricional da população;
 - Saber quais as principais doenças que acometem essas pessoas;
 - Investigar se as mães sofrem de hipertensão, colesterol alto, diabetes e excesso de gordura no sangue;
 - Caracterizar a população em relação às condições socioeconômicas, educacionais, de habitação, se tem água tratada em casa e qual o destino do lixo e dejetos;
 - Conhecer a população quanto à utilização de serviços de saúde (atenção pré e perinatal, posse e utilização do cartão da criança, atualização do calendário de vacinas, assistência médica), se estão recebendo remédio para tratar a anemia e a hipovitaminose A, bem como a participação em programas de segurança alimentar.
- Que para a realização deste estudo os pesquisadores visitarão minha residência para fazer perguntas sobre alimentação, condições socioeconômicas e de saúde, além de pesar, medir, verificar a pressão arterial e tirar uma gota de sangue da ponta do dedo das crianças e gestantes para exame de anemia e das mulheres de 18 a 50 anos para dosagem da glicose, colesterol e triglicérides (gordura do sangue); Adicionalmente, essas mulheres serão pesquisadas em relação à quantidade de gordura que tem no corpo. Isto será feito utilizando-se um equipamento chamado de bioimpedância. Para isso, basta que a pessoa examinada o segure com as duas mãos que, em 5 segundos, se saberá o resultado.
- Que responder essas perguntas, furar o dedo para tirar sangue e se submeter aos demais exames informados acima serão os incômodos que poderei sentir com a minha participação/autorização;
- Que, sempre que eu quiser, serão fornecidas explicações sobre cada uma das partes do estudo.
- Que, a qualquer momento, poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer prejuízo ou problema;
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão minha identificação, nem de qualquer membro da minha família, exceto aos responsáveis pelo estudo.

Finalmente, tendo eu entendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação e a das pessoas sob minha responsabilidade nesse trabalho e sabendo dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO

SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADA OU OBRIGADA.

Cadastro do(a) voluntário(a): _____

Contato de urgência: Prof. Dr. Haroldo da Silva Ferreira. Telefone: 0(xx)82-9381-2731.

Endereço do responsável pela pesquisa: Prof. Dr. Haroldo da Silva Ferreira

Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas

Br 101 Norte, S/nº, Tabuleiro dos Martins, 57072-970 - Maceió. Telefones: 3214-1160

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade

Federal de Alagoas: Prédio da Reitoria, sala do C.O.C., Campus A. C. Simões, Cidade Universitária. Telefone: 3214-1053

_____, _____ de _____ de 2014

Assinatura ou impressão digital do(a) voluntário(a)	Assinatura do pesquisador responsável

APÊNDICE B - Formulário de cadastro familiar e antropometria

N.º	1. NOME	2. R E L A Ç A O	3. S E X O M F	4. E L E G Í V E L	5. I D A D E	6. R A Ç A C O R (R E F E R I D A)	7. E S C O L A	8. C O N D I Ç Ã O D O T R A B A L H O	REND A MENS AL (Pensã o, BF, Benefí cio).	9. ANTROPOMETRIA					Hb		
										Peso (Kg)	Altura (cm)	BIA	CIRCUNFERÊNCIAS (cm)				
													Ca beç a	P e s c o ç o		C i n t u r a	Q u a d r il
01		Chefe															
02																	
03																	
04																	
05																	
06																	
07																	
08																	
09																	
10																	

ESTIMATIVA DA RENDA (per capita/salário mínimo): () Até ½ () Mais de ½ a 1 () Mais de 1 a 2 () Mais de 2

* incluir renda do Bolsa Família ou quaisquer outros programas

2. RELAÇÃO COM O CHEFE DA FAMÍLIA	4. ELEGÍVEL	6. RAÇA/COR (autorreferida)	8. CONDIÇÃO DO TRABALHO	9. ANTROPOMETRIA
1. Chefe; 2. Cônjuge 3. Filho(A); 4. Filho Adotivo 5. Outro Parente: _____ 6. Agregado; 7. Pensionista 8. Empregado Doméstico.	(G) = Gestante; (C2) = Criança < 2 anos. (C5) = Criança 2-5 anos (E) = Escolar (5,1 a 10 anos) (M) = Mulheres (20 a < 50)	1- Cor Branca 2- Cor Preta 3- Cor Parda (morena) 4- Cor Amarela 5- Raça/etnia Indígena	0. Não trabalha 1. Empregado com carteira 2. Funcionário público 3. Empregado sem carteira 4. Desempregado 5. Biscateiro 6. Autônomo 7. Aposentado/ pensionista 8. Criança/estudante 9. Bolsa família	Peso e altura: todos elegíveis BIA – mulheres 20 a < 50 anos Circunferências (todas): mulheres 20 a < 50 anos Circunferência da cabeça: todos os elegíveis.

ESCOLARIDADE E RAÇA DEVEM SER OBTIDAS PARA O CHEFE, MÃES DE LACTENTES, PRÉ-ESCOLARES E ESCOLARES E MULHERES ≥ 20 a < 50 anos.														
Nenhuma		Ensino fundamental [(primário + ginásio) ou 1º grau]						Ensino médio (científico/ pedagógico/ 2º grau...)			Ensino superior		IGN	
0	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	1ª	2ª	3ª	Incompleto	Completo	IGN
00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	99

APÊNDICE C - Formulário de caracterização demográfica, socioeconômica e ambiental

1. **Tipo de moradia (predominante):** CASA |__|
(1) Alvenaria (2) Taipa (3) Madeira (4) Palha/Papelão/Lona/Plástico
2. **Regime de ocupação:** OCUP |__|
(1) Própria (2) Financiada (3) Cedida (4) Alugada (5) Ocupada/Invasão
3. **Número de cômodos na casa?** _____ CMDTOTAL |__|
4. **Quantos estão servindo de dormitório (quarto)?** _____ CMDORME |__|
5. **Origem da água que abastece o domicílio?** ORIGAGUA |__|
(1) Rede geral de distribuição (2) Poço, cacimba ou nascente (3) Outro meio.
6. **Origem da água usada para beber?** AGUABEBE |__|
(1) Rede geral de distribuição (2) Poço, cacimba ou nascente (3) Mineral
(4) Outro meio: _____.
7. **Essa água recebe algum tipo de tratamento em sua casa antes de ser consumida?** AGUATRAT |__|
(1) Adequada (2) Inadequada (88) NSA
8. **Onde é colocado o lixo de sua casa?** (1) Coleta pública (2) Outro meio LIXO |__|
9. **Condição da rua:** (1) Asfaltada/pavimentada (2) Terra/cascalho RUA |__|

“AGORA, VOU FAZER PERGUNTAS SOBRE O QUE TEM EM SUA CASA E A QUANTIDADE...”

A senhora tem <item> aqui em sua casa? (Se SIM, quantos?).

- | | | |
|--|---------------------------|--------------|
| Televisão em cores?
quantas? | () Não () Sim, | TV __ |
| Rádio? | () Não () Sim, quantos? | RADIO __ |
| Banheiro? (somente com vaso sanitário) | () Não () Sim, quantos? | BANHEIRO __ |
| Carro? (Não considerar veículo de trabalho) | () Não () Sim, quantos? | CARRO __ |
| Empregada(o) fixa na residência | () Não () Sim, quantos? | EMPREGAD __ |
| Máquina de lavar (Não considerar tanquinho elétrico)
quantas? | () Não () Sim, | MAQLAV __ |
| Vídeo Cassete? | () Não () Sim, quantos? | VIDEOC __ |
| Geladeira? | () Não () Sim, quantos? | GELAD __ |
| Freezer? (Independente ou parte da geladeira duplex)
quantos? | () Não () Sim, | FREEZER __ |
| Microcomputador? | () Não () Sim, quantos? | MICROCMP __ |
| Lava louça? | () Não () Sim, quantos? | LAVALOU __ |
| Micro-ondas? | () Não () Sim, quantos? | MICROON __ |
| Motocicleta? | () Não () Sim, quantos? | MOTOC __ |
| Secadora de roupa? | () Não () Sim, quantos? | SECROUPA __ |
| DVD? | () Não () Sim, quantos? | DVD __ |

10. Alguém da família é beneficiário de algum programa do governo (Programa do leite, bolsa família, Projovem, PETI, PRONATEC)? COMPLEM |__|
(1) Sim: _____ (2) Não

