



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Fatores de suscetibilidade genética para a hipertensão
arterial: a via de sinalização pelo recetor de
hidrocarbonetos aromáticos

Cristiano José da Silva Sales

Dissertação para obtenção do grau de mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Vera Linda Ribeiro Marques

2021



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Fatores de suscetibilidade genética para a hipertensão
arterial: a via de sinalização pelo recetor de
hidrocarbonetos aromáticos

Cristiano José da Silva Sales

Dissertação para obtenção do grau de mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Vera Linda Ribeiro Marques

2021

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© 2021

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Vera Marques,

por todo o apoio e oportunidades que me proporcionou. Sem ela, nada disto teria sido possível, foi ela quem mais acreditou que eu iria conseguir, mesmo quando eu mesmo não acreditei.

Aos meus pais e à minha irmã,

pedras basilares da minha educação, que muito se esforçaram para que tudo isto fosse possível, a eles devo tudo e nunca nada vai chegar para agradecer todo o apoio e carinho que me deram ao longo destes anos. Amo-vos muito, embora não o diga tantas vezes quanto devia.

À minha Vó Beatriz,

pelos “faz boa viagem!” e “come mais um bocado, não quero que fiques com fome!”. Quero que saiba que é a minha inspiração para SER Farmacêutico, que cuidarei de cada pessoa como se fosse você, porque “não devemos ser trapalhões!”.

À “A Cave”,

os meus irmãos que não são de sangue, mas certamente de coração, por todos estes anos maravilhosos ao vosso lado. Porque mesmo distante, me faziam sentir um bocadinho mais perto de casa. Por todos os *memes*, aventuras, risos e noitadas juntos. Espero que estas grandes amizades se continuem a nutrir e a crescer, até sermos velhinhos.

Ao “Não Sei”,

amigos que ganhei um pouco por todo o país no dia em que entrei nesta instituição de ensino, com quem passei tantas horas a estudar, a procrastinar... algumas horas nem me lembro que passei convosco, mas que certamente foram boas. É um orgulho poder chamar “amigos” a grupo tão distinto de profissionais de saúde, o SNS vai certamente agradecer o vosso contributo. Que esta nova etapa vos traga tudo de bom e permita que um arco-íris nos ligue para sempre, onde quer que estejamos. “Não adiantam as despedidas, porque de um amigo ninguém se livra facilmente”.

À Bruna Ramos,

uma amiga com quem tanto tempo passei, que de repente se tornou numa mulher tão decidida, mesmo à moda do Norte. Foi um prazer ver esta evolução, e partilhar contigo grande parte dela. Nunca esquecerei todos os projetos, o nosso Mitose, o nosso NECiFarm... obrigado por meteres organização no meu modo desorganizado de viver.

Ao Rúben Viegas,

padrinho, amigo, conselheiro... obrigado por me ajudares a tornar numa pessoa que busca por mais, por me ajudares a encontrar o que quero fazer e a dobrar o medo. Por estares lá nos momentos bons e nos momentos maus. Grande parte do que sou devo-o a ti, e nunca o vou conseguir retribuir, mas vou tentando.

E a TI,

aquela rapariga que um dia espero ver o meu apelido no seu nome, ou vice-versa, ainda não nos decidimos, como em tantas outras coisas. E é nessa dicotomia que vejo uma enorme beleza na relação que estamos a construir. Dizem que “os opostos se atraem”, não podiam estar mais certos. Sei que naquele dia te disse “Porquê?”, mas quero que saibas que todos os dias descubro um bocadinho mais da resposta, graças a ti.

“Sei que foi só um beijo
Mas não foi só um beijo
Pra mim”

RESUMO

As doenças cardiovasculares estão entre as causas de morte mais comuns em todo o mundo, sendo responsáveis por milhões de mortes anualmente. Estas doenças estão intrinsecamente relacionadas com a hipertensão, resultando no agravamento dos distúrbios cardíacos e dos vasos sanguíneos com a idade, embora algumas dessas mortes possam ocorrer prematuramente abaixo dos 70 anos de idade. Embora a prevalência global de hipertensão tenda a uma redução no número de novos casos de hipertensão, países economicamente menos estáveis contradizem essas tendências, observando-se um aumento na prevalência de hipertensão. Além disso, a hipertensão apresenta muitas possibilidades quanto à sua etiologia, dificultando a identificação de causas específicas para o desenvolvimento da doença. Alguns polimorfismos de nucleótido único estão associados ao desenvolvimento de hipertensão, no contexto da exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. O presente trabalho teve como foco a análise, PCR-RFLP, dos SNPs ARNT C567G e CYP1A2 C-163A na população tailandesa, relacionando-os com a elevada exposição a PAHs por meio do fumo do tabaco e da poluição atmosférica. Os resultados demonstram um claro desvio no *pool* genético para ambos os SNPs, face ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por exemplo, apenas 7,02% da população não apresentava um polimorfismo em nenhum dos SNPs. Além disso, tanto no ARNT C567G quanto no CYP1A2 C-163A, os genótipos homozigotas para a variante foram os mais prevalentes. Este estudo sugere que a razão pela qual a população tailandesa poderá ser mais propensa ao desenvolvimento de hipertensão reside no facto de que grande percentagem de indivíduos pode apresentar SNPs que contribuem para a ativação de PAHs, aliado à percentagem preocupante de fumadores ativos e passivos. A grande maioria da população também se encontra exposta a níveis perigosos de PAHs atmosféricos nas suas áreas de residência. A falta de urgência na implementação de um sistema de monitoração da HTA mais alargado, aliada à dificuldade de acesso aos cuidados de saúde pode ser a causa da falta de controlo da prevalência de hipertensão por parte do sistema nacional de saúde da Tailândia.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are among the most common causes of death globally, taking millions of lives each year. These diseases are intrinsically related with hypertension, resulting in the aggravation of heart and blood vessel disorders with age, although some of these deaths can occur prematurely under 70 years of age. Even though the global prevalence of hypertension is trending towards a decrease in the number of new afflicted population with hypertension, low- and medium-income countries contradict these trends, for we can observe a rise in the prevalence of hypertension. Furthermore, hypertension as a chronic disease has many possibilities as to its etiology, making it hard to pinpoint specific causes for the onset of the disease. Some single nucleotide polymorphisms have been found to be associated with the development of hypertension, for they occur in genes associated with the conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons into their active forms. This dissertation focuses on the analysis, by PCR-RFLP, of both ARNT C567G and CYP1A2 C-163A SNPs on the Thai population, linking it with the high exposure to PAHs via smoking and atmospheric pollution. The results demonstrate a clear deviation in the genetic pool for both SNPs, versus what was expected via the Hardy-Weinberg equilibrium. For instance, only 7,02% of our population had no polymorphism on any of the SNPs. Furthermore, in both ANRT C567G and CYP1A2 C-163A, the variant genotypes were the most prevalent in the population. This study suggests that the reason the Thai population are prone to develop hypertension resides in the fact that a big percentage of individuals may have SNPs that contribute to the over activation of PAHs, linked to the fact that many of them are active and passive smokers. A great majority of the population are also exposed to dangerous levels of atmospheric PAHs in their residential areas. A lack of urgency in the implementation of a better monitoring system allied with difficulty in accessing medical care may be the cause for the lack of hypertension prevalence control by the Thailand national health system.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS	XIV
ÍNDICE DE QUADROS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1. A Pressão Arterial.....	1
1.1.1. Monitorização da Pressão Arterial	3
1.2. Fisiopatologia Da Hipertensão Arterial.....	6
1.2.1. Sistema Nervoso Simpático.....	6
1.2.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)	9
1.2.3. Formação De Placa Aterosclerótica	12
1.3. Tratamento Da Hipertensão Arterial.....	15
1.3.1. Medidas Não Farmacológicas	15
1.3.2. Medidas Farmacológicas	17
1.4. Epidemiologia da Hipertensão Arterial.....	21
1.5. Hábitos Tabágicos da População Tailandesa.....	29
1.6. Metabolismo de xenobióticos e a sua regulação.....	31
2. Métodos Laboratoriais	51
2.1. PCR-RFLP	51
2.2. Eletroforese	55
2.3. Análise de Restrição dos Fragmentos Amplificados.....	57
2.4. Participantes.....	58
2.5. Procedimento Experimental.....	58
2.5.1. Extração de DNA.....	58
2.5.2. Teste de genotipagem PCR-RFLP para o SNP ARNT C567G.....	59
2.5.3. Teste de genotipagem PCR-RFLP para o SNP CYP1A2 C-163A	61
3. Resultados e Discussão	64
3.1. ARNT C567G	64
3.2. CYP1A2 C-163A.....	69

3.3. Cruzamento de dados.....	73
4. Trabalho Futuro	78
5. Conclusão.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	XXI

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática (A) da sístole, com a representação do movimento de contração, simbolizado pelas setas a roxo e (B) da diástole. AD – Aurícula Direita; VD – Ventrículo Direito; AE – Aurícula Esquerda; VE – Ventrículo Esquerdo. Adaptado de Nabih-Ali et al ⁷. _____ 2
- Figura 2: Estrutura molecular da noradrenalina / norepinefrina (NE). Adaptado de National Center for Biotechnology Information ²⁶. _____ 7
- Figura 3: Transmissão de sinal nervoso entre os neurónios simpáticos pré ganglionares e os neurónios pós ganglionares, com libertação de catecolaminas. Spre - neurónio simpáticos pré-ganglionares; Ach – neurotransmissor; Nic – Recetor nicotínico: Spost - neurónio simpáticos pós-ganglionares; NE - noradrenalina / norepinefrina. Adaptado de Goldstein et al ²⁷. _____ 7
- Figura 4: Transmissão de sinal nervoso entre os neurónios simpáticos pós ganglionares e os recetores adrenérgicos. Spre - neurónio simpáticos pré-ganglionares; Ach – neurotransmissor; Nic – Recetor nicotínico: Spost - neurónio simpáticos pós-ganglionares; NE - noradrenalina / norepinefrina. Adaptado de Adaptado de Goldstein et al ²⁷. _____ 8
- Figura 5: Pormenor dos nódulos sinusal, aurículo-ventricular e do impulso nervoso. Adaptado de Seeley et al ⁸. _____ 9
- Figura 6: Representação anatómica do glomérulo. 1- Podócito; 2- Mácula densa; 3– Células justaglomerulares; 4– Arteriola aferente; 5– Nervos renais; 6– Túbulo proximal. Adaptado de Kurtz et al ³². _____ 10
- Figura 7: Reação de conversão da Arginina em Citrulina com libertação de NO como subproduto da reação. Adaptado de Konukoglu et al ⁵². _____ 14
- Figura 8: Estratégia do tratamento farmacológico central para a hipertensão arterial não complicada. O algoritmo central é também apropriado para a maioria dos doentes com LOA, DCV ou DM. IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina II; ARA – Antagonista do recetor de angiotensina II; BCC- Bloqueador de canais de cálcio. Adaptado de Flack et al ¹¹. _____ 19
- Figura 9: Estratégia do tratamento farmacológico central para a hipertensão arterial e doença coronária. IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina II; ARA – Antagonista do recetor de angiotensina II; BCC- Bloqueador de canais de cálcio. Adaptado de Flack et al ¹¹. _____ 20

Figura 10: Estratégia do tratamento farmacológico central para a hipertensão arterial e doença renal crónica. IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina II; ARA – Antagonista do recetor de angiotensina II; BCC- Bloqueador de canais de cálcio. Adaptado de Flack et al ¹¹ . _____	21
Figura 11: Diferenças na pressão arterial sistólica média estimada (A) no sexo masculino e (B) no sexo feminino e na pressão arterial diastólica média estimada (C) no sexo masculino e (D) no sexo feminino, à escala mundial entre 1975 e 2015. PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica. Adaptado de Mills et al ⁶⁴ . _____	23
Figura 12: Rácios de diagnóstico, tratamento e controlo da hipertensão arterial na população tailandesa para ambos os sexos no ano de 2014. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁷⁰ . _____	24
Figura 13: Causas de morte mais comuns na população tailandesa entre 2009 e 2019. Adaptado de Institute for Health Metrics and Evaluation ⁷³ . _____	24
Figura 14: Prevalência da hipertensão arterial por idade e sexo na população tailandesa no ano de 2014. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁷⁰ . _____	25
Figura 15: Números de novos diagnósticos de hipertensão arterial na população tailandesa em cada mês entre outubro de 2015 e abril de 2019. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁷⁰ . _____	26
Figura 16: Prevalência, diagnóstico, tratamento e controlo da hipertensão arterial na população tailandesa no ano 2014. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁷⁰ . _____	27
Figura 17: Gestão da terapêutica em doentes com hipertensão arterial não controlada após consulta na população tailandesa. Adaptado de Buranakitjaroen et al ⁷⁶ . _____	28
Figura 18: Relação das causas atribuídas à morte pela população com hábitos tabágicos (A) e a distribuição das respetivas mortes causadas por doenças cardiovasculares por idade (B) na população tailandesa. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁸⁰ . _____	29
Figura 19: Distribuição de hábitos tabágicos por género em indivíduos com idade superior a 15 anos (A) e hábitos tabágicos na população com a idade compreendida entre os 13 e 15 anos (B) na população tailandesa. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁸⁰ . _____	30

Figura 20: Distribuição etária de fumadores passivos na população tailandesa. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁸⁰ . _____	31
Figura 21: Abundância relativa das principais formas de CYP no genoma humano. Adaptado de Almazroo et al ⁸⁷ . _____	33
Figura 22: Resumo esquemático do funcionamento da via regulatória do HIF em condições de normóxia (A) e em condições de hipóxia (B). HIF1 α – Hypoxia inducible factor 1 alfa; HIF1 β – Hypoxia inducible factor 1 beta; VHL – Proteínas de von Hippel-Lindau; ub – Ubiquitina; PHD – prolil-hidroxilases; FIH – Fator inibidor do HIF. Adaptado de Chen et al ¹⁰⁸ . _____	36
Figura 23: Resumo esquemático do funcionamento da via regulatória do AHR. AHR – Recetor de hidrocarbonetos arílicos; p23, XAP2 e Hsp90 – proteínas estabilizadoras; ARNT – Translocador nuclear do AHR; AHRR – Regulador do AHR; Pol I – DNA Polimerase; XRE – Elemento de resposta a xenobióticos. Adaptado de Polonikov et al ¹¹⁰ . _____	37
Figura 24: Representação das interações das estruturas de AHR (A) e do ARNT (B) com a região promotora. A interação do complexo ARNT - AHR com o DNA observa-se em (C). DRE – Elemento de resposta a dioxinas. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁸ . _____	38
Figura 25: Resumo das interações entre o ARNT/AHR e o DNA, na região reguladora. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁹ . _____	39
Figura 26: Comparação da expressão de RNA mensageiro dos diferentes génotipos do ARNT C567G. Adaptado de Polonikov et al ¹¹⁰ . _____	40
Figura 27: Representação gráfica da estrutura molecular do CYP1A2. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁹ . _____	41
Figura 28: Conformação dos resíduos de aminoácidos que constituem o canal de entrada do substrato. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁹ . _____	42
Figura 29: Pormenor dos resíduos de treonina presentes na Hélice I. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁹ . _____	43
Figura 30: Síntese de PAHs por processos de pirossíntese e pirólise a partir de hidrocarbonetos saturados. Adaptado de Ravindra et al ¹⁴⁰ . _____	45
Figura 31: Registo dos níveis de PM _{2,5} na região de Bangkok entre julho de 2019 e junho de 2020. Adaptado de Fotiou et al ¹⁷⁹ . _____	49
Figura 32: Representação das etapas de um ciclo de PCR. Adaptado de Wang et al ¹⁸⁴ . _____	53

