Vytor Hugo Pereira Mendes

**Determinantes genéticos de doença arterial coronária
em uma amostra da população brasileira**

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

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mendes, Vytor Hugo Pereira

Determinantes genéticos de doença arterial coronária em uma amostra da população brasileira / Vytor Hugo Pereira Mendes. -- São Paulo, 2015.

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

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

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Doenças das coronárias 2.Polimorfismo de nucleotídeo único 3.Doenças cardiovasculares 4.Fatores de risco 5.Estudos longitudinais 6.Brasil

Dedicatória

Aos meus pais **Vicente** e **Maria Aparecida**, meu porto seguro, pessoas que me ensinaram a batalhar por aquilo que acredito. Exemplos de amor e persistência, de humanidade e caráter. São aqueles em que sei que posso contar incondicionalmente.

Ao meu irmão **João Vytor**, que por tantas vezes me aconselhou, e que, além de irmão, é um amigo em que sempre coloco minha confiança.

À minha irmã **Anna Vytória**, mesmo em sua pequenez, seu amor enche a todos nós.

Agradecimentos

O sentimento de gratidão deve ser algo inerente ao ser humano.
Não basta simplesmente agradecer, mas também sentir-se grato por aquilo
que realizou e pelas pessoas que o ajudaram a realizar seus objetivos.
Munido deste sentimento, quero expressar minha gratidão a todos aqueles que
me ajudaram no desenvolvimento desta dissertação.

São tantas as pessoas que passaram por mim neste período de aprendizado
que se, porventura, eu esquecer de mencionar
peço as mais sinceras desculpas.

Sou imensamente grato ao
Dr. Alexandre da Costa Pereira,
meu orientador, que mesmo por e-mail e telefonemas,
confiou em mim e me abriu as portas para seu grupo de genética.
Sou grato pela sua dedicação para comigo e com seus demais alunos.
Mesmo em momentos difíceis pra mim pude contar com sua compreensão.

Agradeço pela oportunidade que me deu
e espero que outros trabalhos possam vir.

Muito Obrigado!

Agradeço ao Professor Dr. José Eduardo Krieger por ter me dado a
oportunidade de fazer parte deste laboratório e de trabalhar
com pessoas que me proporcionaram um maior aprendizado.

À minha grande amiga Luz Marina G. Gómez,
“meus braços” na parte estatística,

além de uma excelente professora, que me ajudou a entender os dados,
uma amiga e companheira nas horas mais difíceis do projeto.

Muito Obrigado!

Aos amigos do grupo da genética, Paulo Roberto Xavier, Juliana Rocha,
Leiliane Marcatto, Paula Fernanda Fonseca, Carol Tozzi, Carol Capelli, Patrícia
Cajoeiro “Caju”, Mirian Ibañez, Nilse Lopes, Pâmela Rodrigues,
Paulo Caleb, Rodrigo Dias, Michelle Sabrina, Michelle Buscarelli, Larissa
Testai, Theo Gremen, André Vaquero, André Martelini,
Julia Marsiglia, Cinthia Elim, Carla Dinardo,
Julia Amaral, Fanny Fulkan, Noely Ferreira, Gabriela Venturini, Bianca Kiers,
Kallyandra Padilha, Pamela Malagrino, Marina Rossi, Renata Watanabe,
agradeço a honra de trabalhar com vocês.

À minha amiga Renata Alonso pelas conversas e treinamento da parte técnica
do laboratório, além da grande ajuda nesta parte do projeto.

Contar com você foi sempre sinal de segurança.

À minha amiga Hadassa Campos, que para mim é um exemplo
de dedicação e tranquilidade. Companheira de diversão e uma das grandes
amigas que fiz aqui em São Paulo.

Aos amigos do grupo da Bioinformática, atualmente meu reduto no laboratório,
Andréa Horimoto, Nubia Steban, Victor Savoia, Guilherme Casas, Marcia
Santos, as dicas, os conselhos, os momentos do chá com vocês
sempre são alegres.

Sou imensamente grato por trabalhar com vocês!

Agradeço aos colegas e colaboradores do LGCM,

Samantha Teixeira, Mariliza Rodrigues, Renata Carmona, Lucia Mariano, Ana Maria Piesco, Marcelly Rosal, Leonardo Jensen, Thiago Turaça, Thais Girão, Rosangela Aragão, Silvana Campos, Maude Junqueira, Andréia e Brendo.

Agradeço também aos amigos que fiz no laboratório

Luciana Turolla, Julia Estevão, Rafael Reis, Livia Selvatici, Luciana Soares.

Agradeço à minha banca de qualificação

Dr. Luis Gowdack, Dr. Itamar Souza e Maria Cristina Izar

pelos conselhos e contribuição para a finalização deste trabalho.

Aos amigos de Cuiabá que sempre me apoiaram:

Lisdimare Amorim, Philipe Henrique França, Laryssa França, Jayne Almeida, Olival Junior, Emília Ojeda, Douglas Pedroso, Paula Casola, Suelayne Amorim, Lorena Machado, Deborah Isoton e Wesley Silva.

Vocês sabem que sempre podem contar comigo,
sou muito grato por vocês existirem.

Aos amigos que fiz em São Paulo, Francisco Queiróz, Mariliane Brizzotti,

Fabio Shiguehara, Ana Cristina Shiguehara, Lucas Shiguehara,

Maico Dutra, Ana Paula Dutra, ao pequeno Matheus,

Vanessa Lemos, Vanelma Lemos, Vena Maria, Juliana Silva,

Luciano Nader, Lilian Alves e Laurinha.

Agradeço à minha família do coração, aqui em São Paulo,

Família Lemos, Seu João, Dona Carmen, Vanessa, Vlad, Vanelma e Milleny,
que me acolheram e me adotaram em seu seio familiar.

Sempre serei agradecido a Deus por ter colocado vocês na minha vida.

Muito Obrigado!

Agradeço a Raissa Ribeiro, pelo apoio que me dá nos meus objetivos e que, mesmo distantes, sempre está comigo nos meus pensamentos.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio e ajuda, principalmente, aos meus pais e irmãos a quem dedico este trabalho.

Agradeço e amo muito vocês!

Este trabalho foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP).

Normalização Adotada

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

Referências: estilo Vancouver

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

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

*“Tanto para o menor como para o maior
há coisas que só podem ser realizadas uma vez,
e neste feito seu coração repousará”.*

J.R.R. Tolkien

Sumário

SUMÁRIO

<i>Lista de Figuras</i>	I
<i>Lista de Tabelas</i>	III
<i>Lista de Abreviações e Siglas</i>	V
<i>Resumo</i>	XI
<i>Abstract</i>	XIV
1. <i>Introdução</i>	2
1.1 Aterosclerose e lesão aterosclerótica.....	2
1.2 Cálcio arterial coronariano.....	6
1.2.1 Detecção de cálcio arterial coronariano e Escore de cálcio.....	7
1.3 Fatores de risco para doença arterial coronária.....	9
1.4 Fatores genéticos de risco.....	10
1.5 Estudos de associação genômica ampla (GWAS).....	11
1.6 Escores de risco.....	12
1.7 Calibração e validação de modelos de escores de risco.....	13
1.8 Escores de risco genético.....	14
2. <i>Objetivos</i>	17
3. <i>Materiais e métodos</i>	19
3.1 Amostras do Projeto ELSA-BRASIL.....	19
3.2 Fatores de risco para DAC.....	20
3.3 Escore de risco de Framingham (FRS).....	20
3.4 Medição do escore de cálcio coronário.....	21
3.5 Seleção dos SNPs candidatos.....	22

3.6	Preparação e pedido das sondas.....	22
3.7	Extração de DNA genômico.....	24
3.8	Genotipagem TaqMan Open Array™.....	25
3.8.1	A preparação das amostras.....	26
3.8.2	Processo de genotipagem das amostras.....	27
3.9	Análises estatísticas.....	27
4.	<i>Resultados</i>	31
4.1	Análises das Genotipagens.....	32
4.2	Associação entre as variantes genéticas e fatores de risco.....	34
4.3	Associação entre as variantes genéticas e CAC.....	41
4.4	Construção do GRS.....	44
4.5	Derivação do GRS e comparação com o modelo Idade+Sexo e FRS..	46
4.6	Análise de associação entre GRS, Fatores de Risco e CAC.....	48
5.	<i>Discussão</i>	56
6.	<i>Conclusões</i>	63
7.	<i>Anexos</i>	65
8.	<i>Referências Bibliográficas</i>	76

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico das projeções globais de morte.....	1
Figura 2 – Esquema das etapas de recrutamento.....	5
Figura 3 – Imagens de diferentes graus de calcificação.....	8
Figura 4 – Sequência Fasta de bases.....	23
Figura 5 – Sequências de sonda nos ensaios de genotipagem TaqMan® .Erro! Indicador não definido.	25
Figura 6 – Desenho do estudo.....	31
Figura 7 – O software TaqMan Genotyper.....	33
Figura 8 – Distribuição dos indivíduos de acordo com a fluorescência	34
Figura 9 – Gráficos de diagnóstico do modelo zero-inflacionado gama	45
Figura 10 – Gráfico das curvas ROC (Receiver operating characteristic)	47
Figura 11 – Curvas de risco.....	49
Figura 12 – Associação entre os polimorfismos e os fatores de risco e associação com o CAC	51
Figura 13 –Rede de interações entre polimorfismos, fatores de risco e CAC .	61

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características Basais.....	32
Tabela 2 – Quantidade de SNPs por fenótipo/traço associado em GWAS.....	35
Tabela 3 – Lista dos fatores de risco para doença arterial coronária.....	36
Tabela 4 – Associação dos SNPs com os fatores de risco para doença arterial coronária	37
Tabela 5 – Associação de polimorfismos com cálcio arterial coronário.....	43
Tabela 6 – Desempenho do GRS em comparação com o escore Idade+Sexo e FRS.....	48
Tabela 7 – Avaliação da reclassificação de risco do GRS e do escore Idade+Sexo	48
Tabela 8 - Associação do GRS com fatores de risco para cálcio arterial coronário	50
Tabela 9 – Associação do GRS com fatores de risco para cálcio arterial coronário	52
Tabela 10 – Associação do GRS com fatores de risco de risco para CAC por meio de modelo múltiplo	54
Tabela 11 – Modelo logístico entre fatores de risco e o GRS SNPs	55

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADAMTS7	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
AUC	<i>Area under the curve</i> – área sob a curva
C	Citosina
°C	Grau Celsius
CAC	Cálcio arterial coronariano
CACS	Coronary artery calcium score
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CDKN2	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronária
DCV	Doença Cardiovascular
dL	Decilitro
DM2	Diabetes melitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRC	Doença Renal Crônica
EC	Escore de cálcio
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELSA	Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto

FRS	Framingham Risk Score
G	Guanina
GRS	<i>Genetic risk score</i> – Escore genético de risco
GRS SNPs	Escore genético de risco apenas com os SNPs
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	<i>High density lipoprotein</i> – lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IPC	Intervenção percutânea coronária
IDI	<i>Integrated Discrimination Improvement</i>
IDE	<i>Insulin degrading enzyme</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
InCor	Instituto do Coração
Kv	Quilovolt
KCl	Cloreto de potássio
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> – lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
m ²	Metro quadrado

MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCTN	<i>Maximal computer tomographic number</i>
MESA	<i>Multi Ethnic Study of Atherosclerosis</i>
mm	Milímetro
mm ²	Milímetros quadrados
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
mSv	Milisievert
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
ms	Milissegundo
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – fator nuclear kappa B
Ng	Nanograma
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
NHGRI	<i>National Human Genome Research Institute</i>
Nm	Nanômetro
NRI	<i>Net Reclassification Improvement</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

PA	Pressão Arterial
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – reação de Polimerase em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
QRISK	Algoritmo de predição de risco
RCQ	Relação cintura-quadril
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
Rpm	Rotações por minuto
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – polimorfismo de base única
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
<i>TCF7L2</i>	<i>Transcription factor 7 like 2 (T-cell specific, HMG box).</i>
<i>Tris-HCl</i>	<i>Cloridrato tris-hidroximetil-aminometano</i>
µl	Microlitro
UH	Unidades de Hounsfield
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	World Health Organization

ZIGamma

Zero-inflacionado gama

Resumo

RESUMO

Mendes, V.H.P.; Pereira, A.C. Determinantes genéticos de doença arterial coronária em uma amostra da população brasileira [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015.

A importância da doença arterial coronariana (DAC) na sociedade "moderna" é atestada pelo grande número de pessoas afetadas por ela. Os dados da Organização Mundial de Saúde estimam que a doença isquêmica do coração será a segunda principal causa de morte em todo o mundo até 2030. Além disso, com o advento das ferramentas de predição de riscos e estudos de associação genômica ampla (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*), vários estudos tem demonstrado o uso de escores genéticos de risco para prever DAC, porém estes escores apresentam apenas uma discreta melhora em nossa capacidade de avaliação. O presente estudo desenvolveu um escore genético de risco (GRS, do inglês *Genetic risk score*) para DAC, utilizando polimorfismos previamente associados a DAC e/ou a fenótipos relacionados à doença. Mil, trezentos e quarenta e nove indivíduos, provenientes do Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto (ELSA-BRASIL), foram genotipados para nosso estudo. Usando polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) obtidos a partir da base de dados online de GWAS avaliamos a associação de cada polimorfismo escolhido com os fatores de risco para doença cardiovascular. Os indivíduos foram submetidos à determinação do escore de cálcio (EC) coronário e um EC > 100 foi usado como desfecho. Modelos Zero-inflacionados foram utilizados

para a construção do escore de risco genético (GRS). Escore de risco de Framingham para DAC em 10 anos (FRS, do inglês Framingham Risk Score) foi calculado de acordo com o descrito por Wilson e D'Agostino. Nosso GRS foi composto de 47 variantes genéticas, ajustado por sexo e idade, associadas com DAC ou outros fenótipos da doença coronária ou fatores de risco. O GRS mostrou precisão significativamente melhor do que o Escore de Risco de Framingham para prever o risco de CHD (AUC, 0,90; IC 95%: 0,88-0,93; $P < 0,01$). Também foram criados outros dois escores: o primeiro, um modelo com apenas a idade e sexo; o segundo, apenas utilizando a informação genética. Comparamos o modelo Idade+Sexo com o GRS e FRS por meio de curva ROC e avaliamos o desempenho dos modelos em comparação com FRS. Análises do NRI e IDI foram realizadas para avaliar a reclassificação do GRS e do modelo Idade+Sexo em relação ao FRS, que é o atualmente utilizado para a estratificação de indivíduos da população geral. O escore apenas com os SNPs foi utilizado para comparar sua adição a um modelo com fatores de risco. Por fim, analisamos a associação entre o GRS, fatores de risco e CAC usando modelos lineares generalizados. Em suma, criamos um GRS composto por 47 SNPs associado com doença coronariana ou fatores de risco cardiovascular que apresentou bons resultados na predição de risco para DAC. O GRS melhorou a reclassificação de risco para doença arterial coronariana, e melhorou significativamente a discriminação entre os indivíduos afetados e não afetados.

Descritores: Doença coronária/genética, Polimorfismo de nucleotídeo único, Doenças cardiovasculares, Fatores de risco, Estudos longitudinais, Brasil.

Abstract

ABSTRACT

Mendes, V.H.P.; Pereira, A.C. *Genetic determinants of coronary artery disease in a sample of the Brazilian population* [dissertation]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015".

Importance of coronary artery disease (CAD) in "modern" society is attested by the large increase of people affected by it. Data from the World Health Organization estimated that ischemic heart disease is the second leading cause of death worldwide by 2030. Furthermore, with the advent of predictive risk tools and genome-wide association studies, several studies have demonstrated the use of genetic risk scores (GRS) for predicting CAD, but these scores shows a slight improvement in the assessment. This study built a genetic risk score for CAD, using polymorphisms previously associated with CAD and phenotypes related to disease. One thousand, Three hundred forty-nine individuals, from the Brazilian Longitudinal Study of Adults Health (in Portuguese, Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto-BRASIL), were genotyped for our study. Using single nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained from the online database of GWAS evaluated the association of each polymorphism chosen with risk factors for cardiovascular disease. Individuals underwent determination of calcium artery coronary score (CACS) and CAC > 100 was used as the end-point. Zero-inflated models were used for the construction of GRS. Framingham Risk Score (FRS) for CHD in 10 years was calculated as described by Wilson and D'Agostino. In addition, our GRS consists of 47 genetic variants, adjusted for sex and age, associated with CHD or other phenotypes of coronary heart disease or risk factors. GRS showed significantly better accuracy than the

Framingham Risk Score to predict the risk of CAD (AUC, 0.90; 95% CI: 0.88-0.93; $P < 0.01$). Also other two scores were created: first, a model with only age and sex; second, only the genetic information. We compare the Age+Sex model with the GRS and FRS through ROC curve and evaluate the performance of models compared with FRS. NRI and IDI analysis were performed to evaluate the reclassification of GRS and Age + Sex model in relation to the FRS model. The score only the SNPs was used to compare their addition to a model with risk factors. Finally, we analyzed the association between the GRS, risk factors and CAC using generalized linear models. In short, we create a GRS composed of 47 SNPs associated with coronary heart disease or cardiovascular risk factors that showed good results in risk prediction for CAD. GRS improved reclassification of risk for coronary artery disease, and significantly improves the discrimination between affected and unaffected individuals.

Descriptors: Coronary disease/genetics, Polymorphism single nucleotide, Cardiovascular diseases, Risk factors, Longitudinal studies, Brazil.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A doença arterial coronária (DAC), dentre as doenças cardiovasculares, é a principal causa de mortalidade e a que mais consome recursos na área de saúde nos países industrializados (Murray et al. 2012).

São grandes as implicações econômicas mundiais causadas pela DAC. A Organização Mundial de Saúde estima que as doenças isquêmicas do coração ocupem o segundo lugar em 2030, perdendo apenas para a somatória de todas as formas de câncer (Figura 1).

Figura 1– Gráfico das projeções globais de morte, 2004-2030. Fonte: OMS, 2011.

Em 2011, um estudo para projetar os custos até 2030 para várias doenças cardiovasculares mostrou que só nos Estados Unidos, em 2010, 12 milhões de indivíduos apresentavam doença isquêmica do coração sendo, que 6 milhões apresentavam angina e 7 milhões recuperavam-se de infarto agudo do miocárdio o que, na época, gerou um custo, direto e indireto, de 108,9 bilhões de dólares aos cofres públicos (Heidenreich et al. 2011). No Brasil, segundo o DATASUS, foram

cerca de 250 mil internações em 2014, o que resultou num custo direto de mais de um bilhão de reais.

Pode-se conceituar a DAC como uma condição caracterizada por irregularidades funcionais ou estruturais das artérias coronárias, ocasionando a diminuição da oferta de oxigênio para o miocárdio. O principal mecanismo patogênico da DAC, ocorrendo em aproximadamente 90% dos casos, é a obstrução arterial causada por placa aterosclerótica (Halvorsen et al. 2008).