APÊNDICE D - Formulário de caracterização da saúde da mulher

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Número de ordem da mulher no cadastro da família (Conferir no form 2): | ORDEM __ __ |
| 2. A senhora já ficou grávida? (1) Sim (2) Não | MAENTR __ |
| 3. A entrevistada é mãe de menor de 10 anos? (1) Sim (2) Não | MAEMENOR __ |
| 4. Com que idade a senhora teve a sua primeira menstruação? ____ anos | MNARCA1 __ __ |
| 5. Com que idade ficou grávida pela primeira vez ainda que a criança não tenha conseguido nascer? ____ anos (88) NSA | IDIGRAVI __ __ |
| 6. Com que idade teve seu primeiro filho? ____ anos | FILHO1 __ __ |
| 7. Quantos filhos a senhora já teve? | FILHOS __ __ |
| 8. A senhora já perdeu algum filho por falecimento ou aborto? (1) Sim; (2) Não | ABORTO __ |
| 9. SE SIM: Quantos casos de aborto ou falecimento? 01, 02, 03, n... (88) NSA | EVENTOS __ __ |
| 10. A senhora poderia explicar a idade deles: | |

O código é o número de casos relatados: 00; 01; 02..n. (88) Não se aplica	Isso ocorreu o ano passado (2013)? (1) Sim (2) Não (8) NSA
Só perguntar "Nº de casos" se a resposta for SIM	
Natimorto (> 28 semanas/7 meses ou 1 Kg): _____	NTMORTO __ __ Nº de casos? __
Mortalidade infantil: _____ (de 0 a 12 meses)	MORTINF __ __ Nº de casos? __
Mortalidade acima de 12 meses: _____	MORTPOS __ __ Nº de casos? __
Aborto _____ (antes do 6º mês de gestação)	ABORTO __ __ Nº de casos? __

- | | |
|---|-----------------------|
| 11. A senhora teve algum problema de saúde nos últimos 15 dias?
(1) Sim (2) Não SE NÃO, pule para 13 | MORBREF __ |
| 12. SE SIM , qual? (1) Virose (2) Diarreia (3) Infecção respiratória (4) Infecção do trato urinário (5) DST (6) Outra _____ (88)NSA | GMORBRF __ __ |
| 13. Quando a senhora está doente e precisa de atendimento, para onde vai?
(1) Serviço público; (2) Serviço privado; (3) Rezadeira; (4) Não vai; (5) Nunca precisou; (6) Outro; (99) Não sabe | SERV __ __ |
| 14. A senhora fuma atualmente ou já foi fumante?
(1) Fumante; (2) Ex-fumante; (3) Nunca fumou | FUMAMAE __ |
| 15. A senhora toma bebida alcoólica? (1) Sim (2) Não | BEBEMAE __ |
| 16. SE SIM , qual a frequência?
(1) Quase todo dia (2) Finais de semana; (3) Socialmente (festas, passeios, etc); (88) NSA | FREQBEBE __ |
| 17. Neste momento a senhora está ou deveria está tomando algum medicamento? (1) Sim, está tomando (2) Sim deveria está tomando, mas não toma (3) Não | REMEDMAE __ |
| 18. SE SIM , Qual o tipo de medicamento? REMEUSO _____ | |
| 19. Algum parente de sangue da senhora tem/teve pressão alta?
(1) Sim (2) Não (99) Não sabe | PAFAMIL __ |

PRESSÃO ARTERIAL: (PAS x PAD)

1ª medida	__	__	__	x	__	__	__
2ª medida	__	__	__	x	__	__	__
3ª medida	__	__	__	x	__	__	__

APÊNDICE E - Formulário do Self Report Questionnaire (SRQ - 20)

As próximas perguntas são a respeito de certas dores ou problemas que a senhora pode ter tido nos últimos 30 dias. Se a senhora acha que a pergunta corresponde ao que a senhora vem sentindo nos últimos 30 dias responda SIM, mas se achar que não corresponde, responda NÃO.

Por favor não discuta as perguntas enquanto estiver respondendo. Se não tiver certeza sobre algumas delas, responda SIM ou NÃO como lhe parecer melhor.

Nós garantimos que ninguém ficará sabendo suas respostas.

CÓDIGOS ● MARQUE UM “X” NO ESPAÇO CORRESPONDENTE	NÃO	SIM
A senhora tem dores de cabeça frequentemente?		
Tem falta de apetite?		
Dorme mal?		
Assusta-se com facilidade?		
Tem tremores nas mãos?		
Sente-se nervosa, tensa ou preocupada?		
Tem má digestão?		
Tem dificuldade de pensar com clareza?		
Tem se sentido triste ultimamente?		
Tem chorado mais do que de costume?		
Encontra dificuldade em realizar com satisfação suas atividades do dia-a-dia?		
Tem dificuldade em tomar decisões?		
Tem dificuldade no trabalho (seu trabalho é penoso, lhe causa sofrimento?)		
É incapaz de desempenhar um papel útil em sua vida?		
Tem perdido o interesse pelas coisas?		
A senhora se sente uma pessoa inútil, sem préstimo?		
Tem tido a ideia de acabar com a própria vida?		
Sente-se cansada o tempo todo?		
Tem sensações desagradáveis no estômago?		
A senhora se cansa com facilidade?		
SOMATÓRIO (TOTAL DE RESPOSTAS POSITIVAS)		

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió - AL, 10/12/2012

Senhor (a) Pesquisador (a), Haroldo da Silva Ferreira
Monica Lopes de Assumpção
Tema Maria de Menezes Toledo Florêncio
Bernardo Lessa Horta

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) 07/12/2012, em e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 09093012.0.0000.5013 sob o título, **II Diagnóstico de Saúde da População Materno-Infantil do Estado de Alagoas**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

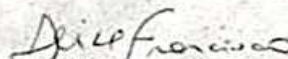
Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais.

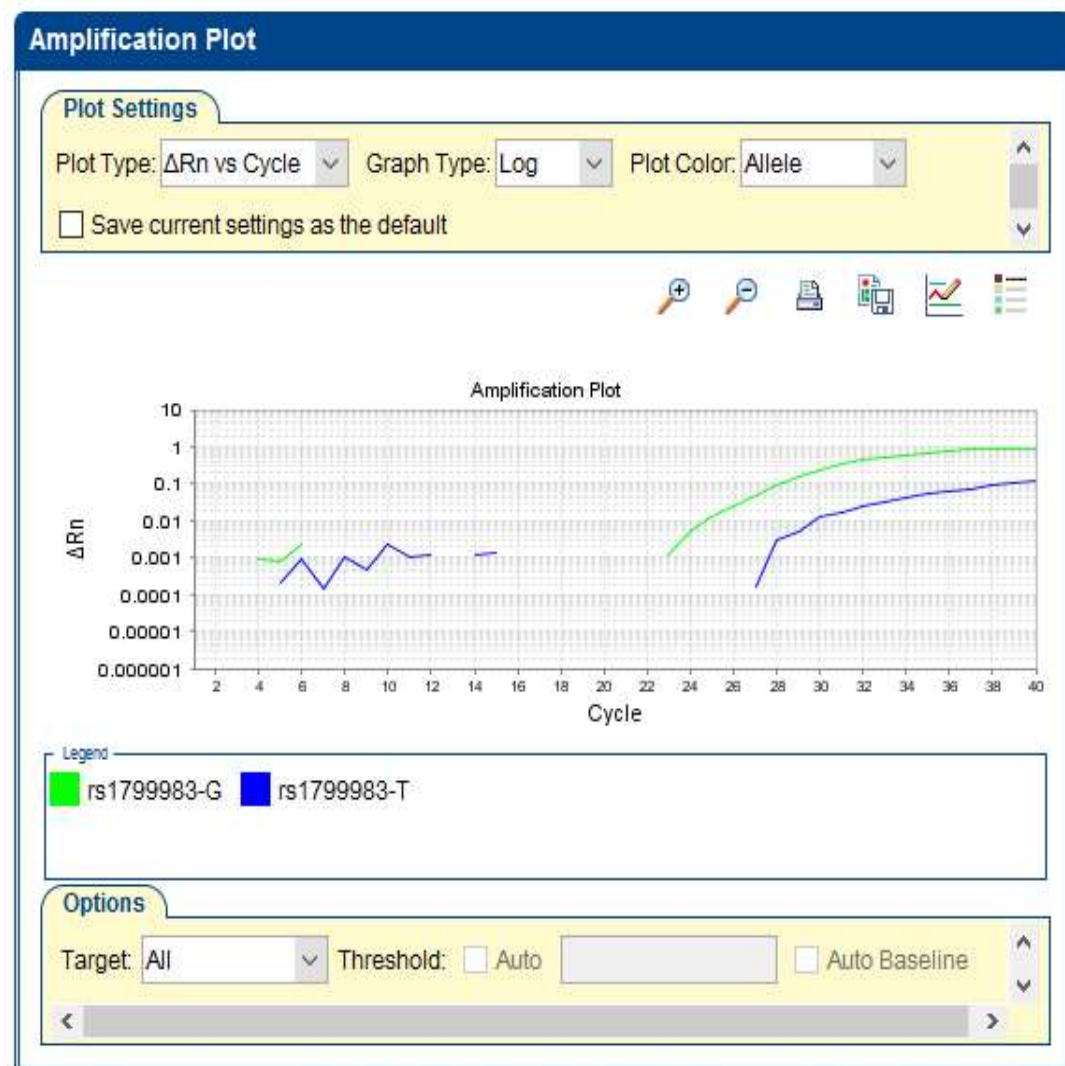
Válido até Dezembro de 2013.