- Figura 33: Padrão de amplificação exponencial das cópias de DNA obtidas em cada ciclo de PCR. Adaptado de Wang et al ¹⁸⁴. _____ 53
- Figura 34: *Thermus aquaticus*. Adaptado de Jackson et al ¹⁹³. _____ 54
- Figura 35: Representação da estrutura molecular dos dNTPs. dATP - desoxiAdenosina Trifosfato; dCTP - desoxiCitidina Trifosfato; dTTP - desoxiTimidina Trifosfato; dGTP - desoxiGuanosina Trifosfato. Adaptado de Ménomá et al ¹⁹⁵. _____ 55
- Figura 36: Representação de um gel de eletroforese sob luz UV, com pormenor do marcador de massa molecular (a laranja) e de uma banda de DNA (a amarelo). Adaptado de Johansson et al ²⁰⁷. _____ 57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sumário dos efeitos no organismo resultantes da exposição a PAHs específicos. _____	48
Tabela 2: Constituintes da mistura reacional para a caracterização do polimorfismo ARNT C567G. _____	59
Tabela 3: Condições experimentais do termociclador(Tpersonal (Biometra™)) no processo de PCR para a caracterização do polimorfismo ARNT C567G. _	60
Tabela 4: Mistura reacional para digestão enzimática por BsmAI dos produtos de PCR para o procedimento experimental do ARNT C567G. _____	60
Tabela 5: Constituintes da mistura reacional para a caracterização do polimorfismo CYP1A2 C-163A _____	61
Tabela 6: Condições experimentais do termociclador (Tpersonal (Biometra™)) no processo de PCR para a caracterização do polimorfismo CYP1A2 C-163A. (a) : 5 ciclos iniciais com 20 s de desnaturação, os restantes ciclos com 30 s; (b) : touchdown - decréscimo de 1 °C a cada 5 ciclos nos primeiros 15 ciclos, depois decréscimo de 1 °C a cada 10 ciclos nos seguintes 20 ciclos; (c) : 15 ciclos iniciais com 30 s de extensão, depois 10 ciclos com 40 s de extensão e depois 10 ciclos com 45 s de extensão. _____	62
Tabela 7: Mistura reacional para digestão enzimática por Mval dos produtos de PCR para o procedimento experimental do CYP1A2 C-163A. _____	62
Tabela 8: Caracterização genotípica dos indivíduos incluídos no estudo do polimorfismo ARNT C567G. _____	65
Tabela 9: Frequências alélicas determinadas para o polimorfismo ARNT C567G na população em estudo. _____	65
Tabela 10: Frequências genotípicas determinadas para o polimorfismo ARNT C567G na população em estudo. _____	66
Tabela 11: Frequências genotípicas esperadas para o polimorfismo ARNT C567G na população em estudo. p – Frequência alélica da referência; q – frequência alélica da variante. _____	68
Tabela 12: Teste do χ^2 aplicado ao polimorfismo ARNT C567G. Freq. Obs – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra (n=62); Freq. Esp – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra (n=62) _____	69

Tabela 13: Caracterização genotípica dos indivíduos incluídos no estudo do polimorfismo CYP1A2 C-163A _____	70
Tabela 14: Frequências alélicas determinadas para o polimorfismo CYP1A2 C-163A na população em estudo. _____	71
Tabela 15: Frequências genotípicas determinadas para o polimorfismo CYP1A2 C-163A na população em estudo. _____	71
Tabela 16: Frequências genotípicas esperadas para o polimorfismo CYP1A2 C-163A na população em estudo. _____	72
Tabela 17 - Teste do χ^2 aplicado ao polimorfismo do CYP1A2 C-163A. Freq. Obs – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra (n=67); Freq. Esp – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra (n=67) _____	72
Tabela 18: Cruzamento de resultados genotípicos obtidos de ambos os polimorfismos em estudo, ARNT C567G e CYP1A2 C-163A. _____	73
Tabela 19: Comparação das frequências alélicas de estudos descritos na literatura com os resultados obtidos no presente estudo do ARNT C567G através do teste do χ^2 com correção de Yates. _____	75
Tabela 20: Comparação das frequências alélicas de estudos descritos na literatura com os resultados obtidos no presente estudo do CYP1A2 C-163A através do teste do χ^2 com correção de Yates. _____	76

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Classificação dos estágios de pressão arterial em consultório e definição dos graus de HTA. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹² . _____	5
Quadro 2: Definições de Hipertensão de acordo com os valores de pressão arterial avaliados em consultório , ambulatório ou em casa . Adaptado de Uhlig et al ²¹ . _____	6
Quadro 3: Resumo listado das intervenções no estilo de vida nos doentes com hipertensão ou com pressão arterial normal alta. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹² . _____	16
Quadro 4: Síntese dos limiares de tratamento da pressão arterial em consultório. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹² . _____	17
Quadro 5: Quadro resumo das classes terapêuticas utilizadas na estratégia do tratamento farmacológico para a hipertensão arterial. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹² . _____	18
Quadro 6: Resumo dos efeitos da exposição PAHs em processos relacionados com doenças cardiovasculares. Adaptado de Holme et al ¹⁴³ . _____	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A - Adenina

ADH - Hormona antidiurética

AHR - Recetor de hidrocarbonetos aromáticos (em inglês: *Aryl Hydrocarbon Receptor*)

AHRR - Regulador do recetor dos hidrocarbonetos aromáticos (em inglês: *Aryl hydrocarbon receptor repressor*)

AMA - Associação Americana do Coração

AMPA - Automedição da pressão arterial

AQI - Índice da qualidade do ar (em inglês: *Air Quality Index*)

ARNT - Translocador nuclear do recetor Ah (em inglês: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*)

Asn - Asparagina

Asp - Ácido aspártico

AV - Nódulo aurículo-ventricular

BCC - Bloqueador dos canais de cálcio

C - Citosina

cGMP - Guanosina monofosfato cíclico (em inglês: *Cyclic Guanosine Monophosphate*)

CV - Cardiovascular

CYP - Citocromo P450

DA - Dopamina

DC - Débito cardíaco

DM - Diabetes mellitus

DME - Enzimas metabolizadoras de fármacos (em inglês: *Drug-metabolizing Enzymes*)

dNTPs - Desoxirribonucleótidos fosfatados (em inglês: *Deoxynucleotide*)

ECA - Enzima de conversão da angiotensina

eNOS - Óxido nítrico sintetase endotelial (em inglês: *Endothelial Nitric Oxide Synthase*)

EPI - Adrenalina/Epinefrina

FA - Frequência Alélica

FC - Frequência Cardíaca

FIH - Fator inibidor do fator induzido em hipóxia (em inglês: *Factor Inhibiting HIF*)

G - Guanina

HIF - Fator induzido em hipóxia (em inglês: *Hypoxia-inducible factor*)

HTA - Hipertensão Arterial

IMC - Índice de massa corporal

KCl - Cloreto de Potássio

K_d - Constante de dissociação

LDL - Lipoproteína de baixa densidade (em inglês: *Low Density Lipoprotein*)

Leu - Leucina

LOA - Lesão de órgão alvo

MAPA - Medição ambulatoria da pressão arterial

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NADPH - Forma reduzida do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (em inglês: *Reduced Form of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NaOH - Hidróxido de Sódio

NE - Noradrenalina/Norepinefrina

NNT - Número necessário para tratar

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintetase (em inglês: *Nitric Oxide Synthase*)

OR - Razão de possibilidades (em inglês: Odds Ratio)

PA - Pressão arterial

PAH - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (em inglês: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

Pb - Pares de bases

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*

pFW - *primer forward*

PHD - Prolil-hidroxilase

Phe - Fenilalanina

PM10 - Partículas inaláveis com diâmetro inferior a 10 µm (em inglês: *particulate matter with diameter of less than 10 µm*)

PM2,5 - Partículas inaláveis com diâmetro inferior a 2,5 µm (em inglês: *particulate matter with diameter of less than 2,5 µm*)

pRV - *primer reverse*

RVP - Resistência vascular periférica

SA - Nódulo sinusal

SNP - Polimorfismos de base ou nucleótido único (em inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*)

SRAA - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

ssDNA - Cadeia de DNA única (em inglês: Single-Stranded DNA)

I - Timina

TFGe - Taxa de filtração glomerular estimada

Thr - Treonina

Tm - Temperatura de hibridação (em inglês: *annealing temperature*)

UV - Radiação ultravioleta

VHL - Proteínas de von Hippel-Lindau (em inglês: *von Hippel Lindau Proteins*)

VS - Volume sistólico

WHO - Organização Mundial de Saúde (em inglês: *World Health Organization*)

XME - Enzimas metabolizadoras de xenobióticos (em inglês: *Xenobiotic-Metabolizing Enzymes*)

XRE – Elementos de resposta a xenobióticos (em inglês: *Xenobiotic Response Elements*)

χ^2 - teste do qui-quadrado

1. Introdução

1.1. A Pressão Arterial

A Pressão Arterial (PA) é uma função fisiológica essencial ao correto funcionamento do organismo e define-se como a força exercida para que o sangue circule no interior das artérias no corpo¹. Quando a pressão arterial se encontra elevada de forma crónica, podemos estar perante um caso de Hipertensão Arterial (HTA)². A PA depende principalmente de dois fatores: o débito cardíaco (DC) - montante/volume de sangue que é bombeado para o corpo por minuto³ - e a resistência vascular periférica (RVP) – a oposição oferecida pelo sistema circulatório à PA⁴, medida pela constrição dos vasos sanguíneos.

Podemos calcular o DC através da multiplicação do Volume Sistólico (VS) - o volume de sangue bombeado numa contração - pela Frequência Cardíaca (FC) - o número de contrações por minuto – como está representada na **Equação 1**, abaixo indicada³.

$$DC = VS \times FC \quad \text{Equação 1}$$

Normalmente este valor ronda os 5,0 L/min. Pode então a PA ser calculada através da **Equação 2**, abaixo representada⁵.

$$PA = DC \times RVP \quad \text{Equação 2}$$

Quando existe um aumento da PA, estamos perante um cenário de vasoconstrição, resultando numa diminuição do fluxo sanguíneo e num aumento da resistência periférica, ocorrendo um estreitamento do diâmetro dos vasos. No outro cenário, quando existe uma diminuição da PA, estamos perante um cenário de vasodilatação, resultando num aumento do fluxo sanguíneo e numa diminuição da resistência periférica, ocorrendo um alargamento do diâmetro dos vasos⁶.

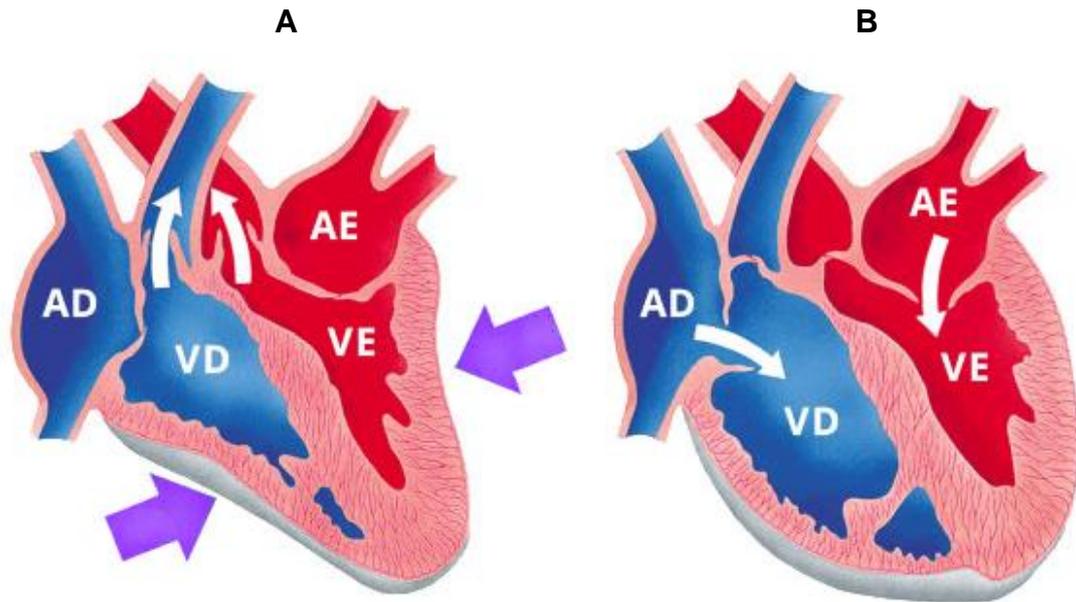


Figura 1: Representação esquemática (A) da sístole, com a representação do movimento de contração, simbolizado pelas setas a roxo e (B) da diástole. AD – Aurícula Direita; VD – Ventrículo Direito; AE – Aurícula Esquerda; VE – Ventrículo Esquerdo. Adaptado de Nabih-Ali et al⁷.

A HTA define-se como a elevação sustentada em repouso da pressão arterial sistólica - também classificada de “máxima” -, diastólica - também classificada de “mínima” - ou de ambas. Entenda-se por pressão arterial sistólica, o momento em que o coração contrai (sístole), bombeando o sangue para todo o corpo^{1,2,7}. A pressão diastólica corresponde então ao momento em que o coração relaxa para que possa voltar a encher-se de sangue (diástole). Manifestam-se quando o coração, ao bombear sangue, exerce uma força excessiva contra a parede das artérias^{8,9}. Na **Figura 1** estão representados estes dois movimentos. A gravidade da hipertensão arterial manifesta-se quando os seus valores permanecem elevados durante longos períodos ou quando a pressão arterial demonstra um aumento súbito e exacerbado dos valores.

Existem vários tipos de HTA. Em: 90 a 95% da população é desconhecida a causa etiológica da doença, sendo atribuído o nome de Hipertensão Arterial Primária² (também conhecida como hipertensão arterial essencial). Nos restantes casos, existem complicações - a nível renal, supra-renal, entre outros - sendo estas as causas para a manifestação da HTA. Esta última denomina-se de hipertensão secundária¹⁰.

1.1.1. Monitorização da Pressão Arterial

De forma a avaliar e monitorizar os valores da PA, existem *guidelines* que auxiliam tanto os doentes como os profissionais de saúde, no controlo da progressão da doença e da eficácia da terapêutica^{11,12}. Esta medição deve ser feita em dois momentos distintos do dia (de manhã e à tarde, por exemplo). Numa primeira fase, para doentes cujo diagnóstico da HTA tenha sido relativamente recente, as primeiras monitorizações devem ser realizadas junto de um profissional de saúde, de modo a permitir ao doente a aprendizagem da técnica, promovendo, eventualmente, a sua automonitorização. É necessário um cuidado maior para doentes com o chamado “efeito bata branca”¹³, isto é, doentes cuja medição em unidades de saúde resulta em valores exacerbados da PA, devido a um maior pico de *stress* ou ansiedade. Para estes doentes, a monitorização deve ser realizada ao longo do dia. Também devem ser realizadas medições durante todo o dia para doentes cujos valores estejam muito próximos do limite dos valores preocupantes.