A etiologia da DAC inclui fatores genéticos e ambientais e a interação entre ambos. A detecção precoce e estratificação de indivíduos de alto risco são de grande importância e podem direcionar as decisões sobre a prevenção de novos eventos e tratamento (Chen et al. 2011).

1.1 Aterosclerose e lesão aterosclerótica

A aterosclerose é uma doença de caráter multifatorial que geralmente se inicia a partir da resposta do endotélio a uma série de estímulos nocivos (Hansson 2005). A simples presença de um endotélio disfuncional, já representa “solo amplamente fértil” para o desenvolvimento da aterosclerose (Campbell and Rosenfeld 2015).

O processo patogênico da doença é crônico, progressivo e sistêmico. A aterosclerose possui um componente hereditário forte e envolve uma série de processos celulares e mecanismos moleculares (Stylianou et al. 2012). Mais recentemente, um grande conjunto de evidências tem apoiado a ideia de que os mecanismos inflamatórios podem desempenhar um papel importante em todas as fases da aterogênese (Halvorsen et al. 2008). Isso não exclui a participação de

múltiplas outras vias que levarão à resultante perda da homeostase tecidual e consequente progressão histológica da doença.

Por meio de mecanismos comuns como estresse oxidativo, inflamação, proliferação e hipertrofia, fatores de risco são capazes de promover um endotélio disfuncional, caracterizado por alterações em suas propriedades normais (Vita 2011). Assim, ao contrário de uma superfície predominantemente antiadesiva, antiproliferativa e anticoagulante, ganha espaço um endotélio de fenótipo propício para o recrutamento de células inflamatórias circulantes e formação de trombos (Funk et al. 2012).

Na disfunção endotelial ocorre a liberação de substâncias aterogênicas como a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) e o fator nuclear de transição kappa B (NF-kB) (Hansson 2005). Em resposta a essas substâncias feitas pelo endotélio disfuncional, pode ocorrer o estímulo na expressão de várias moléculas de adesão, entre as quais se ressaltam a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e as selectinas E e P.

Como resultado, os monócitos aumentam sua adesão com posterior acúmulo de macrófagos ativados na íntima do vaso (Lu et al. 2012). O acúmulo dos macrófagos resulta em várias consequências, a começar pelo acúmulo da LDL oxidada, que possui importante atividade inflamatória (participa da atração dos monócitos) e aterogênica, pois intensifica a disfunção endotelial e diminui a interação do macrófago com a HDL (Keaney 2011).

Em seguida, ocorre a morte dos fagócitos que acontece por apoptose ou necrose que resulta em acúmulo extracelular de lipídios, o que contribui para a

formação, desenvolvimento e progressão da placa aterosclerótica (Kuehnl et al. 2012).

Enzimas proteolíticas (metaloproteases) degradam os componentes da capa fibrosa. Além disso, as metaloproteases degradam componentes da camada média e adventícia o que causa a dilatação da parede do vaso, processo conhecido como remodelamento excêntrico (Kuehnl et al. 2012). Essas alterações contribuem para a instabilidade da placa aterosclerótica.

Em consequência, o processo de reparação fica comprometido em relação à diminuição da síntese de colágeno, bem como ocorre o afinamento da capa fibrosa, estimulando a morte de células musculares e o aumento dos níveis de fator tissular, o que contribui para o estabelecimento de condição trombótica (Ząbczyk et al. 2012).

Figura 2. Esquema das etapas de recrutamento dos fagócitos mononucleares para o surgimento da placa aterosclerótica e algumas das funções destas células no ateroma. Os processos são retratados em sequência aproximada da esquerda para a direita. Modificado de Libby e colaboradores.

Outro mecanismo importante é o da progressão das lesões ateroscleróticas. Inicialmente, acreditava-se que as lesões apresentassem crescimento constante e

linear, com longos períodos assintomáticos (Leonarduzzi et al. 2012). Dessa forma, os pacientes apresentariam sintomatologia quando o grau de obstrução atingisse em torno de 70% da luz do vaso.

Recentemente, entretanto, houve o reconhecimento de que as lesões progridem em crises, por complicações de placas vulneráveis (Badimon and Vilahur 2014). Placas vulneráveis podem ser reconhecidas pelo grande núcleo lipídico, pelo grande número de células inflamatórias, pelo alto grau de remodelamento excêntrico e pela capa fibrosa fina.

Em consequência dessas características, podem ocorrer complicações da placa (ruptura ou erosão), com subsequente formação de trombo (Liang et al. 2011). Portanto, a instabilidade da placa aterosclerótica é o principal mecanismo responsável pela progressão da lesão aterosclerótica em casos de DAC crônica.

1.2 Cálcio arterial coronariano

O cálcio arterial coronariano (CAC) é um componente da aterosclerose, detectado, quase que exclusivamente, em artérias ateroscleróticas (Youssef et al. 2013). O processo de calcificação dessas artérias resulta em menor complacência vascular, respostas vasomotoras anormais e perfusão miocárdica diminuída (Wang et al. 2006).

A calcificação aterosclerótica ocorre principalmente na camada íntima da artéria (Otsuka et al. 2014). Os mediadores inflamatórios e elevado teor de lipídios dentro das lesões ateroscleróticas induzem a uma diferenciação osteogênica de células musculares lisas (Abedin et al. 2004). Por outro lado, o CAC está associado com idade avançada, diabetes e doença renal crônica (DRC) (Johnson et al. 2006).

O que se pensava ser um processo benigno, na verdade, contribui para uma maior rigidez arterial, o que aumenta o risco de eventos cardiovascular adversos.

A extensão do CAC correlaciona-se com a carga da placa. Microcalcificações na capa fibrosa podem promover uma ruptura de placa. Além disso, nódulos calcificados podem afetar a capa fibrosa, ocasionando trombose (Virami 2000). A ruptura da placa e hemorragia com subsequente cicatrização pode resultar no desenvolvimento de lesões obstrutivas fibrocálcificadas e são frequentemente encontradas em pacientes com angina estável e morte súbita coronariana (Virami, 2000; Burke et al. 2001).

1.2.1 Detecção de cálcio arterial coronariano e escore de cálcio

A fisiopatologia do CAC e sua associação com o risco cardiovascular têm sido uma área de intensa investigação por vários anos. Em estudos observacionais de grande escala, o escore de cálcio adiciona valor prognóstico à predição de morte cardíaca e infarto do miocárdio, especialmente em pacientes de risco intermediário para eventos (Labree et al. 2004; Elias-Smale et al. 2010; Polonsky et al. 2010).

A detecção do CAC tornou-se um método estabelecido para avaliação de risco cardiovascular. A tomografia computadorizada (TC) é um teste não invasivo com alta sensibilidade e especificidade para a detecção de cálcio e é capaz de quantificar a calcificação (Tanenbaum et al. 1989). Ela é particularmente útil em indivíduos assintomáticos de risco intermediário.

Até meados dos anos 1990, a detecção do cálcio arterial era feita por tomografia computadorizada por emissão de feixes de elétrons (*Electron-beam computed tomography*), vários estudos descritos na literatura sobre o assunto

utilizaram esta técnica para a detecção de CAC. Com o surgimento da TC com múltiplos detectores no final dos anos 1990, a TC por feixes de elétrons passou a ser considerada ultrapassada.

O escore de cálcio é determinado numa aquisição de uma série de cortes axiais, não contrastados, com espessura de 3 mm que cobre toda a extensão do coração (Tota-Maharaj et al. 2012). As imagens são capturadas de forma simultânea ao sinal produzido pelo eletrocardiograma (ECG) (Figura 3). Este protocolo pode ser de caráter prospectivo ou retrospectivo, sendo que, os protocolos prospectivos são os mais utilizados devido à dose de radiação ser menor que a do protocolo retrospectivo. Atualmente a dose de radiação apresenta um efetivo típico de aproximadamente 1,0 mSv, que é aproximadamente a mesma dose de radiação utilizada de 1,5 em mamografias (Youssef et al. 2013).

Figura 3. Imagens de diferentes graus de calcificação, evidenciando o aumento progressivo do escore de Agatston. Fonte: Youssef e colaboradores.

A medição da calcificação é calculada pela multiplicação da área da lesão pelo MCTN (maximal computer tomographic number), que corresponde a um fator de densidade que varia de 1 a 4. Esse fator de densidade consiste na medida de intensidade de sinal acima de 130 unidades Hounsfield (UH) e área igual ou superior a 3 pixels adjacentes (pelo menos 1 mm²), como mostrado a seguir:

$$\text{Escore} = \text{MCTN} \times \text{Área}(\text{mm}^2)$$

1	130 - 200UH
2	201 - 300UH
3	301 - 400UH
4	> 400

Exemplo: Densidade = 412 (MCTN 4)
Área = 12mm²
CAC = 48

A mais recente diretriz publicada pelo American College of Cardiology / American Heart Association, orienta que a medição não invasiva do escore de cálcio é considerada aceitável para avaliação de risco cardiovascular em pacientes assintomáticos de risco intermediário (aqueles com uma taxa predita de 10% a 20% de eventos coronários em mais de 10 anos pelo FRS; classe IIa, Nível de evidência: B) (Greenland et al. 2010). A interpretação e a utilidade do escore de cálcio são dependentes dos perfis de risco subjacentes para DAC.

1.3 Fatores de risco para doença arterial coronária

Por se tratar de uma doença complexa a DAC está associada a múltiplos fatores: ambientais, genéticos e a interação entre esses dois (Chen et al. 2011). Os fatores de risco clássicos associados são: dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo e obesidade, história familiar precoce para a DAC e sedentarismo (Unal et al. 2004).

As interações entre os fatores de risco têm sido muito estudadas e constituem a base de programas de prevenção primária e secundária para DAC (Smith et al. 2006). Estes, por conseguinte, têm levado a um interesse crescente em encontrar novos biomarcadores humorais mensuráveis e marcadores genéticos para

melhorar a estratificação de risco cardiovascular e a tomada de decisão terapêutica (Chen et al. 2011).

1.4 Fatores genéticos de risco

Partindo do perfil geral de risco das doenças cardiovasculares, determinantes genéticos desempenham um papel importante na fisiopatologia de DAC. Recentemente, muito se discute quanto ao estudo de variantes gênicas para DAC, o qual vem sendo avaliado em subgrupos de pacientes com características específicas que possibilitem a determinação de um fenótipo essencial entre as múltiplas apresentações clínicas da DAC (Arnett et al. 2007). Em relação aos pacientes com doença arterial coronária há sugestões de que fatores genéticos podem explicar parte do aumento do risco de eventos cardíacos adversos importantes a partir de variáveis clínicas.

Muitos estudos têm demonstrado que os mecanismos complexos, determinados por variantes genéticas, podem influenciar a incidência desses eventos. Os mecanismos, na maioria das vezes, incluem processos inflamatórios, atividade das plaquetas, atividades neuro-hormonais (incluindo principalmente sistema renina-angiotensina), metabolismo de lipídios e estresse oxidativo, bem como a atividade do óxido nítrico sintetase (Rywik et al. 2010).

Rywik e Szperl et. al. avaliaram a distribuição de alguns polimorfismos genéticos em pacientes com DAC estável submetidos à intervenção percutânea coronariana (IPC) de rotina de uma artéria coronária, e avaliaram o papel da predisposição genética no prognóstico de longo prazo. Com uma população de estudo composta por 110 indivíduos com DAC confirmada, que foram qualificados

para intervenção percutânea (IPC), conseguiram mostrar uma maior prevalência das variantes genéticas em associação aos fatores de risco da DAC pós-intervenção. No entanto, poucos marcadores genéticos consistentemente associados à DAC são atualmente conhecidos (Beaglehole and Magnus 2002).

1.5 Estudos de associação genômica ampla (GWAS)

O Projeto Genoma Humano, o Projeto HapMap e estudos genômicos posteriores levaram à identificação de muitas variantes comuns na população mundial (Lusis et al. 2004). Recentes estudos de associação do genoma amplo (GWAS - *Genome Wide Association Studies*) demonstraram uma associação consistente de polimorfismos de nucleotídeo de base única (*SNP - Single Nucleotide Polymorphism*) com doença arterial coronariana e infarto agudo do miocárdio (IAM) (Esparragón et al. 2012). Com o desenvolvimento de tecnologias de matriz capazes de genotipar simultaneamente centenas de milhares de SNPs tornou-se possível realizar GWAS para doenças com características complexas, incluindo DAC e seus fatores de risco.

Recentemente, vários grupos envolvidos em tais estudos têm colaborações formadas para executar meta-análises contendo dados de dezenas de milhares de indivíduos (Lusis et al. 2004). Nos últimos anos, vários foram os estudos de GWAS associando marcadores genéticos a fatores de risco para o desenvolvimento da doença arterial coronariana (Hirschhorn and Daly 2005).

Os GWAS têm por objetivo encontrar a associação de novos polimorfismos às doenças estudadas. Eles fornecem informações preliminares sobre a associação entre genes e fenótipos, sem que o pesquisador precise se valer de conhecimentos

prévios sobre a fisiopatologia da doença para gerar candidatos a serem testados (Baudhuin 2009).

As abordagens mais comuns para estudos de associação concentram-se na análise de SNPs e os seus genes vizinhos. Apenas os de maiores evidências de associação são relatados, considerando o grande número de variáveis e o fato da grande maioria deles não satisfazer os critérios de associação. Isso explica parcialmente o porquê, até mesmo nos estudos com grandes coortes, os sinais verdadeiros serem de difícil identificação.

Para aumentar o rendimento e finalmente explicar uma grande proporção da herdabilidade, abordagens de análise devem ser adaptadas para acumular dados complementares disponíveis que permitam testes para a associação com base em unidades funcionais, tais como genes, conjuntos de genes e vias (de las Fuentes et al. 2012).

1.6 Escores de Risco

Escores de riscos são modelos de análise multivariada, desenvolvidos e validados em estudos de populações admitindo que marcadores sejam calculados em conjunto, considerando o valor prognóstico de cada um deles. Isso permite que os recursos em serviços de saúde sejam aplicados para aqueles com maior probabilidade de se beneficiar de cuidados preventivos e para evitar possíveis efeitos adversos do tratamento desnecessário em pessoas com baixo risco.

Muitas diretrizes têm assimilado as evidências epidemiológicas das populações com equações que foram derivadas para permitir o cálculo do risco de doenças cardiovasculares em indivíduos (Wierzbicki, 2012).

Geralmente, modelos de predição de risco têm sido avaliados através de dois critérios, calibração e discriminação. Um modelo bem discriminado distribui o risco dos indivíduos na ordem correta e permite classificar a relação do grau de risco individual com a população como um todo (Dent, 2010). Escores conhecidos, como o Framingham, foram derivados a partir de estudos originais, e possuem versões com alguns fatores de risco sutilmente diferentes (Sheridan, Pignone et al., 2003).

Mais recentemente, devido à ampla disponibilidade de registros médicos eletrônicos nos cuidados primários, permitiu-se que o risco de DCV possa ser calculado a partir dessa fonte de dados e acompanhados por um longo prazo. No Reino Unido, isto tem sido realizado utilizando o banco de dados do país para derivar o algoritmo QRISK e sucessivas versões (Collins e Altman, 2009).

Ambos, Framingham e QRISK foram validados em um número de populações. No entanto, embora estas calculadoras sejam boas e custo eficazes na identificação de indivíduos com risco elevado de DCV, isto, obviamente, não é o mesmo que a identificação inequívoca daqueles que terão acontecimentos futuros (Marsh, 2011).

1.7 Calibração e validação de modelos de escores de risco

Modelos preditivos são muito utilizados na prática médica. Estes modelos, baseados em resultados binários, formam estimativas de probabilidade que o evento de interesse possa ocorrer (Jiang, Osl et al., 2012). Se a predição é perto da proporção de eventos neste grupo a estimativa individualizada é considerada bem calibrada. A calibração é importante para estes tipos de ferramentas de medicina

personalizada, dado que as estimativas são várias vezes utilizadas para determinar um risco individual (Karp, Abrahamowicz et al., 2004).

Como marcadores moleculares começam a ser incorporados em modelos preditivos, e tornam-se disponíveis para os consumidores, entender a deficiência de predições individuais e desenvolver novos métodos para calibrar essas predições torna-se primordial (Kullo e Cooper, 2010). A calibração é ainda mais crucial para aprovar estimativas de probabilidade precisas em medicina personalizada, que inclui estimativas individualizadas para avaliação de risco, diagnóstico, o sucesso da intervenção terapêutica e prognóstico (Jiang, Osl et al., 2012).

A validação de um método de escore de risco envolve o estabelecimento de seu desempenho em pacientes não utilizados para a derivação do próprio escore. Estudos de validação diferem nos seus desenhos, que podem ser amplamente classificados em aqueles de validade convergente e validade externa (Altman e Royston, 2000). A validade convergente avalia a sensibilidade e a especificidade de uma forma simplificada de um modelo de predição de risco em comparação com um modelo de predição "padrão ouro".

A validação externa avalia a generalização de um modelo preditivo ou método de escore de risco, testando a sua calibração e discriminação em uma população distinta. (Altman e Royston, 2000).

1.8 Escores de risco genético

Escores de risco genéticos permitem fazer uma avaliação composta por dados genéticos em doenças complexas. Estas ferramentas permitem combinar o risco relacionado à saúde modelada pela informação genética em um único número,

o que permite uma medida mais direta a ser utilizado para predição de risco (Smith et al. 2015).

A partir dos resultados dos estudos de associação do genoma, vários SNPs foram descobertos e muitos deles estão fortemente associados com infarto agudo do miocárdio, doença arterial coronariana (DAC) ou a fatores de risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão, diabetes e dislipidemia (Goldstein et al. 2014).

Setten e colaboradores publicaram recentemente um GWAS em uma população de fumantes e derivaram um escore de risco genético, construído a partir de 24 SNPs, associados a DCV. Este escore foi associado à calcificação vascular (Setten et al. 2013). Em outro estudo, Paynter e colaboradores construíram dois graus de risco genético baseados numa seleção abrangente de marcadores genéticos, onde a associação já havia sido descrita para doença cardiovascular, ou um fenótipo intermediário, selecionado a partir do catálogo online do NHGRI (*do inglês, National Human Genome Research Institute*) (Paynter et al. 2010).

No geral, o uso de GRS (*do inglês, Genetic Risk Score*) tem sido aplicado para melhorar a avaliação de risco com base em modelos de predição já estabelecidos. Partindo deste cenário, este trabalho teve como objetivo criar um GRS para estimar o risco de DAC, a partir de SNPs selecionados por meio de catálogo online de GWAS.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa teve como objetivo principal a construção de um escore de risco genético para DAC, utilizando polimorfismos previamente associados a DAC e fenótipos relacionados à doença. Ainda, desenvolver um algoritmo de estratificação de risco para DAC em uma amostra de indivíduos da população brasileira.