Prof.^a Dileza Francisco
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa -UFAL

ANEXO B – Gráficos e Resultados do StepOnePlus™ Real-Time PCR System
(AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

Genótipo GG

Experiment: **box1rs1799983** Type: **Genotyping**



Analysis Summary: Total Wells in Plate: 96 Wells Set Up: 68 Wells Omitted Manually: 2

Genótipo GT

Experiment: **box11rs179983**

Type: **Genotyping**

Amplification Plot

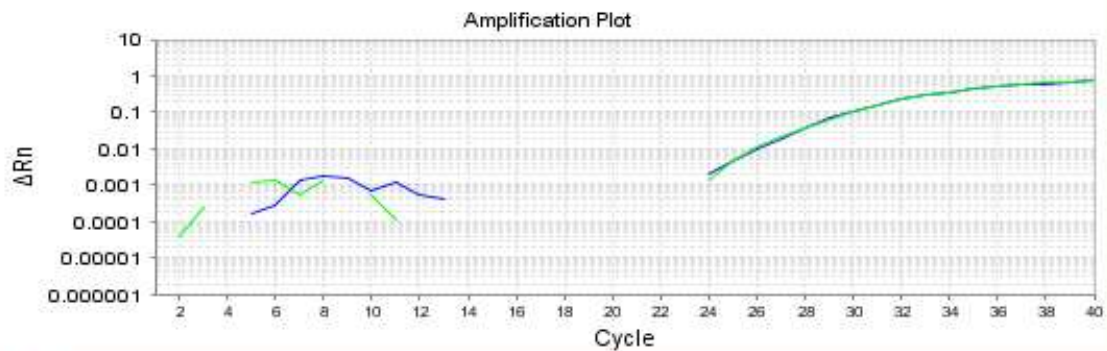
Plot Settings

Plot Type: ΔRn vs Cycle

Graph Type: Log

Plot Color: Allele

Save current settings as the default



Legend

rs1799983-G rs1799983-T

Options

Target: All

Threshold: Auto

Auto Baseline

Analysis Summary:

Total Wells in Plate: 96

Wells Set Up: 68

Wells Omitted Manually: 2

Genótipo TT

Experiment: **box11rs1799983**

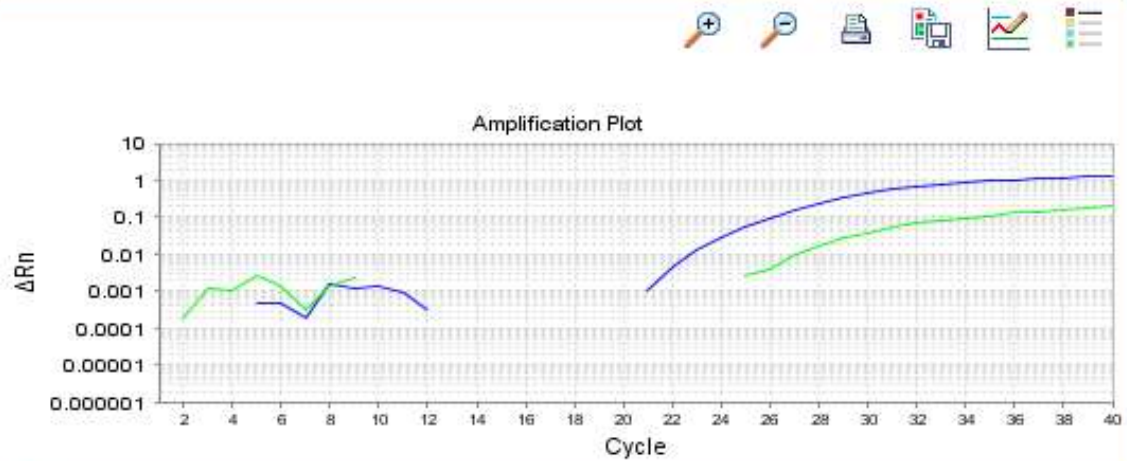
Type: **Genotyping**

Amplification Plot

Plot Settings

Plot Type: ΔRn vs Cycle Graph Type: Log Plot Color: Allele

Save current settings as the default



Legend

■ rs1799983-G ■ rs1799983-T

Options

Target: All Threshold: Auto Auto Baseline

Analysis Summary:

Total Wells in Plate: 96

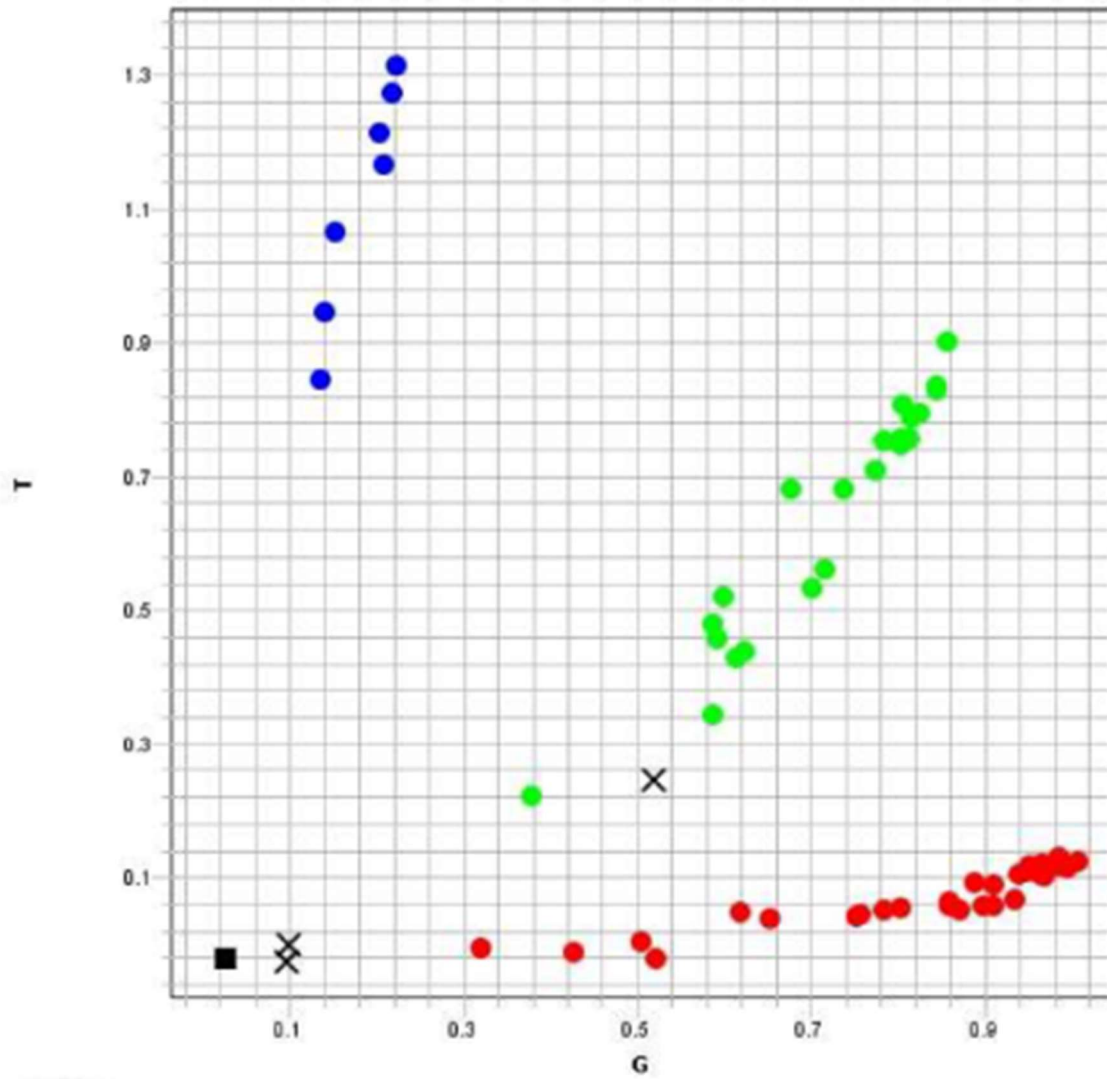
Wells Set Up: 68

Wells Omitted Manually: 2

Gráfico de distribuição Alélica

Allelic Discrimination Plot

Allelic Discrimination Plot (SNP Assay: rs1799983)



Legend

- Homozygous G/G
- Homozygous T/T
- Heterozygous G/T
- × Undetermined

ARTIGO SUBMETIDO

Word counts

Abstract: 232 words

Text: 2955 words

Number of references:39

Number of figures: 1

Number of tables: 3

**PREVALENCE OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (ENOS) GENE
G894T POLYMORPHISM AND ITS ASSOCIATION WITH HYPERTENSION: A
POPULATION-BASED STUDY WITH BRAZILIAN WOMEN**

Running head: Hypertension according to G894T polymorphism

Faculty of Nutrition

Federal University of Alagoas

Campus A. C. Simões, Avenida Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, 57072-900, Maceió, AL, Brazil

A. B. LIRA NETO

Postgraduate Program in Health Sciences of the Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas
abel.neto@arapiraca.ufal.br

M. C. O. FARIAS

Postgraduate Program in Nutrition of the Faculty of Nutrition. Federal University of Alagoas
myrlafarias@gmail.com

N. B. R. VASCONCELOS

Faculty of Nutrition. Federal University of Alagoas
nancymedvet@hotmail.com

A. F. XAVIER JUNIOR

Postgraduate Program in Health Sciences of the Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas
antoniofernando_jr@yahoo.com.br

T. G. ANDRADE

Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas.
deandrade.tiago@gmail.com

M. L. ASSUNÇÃO

Faculty of Nutrition, Federal University of Alagoas.
monica.lopesassuncao@gmail.com

H. S. FERREIRA

Faculty of Nutrition, Federal University of Alagoas.
Campus A.C. Simões – BR 104 Norte – Km 96.7 – Tabuleiro do Martins, 57072-970 – Maceió – AL – Brazil
haroldo.ufal@gmail.com

Author for correspondence: **HAROLDO DA SILVA FERREIRA**

Av. Pilar, 550, Cruz das Almas, 57038-430 – Maceió – Alagoas – Brazil

Email: haroldo.ufal@gmail.com

Phone number: 55 82 98853-8243

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Keywords: Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Hypertension.

Prevalence of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene G894T polymorphism and its association with hypertension: a population-based study with Brazilian women

ABSTRACT

BACKGROUND: Hypertension is one of the most prevalent diseases in the world, accounting for millions of deaths each year. The reduction in the concentration of nitric oxide (NO) produced by the catalysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is associated with higher blood pressure (BP) levels. This reduction might be because of genetic polymorphisms. This study investigated the prevalence of the eNOS gene G894T polymorphism in women from northeast Brazil and its association with hypertension.

METHODS: This cross-sectional study included 810 women (aged 20-49 years). Sociodemographic, health, anthropometric, and BP data were collected. Hypertension was defined according to the following criteria: systolic BP \geq 140 mmHg, diastolic BP \geq 90 mmHg, the regular use of antihypertensive medication, or some combination therein. Epithelial cells from the cheek mucosa were obtained for DNA extraction. Genotyping was performed via real-time PCR. The measure of association was the prevalence ratio (PR) and its 95% CI as calculated via Poisson regression.

RESULTS: The frequencies of the *GG*, *GT*, and *TT* genotypes were 57.1%, 35.7%, and 7.2%, respectively. For each of these genotypes, the prevalence of hypertension in women was 17.9%, 23.6%, and 34.4%, respectively. Relative to the *GG* genotype, the PRs after adjusting for confounding factors were 1.24 (95%CI=0.95-1.61, $p=0.11$) for *GT* and 1.76 (95%CI=1.16-2.67, $p<0.01$) for *TT*.

CONCLUSIONS: The *T* allele of the G894T polymorphisms is associated with hypertension in women. This may have implications for prevention and treatment.

INTRODUCTION

Hypertension is one of the most prevalent diseases in the world, accounting for 9.4 million deaths each year (Lim *et al.*, 2012). This condition is often associated with metabolic disorders as well as functional and structural alterations of target organs. Furthermore, it is aggravated by the presence of other risk factors such as dyslipidemia, abdominal obesity, glucose intolerance, and diabetes (Weber *et al.*, 2014).

Because of its high prevalence and multifactorial etiology, it is important to understand the dynamics of the risk factors associated with hypertension, especially the hereditary component, which might explain approximately 45% of all cases of high blood pressure (BP) (Surendran *et al.*, 2016). Thus, research interest regarding the identification of the genetic polymorphisms associated with hypertension has grown (Ehret *et al.*, 2016). These polymorphic differences include those of the gene of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme, which is involved in the production of nitric oxide (NO) from the oxidation of L-arginine. NO is a free radical that acts in the vasodilation process and regulation of vascular tone (Gamboa *et al.*, 2007; Otani, 2009).

In knockout animal models in which genetic manipulation was performed to inhibit the expression of the eNOS gene (eNOS-KO), an increase in BP levels was observed, demonstrating the importance of NO in the regulation of blood pressure (Huang *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2001).

In addition to BP control, NO is also related to lipid metabolism via the inhibition of LDL oxidation and the platelet aggregation resulting from this oxidation (Qian, J. e Fulton, D., 2013). Thus, NO is an important protective factor against the progression of cardiovascular diseases (Naseem, 2005).

Of the polymorphisms associated with the eNOS gene, G894T is the most scientifically

relevant because it has been recognized as an important risk factor regarding the increase of BP levels and the occurrence of other diseases such as coronary artery disease, vascular diseases, acute myocardial infarction, metabolic syndrome, and type 2 diabetes (Miyamoto *et al.*, 1998). A recent study of individuals from the Iberian Peninsula found an association between this polymorphic variant and systemic hypertension (Goni *et al.*, 2017).

Therefore, the G894T polymorphism, by directly influencing eNOS gene expression, is an important biomarker for the development of hypertension (Qian, J. e Fulton, D., 2013). However, no studies have described the distribution and association of the G894T polymorphism with regard to hypertension in women from northeast Brazil, a region characterized by greater social vulnerability and (in relation to the South/Southeast regions) the worst social indicators in the country. This investigation is important because gene expression can be strongly influenced by environmental factors (Sousa, A. C. *et al.*, 2017).

In addition to the environmental question, hypertension has different effects according to sex, as noted by the National Health Survey in 2013 that observed a higher prevalence of hypertension among women (24.2% vs. 18.3%) (Andrade, S. S. A. *et al.*, 2015).

The present study sought to characterize the distribution of the G894T polymorphism of the eNOS gene in a population of women from northeast Brazil and investigate its association with hypertension.

METHODS

This is a cross-sectional study involving a representative sample of the women from Alagoas, a state in northeastern Brazil, with a population of 3,037,103 million inhabitants (Costa *et al.*, 2017).

For the sample size calculation, the variable of interest was hypertension, whose prevalence in Brazilian adults was estimated to be 23.3% (Pimenta *et al.*, 2011). Given a

population of 718,493 women, a sample error of 3.0%, and a confidence interval (CI) of 95%, the study would require a sample of 762 women. To cover any potential sample losses, an additional 10% was added to this number. Thus, the planned sample was 838 women. The calculations were performed using the StatCalc module of Epi Info 7.1.4. (CDC, Atlanta, USA).