Aspetos importantes na técnica da medição¹⁴, para aparelhos manuais ou automáticos segundo a Associação Americana do Coração (AMA):

1. Os aparelhos devem estar calibrados e validados;
2. O local deve ser calmo, sem barulho, com um ambiente acolhedor e a temperatura agradável;
3. Se o doente não se encontra em repouso, deve descansar durante pelo menos 5 minutos;
4. Caso tenha consumido substância estimulante, como a cafeína ou o tabaco, deve aguardar pelo menos 30 minutos até realizar a medição;
5. Os pés devem estar bem assentes no chão, com as pernas descruzadas;
6. O braço deve estar ao nível do coração;
7. As dimensões da braçadeira devem ser adequadas ao perímetro do braço;
8. Devem ser efetuadas pelo menos duas medições, calculando a média dos resultados;
9. Deve usar-se sempre o mesmo braço, de preferência o braço não dominante;

10. O braço deve estar livre, ou com uma peça de roupa leve, de forma a não formar um garrote;
11. A posição do corpo deve ser perpendicular à posição do braço, que deve estar bem assente na superfície de apoio;
12. Instruir o doente para não falar nem se movimentar durante a medição;
13. O sensor deve estar alinhado com a artéria braquial (parte interior do braço);
14. A braçadeira deve estar 3cm acima do cotovelo. Não deve estar apertada demais;
15. Iniciar a medição carregando no botão *START/STOP*.

Num indivíduo saudável, a pressão sistólica atinge valores de aproximadamente 120 milímetros de mercúrio (mm Hg). Esta pressão permite fazer uma estimativa do esforço feito pelo coração ao bombear o sangue e também a força que é exercida contra as paredes das artérias aquando da contração ventricular. Da mesma forma, num indivíduo saudável, durante a fase de relaxamento do ciclo cardíaco, a pressão arterial cai para cerca de 70 ou 80 mmHg.¹⁵ A pressão diastólica proporciona uma indicação da resistência periférica, a facilidade com que o sangue flui das arteríolas para o interior dos capilares. Quando a resistência periférica é alta, a pressão exercida nas artérias após a sístole não é dissipada rapidamente e permanece elevada durante grande parte do ciclo cardíaco^{4,16}.

Sendo assim, dependendo dos valores obtidos de várias medições, podemos classificar a PA de acordo com os dados do **Quadro 1** ^{11,12}:

Classificação	Sistólica (mmHg)		Diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	e	< 80
Normal	120 - 129	e/ou	80 - 84
Normal Alta	130 - 139	e/ou	85 - 89
HTA Grau 1	140 - 159	e/ou	90 - 99
HTA Grau 2	160 - 179	e/ou	100 - 109
HTA Grau 3	≥ 180	e/ou	≥ 110
Hipertensão Sistólica	≥ 140	e	< 90

Quadro 1: Classificação dos estágios de pressão arterial em consultório e definição dos graus de HTA. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018)¹².

A classificação da PA, quanto à categoria, define-se através da medição dos valores em contexto clínico e atribui-se consoante o maior valor obtido, seja ele da PA Sistólica ou Diastólica¹². Para a HTA Sistólica isolada, classifica-se com grau 1, 2 ou 3, de acordo com o intervalo de valores indicado. Este tipo de classificação é usado para todas as idades a partir dos 16 anos.

De entre as várias metodologias de monitorização da HTA, a Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial (MAPA)¹⁷ consiste numa metodologia muito útil, que permite uma avaliação mais fiável, rigorosa e informativa da pressão arterial do que medições isoladas, não sendo afetada pelo efeito “bata branca”, relacionado com a ansiedade causada pela medição no consultório¹⁸. Consiste na medição automática da PA durante um determinado período de tempo, com intervalos de 15 a 20 minutos – durante o dia – e com intervalos de 30 a 60 minutos – durante a noite¹⁹. É realizado através de um dispositivo colocado na cintura que insufla uma bolsa de borracha, também denominado de manguito, instalado no braço. O exame deve ser programado para um dia em que o utente vá realizar atividades normais do seu dia-a-dia, evitando, contudo, a prática de exercício físico durante o dia anterior ao exame e no próprio dia do exame^{19,20}. Este tipo de medição contínua permite diagnósticos mais precisos e ajuda a delinear planos terapêuticos mais personalizados.

A Auto Medição da Pressão Arterial (AMPA) constitui outra metodologia de monitorização da PA²¹, fora do ambiente de consultório, permitindo que se realizem um maior número de medições ao longo do dia, nas condições ideais.

Resulta numa análise muito fidedigna do perfil tensional do doente, quando a técnica de medição já se encontra consolidada pelo utilizador. Os valores limite para classificação de HTA de acordo com o tipo de monitorização estão descritos no **Quadro 2**.

Categoria	Sistólica (mmHg)		Diastólica (mmHg)
Medição em consultório	≥ 140	e/ou	≥ 90
Medição em ambulatório			
Média Diurna	≥ 135	e/ou	≥ 85
Média Noturna	≥ 120	e/ou	≥ 70
Média Diária	≥ 130	e/ou	≥ 80
Média das medições em casa	≥ 135	e/ou	≥ 85

Quadro 2: Definições de Hipertensão de acordo com os valores de pressão arterial avaliados em **consultório**, **ambulatório** ou em **casa**. Adaptado de Uhlig et al²¹.

Ambas as metodologias, quando comparadas com as medições em contexto de consulta, podem desmascarar não só a "Hipertensão de Bata Branca" como também a "Hipertensão Mascarada", que ao contrário da "Hipertensão de Bata Branca", se verificam valores normais de PA no consultório, mas valores elevados fora deste²².

1.2. Fisiopatologia Da Hipertensão Arterial

1.2.1. Sistema Nervoso Simpático

Um dos fatores que pode contribuir para o desenvolvimento de HTA (primária) é o aumento da estimulação simpática, isto é, uma hipersensibilidade do Sistema Nervoso Simpático^{1,6}. O Sistema Nervoso Simpático tem, entre outros, o importante papel de regular o tónus dos vasos sanguíneos através dos nervos simpáticos. Alguns destes nervos saem da região toracolombar, tendo extremidades nas arteríolas, que podem interagir com diferentes tipos de recetores lá presentes. Quando um neurónio simpático pré-ganglionar é excitado e envia um impulso, no seu axónio são libertadas catecolaminas para as sinapses^{23,24}.

Quimicamente, catecolaminas definem-se como catecóis, substâncias que contêm dois grupos hidroxilo num anel de benzeno²⁵, com um grupo amina na cadeia lateral da molécula²⁶, como se pode observar na **Figura 2**. No plasma humano existem em circulação três catecolaminas²⁷: adrenalina / epinefrina (EPI), noradrenalina / norepinefrina (NE) e dopamina (DA) – que agem como neurotransmissores.

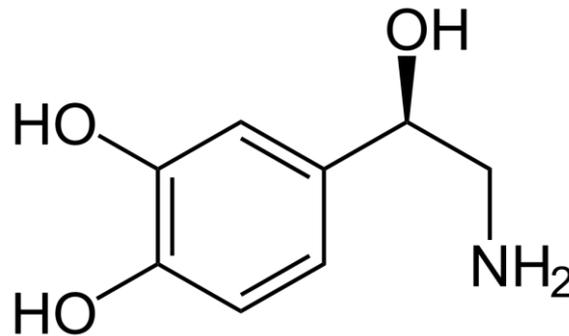


Figura 2: Estrutura molecular da noradrenalina / norepinefrina (NE). Adaptado de National Center for Biotechnology Information ²⁶.

Esta libertação pode ocorrer em todos os neurónios do tronco ganglionar simpático: cervical, torácico, lombar, sacral – podendo também ocorrer nos gânglios pré-aórticos, estes últimos afetando os vasos sanguíneos do trato digestivo⁸.

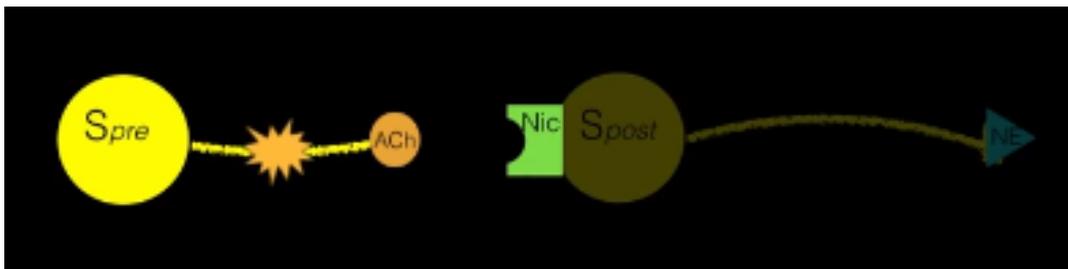


Figura 3: Transmissão de sinal nervoso entre os neurónios simpáticos pré ganglionares e os neurónios pós ganglionares, com libertação de catecolaminas. Spre - neurónio simpáticos pré-ganglionares; Ach – neurotransmissor; Nic – Recetor nicotínico; Spost - neurónio simpáticos pós-ganglionares; NE - noradrenalina / norepinefrina. Adaptado de Goldstein et al ²⁷.

As catecolaminas vão então ligar-se a um recetor colinérgico, por exemplo um recetor nicotínico, continuando a transmissão do impulso através dos neurónios simpáticos pós-ganglionares. No axónio desses neurónios, dá-se a libertação de NE para a segunda sinapse²⁷.

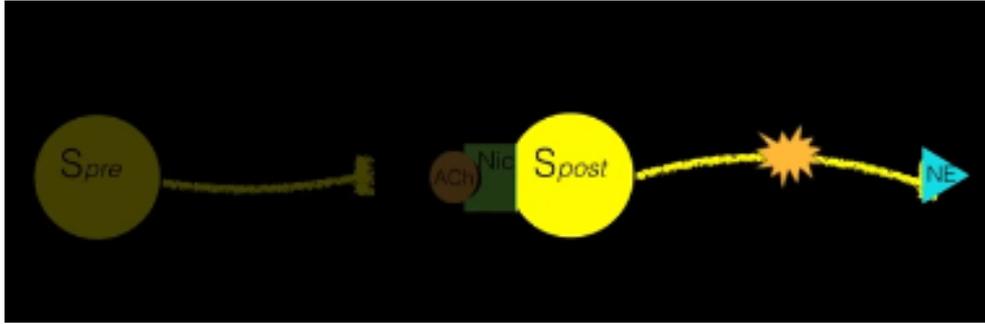


Figura 4: Transmissão de sinal nervoso entre os neurónios simpáticos pós ganglionares e os recetores adrenérgicos. Spre - neurónio simpáticos pré-ganglionares; Ach – neurotransmissor; Nic – Recetor nicotínico; Spost - neurónio simpáticos pós-ganglionares; NE - noradrenalina / norepinefrina. Adaptado de Goldstein et al²⁷.

Uma vez nesta sinapse, a NE vai ligar-se a recetores presentes na *tunica média*, musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Poderá ligar-se aos recetores alfa adrenérgicos que, quando estimulados, causam vasoconstrição com o aumento do tónus das artérias e, conseqüentemente, o aumento da RVP, que resulta num aumento da PA^{6,27}.

Caso a NE se ligue aos recetores beta adrenérgicos, ocorre o fenómeno da vasodilatação. Os recetores beta adrenérgicos encontram-se na musculatura esquelética dos vasos sanguíneos e, quando estimulados pela NE, promovem a diminuição do tónus das artérias²⁸.

O Sistema Nervoso Simpático surte também efeitos ao nível do coração, inervando o nódulo sinusal (SA), o nódulo aurículo-ventricular (AV) e o miocárdio^{29,30}. Estas estruturas podem ser observadas na **Figura 5**.

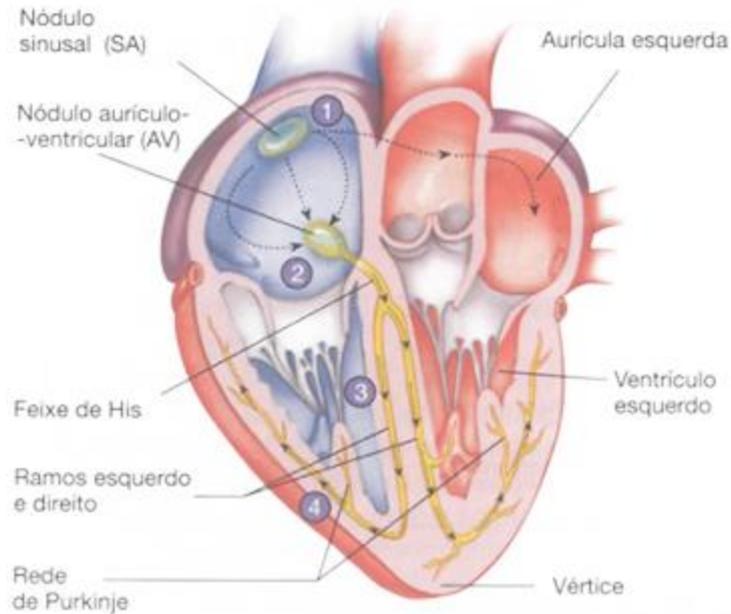


Figura 5: Pormenor dos nódulos sinusal, aurículo-ventricular e do impulso nervoso. Adaptado de Seeley et al⁸.

À semelhança do que acontecia nos vasos sanguíneos, dá-se a libertação de NE por parte dos neurónios pós-ganglionares, atuando nos recetores beta adrenérgicos presentes nos nódulos SA e AV e no miocárdio^{8,29,30}. Este estimula a entrada de iões positivos para dentro das células nodais, ultrapassando a barreira do potencial de ação das células e ativando a abertura de vários canais de cálcio (Ca^{+2}) e de sódio (Na^{+}). Tal fenómeno leva à contração da musculatura cardíaca e, como consequência existe um aumento da FC e do VS, culminando num aumento da pressão arterial.

1.2.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

Um mecanismo fisiológico essencial para a compreensão da homeostasia da PA no corpo humano é o sistema renina-angiotensina-aldosterona^{1,31}. Presentes no rim, existe um tipo de células denominadas de células justaglomerulares, que são células de musculatura lisa modificadas, representadas na **Figura 6**. Estas células são baroreceptores que formam uma bainha em volta da arteríola aferente, responsável por irrigar o glomérulo, aferindo a pressão arterial^{8,32}.