Especificamente, trata-se de:

1. Genotipar polimorfismos, associados a fenótipos de doença arterial coronariana, previamente, publicados em catálogo online de GWAS, numa amostra de indivíduos da população brasileira;
2. Investigar a associação entre as informações de variantes genéticas associadas a DAC utilizando o escore de cálcio;
3. Derivar um escore de risco genético para predição de DAC em uma amostra do estudo ELSA-Brasil;

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras do Projeto ELSA-BRASIL

O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) é um estudo prospectivo multicêntrico que tem como objetivo investigar fatores associados ao risco de doença cardiovascular, obesidade e diabetes numa amostra da população brasileira.

O ELSA-Brasil estudou 15.105 funcionários públicos de cinco universidades e um instituto de pesquisa, localizados em diferentes regiões do Brasil. A concepção do estudo, bem como os métodos aplicados, encontram-se publicados (Aquino et al. 2012). Resumidamente, funcionários, ativos ou aposentados, das seis instituições envolvidas no projeto, com idades entre 35 e 74 anos, foram elegíveis para o estudo.

Os critérios de exclusão foram: gravidez atual ou recente (<4 meses na época da primeira entrevista), a intenção de parar de trabalhar na instituição num futuro próximo, incapacidade cognitiva e quando se aposentou, se o aposentado vivia fora da correspondente área metropolitana de um dos centros de estudos.

O Centro ELSA na Universidade de São Paulo possui 5.061 participantes inscritos, e corresponde a amostra que abordaremos neste trabalho. Um dos focos do estudo deste centro é a análise do escore de cálcio coronariano. 4.456 participantes foram submetidos à análise do escore de cálcio. Além disso, o material genético de todos os participantes do ELSA-Brasil foi coletado. Para o nosso estudo, 1.440 amostras de participantes do centro ELSA da USP foram utilizadas.

3.2 Fatores de risco para DAC

Foram utilizados 17 fatores de risco que são comumente usados em associação com DAC. As dosagens bioquímicas de glicose, insulina, teste de tolerância à glicose, ácido úrico, proteína C-reativa, triglicerídeos, colesterol total, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) foram obtidos por métodos convencionais em amostras de sangue em jejum. As aferições de pressão sistólica e diastólica são o resultado da média de três aferições obtidas com o participante em repouso. Os dados de índice de massa corporal e relação cintura-quadril foram utilizados como medidas de obesidade. A diabetes foi definida como o nível de glicose no plasma em jejum > 126 mg/dL, ou o teste de tolerância à glicose > 200 mg/dL, ou a hemoglobina glicosilada > 6,5%, ou ainda, o tratamento com um agente hiperglicêmico e / ou insulina. Os dados sobre tabagismo e história familiar de doença coronariana foram obtidos através de entrevistas dos participantes durante a entrada no estudo.

3.3 Escore de risco de Framingham (FRS)

O escore de risco de Framingham é um calculador de risco para doenças cardiovasculares. O seu uso permite predizer o risco de doença cardiovascular em 10 anos. Existem outros escores de risco derivados a partir do FRS. Em nosso estudo utilizamos o escore de risco de Framingham para DAC em 10 anos, usando fatores de risco clínicos. Os coeficientes utilizados para o cálculo do FRS foram baseados no estudo publicado por Wilson e cols. Para calcular o FRS as seguintes

variáveis foram consideradas: idade, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, tabagismo, diabetes mellitus tipo II e estratificação por homens e mulheres (Wilson et al. 1998).

3.4 Medição do escore de cálcio coronário

Os participantes do centro ELSA da Universidade de São Paulo passaram por uma tomografia computadorizada sem contraste para avaliação de CAC.

Os exames foram feitos em um tomógrafo computadorizado de 64 canais (Philips Brilliance, Philips, Holanda). O campo de visão foi definido de modo a incluir todo o coração, e a direção do eixo Z incluía dados da bifurcação das artérias pulmonares para o vértice do coração durante uma pausa expiratória. As configurações padrões incluíram 120 Kv, mA ajustado para índice de massa corporal, uma fase de aquisição prospectiva em 70% (mid-diastole) do ciclo cardíaco e colimação de 2,5mm, rotação de pórtilo de 400 ms e reconstruído com um filtro padrão.

As imagens foram analisadas usando um software (Brilliance Workspace). O escore de cálcio coronário foi calculado utilizando um limiar de 130 HU de acordo com Agatston (Agatston and Janowitz 1990; Carr et al. 2005). Os resultados são apresentados como valores absolutos de EC (ou escore Agatston). No presente estudo, foram considerados os participantes com $CAC > 100$ como apresentando o desfecho da doença, ou seja, DAC.

3.5 Seleção dos SNPs candidatos

Os polimorfismos elegíveis a marcadores moleculares para DAC foram selecionados a partir de GWAS publicados até novembro de 2012 e organizados no banco de dados do *National Human Research Genome Institute*, de acordo com o fenótipo da doença ou o traço, a que o SNP está relacionado. O endereço do site é <http://www.genome.gov/gwastudies>. A genotipagem foi realizada pela Plataforma TaqMan® OpenArray®, da *Applied Biosystems*, esse protocolo permite que vários polimorfismos sejam genotipados de uma só vez, por placa. Foram selecionados SNPs com frequência do alelo de risco na população controle entre 30 e 70%, considerando-se que com esse valor de corte o poder estatístico dos testes é de, no mínimo, 80% para o N proposto. Para evitar que menos SNPs sejam plotados no chip em caso de erro, 10% a mais foi listado e enviado para importação.

3.6 Preparação e pedido das sondas

Para a confecção das lâminas de genotipagem Open Array, foram desenhadas sondas para cada SNP escolhido, segundo a orientação do fabricante.

As sondas incluem uma sequência de pares de bases formada por 120 pares antes e 120 pares depois da troca de base do SNP (Figura 4). As sequências foram obtidas através da base de dados dbSNP, do National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Após a escolha, foi necessário que as sequências que possuíam homologia com alguma outra região do genoma fossem mascaradas para que não houvesse pareamento indesejado durante a reação de genotipagem.

```

Fasta Sequence (Legend) ↑
>gnl|dbSNP|rs1042034|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1
|alleles='A/G'|mol=Genomic|build=144
GTTTGATGGC TTGGTACGAG TTAACAAGA ATTCCATATG AAAGTCAAGC ATCTGATTGA
CTCACTCATT GATTTTCTGA ACTTCCCCAG ATTCCAGTTT CCGGGGAAAC CTGGGATATA
CACTAGGGAG GAACTTTGCA CTATGTTTCAT AAGGGAGGTA GGGACGGTAC TGTCCCAGGT
ATATTCGAAA GTCCATAATG GTTCAGAAAT ACTGTTTTCC TATTTCCAAG ACCTAGTGAT
TACACTTCCT TTCGAGTTAA GGAAACATAA ACTAATAGAT GTAATCTCGA TGTATAGGGA
ACTGTTGAAA GATTTATCAA AAGAAGCCCA AGAGGTATTT AAAGCCATTC AGTCTCTCAA
GACCACAGAG GTGCTACGTA ATCTTCAGGA CCTTTTACAA TTCATTTTCC AACTAATAGA
AGATAACATT AAACAGCTGA AAGAGATGAA ATTTACTTAT CTTATTAATT ATATCCAAGA
TGAGATCAAC ACAATCTTCA
R
TGATTATATC CCATATGTTT TTAAATTGTT GAAAGAAAAC CTATGCCTTA ATCTTCATAA
GTTCAATGAA TTTATTCAAA ACGAGCTTCA GGAAGCTTCT CAAGAGTTAC AGCAGATCCA
TCAATACATT ATGGCCCTTC GTGAAGAATA TTTTGATCCA AGTATAGTTG GCTGGACAGT
GAAATATTAT GAACTTGAAG AAAAGATAGT CAGTCTGATC AAGAACCTGT TAGTTGCTCT
TAAGGACTTC CATTCTGAAT ATATTGTCAG TGCCTCTAAC TTTACTTCCC AACTCTCAAG
TCAAGTTGAG CAATTTCTGC ACAGAAATAT TCAGGAATAT CTTAGCATCC TTACCGATCC
AGATGGAAAA GGGAAAGAGA AGATTGCAGA GCTTTCTGCC ACTGCTCAGG AAATAATTAA
AAGCCAGGCC ATTGCGACGA AGAAAATAAT TTCTGATTAC CACCAGCAGT TTAGATATAA
ACTGCAAGAT TTTTCAGACC

```

Figura 4. Sequência Fasta de bases, 120pb antes e após o SNP, selecionada para o desenho da sonda de Open Array.

Para tal, foi utilizada a ferramenta Repeat Masker, um programa que analisa as sequências de DNA para repetições intercaladas e sequências de DNA de baixa complexidade, comparando com bases de dados populares disponíveis e mascarando (substituindo por N) aquelas sequências que estão em homologia com outras regiões do genoma.

Este programa foi desenvolvido pelo *Institute for Systems Biology*, e está disponível na internet <http://www.repeatmasker.org/>.

3.7 Extração de DNA genômico

A extração do DNA foi feita a partir de sangue periférico pelo método de precipitação salina. Nesse protocolo, são transferidos oito (8) ml de sangue em EDTA para um tubo de 50ml e o volume é completado até 30ml com tampão A (1mM NH_4HCO_3 + 144mM NH_4Cl). A mistura é então agitada em vórtex por 20 segundos e mantida a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, leva-se a mistura à centrífuga a 4°C por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante é descartado e o processo então, repetido. O sedimento leucocitário é ressuspensionado em 3 mL de tampão B (10 mM 17Tris-HCl pH 8 + 400 mM NaCl + 2 mM Na_2EDTA pH 8) + 200 μL de SDS 10% + 500 μL de tampão C (50 μL de SDS 10% + 2 μL de Na_2EDTA 0,5 M pH 8 + 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 μL de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e deixado a 37°C por 12-18 horas. Após esse período, adiciona-se 1 mL de solução D (NaCl 6 M) e a mistura é agitada vigorosamente em vórtex por 1 minuto, centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL onde foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado. Após uma leve agitação, o DNA precipitado foi “pescado” e transferido para um microtubo de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O tubo foi levado a uma microcentrífuga a 4°C por 15 minutos a 13.500 rpm e após o término da centrifugação o etanol foi descartado e o sedimento foi mantido em temperatura ambiente até a evaporação completa do etanol. O DNA foi ressuspensionado em 1 mL de água ultrapura e armazenado em freezer -20°C até o momento de uso.

3.8 Genotipagem TaqMan Open Array™

A plataforma de genotipagem TaqMan® OpenArray™ (Applied Biosystems, EUA) consiste numa tecnologia de PCR em tempo real. A plataforma de genotipagem deve estar de acordo com um teste de layout padrão oferecido pela empresa.

Baseado na técnica de hidrólise das sondas TaqMan®, a genotipagem ocorre por meio de ensaios com duas sondas MGB (*Minor Groove Binder*) alelo-específico, sendo uma sonda para a sequência normal, marcado com o fluoróforo VIC®, e a outra para a sequência mutante, marcada com o fluoróforo FAM® e um par de primers, permitindo a identificação dos alelos de forma precisa (figura 5).

Figura 5 - A figura acima ilustra os resultados de encontros e desencontros entre o alvo e as sequências de sonda nos ensaios de genotipagem TaqMan®. Fonte – Manual de procedimento TaqMan®.

Após a deposição do material genético na lâmina onde se encontram plotadas as sondas, o conjunto (lâmina e DNA) é levado ao aparelho para a amplificação das regiões de interesse para cada SNP.

Durante a PCR, cada sonda hibridiza especificamente com a sua sequência complementar entre os sítios de primers *forward* e *reverse*. A DNA polimerase é

capaz de clivar apenas sondas que hibridam ao seu alelo SNP específico. A clivagem separa o corante repórter do corante extintor, aumentando substancialmente a fluorescência do corante repórter. Assim, os sinais de fluorescência gerados durante a amplificação por PCR indicam que os alelos estão presentes na amostra. Em seguida é feita a leitura através de captação de fluorescência.

3.8.1 A preparação das amostras

A concentração e pureza das amostras foram verificadas utilizando o Espectrofotômetro NANODROP™ 1000 (Thermo Scientific). As amostras que apresentaram uma taxa de A260/280 entre 1,7 e 2,1 e uma concentração de 50 ng/mL foram distribuídas numa placa de 384 poços com alíquotas de 2,5 µl combinados com 2,5 µL de Master Mix OpenArray™ seguindo as instruções do fabricante.

A placa foi selada e, em seguida, centrifugada a 1000 rpm durante 2 minutos para remover as bolhas restantes na mistura. As amostras que não estiveram em conformidade com os parâmetros de pureza e concentração, como descritos acima, foram submetidas a um processo de purificação. Especificamente, elas foram submetidas a um processo de concentração à vácuo (SpeedVac® Plus, SAVANT) e purificação em coluna (Invisorb® Fragmento CleanUp) e, em seguida, foram posteriormente reavaliadas.

3.8.2 Processo de genotipagem das amostras

Utilizamos a plataforma de genotipagem TaqMan[®] OpenArray[™] (Applied Biosystems, EUA), com placas de 48 subarrays (4,5 milímetros x 4,5 milímetros), cada um deles com 64 nano-poços.

Esta plataforma compreende um equipamento de genotipagem denominado de QuantStudio[™] 12K Flex (Applied Biosystems[™]). Este sistema de PCR em tempo real inclui um sistema pipetagem (OpenArray[™] AccuFill[®] System), acoplado a um terminal a partir do qual as operações são controladas através de um software do fabricante.

A plataforma contém um termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems), adequado para placas de OpenArray[™]. Utilizou-se o bloco OpenArray[™] para capturar a fluorescência, que foi analisada usando o software TaqMan[®] Genotyper para a geração de gráficos e interpretação dos resultados. A reação para a amplificação dos fragmentos foi realizada no QuantStudio[™] OpenArray[®] 12K Flex, ambos os ciclos duraram cerca de 4 horas.

3.9 Análises Estatísticas

As análises de genotipagem foram feitas através do programa TaqMan Genotyper[®] versão 1.3.1 da *Applied Biosystems*. A análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg para distribuição dos genótipos foi realizada por meio do software PLINK versão 1.07. As análises de associação foram realizadas entre fatores de risco e SNPs e, entre SNPs e escore de cálcio. Modelos lineares generalizados foram

utilizados de acordo com o comportamento dos dados de cada fator de risco. Variáveis como glicose, colesterol total, HDL-C, LDL-C, triglicerídeos e proteína C-reativa tiveram seus logs obtidos para serem ajustados ao modelo. O modelo foi ajustado por idade, sexo e ancestralidade africana. Depois disso, a análise de associação foi realizada entre CAC e os polimorfismos utilizando o modelo zero-inflacionado.

O escore de cálcio apresenta uma distribuição contínua com um "ponto de massa em zero"; com isso, se mostra um caso especial de dados zero-inflacionado. Os modelos de regressão linear são inadequados para esse tipo de dados. Em vez disso, usamos uma distribuição zero-inflacionada gama (ZIGamma) permitindo que os dados possam ser decompostos em duas partes: a primeira, um modelo binário que determina a probabilidade de que o resultado seja 0 ou superior a 0; e a segunda, uma distribuição contínua que modela o valor predito para um escore de cálcio diferente de zero. Este tipo de modelo é similar ao aplicado em estudos anteriores; por exemplo, o MESA (Multi-Ethnic Study of atherosclerosis) (Ma et al. 2010).

Para descrever os dados de CAC, foi utilizado o modelo ZIGamma ajustado para idade, sexo, ancestralidade africana e cada um dos SNP selecionados. Polimorfismos com valores de $p < 0.05$ foram selecionadas para o modelo de regressão múltipla. O CAC foi definido de acordo com Agatston et al., e foi usado como um variável contínua (Agatston and Janowitz 1990).

A partir dos resultados deste modelo um escore de risco genético foi formulado e, de forma análoga, outros dois escores também foram criados, sendo um deles apenas para Idade+Sexo e outro com somente a informação genética dos

SNPs. Nós utilizamos a análise da curva ROC para estabelecer os melhores pontos de corte dos escores e para classificar os indivíduos como afetados com DAC ($CAC \geq 100$) ou não afetados com a doença ($CAC < 100$).

Utilizamos também o Net Reclassification Improvement (NRI) e Integrated Discrimination Improvement (IDI) para avaliar a reclassificação, entre afetados e não afetados, do GRS e do modelo Idade+Sexo em relação à FRS. Estudos de associação foram realizados entre os fatores de risco e GRS usando um modelo linear generalizado (Log-normal). Além disso, um modelo de regressão múltipla foi ajustado com fatores de risco significativos. Nós avaliamos o desempenho dos valores preditivo positivo e negativo do GRS, do modelo Idade+Sexo e FRS, analisamos também a sensibilidade e a especificidade. As análises foram realizadas com R versão 3.1.1 e SPSS versão 20.

Resultados

4. RESULTADOS

Um total de 1.349 participantes, submetidos a escore de cálcio, foram genotipados e incluídos em nosso estudo (Figura 6). As características basais da amostra do estudo utilizado para a análise de associação genética são apresentadas na Tabela 1. Os participantes tinham uma idade média de $48 \pm 7,3$ anos; 47% eram do sexo masculino; 65,7% tinham 0 de CAC, 34,2% tinham CAC entre 0,1 e 99,9 e 10,3% tinham $CAC \geq 100$.

Figura 6. Desenho do estudo que mostra o número de indivíduos estudados nas diferentes fases de seleção, associação e derivação do GRS. GRS indica escore de risco genético.

As prevalências de diabetes, tabagismo e hipertensão foram de 13%, 18% e 28%, respectivamente. Os valores médios de dados bioquímicos como glicemia em jejum, glicose pós-sobrecarga, insulina, ácido úrico, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos, proteína c-reativa, foram 108,0 mg/dl, 130,0 mg/dl, 8 mcUI/mL, 212,0 mg/dl, 130,0 mg/dl, 55,0 mg/dl, 116,0 mg/dl, 3,0 mg/dl, respectivamente. Os valores médios para pressão sanguínea sistólica, pressão sanguínea diastólica, IMC e relação cintura-quadril foram 119,0 mmHg, 76,0 mmHg, 27 kg/m² e 0,9, respectivamente. Histórico familiar para doença cardiovascular estava presente em 28% dos participantes.

Tabela 1 – Características Basais

Variáveis	Amostras do estudo
	Total
Nº de participantes	1349
Homem, %	47
Idade, anos	48 ± 7.3
Glicose (mg/dl)	108 ± 23.8
Glicose pós sobrecarga (mg/dl)	130 ± 44.2
Insulina (mcUI/mL)	8 ± 7
Ácido Úrico (mg/dl)	6 ± 1.5
Colesterol Total (mg/dl)	212 ± 40.7
Colesterol-HDL (mg/dl)	55 ± 13.3
Colesterol-LDL (mg/dl)	130 ± 34.6
Triglicerídeos (mg/dl)	116 (81-166)
Proteína C-Reativa (mg/L)	3 ± 4.3
Pressão sanguínea sistólica (mm Hg)	119 ± 15.3
Pressão sanguínea diastólica (mm Hg)	76 ± 10.4
IMC (kg/m ²)	27 ± 4.6
Relação cintura-quadril	0.9 ± 0.1
Hipertensão, %	28
Diabetes mellitus Tipo 2, %	13
Histórico familiar, %	28
Fumantes, %	18
CAC > 0	462
CAC > 100	140
Escore de cálcio basal	...
(entre aqueles com CAC > 0)	137 ± 276

Valores são médias ± DP, %, ou mediana (interquartil).