To attain the required number of women, a multiple stage process was adopted across four steps. In the first stage, 30 of the 102 municipalities in Alagoas were selected via random sampling with a probability proportional to the number of inhabitants. Because of its larger population, Arapiraca was selected twice, and Maceió, the state capital, which contains a third of the population of Alagoas, was sampled ten times. In the second step, four census tracts per municipality were chosen via a simple drawing, respecting the proportion between urban and rural sectors. For the cities of Maceió and Arapiraca, the census sectors were organized in a list, and the drawing was performed using systematic sampling. In the third step, one block in each census tract was randomly selected; finally (step 4), a starting point (i.e., a corner) in each block was randomly chosen, from which seven consecutive households were visited moving in a counterclockwise direction. Women aged 20 to 49 years old who resided in the selected households were eligible for this study.

Dependent variable

The dependent variable was systemic hypertension. BP was measured in duplicate, with the individual seated after 15 minutes of rest using Omron® HEM-7113 digital BP monitors (Omron, Tokyo, Japan). Systemic hypertension was diagnosed when systolic BP (SBP) was ≥ 140 mmHg, diastolic BP (DBP) was ≥ 90 mmHg, when the patient reported the use of antihypertensive medications, or some combination therein (Chobanian *et al.*, 2003).

Independent variable

The independent variable was the G894T polymorphism of the eNOS gene according to the *GG*, *GT*, and *TT* genotypes.

During the household visits, the women were invited to be present the next day at a predetermined location near their household, where, in addition to biochemical tests, oral mucosa cells were collected. The patients were instructed to pre-rinse with 100 ml of distilled water, and the collection was performed by scraping the inner cheeks with small sterile cytology brushes, making approximately 30 circular movements. The outer portion of the brushes were cut and placed in 2-ml microtubes. The samples obtained were stored in a refrigerator for subsequent DNA extraction with NaCl (Abrao *et al.*, 2005). The DNA was then quantified using a spectrophotometer. After extraction and quantification, the DNA samples were stored at -24°C until genotyping was performed.

The 894G>T (rs1799983) polymorphism has the sequence TTCCTGCTGCAGGCCAGTGA[G/T]CCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCC and was genotyped using the Taqman Genotyping Assay method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR reactions were performed with 5.0 µL of 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 0.125 µL of TaqMan 40X Assay, and 4.87 µL of 4 ng/µL DNA to a final volume of 10 µL. The amplification parameters consisted of 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 92°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute using the Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Individual genotypic discrimination was performed using Step One Plus™ software, version 2.3, at the end of each reaction. Positive controls and negative controls were used to avoid possible contamination for all reactions.

Covariates (variables analyzed to control for confounds, to characterize the sample, or both)

The following variables were obtained: age; Location of residence (rural or urban); employment; schooling; skin color/ethnicity; parity; beneficiary of the “*Bolsa Familia*” Program; access to health services (public or private); and food security status; prevalence of disease over the last 15 days; regular alcohol consumption; smoking status; physical activity level; regular consumption of chicken skin; regular consumption of high-fat meats;

consumption of added salt; body mass index; waist circumference; total cholesterol, Low Density Lipoproteins (LDL) and High Density Lipoproteins (HDL); triglycerides; and blood glucose (Martin *et al.*, 2013).

Data processing and analysis

The data were entered independently in duplicate into an electronic form generated with Epi Info 7.1.4. (CDC, Atlanta, USA), which enabled the identification and correction of possible typing errors.

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was determined with the χ^2 test ($p > 0.05$). This procedure was necessary to certify that the sample complied with the principles of population genetics and as a control measure of the accuracy of the genotype analyses.

The analysis was performed according to the theoretical model adapted from Sturmer (Sturmer *et al.*, 2006) (Figure 1) using two approaches. In the first approach, the dependent variable was hypertension (categorical variable). In the second approach, the dependent variables were SBP and DBP, analyzed as continuous variables. In both situations, the hierarchical analyses were composed of four levels: The first level included the demographic and socioeconomic variables; level 2 included the variables related to lifestyle and dietary factors; level 3 included the anthropometric and biochemical indicators; and level 4 included the associations with the eNOS gene polymorphisms. Level 2 was adjusted by the variables with $p < 0.05$ at level 1; level 3 was adjusted by the variables with $p < 0.05$ at levels 1 and 2; and level 4 was adjusted by all variables with $p < 0.05$ at the previous levels.

To identify the association between hypertension and the *GG*, *GT*, and *TT* genotypes of the eNOS gene G894T polymorphism, the prevalence ratio (PR) and its 95% confidence intervals (CIs) calculated via the Poisson regression were used.

All of the covariates that were associated with hypertension in the basic analysis at a significance level of up to 20% ($p < 0.2$) were eligible for the hierarchical analysis. Non-

significant variables were successively eliminated for each of the four levels of hierarchical analysis (backward stepwise), leaving only those with $p < 0.05$. From this definition, all of these variables remained in the final adjusted model, even if they lost significance at the levels following their original level to control for possible confounds.

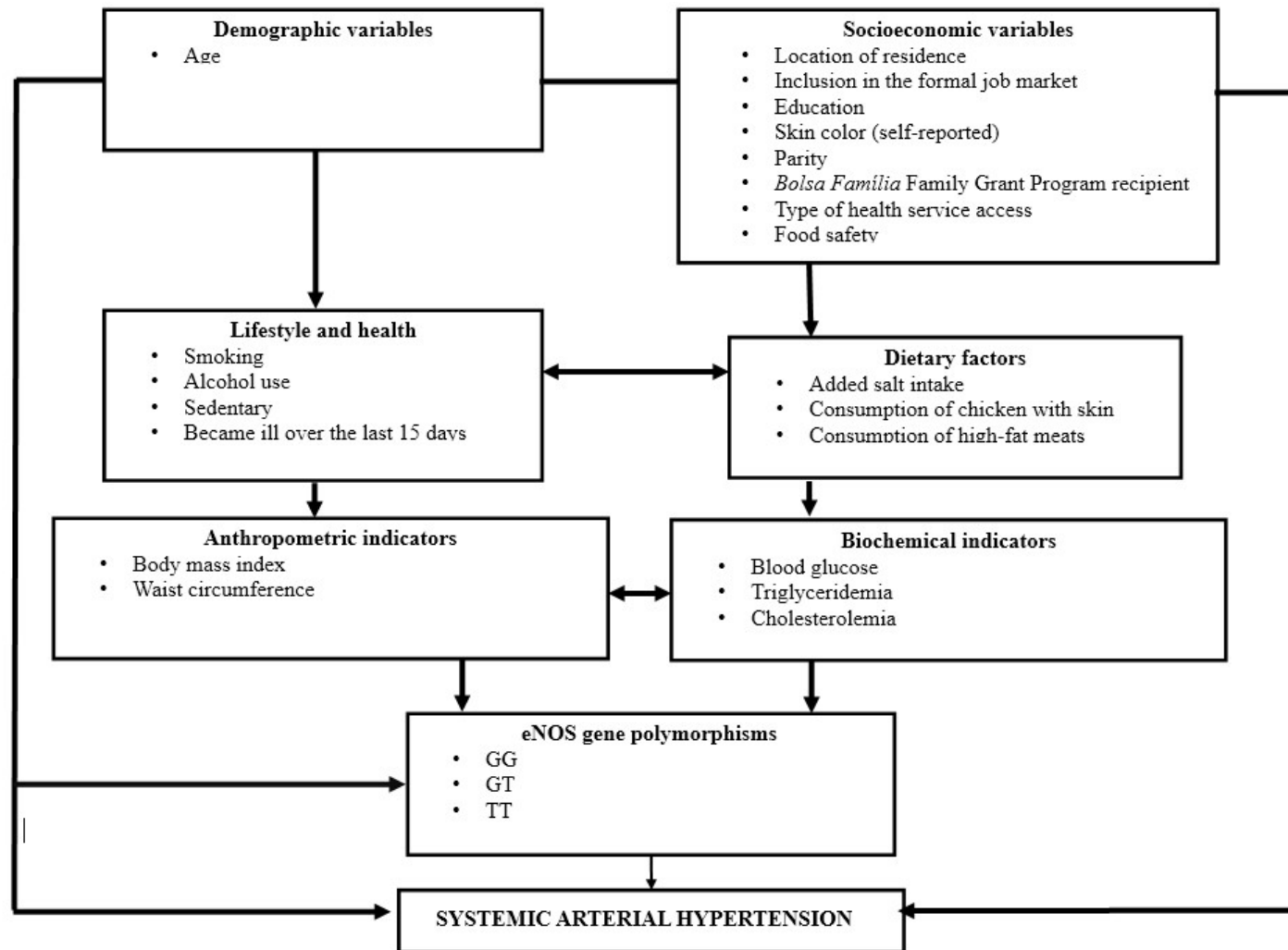


Figure 1. Hierarchical conceptual model of systemic hypertension (Adapted from Sturmer et al., 2006).