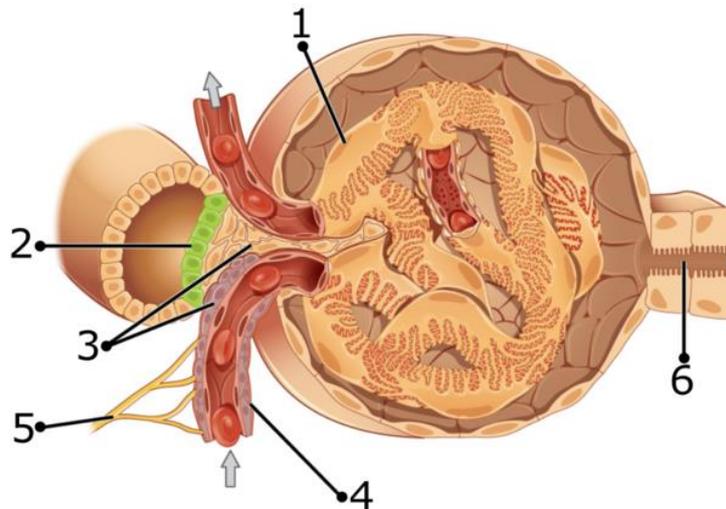


Figura 6: Representação anatómica do glomérulo. 1- Podócito; 2- Mácula densa; 3- Células justaglomerulares; 4- Arteriola aferente; 5- Nervos renais; 6- Túbulo proximal. Adaptado de Kurtz et al³².

Quando a PA se encontra em valores baixos ou o volume de sangue circulante diminui, é desencadeada uma resposta por parte destas células e é libertada uma enzima: a renina³³. Paralelamente, estes dois fatores contribuem para que o filtrado nos glomérulos se mova lentamente, podendo o sódio na forma iónica (Na^+) ser reabsorvido em maior quantidade. No túbulo distal, os níveis de Na^+ no corpo são controlados por um outro tipo de células especializadas, as células da mácula densa³⁴. Quando estas células detetam uma diminuição dos níveis de Na^+ no corpo, ocorre um estímulo para a libertação de renina por parte das células justaglomerulares. Este estímulo é possível, uma vez que, anatomicamente, as células da mácula densa e as células justaglomerulares estão unidas por tecido conjuntivo, podendo comunicar-se facilmente⁸.

Quando o Sistema Nervoso Simpático é estimulado, encontra-se com hipersensibilidade ou é desencadeada uma resposta de *luta ou fuga* (*fight or flight*), ocorre a libertação de renina³³.

Uma vez em circulação, a renina vai atuar sobre uma proteína plasmática sintetizada e armazenada pelo fígado, denominada de angiotensinogénio. Desta interação entre a renina e o angiotensinogénio resulta a clivagem de um fragmento do angiotensinogénio, dando origem à angiotensina I, composta de dez aminoácidos^{8,35}. Esta é clinicamente pouco importante, uma vez que é um vasoconstritor de reduzida potência.

Nos pequenos vasos pulmonares é secretada uma enzima proteolítica que vai atuar sobre a angiotensina I, a enzima de conversão da angiotensina (ECA). Quando a angiotensina I, em circulação, chega aos pulmões, dá-se a conversão de angiotensina I em angiotensina II, reação mediada pela ECA³⁵. Esta reação retira mais dois aminoácidos à proteína, resultando na sua forma ativa⁸. A angiotensina II é constituída por oito aminoácidos e é um potente vasoconstritor geral, provocando vasoconstrição arteriolar e, em menor extensão, vasoconstrição venosa³⁶. Como consequência da atividade da angiotensina II, verifica-se um aumento da resistência periférica e o aumento do retorno venoso ao coração, dois mecanismos que culminam no aumento da pressão arterial^{31,36}. A angiotensina tem também, entre outras funções, causar a vasoconstrição da arteríola eferente. Sendo uma arteríola, tem um tamanho reduzido, mas uma bainha com grande quantidade de células de músculo liso⁸. Quando estas células contraem, um maior volume de sangue recua para o glomérulo, aumentando a taxa de filtração glomerular, culminando num aumento da concentração de sódio (Na⁺) no túbulo distal, não sendo reabsorvido em tanta extensão para o organismo na ansa de *Henle*²⁴. Este fenómeno constitui um mecanismo de *feedback* negativo, uma vez que uma das razões pela qual se dá a libertação de renina prende-se com a diminuição dos níveis de sódio (Na⁺) no túbulo distal^{33,35}.

No córtex das glândulas supra-renais, a angiotensina tem outro papel importante: estimular a secreção de aldosterona, uma hormona esteróide, que entra na corrente sanguínea, difunde-se através das membranas plasmáticas, ligando-se aos seus recetores intracelulares nos seus locais de ação^{8,31,37}.

A aldosterona atua ao nível do túbulo distal e do tubo coletor, levando a um aumento da síntese de transportadores, aumentando o transporte de sódio (Na⁺) através da membrana basal e apical, das células do nefrónio³⁷. Este aumento do transporte de sódio (Na⁺) do filtrado para o sangue, aumenta o volume de sangue circulante, uma vez que, para manter o equilíbrio osmótico, a água também é reabsorvida. Isto resulta numa urina com pouco volume e com baixas concentrações de sódio (Na⁺) e num aumento da pressão arterial³⁴.

É importante referir também que a angiotensina II tem outro papel fundamental: verifica-se que existe atividade da angiotensina II no hipotálamo, estimulando a secreção da hormona antidiurética (ADH) pela glândula pituitária

posterior^{1,38}. Esta hormona entra então em circulação, tendo como alvo o túbulo distal e o tubo coletor. Aqui existe um aumento da reabsorção de água, resultando numa urina com pouco volume e no aumento do volume de sangue circulante, que culmina no aumento da pressão arterial. Quando os níveis de ADH se encontram baixas, a permeabilidade dos túbulos distais e dos tubos coletores é relativamente reduzida, sendo bastante impermeáveis à água na ausência de ADH³⁸.

De uma forma simplista, o SRAA ativa quando existe um estímulo: uma diminuição da pressão arterial e do volume de sangue circulante – resultando num mecanismo de *feedback* negativo que culmina com o aumento da pressão arterial e do volume de sangue circulante.

1.2.3. Formação De Placa Aterosclerótica

Quando o sangue circula nos vasos sanguíneos, exerce forças de fricção sob o endotélio³⁹. Numa situação em que a PA se encontra no intervalo dos valores normais, as flutuações da PA entre a sístole e a diástole não representam um problema, uma vez que existe uma rede de tecido fibroso nos vasos sanguíneos, com propriedades elásticas. Estas fibras conferem maleabilidade aos vasos sanguíneos, reduzindo o risco de danos no endotélio^{2,39,40}. Quando a PA atinge o intervalo considerado da Hipertensão, valores acima dos 140/90 mmHG¹⁷, por períodos prolongados, pode haver deterioração do endotélio. Tal acontece porque, com o aumento da RVP, existe um aumento das forças de fricção que atuam no endotélio, passando o ponto de rutura, podendo observar-se pequenas fendas^{4,16}.

É de notar que, vasos onde se observam bifurcações são geralmente sujeitos a forças de fricção mais intensas devido ao fluxo turbulento, ou não laminar⁴¹. Começa então o processo regenerativo do endotélio, juntamente com o com o processo inflamatório, fator desencadeante do processo de formação de placas de ateroma⁴². O novo tecido presente no endotélio tem características de tecido conjuntivo – é de natureza fibrosa. Esta rede de tecido conjuntivo que se forma no endotélio tem a capacidade de agregar alguns elementos que se encontram em circulação: monócitos, linfócitos T, plaquetas, colesterol e outros lípidos. Desta agregação formam-se placas ateroscleróticas^{1,39,40}.

Aprofundemos então o processo de formação das placas: como consequência do processo regenerativo do endotélio, existe um aumento da permeabilidade deste, ocorrendo migração de LDL¹, lipoproteínas de baixa densidade⁴³. Desta migração culmina uma acumulação de LDL nas camadas internas do endotélio e o começo do processo inflamatório⁴⁴. Tal como as moléculas de LDL, os monócitos e os linfócitos T infiltram-se pelas camadas basais do endotélio e acumulam-se no subendotélio⁴⁵. Aqui ocorre diferenciação dos monócitos em macrófagos, começando o processo de fagocitose das LDL e de outros lípidos séricos, tornando-se células espumosas⁴⁶, repletas de lípidos e constituindo a fase inicial das lesões ateroscleróticas, denominadas por estrias gordurosas. O crescimento da placa é fomentado por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a migração de células de musculatura lisa e de macrófagos, aumentando a matriz extracelular da placa, resultando numa placa subendotelial com características fibrosas circundada por tecido conjuntivo e lípidos^{39,42}.

Dependendo da sua constituição, as placas podem classificar-se como estáveis ou instáveis⁴⁷. Placas classificadas como instáveis têm, por norma, um alto teor de macrófagos, com um núcleo de natureza lipídica bastante espesso, revestidos por uma fina capa fibrosa^{48,49}. Placas classificadas como estáveis são compostas por uma capa fibrosa mais espessa, que confere uma maior estabilidade devido à quantidade de colagénio presente, e apresentam também menor conteúdo lipídico⁴². As placas estáveis têm um crescimento lento – podem passar décadas até que estas possam provocar estenose ou oclusão do vaso sanguíneo - permanecendo estáticas ou até mesmo regredirem⁵⁰. As placas instáveis são vulneráveis à erosão ou rutura espontâneas, apresentando um maior risco.

Uma vez que ocorre o rompimento da placa aterosclerótica, existe a formação de um trombo, que pode ter uma das seguintes evoluções⁵¹:

- O trombo resultante pode incorporar-se no interior da placa aterosclerótica, alterando o seu formato e espoletando o seu crescimento célere;

¹ Lipoproteína de baixa densidade (do inglês: *Low Density Lipoprotein* – LDL)

- O trombo pode levar à rápida oclusão do lúmen vascular e desencadear um evento isquémico agudo;
- O trombo pode provocar embolia, a obstrução de um vaso pelo deslocamento de um trombo até ao local de obstrução;
- A placa aterosclerótica pode ser preenchida pelo sangue circulante no vaso sanguíneo, levando à sua expansão e obstrução do vaso a jusante do local da placa;
- O conteúdo da placa, em detrimento de eventuais trombos, pode provocar embolismo, com oclusão do vaso a jusante do local da placa.

Quando observado em imagiologia, é de notar que placas instáveis estreitam o lúmen dos vasos para menos de metade do seu diâmetro normal. Placas estáveis acarretam menor risco, uma vez que o estreitamento do lúmen dos vasos sanguíneos é menor do que o observado em placa instáveis⁴².

Normalmente, o endotélio saudável dos vasos sanguíneos secreta substâncias que auxiliam na regulação do tónus vascular: o óxido nítrico (NO), com propriedades relaxantes - e a endotelina, com propriedades constritoras. No endotélio saudável, um aumento da PA leva ao aumento da produção de NO, de forma a contrabalançar as forças de fricção que atuam sob o endotélio. A síntese endógena de NO, representada na **Figura 7**, é realizada por uma enzima, a óxido nítrico sintetase (NOS), que converte o aminoácido arginina em citrulina, com NO como subproduto da reação^{2,52}.

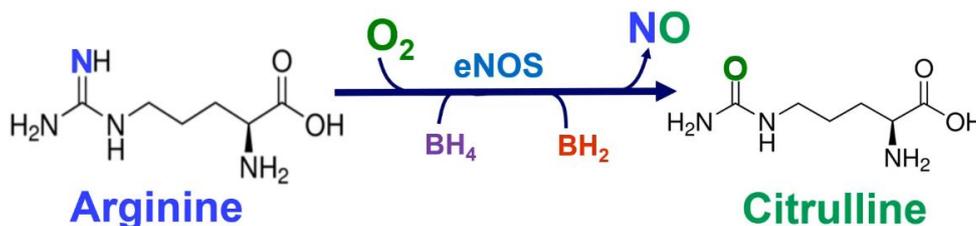


Figura 7: Reação de conversão da Arginina em Citrulina com libertação de NO como subproduto da reação. Adaptado de Konukoglu et al⁵².

O NO induz a síntese de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que ativa uma outra enzima, a proteína cinase G, que induz relaxamento do músculo liso de duas formas: pelo estímulo de efluxo de iões Ca^{2+} para o exterior das células,

promovendo a despolarização da mesma – ou através da ativação de uma enzima, a fosfatase de miosina, que vai promover a desfosforilação da miosina⁵³.

Verifica-se que, quando o endotélio se encontra danificado, existe uma libertação insuficiente de NO e um aumento da libertação de substâncias com propriedades constritoras, bem como fatores pro-inflamatórios, pro-trombóticos e também fatores de crescimento^{1,54}.

1.3. Tratamento Da Hipertensão Arterial

Os objetivos terapêuticos do tratamento da hipertensão assentam em duas premissas: a redução do número de eventos cardiovasculares e a prevenção do aumento da morbidade e mortalidade associadas à doença⁵⁵. Dispomos de dois tipos de abordagem terapêutica: a não farmacológica e a farmacológica. Recomenda-se que os doentes consigam atingir a redução da PA para valores <140/90 mmHg (preferencialmente 130/80 mmHg), salvaguardando sempre a tolerância do doente à terapêutica.

1.3.1. Medidas Não Farmacológicas

Esta abordagem deve ser transversal para todos os casos, incluindo indivíduos cuja PA se classifica como normal alta. Um estilo de vida saudável pode, não só, prevenir ou até mesmo atrasar o aparecimento de hipertensão, como também reduzir o risco de um evento cardiovascular (CV). Estas alterações podem atrasar ou até mesmo prevenir a necessidade de se iniciar terapêutica farmacológica, podem também amplificar os efeitos da terapêutica anti-hipertensora em doentes que já a tenham iniciado⁵⁶. É de notar o caso especial nos doentes com lesão de órgão alvo (LOA) ou com nível elevado de risco CV – nestes doentes, as intervenções no estilo de vida não devem atrasar a iniciação da terapêutica farmacológica, quando há necessidade desta segundo os algoritmos de gestão de risco¹².

No **Quadro 3** estão listadas as recomendações que estão comprovadamente associadas a uma redução da PA:

Recomendações
Recomenda-se a restrição do sal para < 5 g por dia.
Recomenda-se a restrição do consumo de álcool para: <ul style="list-style-type: none"> • Menos de 14 unidades por semana para os homens. • Menos de 8 unidades por semana para as mulheres.
Recomenda-se o aumento do consumo de vegetais, fruta fresca, peixe, nozes, ácidos gordos insaturados (azeite), o baixo consumo de carne vermelha e o consumo de produtos de baixo teor de gordura.
O controlo do peso está indicado para evitar a obesidade (IMC > 30 kg/m ²) ou perímetro abdominal > 102 cm nos homens e > 88 cm nas mulheres), para atingir um IMC saudável (cerca de 20-25 kg/m ²) e valores de perímetro abdominal adequados (< 94 cm nos homens e < 80 cm nas mulheres) de modo a reduzir a PA e o risco CV.
Recomenda-se o exercício físico regular (por exemplo pelo menos 30 minutos de atividade física dinâmica moderada em 5 - 7 dias por semana).
Recomenda-se a cessação tabágica e assistência nesse sentido e a referenciação para programas de cessação tabágica
Recomenda-se a evicção de consumo excessivo de álcool.

Quadro 3: Resumo listado das intervenções no estilo de vida nos doentes com hipertensão ou com pressão arterial normal alta. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹².