4.1 Análises das Genotipagens

A genotipagem foi realizada seguindo o protocolo do fabricante, *Applied Biosystems*. Foram genotipados 265 polimorfismos para 1.349 indivíduos provenientes do estudo ELSA-SP. O software Taqman Genotyper permite fazer as análises dos dados gerados, como também avaliar o controle de qualidade das genotipagens. Todas as amostras apresentaram um bom nível de pureza (A260/280 entre 1,7 e 2,1) e uma concentração de 50 ng/μL. Em nosso estudo, cada placa de OpenArray™ plate possibilitou genotipar concomitantemente 192 polimorfismos para

15 indivíduos e um controle negativo. O resultado das leituras é apresentado de duas diferentes formas: Planilha com a fluorescência captada (figura 7) e distribuição gráfica da captação da fluorescência (figura 8).

Results							
Reference Samples							
Population Statistics							
View Group by Bookmark Tag GT Change Call							
#	Call	Sample ID ¹	Manual	Quality	VIC®	FAM™	ROX™
1	G/G	1		0.99	4,826.347	11,573.852	1,795.412
2	A/G	10		0.99	7,180.651	7,537.308	2,057.305
3	G/G	100		0.99	3,586.618	8,016.052	1,711.161
4	A/A	1000		0.99	7,321.392	3,433.692	1,571.395
5	A/A	1001		0.99	6,771.896	4,169.581	1,667.879
6	A/A	1002		0.99	7,310.415	3,627.987	1,699.381
7	A/G	1003		0.99	7,085.281	7,493.436	1,718.370
8	A/G	1004		0.97	6,901.180	6,334.180	1,600.893
9	A/G	1005		0.99	6,492.145	6,904.080	1,687.266
10	A/G	1006		0.95	5,650.562	5,219.687	1,591.243
11	A/A	1007		0.99	7,477.937	3,703.322	1,416.976
12	A/G	1008		0.99	6,549.037	7,931.624	1,428.211
13	G/G	1009		0.99	4,076.196	10,097.265	1,538.512
14	A/A	101		0.99	8,001.902	4,246.974	2,062.075
15	A/G	1010		0.99	5,912.557	6,012.602	1,682.224
16	G/G	1011		0.99	3,754.066	8,915.510	1,457.684
17	A/A	1012		0.99	7,575.417	3,771.792	1,519.924

Figura 7. O software TaqMan Genotyper, da *Applied Biosystems*, é utilizado para a leitura e análise dos resultados gerados. A coluna “Sample ID” identifica a amostra enquanto a coluna “Call” fornece o genótipo encontrado para o SNP então avaliado. NTC é o controle negativo e N/A indica que ele não foi avaliado.

As frequências do menor alelo (MAF) foram semelhantes às descritas na literatura. Os SNPs rs1178979-*BAZ1B* e rs12463177-*DOCK6* foram excluídos devido à baixa qualidade das genotipagens. Em geral, as genotipagens obtiveram um call rate médio de 98,6% e o Equilíbrio de Hardy-weiberg também foi avaliado. Os dados das genotipagens estão dispostos em tabela (Anexo A).

Figura 8. Distribuição dos indivíduos de acordo com a fluorescência em gráfico de intensidade para um dos SNPs estudados. Eixo X mostra a captação de fluorescência FAM e Eixo Y marca a captação de fluorescência VIC. Três genótipos são diferenciados em um grupo de indivíduos.

4.2 Associação entre as variantes genéticas e fatores de risco

Como mencionado anteriormente, nós selecionamos os polimorfismos de nosso estudo por meio de um banco de dados on-line de GWAS. Para o nosso estudo, cada SNP selecionado é associado com um fenótipo ou traço de DAC. Um total de 265 polimorfismos associados foi selecionado para um total de 44 fenótipos/traços de DAC (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidade de SNPs por fenótipo/traço associado em GWAS

Traço ou Fenótipo	SNPs	Traço ou Fenótipo	SNPs
Agregação plaquetária	8	Infarto do miocárdio (precoce)	2
Calcificação arterial coronariana	1	Intervalo RR (Frequência cardíaca)	5
Carcinoma de células renais	1	Níveis de enzimas hepáticas	1
Colesterol HDL	17	Níveis de Fatores de coagulação	1
Colesterol LDL	3	Níveis de FvW e FVIII	3
Colesterol Total	4	Níveis de lipoproteínas	1
Diabetes mellitus tipo 2	53	Níveis de proteína C	1
Doença arterial coronária	66	Níveis Metabólicos	1
DAC ou AVC isquêmico	1	Obesidade	2
Doença arterial periférica	2	Parada cardíaca súbita	10
Fator VII	1	Pressão Sanguínea	1
Fatores de risco para DCV	7	Pressão sanguínea diastólica	5
Fenótipos hematológicos	7	Pressão sanguínea sistólica	2
Fibrinogênio	2	Proteína C-reativa	4
Frequência cardíaca	1	Relação cintura-quadril	2
Frequência cardíaca em repouso	1	Tratamento antidepressivo	1
Glicose em jejum	6	Rigidez arterial	1
Glicose pós-sobrecarga	2	Tamanho do tronco aórtico	1
Hipertensão	1	Traços eletrocardiográficos	9
HOMA-Resistência à insulina	1	Traços lipídicos	3
Índice de Massa Corporal	4	Triglicerídeos	17
Infarto do miocárdio	1	Tromboembolismo venoso	2

Por causa da grande quantidade de fenótipos disponíveis, optamos por avaliar a associação de polimorfismos aos fatores de risco mais comuns para doença coronariana (Tabela 3). A análise de associação foi realizada para cada um dos SNPs com cada um dos fatores de risco para avaliar o efeito dos polimorfismos nos fatores de risco em nosso estudo utilizando um modelo aditivo de associação (cada alelo presente confere um “risco” aditivo). Não houve associação para insulina, triglicerídeos e tabagismo. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 3 – Lista dos fatores de risco para Doença arterial coronária

Glicose	Colesterol-LDL	Proteína C-reativa
Glicose pós-sobrecarga	Triglicerídeos	Hipertensão
Insulina	Pressão sanguínea sistólica	Diabetes mellitus Tipo 2
Ácido Úrico	Pressão sanguínea diastólica	Histórico familiar
Colesterol Total	Índice de Massa Corporal	Fumantes
Colesterol-HDL	Relação cintura-quadril	

Tabela 4 – Associação dos polimorfismos com os fatores de risco para DAC

Histórico Familiar								
SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs4846914	0.046	-0.868	rs1800588	0.015	-1.214	rs326	0.010	-1.128
rs4938303	0.024	-0.970	rs1864163	0.013	-1.099	rs7177699	0.007	-1.342
rs564398	0.034	-0.939	rs29941	0.004	-1.441	rs1501908	0.016	-1.201
Relação cintura-quadril								
SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs2954029	0.035	-0.005	rs7689714	0.045	0.006	rs2338104	0.039	-0.018
rs16895200	0.015	-0.007	rs12440695	0.003	0.008	rs744487	0.015	0.024
rs1004467	0.039	0.005	rs1800588	0.045	-0.007	rs3117035	0.020	-0.022
rs4352210	0.003	0.008	rs1537370	0.045	-0.017			
Pressão sanguínea sistólica								
SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs4712524	0.045	-1.098	rs4587594	0.045	1.236	rs4380028	0.047	3.656
rs505922	0.024	1.312	rs365990	0.030	-1.171	rs3825807	0.005	5.067
rs6795970	0.047	1.197	rs3213545	0.044	-0.946	rs707040	0.031	-5.245
rs9295474	0.015	-1.442	rs12130333	0.007	-2.099	rs1397048	0.028	4.068
rs1979722	0.016	1.494	rs484914	0.027	1.846	rs10199768	0.048	3.765
Proteína C-reativa								
SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs974819	0.043	0.089	rs1800588	0.027	-0.145	rs1537370	0.021	-0.308
rs7120118	0.003	0.135	rs732577	0.006	-0.355	rs599839	0.040	-0.260
rs157580	0.031	0.101	rs37062	0.018	-0.419	rs744487	0.000	0.562
rs6433232	0.029	0.109	rs780094	0.016	0.383	rs6708166	0.031	-0.291

rs11206510	0.017	0.141	rs1260333	0.035	-0.295	rs4373814	0.027	0.317
------------	-------	-------	-----------	-------	--------	-----------	-------	-------

Hipertensão

SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs4938303	0.019	-0.301	rs16895200	0.042	-0.216	rs4723705	0.035	-0.216
rs4712524	0.032	-0.207	rs10852932	0.040	0.206	rs11920090	0.003	-0.336
rs16998073	0.048	0.236	rs2383208	0.046	-0.234	rs10777317	0.028	-0.636
rs4947339	0.018	0.230	rs5015480	0.014	-0.798	rs2080401	0.031	0.637
rs9295474	0.008	-0.277	rs7754840	0.019	0.705	rs10199768	0.012	0.744

Colesterol HDL

SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs5219	0.038	0.005	rs328	0.024	0.008	rs1167998	0.028	-0.017
rs318090	0.032	-0.005	rs1746048	0.010	-0.006	rs17465637	0.045	0.015
rs1495377	0.025	0.005	rs1800588	0.011	0.008	rs7940646	0.004	0.026
rs17231506	0.005	0.007	rs326	0.023	0.007	rs1829883	0.032	0.015
rs6433232	0.040	-0.005	rs1501908	0.019	0.007	rs744487	0.023	-0.019
rs10199768	0.010	-0.018						

Pressão sanguínea diastólica

SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs2515629	0.032	0.721	rs7121446	0.004	1.341	rs4380028	0.029	2.818
rs505922	0.049	0.828	rs4352210	0.036	0.820	rs3825807	0.004	3.679
rs9295474	0.031	-0.922	rs4686760	0.034	0.834	rs707040	0.029	-3.648
rs780092	0.012	1.437	rs11920090	0.020	-1.156	rs2338104	0.049	-2.691
rs16895200	0.050	-0.835	rs484914	0.016	1.478	rs9943753	0.044	-2.808
rs1122608	0.003	-1.505	rs326	0.021	1.227	rs10199768	0.048	2.616

Índice de massa corporal								
SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β
rs8192284	0.000	1.318	rs693	0.010	-0.459	rs2338104	0.043	-1.398
rs4352210	0.001	0.593	rs7801190	0.012	0.761	rs1004467	0.044	0.320
rs7120118	0.002	0.604	rs2144300	0.014	-0.348	rs11206510	0.044	0.477
rs4846914	0.002	-0.688	rs7044355	0.017	-1.625	rs1549607	0.049	0.417
rs10199768	0.007	1.797	rs10830963	0.022	-0.529	rs2972144	0.049	-0.337
rs1501908	0.008	-0.635	rs5219	0.030	-0.443	rs12946454	0.050	-0.434
rs744487	0.009	2.066	rs9943753	0.036	-1.481			
Glicose								
SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β
rs2144300	0.018	-0.011	rs2895811	0.041	-0.012	rs1801282	0.005	0.017
rs1260326	0.007	-0.016	rs17205526	0.048	0.012	rs2237897	0.046	0.017
rs7395662	0.010	-0.015	rs10830963	0.023	0.017	rs2383208	0.036	-0.015
rs6495335	0.042	-0.013	rs452036	0.029	-0.054	rs7689714	0.028	0.013
rs10885122	0.041	-0.014	rs1088512	0.011	-0.017	rs1800588	0.018	-0.015
rs16965039	0.024	-0.031	rs439401	0.042	0.011	rs1397048	0.030	0.049
rs1532624	0.044	-0.011	rs17577085	0.012	-0.018	rs744487	0.012	0.068
Colesterol Total								
SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β
rs2144300	0.001	-0.019	rs2515629	0.012	0.015	rs10896513	0.034	-0.017
rs163184	0.002	-0.020	rs849142	0.013	-0.019	rs10889353	0.035	-0.055
rs12053903	0.003	0.066	rs10811661	0.016	-0.015	rs2259816	0.040	0.014
rs646747	0.004	-0.021	rs391300	0.021	-0.052	rs9989419	0.040	-0.015
rs17231506	0.005	0.023	rs1167998	0.023	-0.057	rs1200821	0.040	-0.015
rs3213545	0.006	-0.017	rs247616	0.024	-0.068	rs1042034	0.042	-0.014
rs6769511	0.008	0.060	rs3742207	0.029	-0.015	rs864745	0.044	-0.045
rs1903595	0.009	-0.022	rs7844723	0.032	0.016	rs707040	0.044	0.058
rs693	0.011	-0.018	rs4937126	0.034	-0.055			

LDL-colesterol								
SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β
rs2515629	0.004	0.026	rs10830963	0.024	0.031	rs3117035	0.024	0.092
rs1200821	0.021	-0.025	rs10938397	0.046	-0.023	rs6769511	0.027	0.081
rs693	0.002	-0.032	rs3742207	0.022	-0.023	rs6433232	0.011	0.030
rs174547	0.013	0.030	rs3739998	0.034	0.022	rs10896513	0.036	-0.024
rs2144300	<0.001	-0.029	rs17228212	0.016	-0.029	rs646747	0.013	-0.026
rs6795349	0.030	-0.044	rs3213545	0.001	-0.031	rs849142	0.013	-0.028
rs16998073	0.021	0.031	rs10811661	0.002	-0.028	rs2301786	0.025	-0.025
rs1532624	0.010	-0.026	rs1801282	0.038	0.023	rs10183640	0.049	-0.085
rs2259816	0.011	0.025	rs17231506	0.019	0.028	rs11708189	0.014	-0.094
rs1903595	0.020	-0.029	rs1829883	0.033	0.077	rs2346177	0.005	0.100
rs163184	<0.001	-0.037	rs10199768	0.016	0.089	rs5904726	0.020	-0.075
rs1004467	0.032	0.020	rs452036	0.016	0.095	rs8192284	<0.001	-1.387
Teste de tolerância oral a glicose -2 Horas								
SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β	SNP	P-Valor	β
rs8060686	0.034	0.026	rs11902417	0.037	-0.027	rs17577085	0.001	-0.043
rs4846914	0.011	-0.036	rs2895811	0.012	-0.030	rs11920719	0.004	-0.078
rs2144300	0.007	-0.024	rs3807375	0.013	-0.027	rs2237897	0.007	0.043
rs7395662	0.023	-0.026	rs525455	0.029	0.026	rs12239046	0.002	0.038
rs1158867	0.023	0.025	rs10906115	0.026	-0.025	rs646747	0.019	-0.025
rs1333049	0.027	0.025	rs13266634	0.033	0.029	rs11708067	0.018	-0.034
rs11556924	0.033	-0.027	rs163184	0.029	-0.022	rs12413409	0.033	0.038
rs16965039	0.006	-0.072	rs1088512	0.008	-0.035	rs484914	<0.001	0.064
rs12243326	0.033	-0.026	rs10938397	0.035	0.025	rs326	0.001	-0.049
rs318090	0.013	-0.028	rs1160297	0.001	0.037	rs1537370	0.002	-0.140
rs1042034	0.027	-0.022	rs2357013	0.015	-0.027	rs1397048	0.002	0.134
rs17114036	0.001	-0.059	rs7157599	0.026	-0.029	rs9546711	0.001	0.219
rs452036	0.028	-0.109						

Diabetes tipo 2								
SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β	SNP	<i>P</i> -Valor	β
rs2972144	<0.001	-0.484	rs2359536	0.004	0.385	rs1532624	0.017	-0.272
rs1828390	<0.001	-0.435	rs17228212	0.007	-0.361	rs2237892	0.017	0.375
rs10811661	<0.001	-0.367	rs17231506	0.008	0.387	rs17577085	0.017	-0.285
rs3213545	<0.001	-0.385	rs9989419	0.008	-0.327	rs2351706	0.017	-0.289
rs7689714	<0.001	0.544	rs1042034	0.012	-0.292	rs2237895	0.018	-0.304
rs646776	<0.001	-0.435	rs7318731	0.013	0.307	rs11014166	0.021	0.369
rs163184	0.001	-0.436	rs484914	0.014	0.398	rs849142	0.026	-0.300
rs2515629	0.001	0.337	rs646747	0.015	-0.290	rs10777317	0.027	-0.709
rs1397048	0.003	1.009	rs12243326	0.015	-0.331	rs2882047	0.028	0.293
rs675026	0.003	-0.336	rs12440695	0.015	0.353	rs1800775	0.030	-0.712
rs16971384	0.043	-0.286	rs29941	0.036	-0.526	rs2954029	0.032	-0.263
rs2461991	0.046	0.261	rs1111875	0.036	0.244	rs4846914	0.035	-0.394
rs7177699	0.046	-0.491	rs12413409	0.037	0.494	rs1875874	0.036	-0.265
rs10757278	0.049	-0.260	rs3742207	0.040	-0.232	rs6793245	0.036	-0.347

4.3 Associação entre as variantes genéticas e CAC

Nós utilizamos 1.349 indivíduos genotipados para construir um modelo ZIGamma para identificar variantes genéticas (SNPs) associados com o CAC. Destes, 871 indivíduos (participantes que tinham dados completos para todas as variáveis selecionadas para o modelo) foram usados para definir um segundo modelo ZIGamma ajustado para sexo e idade. SNPs significativos utilizados foram os obtidos a partir de ambas as partes, discreta e contínua, do modelo.

O efeito alélico dos SNPs no escore de cálcio foi assumido como sendo independente e aditivo. Assim, o efeito de dois alelos idênticos era duas vezes maior que o efeito do alelo que atua isoladamente, e o efeito de dois alelos diferentes é a soma dos efeitos separados de cada alelo.

Encontramos 56 SNPs que foram significativamente associados com o CAC nas análises univariadas; sendo que, seis deles foram significativos em ambas as partes do modelo. Na parte contínua do modelo, 33 SNPs foram estatisticamente associados ao CAC; sendo que, nove destes foram previamente associados diretamente com DAC, e oito foram previamente associados com diabetes mellitus tipo II.

Na parte discreta do modelo, 17 SNPs foram significativamente associados com CAC; sendo que, quatro foram previamente associados com doença arterial coronariana, e cinco foram previamente associados com diabetes tipo II, como mostra a tabela a seguir:

Tabela 5 – Associação de polimorfismos com cálcio arterial coronário*SNPs significativos em ambas as partes do modelo.*

SNPs	<i>P</i> -valor contínuo	β	<i>P</i> -valor discreto	B
rs7660702	0.010	-0.244	0.027	0.211
rs1042034	0.001	-0.281	0.029	0.205
rs1735151	0.033	-0.204	0.037	0.231
rs3807375	0.010	0.213	0.045	0.189
rs564398	0.008	0.432	0.031	-0.344
rs1501908	0.003	-0.509	0.031	0.348

SNPs significativos na parte contínua do modelo.