To confirm the association between BP levels and the *GG*, *GT*, and *TT* genotypes, a multiple linear regression analysis was used according to the theoretical model defined for the hierarchical analysis. The procedures for variable inclusion and exclusion were identical to those described above for the Poisson regression analysis.

Stata/SE 12.1 for Windows (StataCorp LP, College Station, TX, USA) was used for all statistical analyses.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Alagoas (Case n° 09093012.0.0000.5013).

RESULTS

A total of 887 women eligible were identified for this study. Of these, 40 (4.5%) were not at home at the time of the interview or refused to participate in the study. In addition, women who did not provide data regarding age (n=4, 0.9%), anthropometric indices (n=7, 0.8%), or BP measurements (n=7; 0.8%) as well as those from whom it was not possible to extract DNA (n=19; 2.1%) were excluded from the analyses. Therefore, the final sample consisted of 810 women (35.8±8.4 years).

The socioeconomic, demographic, lifestyle, anthropometric, biochemical, and genetic variables of the sample are described in Table 1. The majority of the sample was black or brown color/race (75.9%), had up to 8 years of education (58.2%), and had no formal employment (74.5%) at the time of the interview. More than half (52.5%) were dependent on government programs for income supplementation (“*Bolsa Família*” Program).

Regarding health conditions, 65.1% of the women reported they were not ill over the last 15 days. Of those who were ill, 91.2% claimed to seek care from public health services. The prevalence of hypertension was 21.1%. Only 8.9% of the women were smokers, but 68.4% reported regular alcohol consumption. According to BMI, 66.1% were overweight ($\geq 30\text{kg/m}^2$).

The minor allele was *T* (24.9%), and the genotypic frequencies for the G894T polymorphism were *GG*=57.1% (n=463), *GT*=35.7% (n=289) and *TT*=7.2% (n=58) (Table 1). The polymorphism distribution conformed to the HWE, with $p=0.16$ indicating that the sample population used was in HWE.

Comparing the *GG*, *GT*, and *TT* genotypes, the rates of systemic hypertension were 13.4%, 19.1%, and 32.7%, respectively. Compared with the prevalence of the *GG* genotype (13.4%), the PRs for the *GT* and *TT* genotypes were 1.24 (95% CIs=0.95-1.61; $p=0.11$) and 1.76 (95% CIs=1.16-2.67; $p<0.01$), respectively (Table 2).

Lipid and glycemic disorders were not significant risk factors for systemic hypertension. After an adjusted analysis, the factors that were significantly associated with hypertension were age ≥ 30 years old, residing in a rural area, education ≤ 8 years, having three or more children, being overweight (BMI ≥ 25 kg/m²), and having a large waist circumference. Compared with the *GG* genotype, the adjusted PRs for the *GT* and *TT* genotype were 1.24 (95% CIs=0.95-1.61; $p=0.11$) and 1.76 (95% CIs=1.16-2.67; $p<0.01$), respectively.

The *GT* was not significantly different between hypertensive and normotensive groups, whereas the *TT* genotype was significantly higher in those with hypertension, the multiple regression analysis showed that both women with *GT* genotype and those with *TT* genotype had BP levels significantly higher than those observed in women with the *GG* genotype, even after adjusting for confounds.

Specifically, compared with the *GG* genotype, women who had the *GT* and *TT* risk genotypes had increases in SBP of 2.72 mmHg ($p=0.02$) and 8.32 mmHg ($p<0.01$), respectively. In the case of DBP, the increase was 1.79 mmHg ($p=0.03$) for the *GT* genotype and 4.69 mmHg ($p<0.01$) for the *TT* genotype (Table 3).

DISCUSSION

The present study provides evidence that the polymorphism G894T of the eNOS gene is associated with higher BP levels and, consequently, with a higher prevalence of hypertension.

Since the first literature reports, NO is considered of fundamental importance in the regulatory process of vascular homeostasis, with its levels being regulated by the eNOS gene. Several polymorphisms have been studied in an attempt to understand the genetic susceptibility to cardiovascular diseases (Saini *et al.*, 2011).

A greater number of homozygous individuals (*GG*) were present in our study (57.2%). In agreement with our results, a study of an Egyptian population found a higher frequency of the *GG* genotype (70%) compared with *GT* (22.9%) and *TT* (7.1%) polymorphisms. Similar results were found in African populations (Li *et al.*, 2004; Hillermann *et al.*, 2005; Gad *et al.*, 2012).

Studies of Asian populations have also shown a predominance of the *GG* genotype; moreover, few or no people with the *TT* genotype were observed in Korea ($n=411$; *GG*: 97.6%, *GT*: 19.5%, and *TT*: 0.9%) (Moon *et al.*, 2002), Japan ($n=513$; *GG*: 84.4%, *GT*: 17.4%, and *TT*: 0.0%) (Moon *et al.*, 2002), and India ($n=105$; *GG*: 74.3%, *GT*: 25.7%, and *TT* 0%) (Nishevitha *et al.*, 2009) .

Our study found an association between systemic hypertension and risk factors such as age, location of residence, overweight, and waist circumference. Several studies have shown that, in addition to hereditary factors, hypertension is influenced by several risk factors such as age, gender, ethnicity, overweight/obesity, alcohol consumption, sedentary lifestyle, and socioeconomic factors (Picon *et al.*, 2013; Andrade, S. S. A. *et al.*, 2015; Malta e Szwarcwald, 2015).

The prevalence of hypertension in women in Alagoas (21.1%) was similar to the

estimated value for the Northeast region (19.4%) and Brazil in general (24.2%) (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (Ibge), 2014).

In the current sample, the presence of the *TT* genotype was associated with a greater predisposition toward systemic hypertension. Evidently, these women also have higher BP levels than those with the *GG* genotype. For those with the *GT* genotype, the differences between the rates of hypertension were not significant. However, as with those who carried the *TT* genotype, they had higher BP levels than the reference genotype. Therefore, these data show that the presence of the T allele is an important risk factor for hypertension.

A recent meta-analysis of 63,258 participants showed that those with the T allele for the G894T polymorphism of the eNOS gene showed a significant risk for systemic hypertension compared with individuals with the G allele (*G* versus *T*, $p < 0.00001$, OR=0.82, 95% CIs=0.76-0.89) (Xie *et al.*, 2017).

In another meta-analysis of 45,287 individuals, the *T* allele of the G894T polymorphism was positively associated with hypertension (odds ratio=1.20; $p=0.015$) (Niu e Qi, 2011). In addition to hypertension, reports have linked the G894T polymorphism of the eNOS gene to the higher rates of diseases such as ventricular hypertrophy, coronary artery disease, and deep vein thrombosis (Qin *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2014).

As previously mentioned, the linear regression showed that the *TT* and *GT* genotypes were associated with significantly higher in SBP and DBP levels, even after controlling for several confounds.

In a study of Caucasian individuals from the Iberian peninsula, Goni *et al.* (2016) found a significantly higher of 1.99 mmHg in the DBP of people with the *GT* or *TT* genotypes compared with those with the *GG* genotype (Goni *et al.*, 2017).

The adjusted analysis revealed an interaction between BMI and the G894T polymorphism with regard to the modulation of SBP and DBP levels. This observation corroborates the results found by Abdel-Aziz et al. (Abdel-Aziz e Mohamed, 2013), who described the association between obesity and the *TT* genotype of the G894T polymorphism with regard to increasing the risk of developing coronary artery disease among the Egyptian population.

Different studies revealed that the presence of thymine (*T*) instead of guanine (*G*) at nucleotide 894 of the gene responsible for the production of eNOS alters one or more of the functional properties of the enzyme that decreases its catalytic activity and therefore compromises the production of NO (Tesauro *et al.*, 2000; Persu *et al.*, 2002).