Muitos fatores influenciam o limiar que dita o início do tratamento farmacológico: o estágio em que se encontra a HTA, o grupo etário, as comorbilidades e o risco associado a estas. Para doentes cuja PA se encontre normal alta (130-139 / 85-89 mmHg) deve considerar-se a terapêutica farmacológica quando em simultâneo exista um risco muito elevado de DCV, em particular doença coronária. Em doentes com HTA grau 1 (140-159 / 90-99 mmHg) já estabelecida, quando acrescido um risco elevado ou muito elevado de DCV, doença renal ou LOA, a terapêutica farmacológica deve ser estabelecida de forma imediata. Para doentes com HTA grau 1 com risco baixo/moderado de DCV, doença renal ou LOA, deve ser estabelecida terapêutica farmacológica quando a terapêutica não-farmacológica não é suficiente para controlar os valores da PA, após um período de três a seis meses de intervenção do estilo de vida. Doentes com HTA grau 2 (160-179 / 100-109 mmHg) ou grau 3 ($\geq 180/110$ mmHg) devem iniciar imediatamente a terapêutica farmacológica, fazendo o controlo da mesma regularmente^{11,12}.

Grupo etário	Limiar do tratamento da PAS no consultório (mmHg)					Limiars de tratamento da PAD no consultório (mmHg)
	Hipertensão	+ Diabetes	+ DRC	+ DC	+ Acidente Vascular Cerebral/AIT	
18 - 65 anos	≥ 140	≥ 140	≥ 140	≥ 140 ^a	≥ 140 ^a	≥ 90
65 - 79 anos	≥ 140	≥ 140	≥ 140	≥ 140 ^a	≥ 140 ^a	≥ 90
≥ 80 anos	≥ 160	≥ 160	≥ 160	≥ 160	≥ 160	≥ 90
Limiars de tratamento da PAD no consultório (mmHg)	≥ 90	≥ 90	≥ 90	≥ 90	≥ 90	

AIT = acidente isquémico transitório; DC = doença coronária; DRC = doença renal crónica; PA = pressão arterial; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica.

^aO tratamento pode ser considerado nestes doentes de risco muito elevado com PAS normal alta (i.e. PAS 130 - 140 mmHg).

Quadro 4: Síntese dos limiars de tratamento da pressão arterial em consultório. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹².

1.3.2. Medidas Farmacológicas

A grande maioria dos doentes hipertensos requer, como complemento a mudanças no estilo de vida, a iniciação de terapêutica farmacológica de forma a obter um maior controlo da PA. Devem ter-se em conta as características do doente, de forma a maximizar as potencialidades da terapêutica, a sua adesão e a minimização dos efeitos adversos associados. No **Quadro 5** estão listadas as classes de fármacos recomendadas para o tratamento rotineiro da HTA^{11,12,57}:

Classes	
Diuréticos	Tiazidas e análogos
	Da ansa
	Poupadores de potássio
	Antagonistas da aldosterona
Modificadores do eixo RAA	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECAs)
	Antagonistas dos recetores da angiotensina II (ARAs)
	Inibidores da renina
Bloqueadores da entrada de cálcio	Diidropiridínicos
	Não Diidropiridínicos
Depressores da atividade adrenérgica	Bloqueadores alfa
	Bloqueadores beta
	Agonistas alfa 2 centrais

Quadro 5: Quadro resumo das classes terapêuticas utilizadas na estratégia do tratamento farmacológico para a hipertensão arterial. Adaptado de Sociedade Europeia de Cardiologia (2018) ¹².

Para a grande maioria dos doentes, o início da terapêutica farmacológica deve ser feito através da associação única de vários fármacos num único comprimido, de forma a melhorar a eficiência do tratamento, resultando num maior controlo da PA. As associações preferenciais englobam um modificador do SRAA juntamente com um bloqueador dos canais de cálcio (BCC) ou um diurético. Poderá dar-se preferência à integração de um betabloqueante no esquema terapêutico quando existem benefícios para outras patologias concomitantes, como é o caso da angina de peito, num evento pós-enfarte do miocárdio, na insuficiência cardíaca ou no controlo da frequência cardíaca. Nestes casos deverá fazer-se a associação de um betabloqueante com um diurético ou com qualquer fármaco das classes recomendadas para o tratamento da HTA^{11,12,57}.

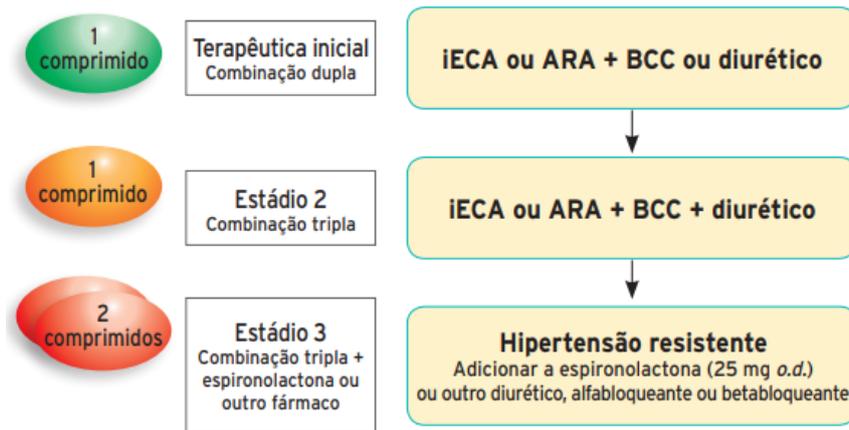


Figura 8: Estratégia do tratamento farmacológico central para a hipertensão arterial não complicada. O algoritmo central é também apropriado para a maioria dos doentes com LOA, DCV ou DM. IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina II; ARA – Antagonista do recetor de angiotensina II; BCC- Bloqueador de canais de cálcio. Adaptado de Flack et al ¹¹.

Poderá ser considerado um esquema em monoterapia em alternativa ao esquema apresentado anteriormente. A monoterapia apresenta-se então como terapêutica inicial nos doentes de baixo risco com HTA de grau 1 que apresentem uma PA Sistólica <150 mmHg ou em doentes considerados de risco muito elevado que apresentem uma PA normal alta. Também poderá recorrer-se à monoterapia em doentes idosos que apresentem grande fragilidade^{11,12,57}.

Caso a PA não seja controlada com uma associação de dois fármacos, recomenda-se que se integre um terceiro fármaco no esquema terapêutico, geralmente um diurético tiazídico⁵⁸. A integração do terceiro fármaco deve, à semelhança do esquema terapêutico supracitado, ser realizada num único comprimido^{11,12,57}.

Se a PA persiste sem controlo após a integração do esquema em combinação de três fármacos, deve complementar-se o tratamento através da adição de espironolactona. Caso não seja tolerado pelo doente, poderá ser substituída por outros diuréticos ou betabloqueantes, em dosagens mais elevadas^{37,59}.

No tratamento da HTA com DC, dá-se preferência à integração de betabloqueantes ou de BCC nos esquemas de tratamento iniciais, uma vez que há benefícios para a patologia concomitante⁶⁰. Desta forma, o esquema inicial

deverá conter uma associação única de um Modificador do SRAA em adição a um betabloqueante ou um BCC.

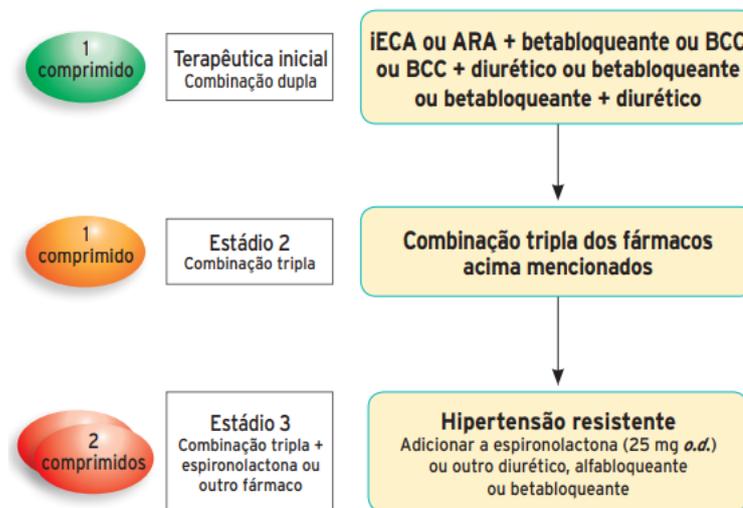


Figura 9: Estratégia do tratamento farmacológico central para a hipertensão arterial e doença coronária. IECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina II; ARA – Antagonista do recetor de angiotensina II; BCC- Bloqueador de canais de cálcio. Adaptado de Flack et al ¹¹.

À semelhança do esquema de tratamento farmacológico central, caso uma associação de dois fármacos se mostre insuficiente no controlo da PA, poderá ser feita uma combinação tripla dos fármacos que constituem uma opção na terapêutica inicial e, caso a combinação tripla se mostre ineficaz no controlo da PA, deverá acrescentar-se espironolactona ao esquema terapêutico (ou outro diurético/betabloqueante)^{11,12,57}.

Em doentes hipertensos com doença renal crónica, isto é, uma taxa de filtração glomerular estimada $<60 \text{ mL/min/1,72m}^2$ (com ou sem proteinúria), a terapêutica inicial deverá consistir da combinação de um modificador do SRAA com um BCC ou um diurético^{11,12,57}. Deverá prestar-se atenção à taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) do doente quando um diurético faça parte do plano terapêutico, uma vez que, aquando da sua monitorização, se esta apresentar valores $<30 \text{ mL/min/1,72m}^2$ deverá substituir-se por um diurético de ansa. Tal facto deve-se à redução da eficácia dos diuréticos tiazídicos quando a TFGe se encontra abaixo do valor supracitado⁶⁰.

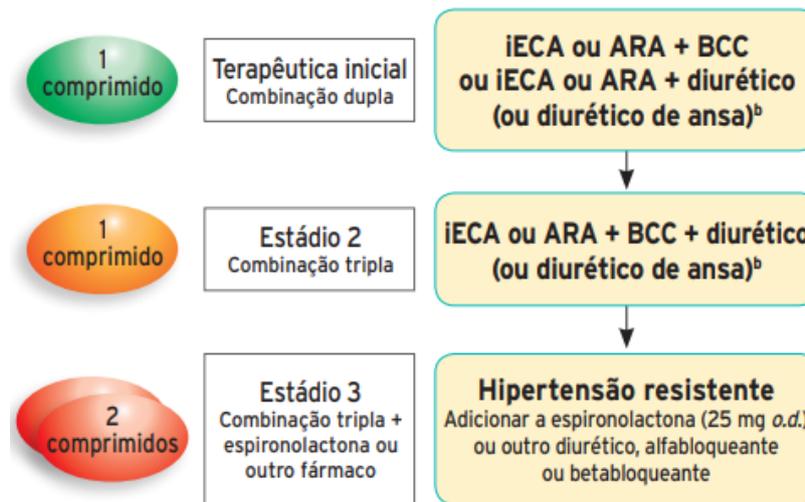


Figura 10: Estratégia do tratamento farmacológico central para a hipertensão arterial e doença renal crônica. iECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina II; ARA – Antagonista do recetor de angiotensina II; BCC- Bloqueador de canais de cálcio. Adaptado de Flack et al ¹¹.

No caso da hipertensão resistente, aquando da adição de espironolactona ao plano terapêutico, deverá ter-se o cuidado de monitorizar a TFGe, sob risco de hipercalemia, quando esta apresenta valores $<45 \text{ mL/min/1,72m}^2$ ou o valor basal de K^+ é $\geq 4,5 \text{ mmol/L}$ ^{12,57}. É também expectável um aumento da creatinina sérica nos doentes hipertensos que estejam a ser tratados com um modificador do SRAA (iECA ou ARA)⁶⁰, no entanto, este valor não deve ultrapassar um crescimento superior a 30%⁶¹. Esta classe de fármacos também influencia uma redução da TFGe no doentes com DRC¹².

1.4. Epidemiologia da Hipertensão Arterial

Globalmente, estima-se que a HTA é responsável por 9,4 milhões de óbitos, cerca de 8,50% do total de mortes a nível mundial⁶². É o fator de risco associado a doenças CV mais comum e também mais evitável e a sua elevada, prevalência associada ao elevado risco de morbilidade, mortalidade e incapacitação tornam esta patologia um problema de saúde particularmente alarmante. Entenda-se por prevalência – ou taxa de prevalência - um indicador de morbilidade que traduz o total de casos, recentes e antigos, da doença em estudo numa população num dado momento (instantânea) ou num período de tempo (periódica)⁶³. Este

indicador difere da taxa de incidência, uma vez que se contabilizam todos os casos, recentes e antigos, num dado período de tempo - enquanto para o cálculo da incidência apenas são contemplados os novos casos.

$$Prevalência = \frac{Total\ de\ Casos}{Total\ de\ População\ em\ risco} \times 10^n \quad \text{Equação 3}$$

A prevalência é baseada na incidência e na duração da doença em estudo: uma taxa de prevalência elevada numa determinada população pode refletir não só uma incidência elevada da doença, mas também um prolongamento da evolução da doença sem cura ou ambos. Da mesma forma, uma taxa de prevalência diminuída numa determinada população pode refletir uma baixa incidência da doença, uma evolução da doença que seja fatal ou uma evolução da doença que leve à recuperação do indivíduo. Por esta razão, a prevalência é um indicador de saúde muito útil para representar estatisticamente doenças crónicas, uma vez são normalmente de longa duração e existe uma incerteza quanto à data de começo da doença⁶³.

Em 2010, cerca de 1,38 mil milhões de pessoas sofriam de HTA, 31,1% da população adulta mundial⁶⁴. Quase uma década depois, em 2019, este número foi atualizado, contabilizando 1,13 mil milhões de pessoas com HTA, cerca de 25,5% da população adulta mundial⁶⁵. Este decréscimo não foi, contudo, uniforme em todos os países, como se pode observar na **Figura 11**. Verificou-se que, em países economicamente mais fortes, ocorreu um decréscimo moderado da prevalência de HTA nas suas populações – enquanto países economicamente mais precários, ocorreu um aumento significativo da prevalência de HTA⁶⁶. Estas disparidades na prevalência da HTA podem sugerir que os sistemas de saúde nos países que estão a atravessar crises económicas não conseguem fazer a gestão da doença nem as complicações CV que lhes estão inerentes, associado ao envelhecimento populacional, à redução da atividade física, aos estilos de vida pouco saudáveis e à falta de acesso a medicamentos⁶⁷.

Relativamente à disparidade dos valores entre sexos, é certo que existe uma maior prevenção da HTA por parte do sexo feminino. A este facto acrescenta-se também uma maior taxa de controlo da doença. Em 2015,

estimou-se que o valor global médio da PA rondava os 127.0 / 78.7 mmHg para indivíduos do sexo masculino e 122.3 / 76.7 mmHg para indivíduos do sexo feminino⁶⁸. Quando comparamos estes valores com os valores calculados em 1975 verificamos o seguinte.