SNPs	<i>P</i> -valor contínuo	β	<i>P</i> -valor discreto	B
rs174547	0.047	-0.208	0.841	-0.022
rs4689388	0.009	0.237	0.218	0.126
rs10447589	0.032	0.238	0.741	0.036
rs16965039	0.002	-0.731	0.542	-0.142
rs2236653	0.016	-0.245	0.789	0.028
rs12243326	0.029	-0.249	0.242	0.133
rs11910624	0.005	0.480	0.252	-0.213
rs12946454	0.007	0.323	0.672	-0.053
rs1532624	0.010	-0.221	0.378	0.081
rs2259816	0.003	0.251	0.651	-0.041
rs12269901	0.001	-0.325	0.829	-0.022
rs1903595	0.022	-0.258	0.061	0.211
rs1111875	0.001	0.289	0.154	0.136
rs7178572	0.046	-0.190	0.962	-0.005
rs7318731	0.002	0.281	0.085	0.166
rs2069133	0.017	0.235	0.613	-0.055
rs10852932	0.021	0.254	0.657	-0.048
rs10838738	0.002	0.334	0.842	-0.023
rs10938397	0.049	-0.213	0.088	-0.189
rs7422339	0.009	0.277	0.168	0.141
rs1412444	0.002	0.260	0.985	0.002
rs2237892	0.002	0.380	0.904	0.016
rs3213545	0.017	-0.188	0.803	0.021
rs10811661	0.010	-0.195	0.174	0.112
rs646776	0.024	0.210	0.184	0.129
rs6760047	0.019	-0.269	0.131	0.178
rs849142	0.001	0.364	0.074	0.194
rs11605924	0.012	0.260	0.894	-0.014
rs1746048	0.025	0.247	0.202	0.153
rs1864163	0.026	-0.292	0.711	0.052
rs4380028	0.047	-0.273	0.488	-0.328
rs599839	0.040	-0.290	0.523	0.286

rs1436953	0.036	0.316	0.670	0.209
<i>SNPs significativas na parte discreta do modelo.</i>				
SNPs	<i>P</i> -valor contínuo	β	<i>P</i> -valor discreto	B
rs693	0.279	0.094	0.034	0.206
rs2144300	0.466	0.052	0.000	0.277
rs10777845	0.610	-0.057	0.035	0.230
rs505922	0.332	0.107	0.039	-0.221
rs5219	0.777	0.030	0.039	0.231
rs7865618	0.624	-0.053	0.027	0.252
rs163184	0.094	0.162	0.002	0.292
rs2972144	0.125	0.140	0.011	0.250
rs10830963	0.477	0.087	0.038	-0.272
rs10892151	0.944	-0.015	0.005	0.579
rs11920719	0.772	0.072	0.032	0.510
rs4506565	0.100	0.175	0.049	-0.205
rs7689714	0.787	-0.030	0.041	-0.231
rs1828390	0.545	0.052	0.008	0.243
rs2080401	0.426	0.120	0.023	-1.771
rs7901695	0.255	0.189	0.031	1.378
rs642858	0.215	-0.244	0.034	-1.141

Devido a uma elevada proporção dos dados *missing* na genotipagem foram excluídos os SNPs rs2080401-*HMGB1P4*, rs7901695-*TCF7L2*, rs642858-*ATP5F1P6*, rs4380028-*ADAMTS7*, rs599839-*SORT1*, rs1436953-*C2CD4A*, rs1864163-*CETP*, rs1501908-*TIMD4* e rs564398-*CDKN2B-AS1*. Finalmente, um modelo ZIGamma múltiplo para CAC (Figura 9) foi ajustado para sexo, idade e 47 SNPs.

Figura 9. Gráficos de diagnóstico do modelo zero-inflacionado gama. O modelo é adequado para os dados porque a estimativa de densidade e o QQ-Plot mostram resíduos com a distribuição esperada.

4.4 Construção do GRS

Para a derivação do GRS, foi ajustado um modelo zero-inflacionado múltiplo com 871 indivíduos. Estes indivíduos são o resultado da genotipagem de 47 SNPs escolhidos para obter o escore. A sequência para a construção do GRS é mostrada abaixo:

$$CAC = \text{Modelagem contínua } (\mu) + \text{Modelagem discreta } (\eta)$$

em que,

$$\mu = Age + Sex + SNP1 + SNP2 + \dots + SNP33 + \varepsilon$$

e

$$\eta = Age + Sex + SNP1 + SNP2 + \dots + SNP17 + \varepsilon$$

A partir disso, foram calculados os valores ajustados da parte discreta e contínua do modelo. Os valores ajustados da parte contínua fornecem o valor estimado do CAC, dado $CAC > 0$. Os valores da parte discreta do modelo fornecem a probabilidade de o indivíduo ter $CAC = 0$. Depois disso, o valor do GRS é formulado como:

$$GRS = W * (1 - \hat{P}(CAC = 0)) * (\widehat{CAC} | CAC > 0)$$

W corresponde a um peso específico, calculado como um peso que minimiza o erro quadrado médio dos valores ajustados de CAC. Em outras palavras, W varia de 0,1 a 5, em incrementos de 0,1, o W para este modelo corresponde a 0,76. Desta forma, o GRS é calculado como:

$$GRS = 0.76 * (1 - \hat{P}(CAC = 0)) * (\widehat{CAC} | CAC > 0)$$

Seguindo os mesmos passos da modelagem anterior, nós calculamos escore apenas com a informação genética (GRS *SNP*). Com isso, outro peso foi gerado para este modelo, o que resultou em 0,65. Por fim, geramos um escore apenas com Idade+Sexo e, desta vez, excluindo os polimorfismos. O W do modelo Idade+Sexo foi de 0,84.

4.5 Derivação do GRS e comparação com o modelo Idade+Sexo e FRS

O GRS foi derivado a partir do modelo zero-inflacionado, como descrito acima. Nós comparamos seu desempenho com o escore Idade+Sexo e FRS para DAC em 10 anos por meio de análise da área sobre a curva (Figura 10). Os pontos de corte para os escores foram obtidos por meio do ponto máximo da soma entre a sensibilidade e especificidade dos escores obtidos com os modelos ajustados.

Figura 10. Gráfico das curvas ROC (Receiver operating characteristic). Curvas ROC dos escores GRS, Idade+Sexo e FRS para a predição de CAC. As áreas sob as curvas são 0,908, 0,860 e 0,812, respectivamente.

A Tabela 4 mostra que o GRS alcança uma predição de 91%, que foi maior do que os valores obtidos para o escore Idade+Sexo e FRS (86% e 81%, respectivamente). Além disso, o FRS e escore Idade+Sexo apresentaram menor sensibilidade do que o GRS. Em contrapartida, FRS foi o que apresentou maior valor preditivo positivo (VPP) devido a maior especificidade encontrada.

Tabela 6 – Desempenho do GRS em comparação com o escore Idade+Sexo e FRS

	GRS	Idade+Sexo	FRS
Estatística-C (IC 95%)	0.908	0.86	0.812
...	(0.882 - 0.934)	(0.825 - 0.895)	(0.774 - 0.850)
Sensibilidade (%)	93	84	43
Especificidade (%)	76	74	90
VPP (%)	38	33	41
VPN (%)	99	97	90

Os parâmetros NRI e IDI indicam a melhora na reclassificação, quando se usa o GRS em vez de FRS (Tabela 7). Em comparação com o FRS, o GRS gerou um NRI de 0,35 (IC de 95% de IC, 0,25 a 0,45). O efeito da reclassificação foi maior para o anterior quando se compara o escore Idade+Sexo com FRS (NRI, 0,24; IC de 95%, 0,14 a 0,35). Estes resultados indicam que o GRS e o modelo Idade+Sexo aumentam a distinção entre indivíduos verdadeiramente afetados e não afetados pela doença coronariana em comparação com o FRS.

Tabela 7 – Avaliação da reclassificação de risco do GRS e do escore Idade+Sexo

Modelos	GRS	Idade+Sexo
NRI (IC 95%)	0.355 (0.255 a 0.455)	0.246 (0.145 a 0.346)
IDI (IC 95%)	0.154 (0.098 a 0.209)	0.114 (0.058 a 0.170)
ContNRI (IC 95%)	1.05 (0.881 a 1.236)	0.193 (-0.001 a 0.388)
NRI Evento/Não evento	0.496/-0.140	0.374/0.685

Além disso, foi avaliado o NRI contínuo (CountNRI), que é um índice independente de categorias de risco e que maximiza a potência estatística; CountNRI para o GRS foi de 1,05 (IC de 95%: 0,88 a 1,23). Para o modelo Idade+Sexo, o CountNRI foi 0,19 (IC de 95%: -0,001 a 0,39). Além disso, o IDI mostrou que o GRS ofereceu uma melhora na discriminação entre os indivíduos afetados e não afetados em comparação com o FRS (IDI, 0,15; IC de 95%: 0,10-

0,20). Quando analisamos o IDI entre o escore Idade+Sexo e FRS, o resultado obtido foi de 0,11 (IC de 95%: 0,05 a 0,17). A Figura 11 mostra exemplos do GRS em função da idade, em indivíduos afetados e não afetados por doença coronária, geradas por modelo logístico.

Figura 11. Curvas de risco geradas a partir de modelo logístico do GRS.

4.6 Análise de associação entre GRS, Fatores de Risco e CAC

Para analisar a associação entre o GRS e os fatores de risco, nós ajustamos modelos lineares generalizados para cada um dos fatores de risco e o GRS (Tabela 8).

Tabela 8 – A associação entre o GRS, fatores de risco e cálcio arterial coronário

Fatores de Risco	β	Erro Padrão	P-valor
Glicose	0.016	0.002	1.22e-10
Glicose pós-sobrecarga	0.009	0.001	2.10e-10
Insulina	0.031	0.008	1.58e-04
Ácido úrico	0.450	0.035	<2e-16
Colesterol total	0.005	0.001	1.78e-04
HDL-c	-0.019	0.004	1.69e-05
LDL-c	0.005	0.002	0.003
Triglicerídeos	0.004	0.001	2.12e-12
Proteína C-reativa	-0.008	0.013	0.538
Pressão sistólica	0.044	0.004	<2e-16
Pressão diastólica	0.040	0.005	4.88e-13
IMC	0.020	0.013	0.116
Relação cintura-quadril	10.400	0.595	<2e-16
Hipertensão	1.249	0.126	<2e-16
Diabetes tipo II	1.277	0.177	1.26e-10
Fumantes	0.171	0.155	0.27
Histórico Familiar	0.342	0.131	0.00899

Observamos que glicose, glicose pós-sobrecarga, insulina, ácido úrico, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicerídeos foram significativamente associados com o GRS. Além disso, as pressões, sistólica e diastólica, a relação cintura-quadril, hipertensão, diabetes tipo 2 e o histórico familiar também foram associados com o GRS. A figura 12 permite observar melhor essas associações.

Figura 12. Diagrama de Venn mostra a associação entre os polimorfismos e os fatores de risco, além da associação com o CAC usando o modelo-inflado zero. **A.** Fatores de Risco; **B.** Zero-inflacionado parte contínua da CAC; **C.** Zero-inflacionado parte discreta do CAC

Na Tabela 9, cada um dos fatores de risco foi usado para avaliar o seu efeito sobre o escore de cálcio. Os fatores de risco colesterol total, LDL-C, RCQ, hipertensão e diabetes foram significativas em ambas as partes do modelo. A Glicose pós-sobrecarga, insulina, triglicerídeos, pressão arterial sistólica, IMC e o histórico familiar foram significativos apenas na parte discreta do modelo. Não houve fatores de risco significativos somente para a parte contínua do modelo. Além disso, foi avaliado o efeito da adição de apenas a informação genética (GRS *SNPs*) para o modelo de **CAC = Idade + Sexo + Fator de Risco** para observar as mudanças na importância dos fatores de risco. Apenas glicose, RCQ e tabagismo havia mudaram sua significância. Outra análise de associação foi realizada, desta vez com um modelo múltiplo.

Tabela 9 – Associação do GRS *SNPs* com fatores de risco para cálcio arterial coronário

		CAC = Idade + Sexo + Fator de risco				CAC = Idade + Sexo + Fator de risco + GRS <i>SNPs</i>			
		<i>Parte discreta</i>		<i>Parte contínua</i>		<i>Parte discreta</i>		<i>Parte contínua</i>	
		β	<i>P</i> -valor	β	<i>P</i> -valor	β	<i>P</i> -valor	β	<i>P</i> -valor
Glicose	Fator de risco	-0.010	0.006	0.009	0.007	-0.010	0.008	0.002	4.87e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.172	0.012	9.36e-11
Glicose pós-sobrecarga	Fator de risco	-0.009	4.69e-05	0.003	0.070	-0.009	7.28e-05	0.002	3.93e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.001	3.33e-01	0.012	1.00e-09
Insulina	Fator de risco	-0.029	0.013	0.015	0.165	-0.027	0.021	-0.001	9.16e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.181	0.012	1.80e-11
Ácido úrico	Fator de risco	-0.118	0.073	0.044	0.400	-0.111	0.093	-0.063	2.41e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.139	0.012	1.33e-11
Colesterol Total	Fator de risco	-0.009	2.90e-05	-0.003	0.050	-0.009	2.76e-05	-0.003	2.88e-02
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.103	0.011	6.07e-11
HDL-c	Fator de risco	0.007	0.310	0.001	0.849	0.007	0.328	0.004	5.62e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.112	1.18e-02	3.48e-11
LDL-c	Fator de risco	-0.008	0.001	-0.004	0.041	-0.008	0.001	-0.004	2.55e-02
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.093	0.011	4.91e-11
Triglicerídeos	Fator de risco	-0.004	1.25e-04	-4.78e-04	0.544	-0.004	1.53e-04	-5.53e-04	3.95e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.146	1.17e-02	4.36e-11
Proteína C-reativa	Fator de risco	0.024	0.252	-0.003	0.915	-0.074	0.354	-0.047	5.76e-01
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.112	0.012	4.48e-11
Pressão sistólica	Fator de risco	-0.014	0.028	0.001	0.768	-0.014	0.031	-0.003	0.5177
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.119	0.012	3.02e-11
Pressão diastólica	Fator de risco	-0.016	0.064	4.38e-04	0.950	-0.016	0.070	-3.25e-03	0.6386
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.119	1.17e-02	3.51e-11

IMC	Fator de risco	-0.066	0.001	0.029	0.060	-0.065	0.001	0.006	0.697
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.141	0.012	7.11e-11
Relação cintura-quadril	Fator de risco	-5.372	8.24e-05	3.134	0.004	-5.246	1.23e-04	0.586	0.588
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.184	0.012	1.21e-10
Hipertensão	Fator de risco	-0.593	0.002	0.599	0.000	-0.566	0.003	0.311	5.18e-02
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.204	0.011	1.65e-10
Diabetes tipo II	Fator de risco	-1.061	3.77e-05	0.712	1.88e-04	-1.023	7.98e-05	0.383	3.49e-02
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.275	0.011	1.62e-10
Fumantes	Fator de risco	-0.203	0.347	0.251	0.230	-0.259	0.262	0.538	8.04e-03
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.108	0.012	1.91e-11
Histórico familiar	Fator de risco	-0.474	0.012	0.169	0.325	-0.464	0.015	0.251	0.1041
	GRS <i>SNPs</i>	—	—	—	—	-0.002	0.169	0.012	1.38e-11

O GRS *SNPs* e todos os fatores de risco foram colocados juntos em um modelo múltiplo e ajustados para sexo e idade. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Associação do GRS *SNPs* com fatores de risco de risco para CAC por meio de modelo múltiplo

	Parte contínua		
	β	Erro padrão	<i>P</i> -valor
(Intercept)	2.339	0.659	4.11E-04
Idade	0.064	0.010	6.51 e-11
Sexo	-0.785	0.167	3.22 e-6
LDL-c	-0.004	0.002	0.033
Glicose	-0.006	0.004	0.092
Diabetes tipo II	0.407	0.233	0.081
GRS <i>SNP</i>	0.012	0.002	3.48 e-11
	Parte discreta		
	β	Erro padrão	<i>P</i> -valor
(Intercept)	12.448	1.134	<2.00e-16
Idade	-0.166	0.016	< 2.00e-16
Sexo	1.641	0.201	1.15E-05
Histórico familiar	-0.428	0.200	0.032
IMC	-0.056	0.022	0.009
Colesterol total	-0.008	0.002	2.62E-04
Glicose pós-sobrecarga	-0.006	0.003	0.024
Diabetes tipo II	-0.523	0.335	0.118

Além disso, aplicou-se de regressão logística múltipla para avaliar se a adição de GRS *SNPs* poderia aumentar a precisão de um modelo que incluía apenas fatores de risco. Esta análise mostrou que a GRS foi significativa ($P = 0,003$), e foi independentemente associada com um CAC ≥ 100 (Tabela 11).

Tabela 11 – Modelo logístico entre fatores de risco e o GRS *SNPs*

	β	Erro Padrão	<i>P</i> -valor
Idade	0.152	0.021	1.45e-12
Sexo	-1.449	0.357	5.52e-05
Hipertensão	0.800	0.327	0.015
Fumantes	0.846	0.313	0.007
Pressão sistólica	0.023	0.015	0.108
Pressão diastólica	-0.041	0.022	0.063
Relação cintura-quadril	6.021	2.065	0.004
HDL-c	0.020	0.011	0.063
Glicose pós-sobrecarga	0.006	0.003	0.040
Pretína C-reativa	-0.086	0.049	0.082
GRS <i>SNPs</i>	0.006	0.002	0.003

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a construção de um escore genético de risco para a doença arterial coronariana. Antes da derivação do modelo, genotipamos 265 polimorfismos para 1.349 indivíduos oriundos do projeto ELSA-SP.

Escore de risco tradicionais são amplamente utilizados porque os indicadores são de fácil acesso e mensuração (Battes et al. 2013). Assim, vários calculadores de risco, extensivamente validados, estão disponíveis e podem integrar informações de vários fatores de risco em um único número. No entanto, por si só, estes escores de risco possuem capacidade limitada de prever ou estratificar o risco em uma porção significativa da população (Azevedo et al. 2012) sendo esta abordagem abaixo do ideal para o gerenciamento de um número de subgrupos de risco e indivíduos. A acurácia das predições dos atuais escores de risco para doenças cardiovasculares é em torno de 0,75, e a predição varia de acordo com diferentes populações (Ioannidis 2009). Este resultado foi replicado no presente estudo, quando analisamos as estatísticas relativas às predições do FRS.