Kayhan et al. studied the effects of eNOS associated with hypertension among Turkish patients who suggested that the G894T polymorphism of the eNOS gene increases the risk of hypertension when associated with high serum levels of total cholesterol (Kayhan *et al.*, 2013). Increased serum cholesterol levels in the circulatory system lead to increased lipid oxidation, resulting in elevated BP and increased amounts of reactive oxygen species (ROS), which reduced the expression of eNOS and decreased the production of NO (Sawada *et al.*, 2008). Furthermore, oxidative stress is a common process associated with obesity and has been associated with the eNOS gene. An animal model study suggested that a reduction in NO production leads to an increase in ROS, contributing to hypertension in obese rats (Da Cunha *et al.*, 2014).

The present study sampled an ethnically heterogeneous population that included individuals with European and African ancestry as well as indigenous peoples; therefore, this sample contained people with different genetic backgrounds. As such, these results should be

generalized to other populations with caution (i.e., by defining to what extent the referred population is similar to the profile of the population of the present study).

CONCLUSIONS

The results indicate that the *TT* genotype of the eNOS gene G894T polymorphism is significantly associated with a higher prevalence of hypertension and an important risk factor for this disease, especially when it is associated with older age groups and excess body weight.

Considering that the mechanism of action that might cause women with the *GT* or *TT* genotype to present with higher BP levels involves less metabolic production of NO, the current findings suggest that this polymorphism is directly related to the regulation of BP and might be an important marker in the diagnosis of systemic hypertension.

REFERENCES

- ABDEL-AZIZ, T. A.; MOHAMED, R. H. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with classical risk factors in development of premature coronary artery disease. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 4, p. 3065-71, Apr 2013. ISSN 0301-4851.
- ABRAO, M. G. et al. [Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 49, n. 6, p. 978-82, Dec 2005. ISSN 0004-2730 (Print) 0004-2730.
- ANDRADE, S. S. A. et al. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013 [Self-reported hypertension prevalence in the Brazilian population: analysis of the National Health Survey, 2013.]. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, p. 297-304, 2015. ISSN 2237-9622. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222015000200297&nrm=iso >.
- ANDRADE, S. S. D. A. et al. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 297-304, 2015. ISSN 1679-4974.
- CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-52, Dec 2003. ISSN 0194-911x.
- COSTA, N. S. et al. Prevalence and Factors Associated with Food Insecurity in the Context of the Economic Crisis in Brazil. **Current Developments in Nutrition**, v. 1, n. 10, 2017.
- DA CUNHA, N. V. et al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 10, p. H1472-80, May 15 2014. ISSN 0363-6135.
- EHRET, G. B. et al. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. **Nat Genet**, v. 48, n. 10, p. 1171-1184, Oct 2016. ISSN 1061-4036.
- GAD, M. Z. et al. Endothelial nitric oxide synthase (G894T) gene polymorphism in a random sample of the Egyptian population: comparison with myocardial infarction patients. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 16, n. 7, p. 695-700, Jul 2012. ISSN 1945-0257.
- GAMBOA, A. et al. Contribution of endothelial nitric oxide to blood pressure in humans. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 170-7, Jan 2007. ISSN 0194-911x.
- GONI, L. et al. Influence of fat intake and BMI on the association of rs1799983 NOS3 polymorphism with blood pressure levels in an Iberian population. **Eur J Nutr**, v. 56, n. 4, p. 1589-1596, Jun 2017. ISSN 1436-6207.
- HILLERMANN, R.; CARELSE, K.; GEBHARDT, G. S. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio

placentae in pre-eclampsia. **J Hum Genet**, v. 50, n. 8, p. 415-9, 2005. ISSN 1434-5161 (Print) 1434-5161.

HUANG, P. L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 377, n. 6546, p. 239-42, Sep 21 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2013 [Health National Survey 2013]. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>. Acesso em: November 05, 2017.

KAYHAN, F. E. et al. Prevalence of endothelial nitric oxide synthase E298D polymorphism in Turkish patients with essential hypertension. **Diabetes Metab Syndr**, v. 7, n. 1, p. 12-6, Jan-Mar 2013. ISSN 1871-4021.

LI, R. et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. **Am J Hypertens**, v. 17, n. 7, p. 560-7, Jul 2004. ISSN 0895-7061 (Print) 0895-7061.

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2224-60, Dec 15 2012. ISSN 0140-6736.

MALTA, D. C.; SZWARCOWALD, C. L. Lifestyles and chronic non-transmissible diseases of the Brazilian population according to the National Health Survey: balance of the main results. **Sao Paulo Med J**, v. 133, n. 4, p. 286-9, Jul-Aug 2015. ISSN 1516-3180.

MARTIN, S. S. et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. **Jama**, v. 310, n. 19, p. 2061-8, Nov 20 2013. ISSN 0098-7484.

MIYAMOTO, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 3-8, Jul 1998. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911x.

MOON, J. et al. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. **Thromb Res**, v. 107, n. 3-4, p. 129-34, Aug 15 2002. ISSN 0049-3848 (Print) 0049-3848.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 1-2, p. 33-65, Feb-Apr 2005. ISSN 0098-2997 (Print) 0098-2997.

NISHEVITHA, N. S.; ANGELINE, T.; JEYARAJ, N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298-->Asp polymorphism (G894T) among south Indians. **Indian J Med Res**, v. 129, n. 1, p. 68-71, Jan 2009. ISSN 0971-5916 (Print) 0971-5916.

NIU, W.; QI, Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24266, 2011. ISSN 1932-6203.

OTANI, H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 8, p. 1913-28, Aug 2009. ISSN 1523-0864.

PERSU, A. et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 3, p. 229-41, Feb 01 2002. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906.

PICON, R. V. et al. Prevalence of hypertension among elderly persons in urban Brazil: a systematic review with meta-analysis. **Am J Hypertens**, v. 26, n. 4, p. 541-8, Apr 2013. ISSN 0895-7061.

PIMENTA, A. M.; GAZZINELLI, A.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalência da síndrome metabólica e seus fatores associados em área rural de Minas Gerais (MG, Brasil) [Prevalence of metabolic syndrome and its associated factors in a rural area of Minas Gerais State (MG, Brazil)]. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 3297-3306, 2011. ISSN 1413-8123. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000800029&nrm=iso>.

QIAN, J.; FULTON, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. **Front Physiol**, v. 4, p. 347, Dec 13 2013. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042x.

QIAN, J.; FULTON, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. **Frontiers in physiology**, v. 4, 2013.

QIN, J. et al. Genetic polymorphism of NOS3 with susceptibility to deep vein thrombosis after orthopedic surgery: a case-control study in Chinese Han population. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70033, 2013. ISSN 1932-6203.

RAI, H. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113363, 2014. ISSN 1932-6203.

SAINI, V.; BHATNAGAR, M. K.; BHATTACHARJEE, J. Association of endothelial dysfunction with endothelin, nitric oxide and eNOS Glu298Asp gene polymorphism in coronary artery disease. **Dis Markers**, v. 31, n. 4, p. 215-22, 2011. ISSN 0278-0240.

SAWADA, T. et al. Relation of the Glu298Asp polymorphism of the nitric oxide synthase gene to hypertension and serum cholesterol in Japanese workers. **Prev Med**, v. 47, n. 2, p. 167-71, Aug 2008. ISSN 0091-7435.

SOUSA, A. C. et al. Synergistic Association of Genetic Variants with Environmental Risk Factors in Susceptibility to Essential Hypertension. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 21, n. 10, p. 625-631, 2017. ISSN 1945-0265.

SOUSA, A. C. et al. Synergistic Association of Genetic Variants with Environmental Risk Factors in Susceptibility to Essential Hypertension. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 21, n. 10, p. 625-631, Oct 2017. ISSN 1945-0257.

STURMER, G. et al. [Non-pharmacological management of hypertension in Southern Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 22, n. 8, p. 1727-37, Aug 2006. ISSN 0102-311X (Print) 0102-311x.

SURENDRAN, P. et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. **Nat Genet**, v. 48, n. 10, p. 1151-1161, Oct 2016. ISSN 1061-4036.

TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 6, p. 2832-5, Mar 14 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

THOMAS, G. D.; ZHANG, W.; VICTOR, R. G. Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. **Jama**, v. 285, n. 16, p. 2055-7, Apr 25 2001. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484.

WEBER, M. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 16, n. 1, p. 14-26, Jan 2014. ISSN 1524-6175.

XIE, X. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene single nucleotide polymorphisms and the risk of hypertension: A meta-analysis involving 63,258 subjects. **Clin Exp Hypertens**, v. 39, n. 2, p. 175-182, 2017. ISSN 1064-1963.

Table 1 - Distribution of hypertension according to socioeconomic, demographic, lifestyle, anthropometric, biochemical, and genetic variables. Women from Alagoas, Brazil (n=851), 2015.

Variables	n (%)	Hypertensio n (%)	P-value
Age group (years)			
19 to 30	257 (31.7)	7.7	-
30.1 to 40	274 (33.8)	17.1	<0.01
40.1 to 50	277 (33.5)	37.5	<0.01
Location of residence			
Urban	639 (78.8)	19.7	-
Rural	171 (21.2)	26.3	0.05
Unemployed			
No	207 (25.5)	17.9	-
Yes	603 (74.5)	22.2	0.2
Education			
•8 years	340 (41.8)	14.7	-
≤8 years	470 (58.2)	25.8	<0.01
Skin color (self-reported)			
Not black or brown	193 (24.1)	19.1	-
Black and brown	608 (75.9)	22.1.9	0.39
Parity			
One or two children	430 (59.5)	18.8	-
Three or more	292 (40.5)	27.4	<0.01
Access to health services			
Private system	68 (8.7)	13.4	-
Public Healthcare system	708 (91.2)	22.4	0.08
Supplementary income			
Yes	461 (56.8)	21.7	
No	348 (43.2)	20.4	0.67
Food security			
Food security (0)	254 (33.4)	17.3	
Food insecurity (≥1)	505 (66.6)	23.1	0.06
Became ill over the last 15 days			
No	283 (34.9)	19.6	-
Yes	526 (65.1)	24.1	0.14
Alcohol use			
No	554 (68.4)	20.5.	-
Yes	256 (31.6)	23.5	0.31
Smoking			
No	738 (91.1)	20.2	
Yes	72 (8.90)	30.5	0.03
Physical activity			

<i>Active >150 min/week</i>	541 (68.7)	18.7	
<i>Sedentary ≤150 min/week</i>	246 (31.3)	22.4	0.23
Continuation			
Variables	n (%)	Hypertensio n (%)	P-value
<i>Added salt intake</i>			
<i>No</i>	684 (84.4)	22.5	
<i>Yes</i>	126 (15.6)	13.4	0.02
<i>Remove skin from chicken</i>			
<i>Yes</i>	728 (89.9)	21.1	
<i>No</i>	81 (10.1)	19.7	0.76
<i>Eat high-fat meats</i>			
<i>No</i>	553 (68.2)	20.9	
<i>Yes</i>	257 (31.8)	21.4	0.86
<i>BMI classification (kg/m²)</i>			
<i>Normal (18.5 to <25)</i>	255 (31.6)	9.4	-
<i>Overweight (≥25 to <30)</i>	293 (36.4)	20.4	<0.01
<i>Obese (≥30)</i>	243 (29.7)	35.4	<0.01
<i>Waist circumference</i>			
<i>Normal (<0.80)</i>	320 (40.6)	10.9	
<i>Increased (≥0.80)</i>	467 (59.4)	29.1	<0.01
<i>Blood glucose (mg/dL)</i>			
<i>Normal (≤99)</i>	549 (83.6)	19.8	
<i>High (≥100)</i>	107(16.4)	30.8	<0.01
<i>Triglycerides (mg/dL)</i>			
<i>Normal (<150)</i>	454 (69.1)	18.2	
<i>High (≥150)</i>	203(30.9)	29.7	<0.01
<i>Total cholesterol (mg/dL)</i>			
<i>Normal (<190)</i>	342 (52.1)	17.8	
<i>High (≥190)</i>	315 (47.9)	20.6	0.01
<i>LDL-c (mg/dL)</i>			
<i>Normal (<130)</i>	390 (62.9)	21.8	
<i>High (≥130)</i>	230 (37.1)	23.4	0.56
<i>HDL-c (mg/dL)</i>			
<i>Normal (≥40)</i>	357 (54.4)	19.3	
<i>Low (<40)</i>	299(45.6)	24.5	0.1
<i>Alleles</i>			
<i>G</i>	1215 (75.1)	14.8	
<i>T</i>	405 (24.9)	22.7	<0.01
<i>Genotype</i>			
<i>GG</i>	463 (57.1)	13.4	-
<i>GT</i>	289 (35.7)	19.1	0.36
<i>TT</i>	58 (7.2)	32.7	<0.01

GG	-	-	-	-	-	-	1	-
GT	-	-	-	-	-	-	1.24 (0.95 – 1.61)	0.11
TT	-	-	-	-	-	-	1.76 (1.16 – 2.67)	<0.01

Table 3 - Standardized angular coefficients (SACs) adjusted in the multivariate linear regression related to systolic and diastolic blood pressure levels according to the hierarchical theoretical model of the determinants. Women from Alagoas, Brazil (n=810), 2015.

VARIABLES	Level 1 SAC	P- value	Level 2 SAC	P- value	Level 3 SAC	p- value	Level 4 SAC	P- value
Systolic blood pressure								
LEVEL 1								
Age group ≥30 (years)	6.601	<0.01	6.669	<0.01	4.418	<0.01	4.744	<0.01
Living in a rural area	4.173	<0.01	5.001	<0.01	3.395	<0.01	4.014	<0.01
Education: ≤8 years	0.828	0.574	*	*	*	*	*	*
Parity: ≥3 children	1.534	0.311	*	*	*	*	*	*
Access to health services: Public	2.790	0.298	*	*	*	*	*	*
Food insecurity: ≥1	0.136	0.928	*	*	*	*	*	*
LEVEL 2								
Became ill over the last 15 days	-	-	0.061	0.960	*	*	*	*
Salt intake	-	-	-3.123	0.051	*	*	*	*
Smoking	-	-	0.550	-0.202	*	*	*	*
LEVEL 3								
Overweight (BMI ≥25 kg/m ²)	-	-	-	-	3.991	<0.01	4.171	<0.01
Waist circumference ≥80 cm	-	-	-	-	4.681	<0.01	3.466	0.011
Blood glucose ≥100 mg/dL	-	-	-	-	2.533	0.146	*	*
Triglycerides ≥150 mg/dL	-	-	-	-	1.696	0.251	*	*
Total cholesterol ≥190 mg/dL	-	-	-	-	-2.271	0.096	*	*
LEVEL 4								
Genotypes								
GT	-	-	-	-	-	-	2.726	0.026
TT	-	-	-	-	-	-	8.320	<0.01
Diastolic blood pressure								
LEVEL 1								
Age group ≥30 (years)	3.413	<0.01	3.248	<0.01	1.981	<0.01	2.049	<0.01
Living in a rural area	3.727	0.014	2.420	0.019	1.548	0.149	1.714	0.088
Education: ≤8 years	0.607	0.530	*	*	*	*	*	*
Parity: ≥3 children	2.026	0.041	1.950	0.028	2.368	0.016	1.659	0.054
Access to health services: Public	0.657	0.709	*	*	*	*	*	*
Food insecurity: ≥1	0.114	0.909	*	*	*	*	*	*
LEVEL 2								
Became ill over the last 15 days	-	-	0.025	0.976	*	*	*	*
Added salt intake	-	-	-1.752	0.119	*	*	*	*
Smoking	-	-	-2.135	0.130	*	*	*	*
LEVEL 3								
Overweight (BMI ≥25 kg/m ²)	-	-	-	-	3.002	<0.01	2.797	<0.01
Waist circumference ≥80 cm	-	-	-	-	2.177	0.040	2.123	0.023
Blood glucose ≥100 mg/dL	-	-	-	-	-0.290	0.840	*	*
Triglycerides ≥150 mg/dL	-	-	-	-	1.936	0.066	*	*
Total cholesterol ≥190 mg/dL	-	-	-	-	-1.293	0.188	*	*
LEVEL 4								
Genotypes								
GT	-	-	-	-	-	-	1.797	0.034

TT

-

-

-

-

-

-

4.694

<0.01