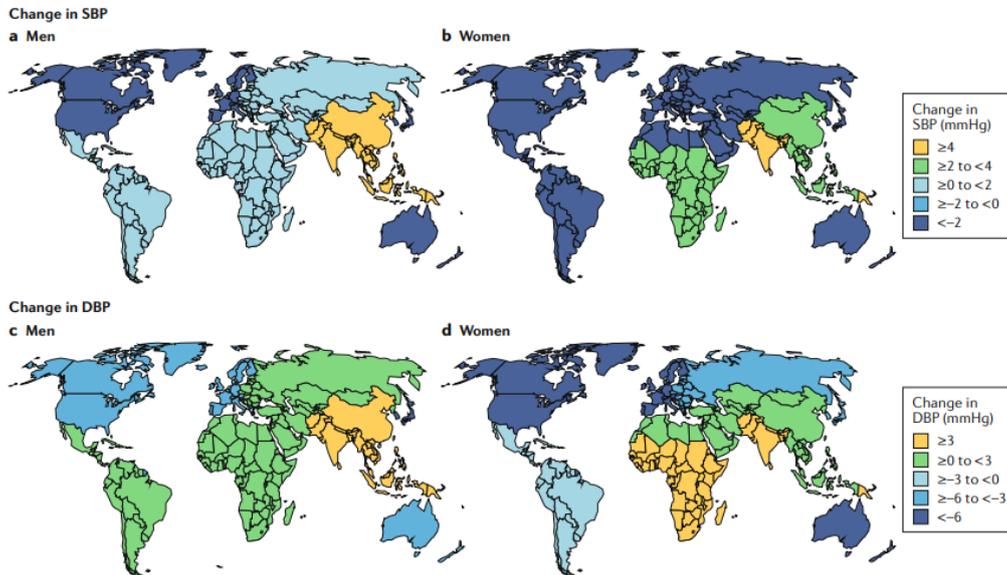


Figura 11: Diferenças na pressão arterial sistólica média estimada (A) no sexo masculino e (B) no sexo feminino e na pressão arterial diastólica média estimada (C) no sexo masculino e (D) no sexo feminino, à escala mundial entre 1975 e 2015. PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica. Adaptado de Mills et al⁶⁴.

Embora os valores não fltuem muito, nos países economicamente mais estáveis, verifica-se uma diminuição subtil da PA em 40 anos, enquanto em países economicamente mais desfavorecidos ocorreu um aumento da PA⁶⁴.

Este trabalho teve como foco a análise de polimorfismos que poderiam ter influência na propensão da população tailandesa a desenvolver HTA. Um dos principais motivos prendeu-se com o facto de, numa população total com cerca de 70 milhões de indivíduos⁶⁹, 1 em cada 4 adultos tailandeses sofre de HTA, sendo que apenas 1 em cada 3 tem a HTA sob controlo⁷⁰. Como se pode observar na **Figura 11**, entre 1975 e 2015 a pressão arterial sistólica média da população tailandesa aumentou em ≥ 4 mmHg e a pressão arterial diastólica média aumentou em ≥ 3 mmHg⁶⁶.

Foi verificado que a morbilidade associada a HTA por cada 100.000 habitantes em 2003, 2008 e 2013 foram 389,80, 860,53 e 1621,72, respetivamente⁷¹. Esta tendência de crescimento exponencial que se tem vindo

a verificar ao longo dos anos é um fator que levanta muitas preocupações quanto ao risco CV da população tailandesa.

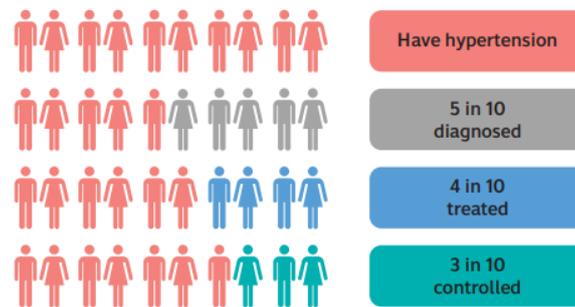


Figura 12: Rácios de diagnóstico, tratamento e controlo da hipertensão arterial na população tailandesa para ambos os sexos no ano de 2014. Adaptado de World Health Organization (2019)⁷⁰.

A HTA na Tailândia tem vindo a verificar-se, para além de comum, um problema crescente nesta população, onde doenças do foro CV são responsáveis por aproximadamente um quarto (1/4) das mortes anualmente⁷², um problema que tem vindo a marcar-se com evidência, já que as duas causas de morte mais comuns deveram-se a enfarte e ataque isquémico⁷³, como se pode observar na **Figura 13**.

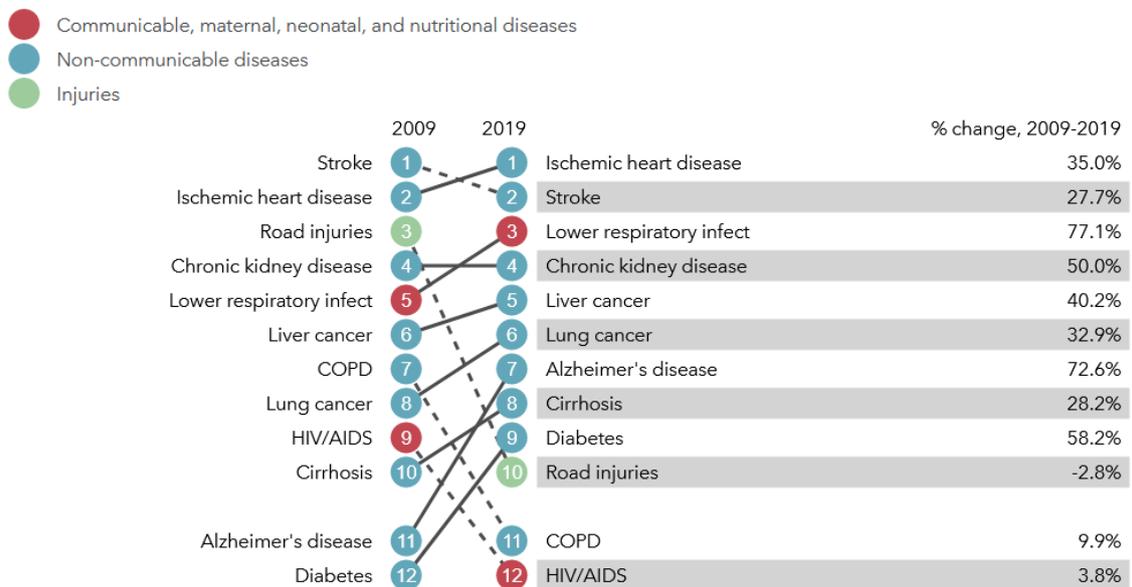


Figura 13: Causas de morte mais comuns na população tailandesa entre 2009 e 2019. Adaptado de Institute for Health Metrics and Evaluation⁷³.

Em 2003, a prevalência de HTA na população tailandesa rondava os 21%, sendo que este valor tem vindo a aumentar com o tempo, tendo atingido os 25% em 2014, com tendência a aumentar⁷⁰.

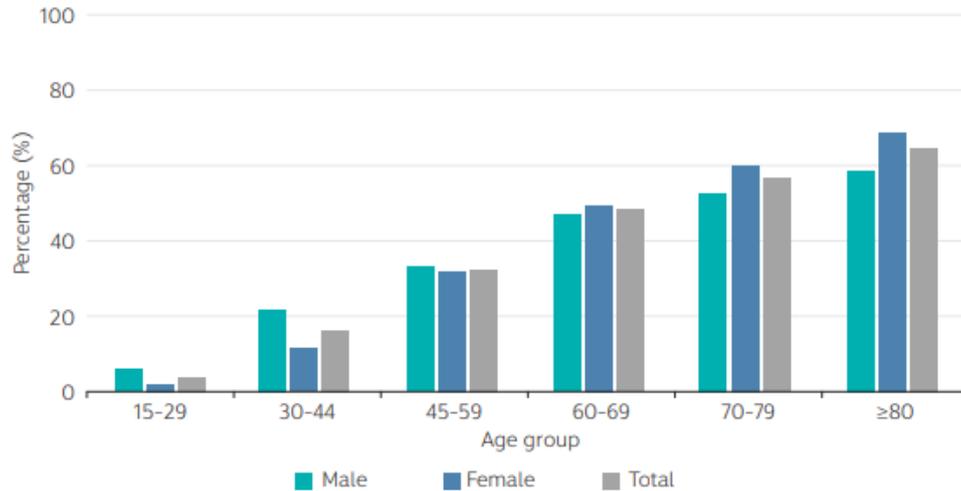


Figura 14: Prevalência da hipertensão arterial por idade e sexo na população tailandesa no ano de 2014. Adaptado de World Health Organization (2019)⁷⁰.

Como podemos observar na **Figura 14**, a prevalência tem tendência a aumentar com o avanço da faixa etária, sendo mais comum nos indivíduos do sexo masculino até uma certa idade, tendência que se inverte para faixas etárias mais avançadas. Esta inversão tendencial pode dever-se ao facto de que a esperança média de vida nos indivíduos do sexo feminino – 82 anos - seja muito superior à do sexo masculino – 74,3 anos -, para a população tailandesa⁷³. Todos os meses são diagnosticados aproximadamente entre 50.000 e 70.000 novos casos de HTA⁷⁰. É interessante verificar que existe uma tendência cíclica no padrão de diagnóstico da HTA, como se observa no seguinte gráfico da **Figura 15**:

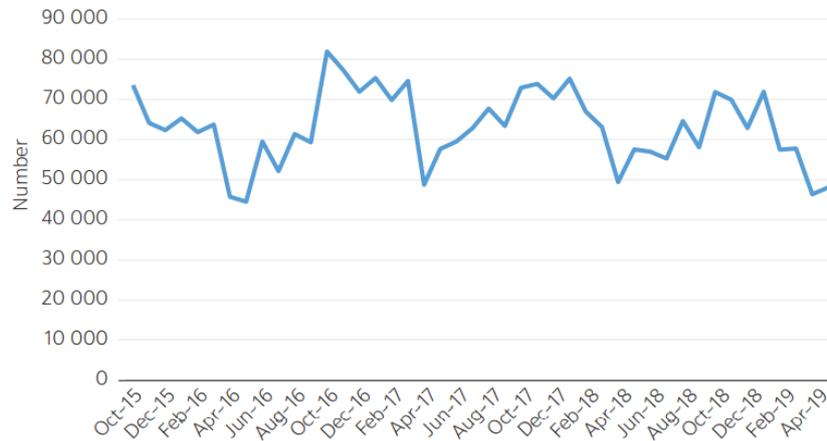


Figura 15: Números de novos diagnósticos de hipertensão arterial na população tailandesa em cada mês entre outubro de 2015 e abril de 2019. Adaptado de World Health Organization (2019)⁷⁰.

Tal facto pode prender-se com a sazonalidade das atividades de diagnóstico por parte do Sistema Nacional de Saúde Tailandês, devendo reforçar-se estas atividades, uma vez que poderão existir mais casos de HTA que não foram diagnosticados.

É possível ver o esforço do SNS Tailandês na gestão da doença, uma vez que, como se observa na **Figura 16**, tanto a percentagem de pessoas cientes do seu diagnóstico aumentou, de 29% para 55%⁷⁴. A este resultado, alia-se também um aumento do número de indivíduos tratados, de 24% para 49%⁷⁴ - bem como um aumento do número de indivíduos cuja PA se encontra controlada, de 8,6% para 30%⁷⁴.

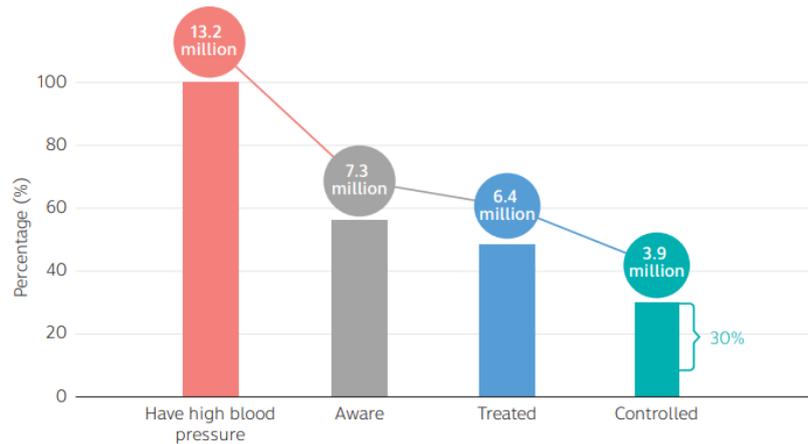


Figura 16: Prevalência, diagnóstico, tratamento e controlo da hipertensão arterial na população tailandesa no ano 2014. Adaptado de World Health Organization (2019) ⁷⁰.

Embora exista muito a fazer ainda, estima-se que, com um aumento da gestão da doença no controlo da PA em doentes hipertensos, poderão evitar-se um grande número de óbitos por DCV. Aplicando o algoritmo do número necessário para tratar (NNT) aos cerca de 9,5 milhões de doentes hipertensos não controlados, estima-se que poderão reduzir-se mais de 14000 mortes, 27000 enfartes e 18000 ataques cardíacos num período de 5 anos⁷⁵. Com isto em mente, o governo tailandês traçou como objetivo uma redução da mortalidade prematura por DCV em 25% até 2025⁷⁰, tendo a HTA um papel de destaque neste objetivo, uma vez que se verificam alguns problemas na gestão da doença, nomeadamente no diagnóstico, adesão à terapêutica e a logística no acesso às unidades de saúde. Num estudo⁷⁶ conduzido em 2007 com pacientes hipertensos (n=1914), mais de metade (n=1000) não atingiram o objetivo na redução da PA, mesmo tendo conhecimento das *guidelines* e recomendações médicas sobre o assunto.

Na **Figura 17** encontra-se o *feedback* dado por parte dos médicos aos 1000 pacientes do estudo:

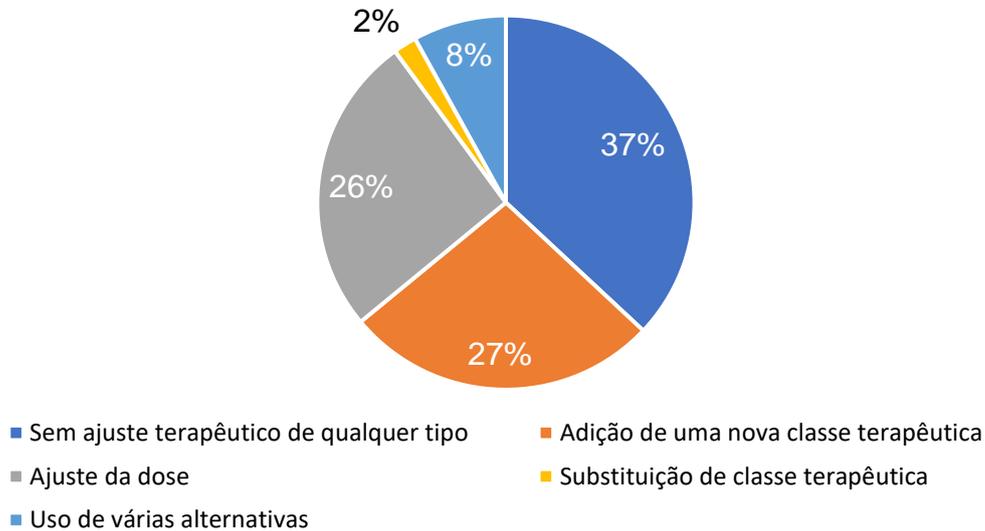


Figura 17: Gestão da terapêutica em doentes com hipertensão arterial não controlada após consulta na população tailandesa. Adaptado de Buranakitjaroen et al ⁷⁶.