Vários escores de risco foram desenvolvidos para prever eventos cardiovasculares. Além disso, os escores foram adaptados a diferentes regiões geográficas e em diferentes amostras de coortes (Versteysen et al. 2011). Utilizamos o FRS para o risco de DAC em 10 anos, descrito por Wilson e cols., para comparações com o nosso GRS. Obviamente, há outras diretrizes para a prevenção de doença coronariana com novas categorias de risco, e existem outras variáveis, parâmetros e fórmulas para calcular o risco (Wilson et al. 1998). No entanto, esses novos modelos de predição e a validade das novas recomendações permanecem controversos (Ioannidis and Tzoulaki 2014).

Nos últimos anos, temos visto um aumento na identificação de variantes genéticas associadas à DAC (Lieb and Vasan 2013). Consequentemente, existe um interesse crescente em como podemos usar essas informações para melhorar a predição de risco de DAC. Uma abordagem importante é combinar vários SNPs em uma única medição de risco que poderia, eventualmente, ser usado na prática clínica (Dandona and Roberts 2009).

Neste estudo, foi proposto um escore de risco genético composto de SNPs que foram previamente associados com doença coronária e / ou fenótipos relacionados com a doença. Nós avaliamos a capacidade desta "nova ferramenta" em prever o risco de DAC em uma amostra de indivíduos do estudo ELSA-Brasil.

Por meio da aplicação do modelo zero-inflacionado, derivamos um GRS baseado em 47 SNPs. O modelo considera também a idade e o sexo de cada indivíduo. Nossos resultados mostraram uma alta acurácia, na predição de DAC, usando o nosso modelo de GRS. Quando comparado com o FRS, o GRS mostrou boa reclassificação e uma boa discriminação entre os afetados e não afetados.

Criamos outros dois escores para comparação com o efeito original GRS. O escore Idade+Sexo foi comparado independentemente do GRS e demonstrou uma boa acurácia em relação ao FRS. Este modelo conseguiu uma acurácia maior do que FRS e, como o GRS, mostrou boa reclassificação e discriminação entre os afetados e não afetados. O modelo GRS *SNPs* foi utilizado para comparar a análise de associação entre CAC, fatores de risco e polimorfismos.

Estudos anteriores, que conceberam um GRS para a doença cardiovascular, forneceram algumas evidências de melhora capacidade preditiva (Morrison et al. 2007; Vaarhorst et al. 2012; Do et al. 2013). Por exemplo, Thanassoulis e cols.

construíram um GRS que compreendia 13 SNPs associados com doença coronariana, o qual mostrou ser um preditor independente de eventos cardiovasculares e de escore de cálcio alto (Thanassoulis et al. 2012). Este escore obteve uma leve melhora na reclassificação de risco para DAC, e mostrou uma melhoria significativa na discriminação de escore de cálcio alto. Esse estudo também acrescentou SNPs recém-descobertos, mas esses SNPs não melhoraram o desempenho de seu GRS. Kathiresan e cols. também geraram um GRS com SNPs que foram robustamente associados com os níveis lipídicos. Este GRS foi associado com um aumento de 15% na determinação do risco de DAC, mas não melhorou a discriminação e, como no estudo de Thanassoulis, mostrou apenas uma melhora marginal na reclassificação de risco (Kathiresan et al. 2008; Thanassoulis et al. 2012). No presente estudo, o GRS apresentou um índice de reclassificação de 0,35 (em comparação com as FRS), e mostrou uma habilidade altamente significativa para discriminar os indivíduos afetados e os não afetados com DAC.

Paynter e cols. criaram dois GRSs, com base na literatura, para prever o risco cardiovascular em uma coorte prospectiva. Um GRS usando SNPs fortemente associados com DAC e o outro GRS utilizando um conjunto maior de SNPs que foram associados com qualquer fator de risco para DAC. No entanto, eles não encontraram nenhuma evidência de que qualquer um dos dois GRSs melhorasse, significativamente, a predição de risco quando comparados com escores de risco clínicos (Paynter et al. 2010).

A nossa abordagem para a seleção dos SNPs foi semelhante ao utilizado em estudos prévios. Nós também investigamos as associações entre o nosso GRS, baseados nos SNPs e nos traços, com os resultados utilizados em estudos

anteriores. No entanto, a capacidade preditiva do nosso escore foi significativamente melhor do que o descrito em estudos anteriores.

Nossa hipótese é de que há duas explicações possíveis para este resultado. Em primeiro lugar, a abordagem de modelagem que implantamos foi sem dúvida mais adequada do que os modelos anteriores para representar a distribuição empírica do fenótipo alvo (Ma et al. 2010). Nenhum estudo anterior que gerou um GRS para CAC tomou vantagem desta abordagem de modelagem. Nossos resultados sugerem que estudos futuros utilizem esta abordagem. Em segundo lugar, nós não tentamos usar informações do GRS para melhorar sua predição sobre os fatores de risco clínicos. Este esforço, em nossa opinião, seria negar a diferença entre o traço e os fenótipos de estado na arquitetura complexa do desenvolvimento de CAC. Nossa intenção foi avaliar o efeito da adição da informação genética aos fatores de risco e, na verdade, mostramos que nosso GRS poderia capturar as informações fornecidas pela maioria (mas não todos) fatores de risco cardiovascular, comumente usados em ferramentas clínicas de predição.

Supomos que o GRS possa, eventualmente, ser capaz de produzir funções baseadas em idade, sexo, fatores de risco e fatores genéticos, permitindo explicar a doença em longo prazo (como mostrado na Figura 11). Isto não permite dizer que a informação do estado de risco não possa ser usada para modular as funções de risco derivadas com este modelo.

Partindo disso, nós modelamos uma rede de interações (Figura 12) que nos permite visualizar como funciona essa interação entre os polimorfismos, fatores de risco e CAC. Percebemos que alguns polimorfismos estão associados com mais de um fator de risco e o CAC em nosso estudo. Isso nos permite inferir que esta

associação poderia explicar, em parte, o efeito de polimorfismos nos fatores de risco, mas não a doença em si.

Figura 13. Rede de interações entre as associações de polimorfismos com CAC e fatores de risco. Associação com o CAC realizada por modelo zero-inflacionado.

Uma questão importante que permanece é como usar esta informação para promover nossa compreensão de como a informação genética pode influenciar as avaliações de risco e manejo clínico da doença. Estudos futuros devem se concentrar em maneiras de melhorar o GRS, e também, sobre a forma como esta informação genética pode ser efetivamente usada para informar os pacientes e os prestadores de serviço da saúde.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Concluindo, estabelecemos um GRS que compreende 47 polimorfismos selecionados previamente por associação com DAC ou fatores de risco cardiovascular em GWAS. O GRS se mostrou eficaz na estratificação de risco dos indivíduos, de acordo com o valor do escore de cálcio. Além disso, os nossos resultados sugerem que os polimorfismos permitem explicar a variabilidade do CAC, mas não alta predição de DAC. Acreditamos que essas observações devem levar a discussões aprofundadas sobre o uso do GRS em manejo clínico e suas implicações para a saúde e prevenção de doenças.

Anexos

ANEXO A. Polimorfismos escolhidos em banco online de GWAS para este estudo

CHR	Locus	Gene	SNP	Posição	Alelo de risco	Menor alelo	Maior alelo	Call rate %	MAF	EHW	Fenótipos/traços	Referências
1	1q42.12	<i>GALNT2</i>	rs10489615	230304988	G	A	G	100	0.4731	0.05872	Colesterol HDL	Willer CJ (2008)
1	1q23.3	<i>NOS1AP</i>	rs10494366	162085685	G	G	T	100	0.4496	0.1148	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
1	1p31.3	<i>DOCK7</i>	rs10889353	63118196	C	C	A	100	0.2802	0.8176	Colesterol Total	Aulchenko YS (2008)
1	1p32.3	<i>PCSK9</i>	rs11206510	55496039	T	C	T	100	0.2202	5.34e-05	Colesterol LDL	Waterworth DM (2010)
1	1p31.3	<i>DOCK7</i>	rs1167998	62931632	C	C	A	100	0.3609	1	Triglicerídeos	Aulchenko YS (2008)
1	1p31.3	<i>DOCK7</i>	rs1168013	62996838	G	C	G	100	0.384	0.689	Triglicerídeos	Waterworth DM (2010)
1	1q42.2	<i>PCNXL2</i>	rs12027542	233340154	A	G	A	100	0.3304	0.0002314	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)
1	1p31.3	<i>ANGPTL3</i>	rs12130333	63191777	T	T	C	99	0.1664	0.1015	Triglicerídeos	Kathiresan S (2008)
1	1q44	<i>NLRP3</i>	rs12239046	247601595	C	T	C	99	0.4202	0.08346	Proteína C-reativa	Dehghan A (2011)
1	1q44	<i>DOCK7</i>	rs1539019	247600301	A	A	C	100	0.3814	0.4422	Fibrinogênio	Dehghan A (2009)
1	1q32.2	<i>CR2</i>	rs17045328	207652176	G	G	A	100	0.03628	0.1009	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)
1	1p32.2	<i>PPAP2B</i>	rs17114036	56962821	T	G	A	100	0.12	0.6842	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
1	1p36.22	<i>MTHFR</i>	rs17367504	11862778	G	G	A	100	0.1115	0.1993	Pressão sanguínea	Newton-Cheh C (2009)
1	1q41	<i>MIA3</i>	rs17465637	222823529	C	A	C	100	0.416	1	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
1	1p31.3	<i>DOCK7</i>	rs1979722	62940097	T	A	G	100	0.2986	0.3122	Colesterol Total	Aulchenko YS (2008)
1	1q42.13	<i>GALNT2</i>	rs2144300	230294916	T	C	T	100	0.4053	8.20e-175	Colesterol HDL	Willer CJ (2008)
1	1p31.3	<i>DOCK7</i>	rs4587594	63133930	G	A	G	100	0.3244	0.05272	Níveis metabólicos	Inouye M (2012)
1	1q42.13	<i>GALNT2</i>	rs4846914	230295691	G	A	G	98	0.4815	0.05816	Colesterol HDL	Willer CJ (2013)
1	1p13.3	<i>SORT1</i>	rs599839	109822166	A	G	A	98	0.3904	0.0007685	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
1	1p13.3	<i>CELSR2</i>	rs646776	109818530	T	C	T	100	0.4683	8.51e-19	Doença arterial coronária	Consórcio Gen. DAC (2001)
1	1q42.3	<i>TARBP1</i>	rs744487	234726012	A	C	A	98	0.339	0.09849	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
1	1q21.3	<i>IL6R</i>	rs8192284	154426970	C	C	A	100	0.3602	1	Proteína C-reativa	Ridker PM (2008)
2	2q24.1	<i>ACVR1</i>	rs10183640	158780204	G	A	G	100	0.2778	0.4889	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
2	2p24.1	<i>APOB</i>	rs10199768	21244000	T	T	G	99	0.3348	0.09411	Fatores de risco para DCV	Middelberg RP (2011)
2	2p24.1	<i>APOB</i>	rs1042034	212225281	C	C	T	100	0.4875	9.85e-37	Triglicerídeos	Teslovich TM (2010)
2	2q37.1	<i>INPP5D</i>	rs10933436	233998481	A	A	C	100	0.493	0.7449	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)

2	2q14.3	<i>PROC</i>	rs1158867	128177377	C	C	T	100	0.4451	0.001536	Níveis de proteína C	Tang W (2010)
2	2p16.2		rs1160297	53237320	G	G	C	100	0.3774	0.05761	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
2	2p25.3	<i>DCDC2C</i>	rs11677370	3841420	T	A	T	100	0.3176	0.2908	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)
2	2p24.1	<i>APOB</i>	rs11902417	21198900	G	A	G	99	0.2354	0.008623	Colesterol HDL	Waterworth DM (2010)
2	2p23.3	<i>GCKR</i>	rs1260326	27730940	T	T	C	100	0.3591	0.06828	Triglicerídeos	Kathiresan S (2008)
2	2p23.3	<i>GCKR</i>	rs1260333	27748624	A	A	G	100	0.4556	0.6703	Triglicerídeos	Waterworth DM (2010)
2	2q31.1	<i>HMGB1P4</i>	rs2080401	171540823	A	C	A	100	0.3805	0.8422	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
2	2p21	<i>EPAS1</i>	rs2346177	46642249	A	G	A	100	0.487	0.3504	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
2	2p16.3	<i>ASB3</i>	rs2357013	53266129	A	C	T	98	0.378	0.003499	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
2	2q24.1	<i>GALNT13</i>	rs2882047	155235000	G	G	T	100	0.4303	0.3841	Obesidade	Comuzzie AG (2012)
2	2q36.3	<i>NYAP2</i>	rs2943634	227068080	C	A	C	100	0.4043	0.2451	Doença arterial coronária	Samani NJ (2007)
2	2q36.3	<i>NYAP2</i>	rs2943641	227093745	C	T	C	100	0.3621	0.06906	Diabetes tipo 2	Rung J (2009)
2	2q36		rs2972144	227101411	A	A	G	100	0.4937	7.65e-11	Diabetes tipo 2	Zheng,(2014)
2	2p22.2	<i>QPCT</i>	rs4352210	37750980	A	A	G	100	0.4165	0.8682	Intervalo RR (Frequência cardíaca)	Marroni F (2009)
2	2p24.1	<i>KLHL29</i>	rs4665630	23898317	C	C	T	98	0.1977	2.42e-05	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
2	2q31		rs6433232	171546213	G	A	G	98	0.3365	0.1006	Doença arterial coronária	The CHD Genetics Consortium (2001)
2	2p23.1	<i>LBH</i>	rs6708166	30526780	A	A	G	100	0.3866	1	Níveis de FvW e FVIII	Antoni G (2011)
2	2p23		rs6760047	30528297	A	G	A	98	0.3853	0.03945	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
2	2p24.1	<i>APOB</i>	rs693	21232195	G	A	G	98	0.4796	0.1171	Cholesterol total	Aulchenko YS (2008)
2	2q24.1	<i>GALNT13</i>	rs707040	155226677	T	C	T	100	0.372	0.639	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
2	2q34	<i>CPS1</i>	rs7422339	211540507	A	A	C	100	0.35	1	Fibrinogênio	Danik JS (2009)
2	2p21	<i>EPAS1</i>	rs7579899	46537604	A	A	G	100	0.4695	0.03061	Carcinoma de células renais	Purdue MP (2010)
2	2p23.3	<i>GCKR</i>	rs780092	27743154	A	C	T	99	0.1651	0.1809	Traços lipídicos	Wu Y (2010)
2	2p23.3	<i>GCKR</i>	rs780094	27741237	T	T	C	98	0.4487	0.008451	Triglicerídeos	Aulchenko YS (2008)
3	3p22.2	<i>SCN5A</i>	rs11129795	38589163	G	A	G	98	0.2193	0.1732	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
3	3q21.1	<i>ADCY5</i>	rs11708067	123065778	A	G	A	100	0.1902	0.1448	Glicose em jejum	Dupuis J (2010)
3	3q23	<i>CLSTN2</i>	rs11708189	140175360	G	G	A	100	0.4569	0.7111	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
3	3q26.2	<i>SLC2A2</i>	rs11920090	170717521	T	A	T	99	0.1914	0.003678	Glicose em jejum	Dupuis J (2010)

3	3q26.2	<i>TNIK</i>	rs11920719	170834559	T	C	A	100	0.0493	0.136	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
3	3p22.2	<i>SCN5A</i>	rs12053903	38593393	T	C	T	100	0.4958	0.2043	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
3	3p25.2	<i>PPARG</i>	rs1801282	12393125	C	G	C	100	0.1993	5.07e-60	Diabetes tipo 2	Saxena R (2007)
3	3p23	<i>OSBPL10</i>	rs1902341	31795570	T	T	C	100	0.496	0.914	Doença arterial periférica	Koriyama H (2010)
3	3q27.2	<i>IGF2BP2</i>	rs4402960	185511687	T	T	G	100	0.375	0.07401	Diabetes tipo 2	Takeuchi F (2009)
3	3q27.2	<i>VPS8</i>	rs4686760	184514613	G	A	G	100	0.4547	0.383	Níveis de FvW e FVIII	Antoni G (2011)
3	3p26.3	<i>CHL1</i>	rs6764363	312349	T	C	T	99	0.3673	0.1078	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
3	3q27.2	<i>IGF2BP2</i>	rs6769511	185530290	C	C	T	100	0.4342	0.08813	Diabetes tipo 2	Unoki H
3	3p22	<i>SCN5A</i>	rs6793245	38599037	A	A	G	100	0.4057	0.8635	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
3	3p26.3	<i>CHL1</i>	rs6795349	172477	G	G	A	100	0.08899	0.2241	Response to antidepressant treatment	Clark SL (2011)
3	3p22.2	<i>SCN10A</i>	rs6795970	38766675	A	A	G	100	0.2886	0.8436	Traços eletrocardiográficos	Chambers JC (2010)
3	3p25.1	<i>BTB</i>	rs7651039	15648004	C	T	C	100	0.3766	0.3876	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
4	4p12	<i>GNPDA2</i>	rs10938397	45182527	G	G	A	99	0.3836	0.9523	Obesidade	Speliotes EK (2010)
4	4q21.21	<i>FGF5</i>	rs16998073	81184341	T	T	A	100	0.2189	0.163	Pressão sanguínea diastólica	Newton-Cheh C (2009)
4	4q35.2	<i>F11</i>	rs3756008	187185385	T	T	A	100	0.3842	0.7741	Tromboembolismo venoso	Germain M (2011)
4	4q22.1	<i>AFF1</i>	rs442177	88030261	G	G	T	100	0.3896	0.2922	Triglicerídeos	Teslovich TM (2012)
4	4p16.1	<i>WFS1</i>	rs4689388	6270056	G	G	A	100	0.3397	0.05314	Diabetes tipo 2	Rung J (2009)
4	4q27	<i>NR</i>	rs7659604	122665514	T	T	C	98	0.4407	0.2641	Diabetes tipo 2	WTCCC (2007)
4	4q21.23	<i>ARHGAP24</i>	rs7660702	86651464	T	C	T	100	0.4271	0.002227	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
4	4q27		rs7689714	122665943	T	A	T	100	0.2958	1.13e-06	Doença arterial coronária	The Genetics Consortium (2001)
5	5q12.3	<i>SREK1</i>	rs10514995	65739439	G	C	T	100	0.3655	0.8438	Frequência cardíaca	Marroni F (2009)
5	5q33.3	<i>TIMD4</i>	rs1501908	156398169	G	G	C	98	0.4027	0.1706	Colesterol LDL	Kathiresan S (2008)
5	11q13	<i>LOC401191</i>	rs16895200	65747292	A	C	A	98	0.3478	0.804	Relação cintura-quadril	Hindorff LA (2009)
5	5q31.3	<i>SPRY4</i>	rs17577085	141863604	T	G	T	98	0.1252	1.78e-81	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
5	5q21.1	<i>RPS9P3</i>	rs1829883	98781103	C	T	C	100	0.3542	0.1139	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
5	5q21		rs2461991	98793332	C	C	G	100	0.4893	0.00473	Diabetes tipo 2	Scott LJ (2007)
6	6p22.3	<i>CDKAL1</i>	rs10946398	20661034	C	C	A	100	0.3711	0.005291	Diabetes tipo 2	Zeggini E (2007)
6	6p22.2	<i>SLC17A4</i>	rs11754288	25776949	A	A	G	100	0.3295	0.0294	Fatores de risco para DCV	Middelberg RP (2011)

6	6q23.2	<i>TCF21</i>	rs12190287	134214525	T	G	C	100	0.3238	0.1335	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
6	6p23	<i>PHACTR1</i>	rs12526453	12927544	C	G	C	100	0.3083	1	Doença arterial coronária	Hager J (2012)
6	6p21.31	<i>ANKS1A</i>	rs17609940	35034800	G	C	G	100	0.121	0.1559	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
6	6p21.32	<i>TRNAI25</i>	rs3117035	33086249	C	T	C	100	0.3478	0.5386	Intervalo RR (Frequência cardíaca)	Marroni F (2011)
6	6p22.3	<i>CDKAL1</i>	rs4712523	20657564	G	G	A	98	0.3753	0.7308	Diabetes tipo 2	Rung J (2009)
6	6p22.3	<i>CDKAL1</i>	rs4712524	20657865	G	G	A	100	0.3714	0.064	Diabetes tipo 2	Unoki H (2008)
6	6p22.1	<i>TRIM27</i>	rs4947339	28916252	T	C	T	100	0.3991	0.4328	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
6	6q24.1	<i>ATP5F1P6</i>	rs642858	140273647	A	A	G	100	0.2217	0.7911	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)
6	6q24		rs646747	140280368	T	C	T	100	0.3807	4.95e-14	Doença arterial coronária	The CHD Genetics Consortium (2001)
6	6q25.2	<i>OPRM1</i>	rs675026	154414563	A	A	G	100	0.465	4.57e-08	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
6	6p22.3	<i>CDKAL1</i>	rs7754840	20661250	C	C	G	100	0.3405	0.02336	Diabetes tipo 2	Li H (2012)
6	6q26	<i>PLG</i>	rs783147	161137990	A	A	G	100	0.4853	4.55e-11	Níveis de lipoproteína	Qi Q
6	6p21.3		rs9277767	33097306	C	G	C	100	0.2537	0.4179	Doença arterial coronária	The Genetics Consortium (2001)
6	6p22.3	<i>CDKAL1</i>	rs9295474	20652717	G	G	C	99	0.3176	0.9497	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)
6	6q24.3	<i>STXBP5</i>	rs9390459	147680359	A	A	G	99	0.4522	0.7039	Níveis de fatores de coagulação	Smith NL (2010)
7	7p21		rs10447589	12937133	T	A	T	99	0.4388	0.3049	Diabetes tipo 2	WTCCC (2007)
7	7p22.2	<i>RPL21P72</i>	rs10488360	4411209	G	G	A	100	0.3609	1.69e-07	Factor VII	Yang Q
7	7q22.3	<i>BCAP29</i>	rs10953541	107244545	C	T	C	100	0.1841	0.05809	Doença arterial coronária	The CHD Genetics Consortium (2001)
7	7q32.2	<i>ZC3HC1</i>	rs11556924	129663496	C	T	C	100	0.2692	0.01888	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
7	7q36.1	<i>KCNH2</i>	rs3807375	150667210	T	T	C	99	0.4615	1.80e-05	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
7	7q31.2	<i>CAV1</i>	rs3807989	116186241	A	A	G	100	0.4703	0.05848	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
7	7p22		rs4723705	4412593	A	G	A	100	0.3417	0.04472	Diabetes tipo 2	Unoki H (2008)
7	7p21.3	<i>ARL4A</i>	rs732577	12932049	G	G	T	100	0.5	0.5789	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
7	7q22.1	<i>SLC12A9</i>	rs7801190	100458093	C	G	C	100	0.1037	1	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
7	7p15.1	<i>JAZF1</i>	rs849142	28185891	T	C	T	99	0.4773	0.3846	Diabetes tipo 2	Zeggini E (2008)
7	7p15.1	<i>JAZF1</i>	rs864745	28180556	T	C	T	100	0.406	0.1791	Diabetes tipo 2	Zeggini E (2008)
8	8p21.3	<i>LPL</i>	rs10105606	19827848	C	A	C	100	0.4202	1	Triglicerídeos	Waterworth DM (2010)

8	8p23.1	<i>XKR6</i>	rs10156356	11046209	T	C	T	98	0.396	0.02474	Triglicerídeos	Teslovich TM (2010)
8	8q11.21	<i>EFCAB1</i>	rs12155623	49812201	T	A	T	99	0.3404	0.6307	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
8	8q24.11	<i>SLC30A8</i>	rs13266634	118184783	C	T	C	98	0.2394	0.5528	Diabetes tipo 2	Rung J (2009)
8	8q24.13	<i>TRIB1</i>	rs17321515	126486409	A	A	G	98	0.4832	0.4628	Triglicerídeos	Willer CJ (2008)
8	8p22	<i>SGCZ</i>	rs1903595	14389481	T	C	T	99	0.2321	0.3635	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
8	8q24.13	<i>TRIB1</i>	rs2954029	126490972	T	T	A	98	0.4109	0.04891	Colesterol LDL	Teslovich TM (2010)
8	8q12.1	<i>TOX</i>	rs3110127	60130296	C	T	C	98	0.4327	0.005197	Intervalo RR(Frequência cardíaca)	Marroni F (2011)
8	8p21.3	<i>LPL</i>	rs326	19819439	A	G	A	100	0.3331	0.2597	Triglicerídeos	Kooner JS (2008)
8	8p21.3	<i>LPL</i>	rs328	19819724	G	G	C	100	0.09729	0.7467	Triglicerídeos	Kathiresan S (2008)
8	8p23.1	<i>XKR6</i>	rs7819412	11045161	G	G	A	100	0.4658	0.5785	Triglicerídeos	Kathiresan S (2008)
8	8q24.13	<i>HAS2-ASI</i>	rs7844723	122908503	C	T	C	100	0.4315	0.02772	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
9	9q21.4	<i>CDKN2A</i>	rs10757278	22124477	G	G	A	100	0.3087	3.80e-06	Myocardial infarction	Helgadottir A (2007)
9	9p21.3	<i>CDKN2A</i>	rs10811661	22134094	T	C	T	100	0.3756	3.55e-64	Diabetes tipo 2	Hara K (2014)
9	9q21.3	<i>CDKN2BAS</i>	rs1333049	22125503	C	C	G	100	0.4662	0.5535	Doença arterial coronária	Wild PS (2011)
9	9p21.3	<i>CDKN2B-ASI</i>	rs1537370	22084310	T	C	T	100	0.4135	0.4184	Calcificação arterial coronariana	van Setten J (2013)
9	9q21.1	<i>NCAPD3</i>	rs1538521	8197045	G	A	G	99	0.4762	0.4291	Diabetes tipo 2	Saxena R (2007)
9	9p21.3	<i>CDKN2B</i>	rs2383208	22132076	T	G	A	99	0.2018	0.6118	Diabetes tipo 2	Takeuchi F (2009)
9	9q31.1	<i>ABCA1</i>	rs2515629	107594364	A	G	A	99	0.4453	4.60e-64	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
9	9q31.1	<i>CNOT1</i>	rs4149268	107647220	C	C	T	99	0.4957	0.5805	Colesterol HDL	Willer CJ (2008)
9	9q33	<i>ASTN2</i>	rs4838303	119996497	T	C	T	99	0.3574	0.364	Doença arterial coronária	The CHD Genetics Consortium (2001)
9	9p21.3	<i>CDKN2B-ASI</i>	rs4977574	22098574	G	G	A	99	0.4691	0.001139	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
9	9q34.2	<i>ABO</i>	rs505922	136149229	C	C	T	99	0.3157	1	Tromboembolismo venoso	Germain M (2011)
9	9p21.3	<i>CDKN2B-ASI</i>	rs564398	22029547	T	C	T	100	0.2435	0.9241	Diabetes tipo 2	Zeggini E (2007)
9	9p23	<i>PTPRD</i>	rs649891	10430602	C	C	T	100	0.4779	3.43e-10	Diabetes tipo 2	Below JE (2011)
9	9p24.1	<i>PTPRD</i>	rs7044355	8196511	G	G	A	100	0.4912	0.8527	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
9	9p21.3	<i>CDKN2B-ASI</i>	rs7865618	22031005	A	G	A	100	0.2573	0.04756	Doença arterial coronária	Wild PS (2011)

9	9p21.3	<i>CDKN2A</i>	rs944797	22115286	C	T	C	100	0.4266	0.01848	Doença arterial coronária	Takeuchi F (2011)
10	10q24.32	<i>CYP17A1</i>	rs1004467	104594507	A	G	A	98	0.4847	1.77e-58	Pressão sanguínea sistólica	Levy D (2009)
10	10q25.2	<i>ADRA2A</i>	rs10885122	113042093	G	T	G	98	0.2662	0.002299	Glicose em jejum	Dupuis J (2010)
10	10p13	<i>CDC123</i>	rs10906115	12314997	A	G	A	100	0.3726	0.01109	Diabetes tipo 2	Shu XO (2010)
10	10p12.31	<i>CACNB2</i>	rs11014166	18708798	A	T	A	99	0.3365	8.25e-16	Hipertensão	Levy D (2009)
10	10q23.33	<i>HHEX</i>	rs1111875	94462882	C	T	C	98	0.4899	0.02097	Diabetes tipo 2	Takeuchi F (2009)
10	10p11.21		rs1200821	37559580	A	A	G	98	0.4918	0.1791	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
10	10q25.2	<i>TCF7L2</i>	rs12243326	114788815	C	C	T	99	0.3139	0.1515	Teste de tolerância a glicose	Saxena R (2010)
10	10q24.32	<i>CNNM2</i>	rs12413409	104719096	G	A	G	100	0.1204	0.08716	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
10	10q23.31	<i>LIPA</i>	rs1412444	91002927	T	T	C	98	0.4831	0.01557	Doença arterial coronária	Wild PS (2011)
10	10q21.2	<i>C10orf107</i>	rs1530440	63524591	T	T	C	100	0.1584	0.0002483	Pressão sanguínea diastólica	Newton-Cheh C (2009)
10	10q11.21	<i>CXCL12</i>	rs1746048	44775824	C	T	C	100	0.2449	0.03305	Infarto do miocárdio (precoce)	Kathiresan S (2009)
10	10p12.31	<i>MIR4675</i>	rs2359536	20899608	C	C	T	100	0.346	0.8589	Doença arterial periférica	Koriyama H (2010)
10	10p11.23	<i>KIAA1462</i>	rs2505083	30335122	C	C	T	100	0.3549	0.5585	Doença arterial coronária	The CHD Genetics Consortium (2001)
10	10q21.3	<i>JMJD1C</i>	rs2893923	65261184	T	T	C	100	0.269	0.3882	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
10	10p11.23	<i>KIAA1462</i>	rs3739998	30316072	C	G	C	100	0.4835	0.0768	Doença arterial coronária	Erdmann J (2010)
10	10p12.33	<i>CACNB2</i>	rs4373814	18419972	G	G	C	100	0.4322	0.3476	Pressão sanguínea diastólica	Ehret GB (2011)
10	10q25.2	<i>TCF7L2</i>	rs4506565	114756041	T	T	A	100	0.3675	0.1041	Glicose em jejum	Dupuis J (2010)
10	10q23.33	<i>HHEX</i>	rs5015480	94465559	C	T	C	99	0.4779	0.5739	Diabetes tipo 2	Shu XO (2010)
10	10p13	<i>MST151</i>	rs525455	13103285	G	G	A	100	0.4051	0.7784	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
10	10q25.2	<i>TCF7L2</i>	rs7901695	114754088	C	C	T	99	0.3898	0.03261	Diabetes tipo 2	Zeggini E (2007)
10	10q25.2	<i>TCF7L2</i>	rs7903146	114758349	T	T	C	99	0.312	0.5189	Diabetes tipo 2	Perry JR (2012)
10	10q25.2	<i>ADRA2A</i>	rs869244	112909105	A	A	G	100	0.3894	0.009481	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
11	11q14.3	<i>MTNR1B</i>	rs10830963	92708710	G	G	C	99	0.2053	0.346	Glicose em jejum	Rasmussen-Torvik LJ (2012)
11	11p11.2	<i>MTCH2</i>	rs10838738	47663049	G	G	A	99	0.2902	0.3032	Índice de massa corporal	Willer CJ (2008)
11	11q23.3	<i>DSCAML1</i>	rs10892151	117531731	C	T	C	100	0.08543	0.02849	Triglicerídeos	Pollin TI (2008)
11	11q12	<i>OR9G1</i>	rs10896513	56467085	T	C	T	100	0.4168	0.8611	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
11	11p11.2	<i>CRY2</i>	rs11605924	45873091	A	C	A	100	0.4358	0.07682	Glicose em jejum	Dupuis J (2010)

11	11q23.3	<i>RPS27P19</i>	rs12269901	116973929	C	C	G	100	0.3682	0.1481	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
11	11q12.1	<i>OR9G1</i>	rs1397048	56466099	C	T	C	100	0.4622	0.04285	Fenótipos hematológicos	Yang Q (2007)
11	11p15.4	<i>KCNQ1</i>	rs163182	2844216	C	C	G	98	0.2387	1.78e-05	Diabetes tipo 2	Cui B (2011)
11	11p15.4	<i>KCNQ1</i>	rs163184	2847069	G	T	G	98	0.3339	2.41e-77	Diabetes tipo 2	Mahajan A (2013)
11	11q12.2	<i>FADS1</i>	rs174547	61570783	C	C	T	98	0.2902	0.8947	Colesterol HDL	Kathiresan S (2008)
11	11p12		rs1828390	41922185	T	C	T	100	0.4526	7.21e-46	Diabetes tipo 2	Kelliny (2009)
11	11q24.2	<i>ST3GAL4</i>	rs2236653	126283785	T	T	C	100	0.4442	0.4216	Níveis de enzimas hepáticas	Chambers JC (2011)
11	11p15.4	<i>KCNQ1</i>	rs2237892	2839751	C	T	C	100	0.1913	8.44E-05	Diabetes tipo 2	Li H (2012)
11	11p15.4	<i>KCNQ1</i>	rs2237895	2857194	C	C	A	100	0.3598	0.07153	Diabetes tipo 2	Tsai FJ (2010)
11	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	rs2237897	2858546	C	T	C	100	0.1268	5.20e-08	Diabetes tipo 2	Unoki H (2008)
11	11q24.2	<i>ST3GAL4</i>	rs4937126	126281897	G	A	G	98	0.2815	0.6517	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
11	1q23.3	<i>BUD13</i>	rs4938303	116584987	T	C	T	100	0.3522	0.4417	Triglicerídeos	Waterworth DM (2010)
11	11p15.1	<i>KCNJ11</i>	rs5219	17409572	T	T	C	100	0.2924	0.7425	Diabetes tipo 2	Saxena R (2007)
11	11p11.2	<i>NR1H3</i>	rs7120118	47286290	T	C	T	100	0.2969	0.2007	Colesterol HDL	Sabatti C (2008)
11	11q24.1	<i>SORL1</i>	rs7121446	121954657	G	A	G	100	0.2447	0.7665	Fatores de risco para DCV	Smith EN (2010)
11	11p11.2	<i>MADD</i>	rs7395662	48518893	G	A	G	100	0.3983	0.1757	Colesterol HDL	Aulchenko YS (2008)
11	11p15.4	<i>MRVII</i>	rs7940646	10669228	T	T	C	100	0.2292	0.612	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
11	11p12	<i>RPL9P23</i>	rs9300039	41915366	C	A	C	100	0.1106	0.002221	Diabetes tipo 2	Scott LJ (2007)
11	11q22.3	<i>PDGFD</i>	rs974819	103660567	G	A	G	100	0.386	0.005279	Doença arterial coronária	The Genetics Consortium (2001)
12	12q21.33	<i>DCN</i>	rs10777317	91980374	T	C	T	99	0.4231	0.451	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
12	12q23.1	<i>TRNAQ46P</i>	rs10777845	97689768	C	T	C	98	0.3161	0.07198	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
12	12p13.3		rs1088512	4092365	T	T	C	100	0.2575	1.06E-05	HOMA-RI	Talmud (2011)
12	12q21.1	<i>TSPAN8</i>	rs1495377	71577101	G	G	C	100	0.4861	0.1444	Diabetes tipo 2	WTCCC (2007)
12	12q24.31	<i>HNF1A</i>	rs2259816	121435587	T	T	G	100	0.4756	2.33e-09	Proteína C-reativa	Reiner AP
12	12q24.11	<i>KCTD10</i>	rs2338104	109895168	G	C	G	100	0.4254	0.7011	Colesterol HDL	Willer CJ (2008)
12	12q24.12	<i>SH2B3</i>	rs3184504	111884608	T	T	C	100	0.3326	0.0004109	Pressão sanguínea diastólica	Ehret GB (2011)
12	12q24.31	<i>OASL</i>	rs3213545	121471337	A	A	G	100	0.4722	4.95e-30	Fatores de risco para DCV	Middelberg RP (2011)
12	12q24.33	<i>GPR133</i>	rs885389	131621762	A	A	G	99	0.3851	6.79e-05	Intervalo RR(Frequência cardíaca)	Marroni F (2009)