Como verificamos anteriormente, cerca de metade dos indivíduos com HTA não tem a sua condição diagnosticada, mesmo com a utilização extensiva dos serviços de saúde, indicando que o processo de diagnóstico pode ter algumas falhas. Uma dessas falhas é o ambiente em que são feitos os diagnósticos, normalmente realizados em locais com muito ruídos, sem privacidade e com equipamentos não calibrados^{58,70}. Também foi verificado que uma grande parte dos indivíduos cuja medição da PA revela valores acima do normal, não regressa para efetuar medições adicionais. Parece também existir uma relutância no diagnóstico de HTA quando as medições se verificam acima dos valores normais em consultório, com receio de que se encontrem perante casos de HTA de Bata Branca, um problema que afeta cerca de 7% da população.

Um estudo revelou que $\frac{1}{4}$ dos indivíduos cujas medições se revelaram acima do valor normal, tinham HTA de Bata Branca, verificando-se também que apresentavam valores para PA sistólica e diastólica abaixo da média⁷⁷.

1.5. Hábitos Tabágicos da População Tailandesa

A Hipertensão Primária, isto é, cerca de 90% dos casos de hipertensão⁷⁸, está relacionada com os hábitos de vida pouco saudáveis, estando entre estes os hábitos tabágicos.

Na população tailandesa este fator pode revelar-se ainda mais importante, uma vez que podem atribuir-se 18% (81 521 mortes)⁷⁹ do total de mortes anuais a causas relacionadas com o consumo de tabaco, nas mais variadas formas. Como podemos observar na **Figura 18**, quase ¼ de todas as mortes atribuídas aos hábitos tabágicos prolongados são por complicações do foro CV⁸⁰, sendo que a faixa etária mais afetada compreende adultos com idades entre os 30 e os 44 anos. Existe uma diminuição progressiva da culpabilidade do tabaco no desencadeamento de eventos CV à medida que avançamos na faixa etária, podendo dever-se ao conjunto de outras comorbilidades existentes.

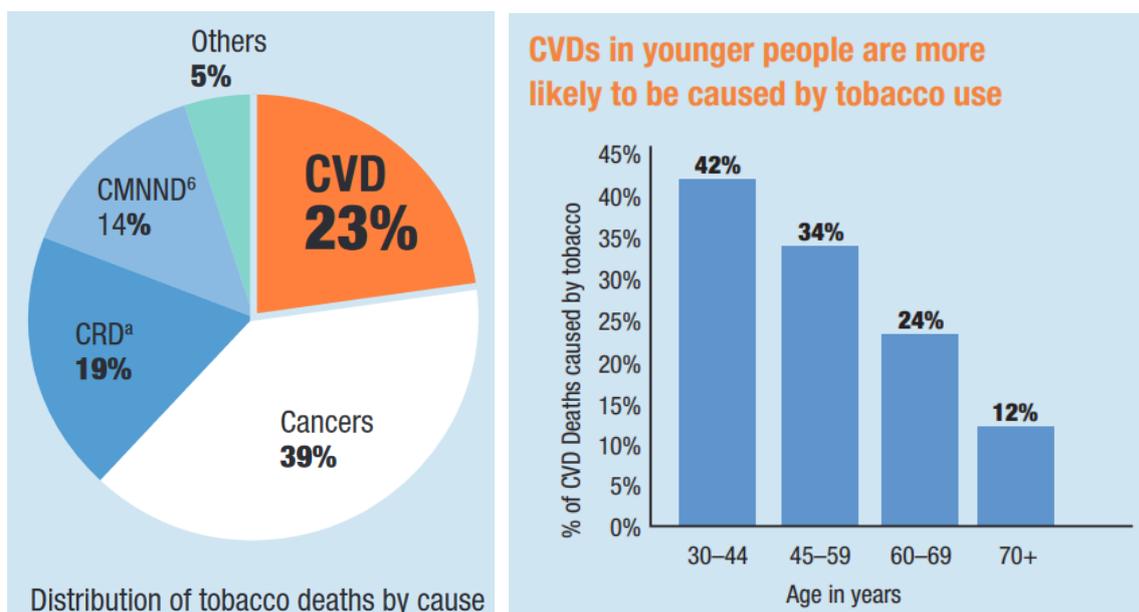


Figura 18: Relação das causas atribuídas à morte pela população com hábitos tabágicos (A) e a distribuição das respetivas mortes causadas por doenças cardiovasculares por idade (B) na população tailandesa. Adaptado de World Health Organization (2019)⁸⁰.

Estes números são justificados através da análise dos hábitos tabágicos da população tailandesa, que em média inicia o consumo diário de tabaco por

volta dos 17,4 anos de idade⁸⁰. Observando um pouco mais as estatísticas, deparamo-nos para o facto de que, para uma idade compreendida entre os 13 e os 15 anos, cerca de 15% dos jovens apresenta hábitos tabágicos⁸¹. É de notar que a disparidade entre o consumo por adolescentes do sexo masculino face às adolescentes do sexo feminino pode prender-se com padrões sociais e/ou tradições enraizadas na cultura tailandesa, tendência que se mantém nas faixas etárias mais avançadas, como se podem observar nos gráficos da **Figura 19**.

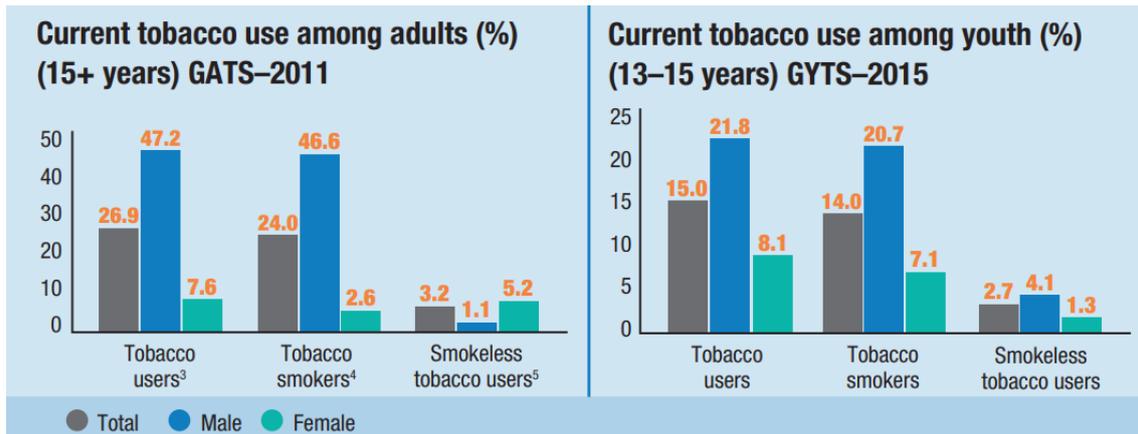


Figura 19: Distribuição de hábitos tabágicos por género em indivíduos com idade superior a 15 anos (A) e hábitos tabágicos na população com a idade compreendida entre os 13 e 15 anos (B) na população tailandesa. Adaptado de World Health Organization (2019)⁸⁰.

Como se observa na **Figura 20**, grande parte da população não tem qualquer tipo de hábitos tabágicos, mas inala de forma involuntária o fumo do tabaco na sua residência, sendo considerados fumadores passivos e acarretando também riscos no desenvolvimento de doenças do foro CV⁸². Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), cerca de 14,6 milhões de tailandeses⁸⁰, fumadores ativos e passivos estão em risco acrescido para o desenvolvimento de complicações CV.

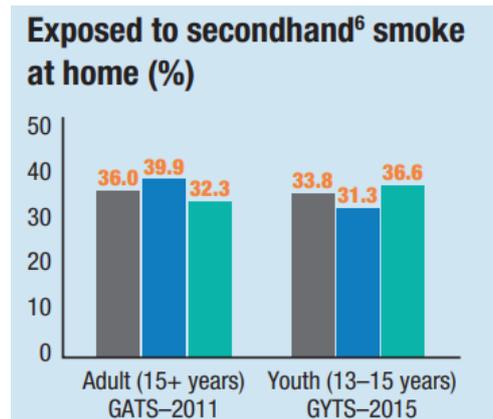


Figura 20: Distribuição etária de fumadores passivos na população tailandesa. Adaptado de World Health Organization (2019)⁸⁰.

1.6. Metabolismo de xenobióticos e a sua regulação

De forma simples, podemos classificar o termo enzima como as moléculas responsáveis pelos processos de catálise nos processos biológicos⁸³. A noção de que as enzimas funcionam como biocatalisadores data de 1833⁸⁴, quando Anselme Payen e Jean-François Persoz, com a descoberta da conversão de amidos em açúcares, mediada pela diástase (alfa-amilase). As enzimas podem ser agrupadas, de acordo com as suas características, em famílias e superfamílias, dependendo da sua sequência, estrutura e ancestrais comuns⁸⁵. Existe, portanto, uma grande diversidade no tipo de enzimas que encontramos nos mais variados organismos. Fatores como localização, tipos celulares e tecidulares podem influenciar também variações que contribuem para a variabilidade enzimática nos organismos⁸⁶.

As enzimas também são responsáveis pelo metabolismo de fármacos (DME) ou xenobióticos (XME), compostos químicos externos ao organismo⁸⁷. Este metabolismo tem um papel central não só na biotransformação, em compostos ativos ou inativos⁸⁶ - como na eliminação destas substâncias do corpo que, de outra forma poderiam surtir um efeito tóxico. Uma vez no corpo e em circulação, estas substâncias podem induzir vias de transdução de sinal que podem resultar num conjunto de respostas celulares, tais como^{86,88}: diferenciação celular, proliferação, homeostasia, apoptose ou até mesmo necrose. De forma a minimizar potenciais efeitos nefastos causados por

xenobióticos, dispomos de diversas DME e XME, incluindo enzimas de fase I e fase II, presentes em abundância em vários tecidos e órgãos⁸⁶. De notar que estes enzimas podem ter expressão constitutiva ou alterada, mediante a sua indução ou inibição resultante da exposição aos xenobióticos⁸⁹.

O fígado é considerado o órgão de excelência do processo metabólico, pela sua abundante concentração de enzimas e pela sua localização anatómica⁹⁰. Podemos considerar as reações metabólicas em três tipos: metabolismo de fase 1, fase 2 e fase 3. Metabolismo de fase 1 é caracterizado por reações de funcionalização, isto é, adicionar ou revelar um grupo funcional⁸⁶. Processos como oxidação, redução e hidrólise têm o objetivo de aumentar a polaridade de uma molécula lipofílica, tornando-a hidrofílica⁸⁷. O ato de polarizar uma molécula facilita o processo de excreção da mesma através da urina. Existem, no entanto, situações específicas onde estes processos convertem uma molécula, anteriormente numa forma inativa, na sua forma ativa – o caso dos profármacos⁹¹.

Responsável por grande parte das reações metabólicas de fase 1 que ocorrem no organismo está a superfamília de enzimas microsossomais designadas por citocromos P450 (CYP)⁹². Este tipo de enzimas encontra-se em abundância no fígado - no retículo endoplasmático liso e nas mitocôndrias dos hepatócitos⁹³ - no trato gastrointestinal, pulmões e rins⁹⁰. A sua classificação desdobra-se num sistema de família e superfamílias, baseando-se na sua sequência de aminoácidos e ancestrais comuns para os agrupar taxonomicamente⁸⁷. Como é possível observar na **Figura 21**, de entre todos os tipos de CYP existentes nos humanos, o CYP3A4 é o mais abundante, seguindo-se o CYP2E1 e o CYP2C9, representando aproximadamente 22,1%, 15,3% e 14,6% de todos os CYP, respetivamente^{87,94}.

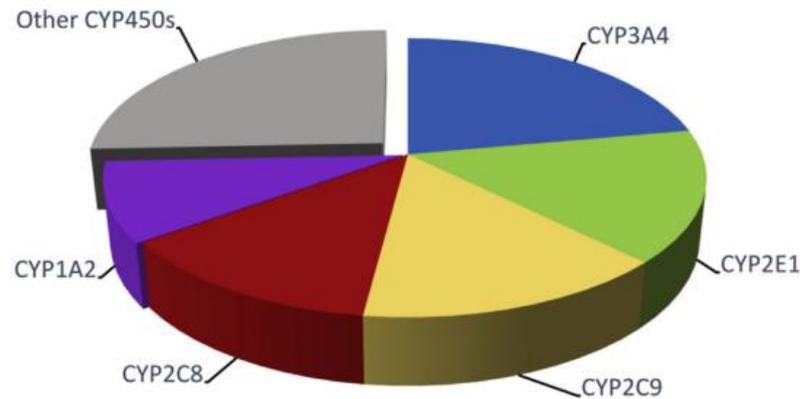


Figura 21: Abundância relativa das principais formas de CYP no genoma humano. Adaptado de Almazroo et al⁸⁷.

A expressão dos CYP é regulada por inúmeros fatores e co-fatores, presentes em vários compartimentos celulares, núcleo ou citoplasma que podem atuar como fatores de transcrição⁹⁵. Estes fatores podem promover ou inibir a expressão de mRNA de genes alvo, aumentando ou diminuindo a síntese proteica, respetivamente. Existem também substâncias exógenas capazes de promover indução ou inibição da expressão genética de enzimas. Um aumento da expressão de um gene que codifica uma enzima resulta no aumento da atividade enzimática dessa mesma enzima, uma vez que existe uma diferença no equilíbrio enzima-substrato que favorece a enzima^{89,95}. Da mesma forma, uma inibição da expressão de um gene que codifica uma enzima resulta na diminuição da atividade enzimática, uma vez que existe uma diferença no equilíbrio enzima-substrato que favorece o substrato.

As reações envolvidas no metabolismo de fase 2 são caracterizadas por reações de conjugação do substrato (que podem ser uma molécula resultante do metabolismo de fase 1) com compostos endógenos hidrofílicos, através de enzimas transferases. Também estas enzimas estão sujeitas a indução ou inibição da sua expressão genética mediada por substâncias endógenas ou exógenas, provocando alterações na sua atividade⁹⁶. Destas reações de conjugação resultam moléculas hidrofílicas e mais propensas para excreção.

A atividade enzimática também pode ser modificada por alterações na estrutura da proteína, devido, nomeadamente, a variação genética. *Os mais frequentes polimorfismos genéticos encontrados no genoma humano são*

*polimorfismos de base ou nucleótido único (SNPs, single nucleotide polymorphisms)*⁹⁷, e consistem na troca de um nucleótido por outro, num determinado local de um gene, por exemplo a troca de uma citosina (C) por uma timina (T). É perfeitamente normal ocorrerem trocas de nucleótidos na enorme extensão de DNA que constitui o genoma, podendo ocorrer em média num rácio de 1:1000 nucleótidos, o que significa que poderão existir aproximadamente 4 a 5 milhões de SNPs no genoma humano⁹⁸. Em termos de expansão, a elevada incidência de determinado polimorfismo numa população pode constituir uma característica distintiva sobre outra população - tal como SNPs com incidências muito baixas constituem polimorfismos isolados e únicos, mas que também carecem de investigação, dada a sua importância clínica^{98,99}.