12	12q24.11	<i>MYO1H</i>	rs9943753	109840940	G	A	G	99	0.3151	0.6709	Colesterol HDL	Waterworth DM (2010)
13	13q34	<i>COL4A1</i>	rs3742207	110818598	C	G	T	100	0.4722	3.17e-09	Rigidez arterial	Tarasov KV (2009)
13	13q34	<i>COL4A1</i>	rs4773144	110960712	G	G	A	100	0.4395	0.01595	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
13	13q12.11	<i>MTND3P1</i>	rs7318731	22709670	A	A	C	99	0.4228	0.271	Intervalo RR(Frequência cardíaca)	Marroni F (2009)
13	13q31.1	<i>ncRNA*</i>	rs9546711	85054266	A	A	G	100	0.1597	0.7339	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
14	14q32.2	<i>HHIPL1</i>	rs2895811	100133942	C	C	T	100	0.3382	0.2762	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
14	14q11.2	<i>MYH6</i>	rs365990	23861811	G	G	A	100	0.4304	0.1512	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
14	14q11.2	<i>MYH6</i>	rs452036	23865885	A	A	G	100	0.4565	1	Resting Frequência cardíaca	Eijgelsheim M (2010)
14	14q32.2	<i>DEGS2</i>	rs7157599	100625902	C	C	T	100	0.2498	1	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
15	15q21.3	<i>LIPC</i>	rs10468017	58678512	T	T	C	99	0.2284	0.09139	Fatores de risco para DCV	Middelberg RP (2011)
15	15q22.2		rs12440695	62435156	T	C	T	99	0.3525	0.3496	Diabetes tipo 2	Beer (2012)
15	15q22.2	<i>C2CD4A</i>	rs1436953	62414014	G	C	T	98	0.3782	0.5584	Diabetes tipo 2	Cui B (2011)
15	15q21.3	<i>LIPC</i>	rs1532085	58683366	A	A	G	99	0.419	0.02898	Colesterol Total	Teslovich TM (2010)
15	15q22.2		rs17205526	62417134	A	T	A	100	0.3797	0.2833	Relação cintura-quadril	Hindorff LA (2009)
15	15q22.33	<i>SMAD3</i>	rs17228212	67458639	A	C	T	99	0.3008	0.001024	Doença arterial coronária	Samani NJ (2007)
15	15q21.3	<i>LIPC</i>	rs1800588	58723675	T	T	C	100	0.3553	0.3142	Colesterol HDL	Kathiresan S (2008)
15	15q26.1	<i>AP3S2</i>	rs2028299	90374257	C	C	A	100	0.3319	0.4016	Diabetes tipo 2	Kooner JS (2011)
15	15q31.3	<i>GCOM1</i>	rs2069133	57918069	A	G	A	100	0.4899	0.5322	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
15	15q26.1	<i>AP3S2</i>	rs2351706	90384115	A	A	G	100	0.4825	3.03E-12	Diabetes tipo 2	Kooner (2011)
15	15q25.1	<i>ADAMTS7</i>	rs3825807	79089111	A	G	A	100	0.319	0.00258	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
15	15q25	<i>ADAMTS7</i>	rs4380028	79111093	C	T	C	100	0.3673	0.02509	Doença arterial coronária	Dechamethakun (2012)
15	15q21.3	<i>LIPC</i>	rs4775041	58674695	C	C	G	100	0.2222	0.05654	Colesterol HDL	Willer CJ (2008)
15	15q25		rs6495335	79117133	G	G	T	100	0.4093	0.2024	Doença arterial coronária	Reilly (2011)
15	15q22.2	<i>C2CD4A</i>	rs7172432	62396389	A	G	A	98	0.4806	0.1291	Diabetes tipo 2	Yamauchi T (2010)
15	15q25	<i>ADAMTS7</i>	rs7177699	79089734	T	C	T	98	0.3441	0.2701	Doença arterial coronária	Reilly MP (2011)
15	15q24.3	<i>HMG20A</i>	rs7178572	77747190	G	A	G	100	0.3825	0.1878	Diabetes tipo 2	Kooner JS (2011)
15	15q21.3	<i>GCOM1</i>	rs937254	57910164	A	A	G	100	0.4957	0.7102	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
15	15q25.1	<i>CHRNA4</i>	rs950776	78926018	T	C	T	98	0.2387	0.8809	Parada cardíaca súbita	Aouizerat BE (2011)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs1532624	57005479	C	A	C	100	0.4633	1.97E-05	Colesterol HDL	Aulchenko YS (2008)

16	16q21	<i>CNOT1</i>	rs1549607	58583975	A	A	G	98	0.2552	0.2077	Diabetes tipo 2	Scott LJ (2007)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs16965039	57047299	T	C	T	100	0.04743	0.001369	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
16	16q22.3	<i>ZFHX3</i>	rs16971384	72931085	A	G	A	100	0.3035	1	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs17231506	56994528	C	T	C	100	0.3409	0.002586	Colesterol HDL	Kim YJ (2011)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs173539	56988044	C	T	C	100	0.008475	1	Fatores de risco para DCV	Kraja AT (2011)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs1800775	56995236	C	C	A	100	0.4696	0.1905	Colesterol HDL	Kathiresan S (2008)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs1864163	56997233	G	A	G	100	0.2975	0.197	Colesterol HDL	Willer CJ (2008)
16	16p13.3	<i>JMJD8</i>	rs2058824	681572	C	T	G	100	0.4206	0.7972	Diabetes tipo 2	Kooner JS (2011)
16	16q13	<i>CETP</i>	rs247616	56989590	A	T	C	100	0.2176	0.5782	Fatores de risco para DCV	Smith EM (2010)
16	16q21	<i>CNOT1</i>	rs37062	58567238	A	G	A	99	0.192	1	Traços eletrocardiográficos	Holm H (2010)
16	16q22.1	<i>LCAT</i>	rs3729639	67225501	T	T	C	99	0.06385	8.53E-07	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
16	16q12.2	<i>FTO</i>	rs8050136	53816275	A	A	C	100	0.4018	0.4643	Índice de massa corporal	Tabassum R (2012)
16	16q23.3	<i>CDH13</i>	rs8055236	83212398	G	T	G	100	0.2743	0.7868	Doença arterial coronária	WTCCC (2007)
16	16q22.2	<i>EDC4</i>	rs8060686	67911517	T	C	T	100	0.3154	4.52E-06	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
16	16q12.2	<i>FTO</i>	rs9939609	53820527	A	A	T	100	0.412	0.4359	Índice de massa corporal	Willer CJ (2008)
16	16q13	<i>HERPUD1</i>	rs9989419	56985139	A	G	A	100	0.3965	0.0001338	Traços lipídicos	Keller M 92013)
17	17p13.3	<i>SMG6</i>	rs10852932	2143460	T	T	G	100	0.4327	0.7751	Tamanho do tronco aórtico	Vasan RS (2009)
17	17p13.3	<i>SMG6</i>	rs1231206	2125605	A	A	G	100	0.411	0.2559	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
17	17p11.2	<i>RAI1</i>	rs12449964	17544704	C	T	C	100	0.378	0.3072	Coronary artery disease or ischemic stroke	Dichgans M (2012)
17	17p11.2	<i>RASD1</i>	rs12936587	17543722	T	A	G	98	0.4292	0.852	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
17	17q21.31	<i>PLCD3</i>	rs12946454	43208121	T	T	A	98	0.2289	0.2969	Pressão sanguínea sistólica	Newton-Cheh C (2009)
17	17q11.2	<i>ASIC2</i>	rs1354492	31737421	C	T	C	100	0.4254	1	Níveis de FvW e FVIII	Antoni G (2011)
17	17q21.33	<i>ZNF652</i>	rs16948048	47440466	G	G	A	98	0.342	0.2604	Pressão sanguínea diastólica	Newton-Cheh C (2009)
17	16q12	<i>ASIC2</i>	rs1875874	31737734	G	T	G	98	0.4894	1.18e-05	Teste de tolerância a glicose	Saxena R (2010)
17	17p13.3	<i>SMG6</i>	rs216172	2126504	C	C	G	100	0.4787	0.7469	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
17	17q21.3	<i>UBE2Z</i>	rs318090	46991752	G	G	A	100	0.4846	0.01549	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
17	17p13.3	<i>SRR</i>	rs391300	2216258	T	T	C	100	0.4386	0.705	Diabetes tipo 2	Tsai FJ (2010)
17	17q21.32	<i>UBE2Z</i>	rs46522	46988597	T	T	C	99	0.4103	0.03697	Doença arterial coronária	Schunkert H (2011)
18	18p11.31	<i>LPIN2</i>	rs10460009	2948029	C	T	C	98	0.1286	0.03977	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)

18	18q21.1	<i>EPG5</i>	rs484914	43385269	A	A	G	98	0.4556	0.01301	Doença arterial coronária	The CHD Genetics Consortium (2001)
19	19p13.2	<i>SMARCA4</i>	rs1122608	11163601	G	T	G	100	0.2055	0.1831	Infarto do miocárdio (precoce)	Kathiresan S (2009)
19	19q13.32	<i>TOMM40</i>	rs157580	45395266	A	G	A	100	0.3187	0.1881	Colesterol HDL	Aulchenko YS (2008)
19	19q13.1	<i>SUGP1</i>	rs2301786	19413947	A	G	A	99	0.4111	0.5589	Traços lipídicos	Haga (2008)
19	19q13.11	<i>KCTD15</i>	rs29941	34309532	G	A	G	100	0.2883	0.04473	Índice de massa corporal	Speliotes EK (2010)
19	19q13.32	<i>APOE</i>	rs439401	45414451	T	T	C	100	0.3855	2.49e-07	Triglicerídeos	Teslovich TM (2012)
19	19p13.2	<i>DOCK6</i>	rs4804155	11334295	C	G	C	100	0.193	0.3616	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
20	20q13.12	<i>HNF4A</i>	rs1800961	43042364	T	T	C	100	0.03041	0.3626	Proteína C-reativa	Reiner AP (2012)
20	20p13	<i>PRNP</i>	rs6052699	4611877	A	G	A	100	0.4223	0.2454	Agregação plaquetária	Johnson AD (2010)
21	21q22.1		rs11910624	32442499	T	G	T	99	0.09191	0.01041	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
21	21q22.11	<i>UBE3AP2</i>	rs1475591	32440540	T	T	C	100	0.1522	0.7226	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
21	21q22.2	<i>IGSF5</i>	rs1735151	41123301	T	T	C	100	0.2928	0.1479	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
21	21q22.11	<i>HUNK</i>	rs2833610	33385186	A	A	G	100	0.4872	0.8543	Diabetes tipo 2	Sim X (2011)
22	22q12.1	<i>SEZ6L</i>	rs688034	26689635	T	T	C	100	0.2731	0.6443	Doença arterial coronária	WTCCC (2007)
23	xq27.3	<i>MIR508</i>	rs5904726	146322623	A	G	A	98	0.4157	0.2651	Doença arterial coronária	Lettre G (2011)
23	xq27.1	<i>RPS4XP2</i>	rs5951956	146328831	A	G	A	100	0.402	2.80e-10	Diabetes tipo 2	Griffiths (2003)

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jul;24(7):1161–70.
- Agatston A, Janowitz W. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J.* 1990;15(4):827–32.
- Aquino EM, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB, et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design. *Am J Epidemiol.* 2012/01/12 ed. 2012;175(4):315–24.
- Arnett DK, Baird AE, Barkley R a, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, et al. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational. *Circulation.* 2007 Jun 5;115(22):2878–901.
- Azevedo CF, Rochitte CE, Lima JAC. Review Article Coronary Artery Calcium Score and Coronary Computed Tomographic Angiography for Cardiovascular Risk Stratification. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98:559–68.
- Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014 Dec; 276(6):618–32.
- Battes L, Barendse R, Steyerberg EW, Simoons ML, Deckers JW, Nieboer D, et al. Development and validation of a cardiovascular risk assessment model in patients with established coronary artery disease. *Am J Cardiol.* Elsevier Inc.; 2013 Jul;112(1):27–33.
- Baudhuin L. Genetics of coronary artery disease: focus on genome-wide association studies. *Am J Transl Res.* 2009;1(3):221–34.
- Beaglehole R, Magnus P. The search for new risk factors for coronary heart disease: occupational therapy for epidemiologists? *Int J Epidemiol.* 2002;31(6):1117–22.
- Burke A, Weber D, Kolodgie F, Farb A. Pathophysiology of calcium deposition in coronary arteries. *Herz.* 2001;(4):239–44.
- Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res.* Elsevier Inc; 2015 May;
- Carr JJ, Nelson JC, Wong ND, McNitt-Gray M, Arad Y, Jacobs DR, et al. Calcified coronary artery plaque measurement with cardiac CT in population-based studies: standardized protocol of Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Radiology.* 2005 Jan;234(1):35–43.
- Chen Z, Xie F, Ma G, Feng Y, Qian Q, Liu N. Study of the association between growth differentiation factor 15 gene polymorphism and coronary artery disease in a Chinese population. *Mol Biol Rep.* 2011 Nov;38(8):5085–91.

- Dandona S, Roberts R. Creating a Genetic Risk Score for. *Curr Atheroscler Rep*. 2009;11(3):175–81.
- Dent THS. Predicting the risk of coronary heart disease I. The use of conventional risk markers. *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd; 2010 Dec;213(2):345–51.
- Elias-Smale SE, Proença RV, Koller MT, Kavousi M, van Rooij FJ a, Hunink MG, et al. Coronary calcium score improves classification of coronary heart disease risk in the elderly: the Rotterdam study. *J Am Coll Cardiol*. Elsevier Inc.; 2010 Oct 19;56(17):1407–14.
- Esparragón FR, Companioni O, Bello MG, Ríos NB, Pérez JCR. Replication of relevant SNPs associated with cardiovascular disease susceptibility obtained from GWAs in a case-control study in a Canarian population. *Dis Markers*. 2012 Jan;32(4):231–9.
- Funk SD, Yurdagul A, Orr a W. Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. *Int J Vasc Med*. 2012 Jan;2012:569654.
- Goldstein B a, Knowles JW, Salfati E, Ioannidis JP a, Assimes TL. Simple, standardized incorporation of genetic risk into non-genetic risk prediction tools for complex traits: coronary heart disease as an example. *Front Genet*. 2014 Jan;5(August):254.
- Greenland P, Alpert JS, Beller G a, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad Z a, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. Elsevier Inc.; 2010 Dec 14;56(25):e50–103.
- Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L, Øie E, et al. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis*. Elsevier Inc.; 2008;51(3):183–94.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685–95.
- Heidenreich P a, Trogdon JG, Khavjou O a, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011 Mar 1;123(8):933–44.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005 Feb;6(2):95–108.
- Ioannidis JP a. Prediction of cardiovascular disease outcomes and established cardiovascular risk factors by genome-wide association markers. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 Feb;2(1):7–15.
- Ioannidis JPA, Tzoulaki I. What Makes a Good Predictor? The Evidence Applied to Coronary Artery Calcium Score. *JAMA*. 2014;303(16):1646–7.
- Johnson RC, Leopold J a, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* [Internet]. 2006 Nov 10 [cited 2015 Jun 10];99(10):1044–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095733>

- Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2008 Mar;358(12):1240–9.
- Keaney JF. Immune modulation of atherosclerosis. *Circulation*. 2011 Nov 29;124(22):e559–60.
- Kuehnl a, Pelisek J, Pongratz J, Eckstein H-H. C-type natriuretic peptide and its receptors in atherosclerotic plaques of the carotid artery of clinically asymptomatic patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Elsevier Ltd; 2012 Jun;43(6):649–54.
- Labree L, Azen SP, Doherty TM. Coronary Artery Calcium Score Combined With Framingham Score for Risk Prediction in Asymptomatic Individuals. *JAMA*. 2004;291(2):210–5.
- De las Fuentes L, Yang W, Dávila-Román VG, Gu CC. Pathway-based genome-wide association analysis of coronary heart disease identifies biologically important gene sets. *Eur J Hum Genet*. 2012 Nov;20(11):1168–73.
- Leonarduzzi G, Gamba P, Gargiulo S, Biasi F, Poli G. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. Elsevier Inc.; 2012 Jan 1;52(1):19–34.
- Liang M, Puri A, Devlin G. The vulnerable plaque: the real villain in acute coronary syndromes. *open Cardiovasc Med*. 2011;123–9.
- Lieb W, Vasan RS. Genetics of coronary artery disease. *Circulation*. 2013 Sep;128(10):1131–8.
- Lu Y, Zhu X, Liang G-X, Cui R-R, Liu Y, Wu S-S, et al. Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF- κ B/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids*. 2012 Nov;43(5):2125–36.
- Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004 Jan;5(Mi):189–218.
- Ma S, Liu A, Carr J, Post W, Kronmal R. Statistical modeling of Agatston score in multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *PLoS One*. 2010 Jan;5(8):e12036.
- Morrison AC, Bare L a, Chambless LE, Ellis SG, Malloy M, Kane JP, et al. Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 2007 Jul;166(1):28–35.
- Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec 15;380(9859):2197–223.
- Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Apr;34(4):724–36.

- Paynter NP, Chasman DI, Paré G, Buring JE, Cook NR, Miletich JP, et al. Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in women. *JAMA*. 2010 Feb;303(7):631–7.
- Polonsky TS, McClelland RL, Jorgensen NW, Bild DE, Burke GL, Guerci AD. Coronary Artery Calcium Score and Risk Classification for Coronary Heart Disease Prediction. *JAMA*. 2010;303(16):1610–6.
- Rywik T, Szperl M, Płoski R. Is evaluation of complex polymorphism helpful in the assessment of prognosis after percutaneous coronary intervention. A prospective study. *Kardiol*. 2010;881–8.
- Setten J Van, Isgum I, Smolonska J, Ripke S, Jong PA De, Oudkerk M, et al. Genome-wide association study of coronary and aortic calci fi cation implicates risk loci for coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. Elsevier Ltd; 2013;228(2):400–5.
- Smith JA, Ware EB, Middha P, Beacher L, Kardina SLR. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Subclinical Phenotypes. *Curr Epidemiol Rep*. 2015;2:180–90.
- Smith SC, Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2006 May 16;113(19):2363–72.
- Stylianou IM, Bauer RC, Reilly MP, Rader DJ. Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans. *Circ Res*. 2012 Jan 20;110(2):337–55.
- Tanenbaum SR, Kondos GT, Veselik KE, Prendergast MR, Brundage BH, Chomka E V. Seth R. Tanenbaum,. *Am J Cardiol*. 1989;63(12):870–2.
- Thanassoulis G, Peloso GM, Pencina MJ, Hoffmann U, Fox CS, Cupples LA, et al. A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and coronary artery calcium: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Feb;5(1):113–21.
- Tota-Maharaj R, Blaha MJ, McEvoy JW, Blumenthal RS, Muse ED, Budoff MJ, et al. Coronary artery calcium for the prediction of mortality in young adults <45 years old and elderly adults >75 years old. *Eur Hear J*. 2012/07/31 ed. 2012;33(23):2955–62.
- Unal B, Critchley JA, Capewell S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. *Circulation* [Internet]. 2004 Mar 9 [cited 2015 Jun 11];109(9):1101–7.
- Vaarhorst A a M, Lu Y, Heijmans BT, Dollé MET, Böhringer S, Putter H, et al. Literature-based genetic risk scores for coronary heart disease: the Cardiovascular Registry Maastricht (CAREMA) prospective cohort study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Apr;5(2):202–9.
- Versteyslen MO, Joosen I a, Shaw LJ, Narula J, Hofstra L. Comparison of Framingham, PROCAM, SCORE, and Diamond Forrester to predict coronary atherosclerosis and cardiovascular events. *J Nucl Cardiol*. 2011 Oct;18(5):904–11.

Virami R. Lessons from Sudden Coronary Death. *Arter Thromb Biol.* 2000;1262–75.

Vita J a. Endothelial function. *Circulation.* 2011 Dec 20;124(25):e906–12.

Wang L, Jerosch-Herold M, Jacobs DR, Shahar E, Detrano R, Folsom AR. Coronary artery calcification and myocardial perfusion in asymptomatic adults: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol.* 2006 Sep 5;48(5):1018–26.

Wierzbicki a S. New directions in cardiovascular risk assessment: the role of secondary risk stratification markers. *Int J Clin Pract.* 2012 Jul;66(7):622–30.

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger a M, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97(18):1837–47.

Youssef G, Kalia N, Darabian S, Budoff MJ. Coronary calcium: new insights, recent data, and clinical role. *Curr Cardiol Rep.* 2013 Jan;15(1):325.

Ząbczyk M, Butenas S, Plicner D, Fijorek K, Sadowski J, Undas A. Factors associated with the presence of circulating active tissue factor and activated factor XI in stable angina patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012 Apr;23(3):189–94.