Um SNP traduz-se na troca de um nucleótido por outro numa determinada sequência, no entanto esta troca nem sempre se traduz numa alteração do aminoácido codificado - mutação silenciosa - uma vez que o código genético é redundante¹⁰⁰, isto é, vários codões codificam para um mesmo aminoácido.

Estimam-se que 50% destas variações ocorrem em extensões de DNA classificadas como não-codificantes¹⁰¹. Cerca de 25% dos SNPs localizam-se em regiões codificantes e resultam em mutações *missense*, ocorrendo uma alteração do aminoácido sintetizado. Os restantes 25% dos SNPs classificam-se como variações silenciosas, não ocorrendo uma alteração do aminoácido sintetizado⁹⁸. Os SNPs podem ainda influenciar a expressão de genes, pela regulação da atividade na região promotora do gene⁹⁹. A estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), que é crucial para a totalidade do processo de expressão genética é também um fator que pode ser influenciado pela presença de SNPs, uma vez que no decorrer do processo de tradução, existem muitas moléculas que podem interferir na atividade do mRNA.

Clinicamente, a importância de SNPs reside no facto de serem forças motrizes na variabilidade de resposta a fármacos e xenobióticos, mas também podem influenciar a propensão no desenvolvimento de doenças comuns como a HTA, obesidade, *diabetes mellitus* (DM) e até mesmo doenças do foro psiquiátrico^{98,102}.

Pretendeu-se avaliar com o trabalho experimental desenvolvido, dois SNPs que poderão estar relacionados com a propensão para o desenvolvimento de HTA primária por parte da população tailandesa, de forma a atribuírem-se fatores mais claros à etiologia da doença. Também visa entender de que forma os hábitos tabágicos e a poluição ambiental podem exacerbar esta relação entre os vários fatores que se pretendem estudar.

O oxigénio é um elemento essencial para a homeostasia do organismo, tem um papel de grande importância tanto para o metabolismo como para a correta fisiologia do corpo, uma vez que é necessário para a produção de energia sob forma de ATP, mas também como cofator/substrato de muitas reações enzimáticas¹⁰³. Por ter tamanha importância no organismo, é expectável a existência de mecanismos de regulação da expressão genética em função dos níveis de oxigénio, que desencadeiam reações de adaptação a nível celular. O factor induzido em hipoxia (HIF, *hypoxia inducible factor*) funciona como um regulador que é ativado quando a concentração celular e tecidual de oxigénio diminui, promovendo a adaptação celular¹⁰⁴.

O HIF pertence a uma família de fatores de transcrição heterodiméricos, e consiste numa unidade alfa - HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α - e uma unidade beta - HIF-1 β ou ARNT (*Ah receptor nuclear translocator*)¹⁰⁵. O HIF tem, entre outras funções, a da regulação da resposta adaptativa da célula à hipoxia^{103,106} - condição que tem um papel importante no processo patológico da hipertensão.

No que toca à oximetria podemos definir quatro estados, por ordem crescente de concentração de oxigénio: Anóxia, Hipóxia, Normóxia e Hiperóxia¹⁰⁷.

Dependendo da oximetria, o HIF vai comportar-se de maneira diferente, como se pode observar na **Figura 22**. Em normóxia, na presença de oxigénio, a unidade alfa liga-se às proteínas de von Hippel-Lindau (VHL), ativando o sistema da ubiquitina ligase, marcando o HIF com ubiquitina, o que o conduz posteriormente a sofrer degradação proteossomal¹⁰⁸. A hidroxilação dos resíduos de prolina no HIF é crucial para que a VHL se ligue e é dependente de várias enzimas: dioxigenases α -cetoglutarato-dependentes, prolil-hidroxilases

(PHD) e a *factor inhibiting HIF* (FIH), uma asparaginil-hidroxilase, cuja função é a regulação da atividade transcricional do HIF¹⁰⁹.

Quando a célula se encontra em hipóxia, o processo de hidroxilação e degradação proteossomal é inibido. Ocorrendo a estabilização da subunidade alfa (HIF-1 α), esta vai ser transportada para o núcleo da célula. Uma vez no núcleo, vai dimerizar com a subunidade beta (HIF-1 β), promovendo a transcrição de genes alvo¹⁰⁹.

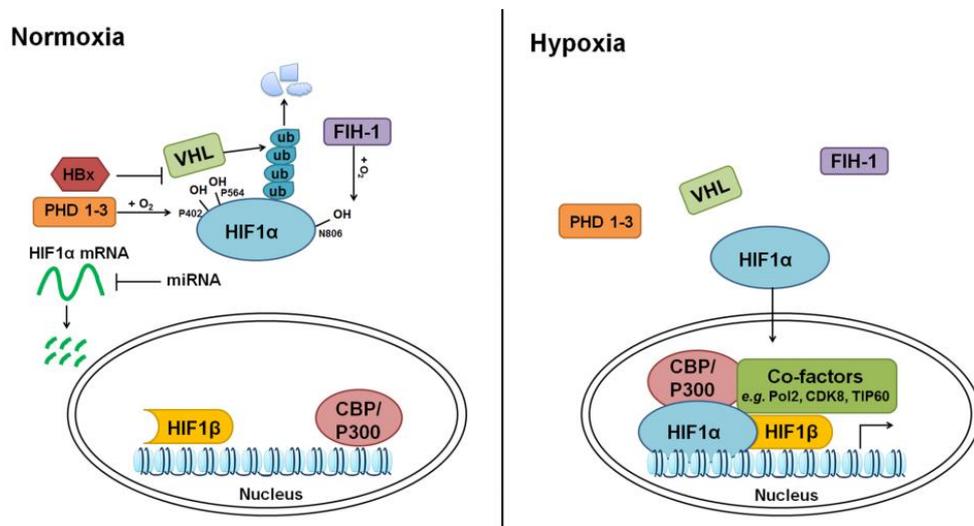


Figura 22: Resumo esquemático do funcionamento da via regulatória do HIF em condições de normóxia (A) e em condições de hipóxia (B). HIF1 α – Hypoxia inducible factor 1 alfa; HIF1 β – Hypoxia inducible factor 1 beta; VHL – Proteínas de von Hippel-Lindau; ub – Ubiquitina; PHD – prolin-hidroxilases; FIH – Fator inibidor do HIF. Adaptado de Chen et al¹⁰⁸.

Os genes alvo da regulação pelo HIF codificam proteínas envolvidas em inúmeras funções, tais como controlo da homeostasia celular do oxigênio, controlo do consumo de oxigênio e de glicose, produção de eritrócitos – eritropoiese -, promoção da angiogénese e controlo da atividade metabólica mitocondrial¹⁰⁴.

O HIF-1 β está também relacionado com a via de sinalização do recetor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR, *aryl hydrocarbon receptor*)^{110,111}. O AHR é um fator de transcrição dependente de ligandos, cuja função é regular a indução de XMEs por compostos químicos, como por exemplo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) que, quando se encontram no organismo, são

metabolizados por esses XMEs, sendo ativados e desencadeando o seu potencial tóxico e carcinogénico^{112,113}. O AHR permanece num estado inativo no citoplasma da célula, onde um conjunto de proteínas (Hsp90, XAP2 e p23) asseguram a correta conformação e estabilização do AHR, prevenindo potenciais translocações para o núcleo¹¹⁴. Quando um ligando estabelece uma ligação com o AHR, a estrutura do complexo “AHR-proteínas reguladoras” sofre mudanças conformacionais e é ativado, ocorrendo a translocação do complexo para o núcleo. Uma vez no núcleo, ocorre a dimerização com o ARNT, como é possível observar na Figura 27^{110,114}.

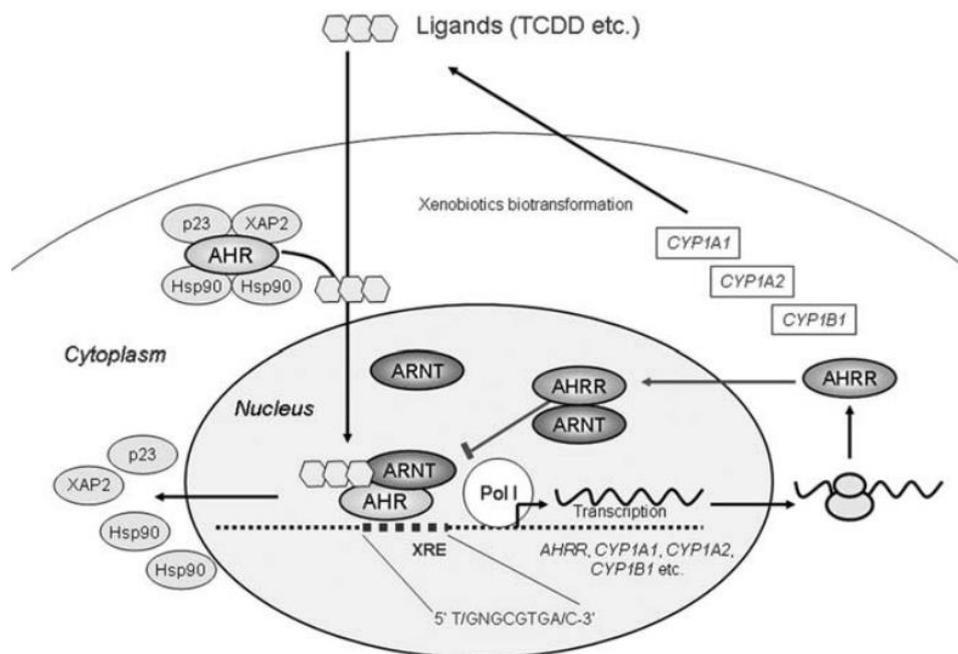


Figura 23: Resumo esquemático do funcionamento da via regulatória do AHR. AHR – Recetor de hidrocarbonetos arílicos; p23, XAP2 e Hsp90 – proteínas estabilizadoras; ARNT – Translocador nuclear do AHR; AHRR – Regulador do AHR; Pol I – DNA Polimerase; XRE – Elemento de resposta a xenobióticos. Adaptado de Polonikov et al¹¹⁰.

Posteriormente dá-se início à indução da transcrição de genes alvo codificantes de XMEs, pela ligação do complexo HIF-1 α /HIF-1 β /ligando a sequências específicas na região reguladora a montante do gene alvo¹¹⁵. Estas sequências designam-se por elementos de resposta a xenobióticos (XREs, xenobiotic response elements ou DREs, dioxin response elements). O reconhecimento do local da região reguladora é realizado por ambas as partes do dímero, através de uma sequência de nucleótidos específica¹¹⁶: 5'-TTGCGTG-3'. Na Figura 24 é possível observar que o aminoácido R39 do AHR

reconhece a primeira metade da sequência e estabelece três ligações por pontes de hidrogénio com a guanina (G) e com a guanina (G) complementar à citosina (C) na cadeia de DNA com sentido 5'→3'. A segunda metade da sequência, 5'-GTG-3', é reconhecida pelo ARNT, onde ambos os aminoácidos R91 e H94 interagem com um grupo fosfato do DNA e com a base azotada, respetivamente¹¹⁷.

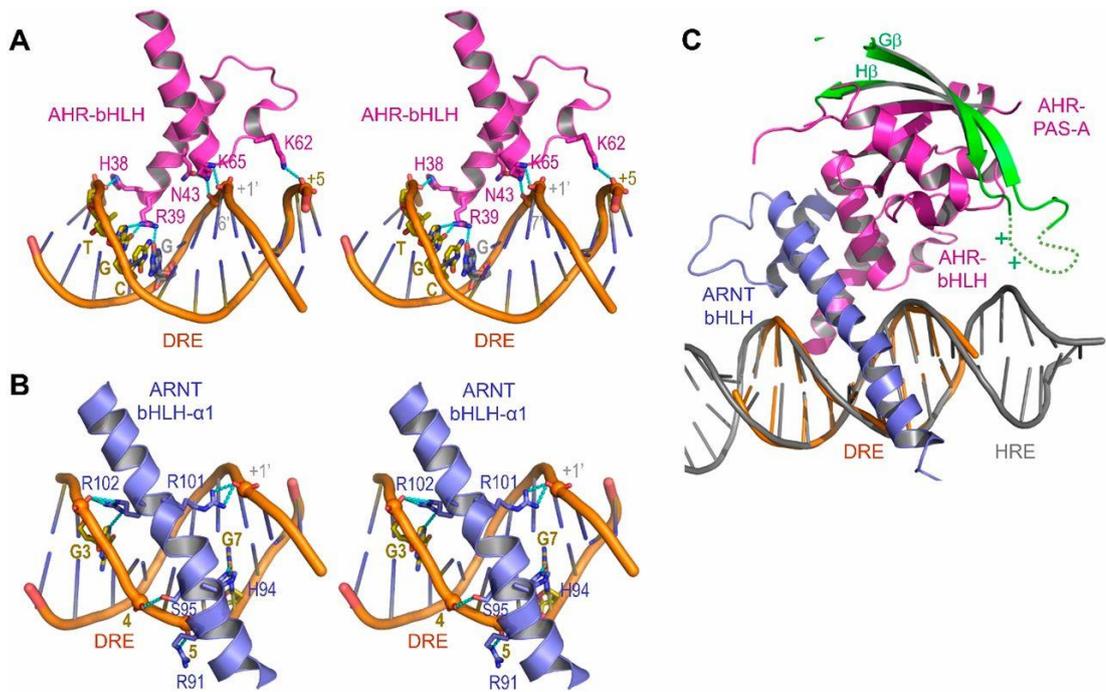


Figura 24: Representação das interações das estruturas de AHR (A) e do ARNT (B) com a região promotora. A interação do complexo ARNT - AHR com o DNA observa-se em (C). DRE – Elemento de resposta a dioxinas. Adaptado de Watanabe et al¹¹⁸.

As restantes estruturas conferem estabilidade ao dímero e asseguram a correta orientação para que as zonas de reconhecimento se encontrem corretamente posicionadas¹⁰⁹. A orientação é assegurada por grupos polares ou carregados positivamente, que interagem com grupos fosfatos carregados negativamente, criando corredores estreitos que facilitam a interação com a zona promotora. Na **Figura 25**, encontram-se resumidamente todas as interações do dímero ARNT - AHR com o DNA.

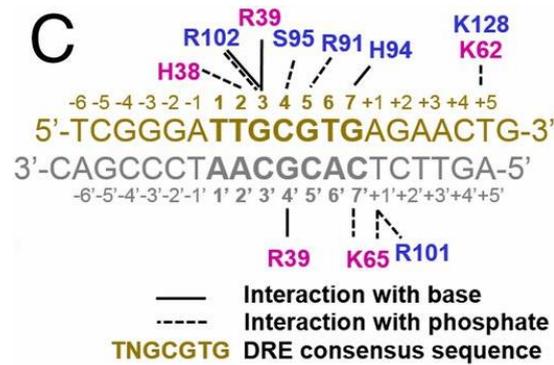


Figura 25: Resumo das interações entre o ARNT/AHR e o DNA, na região reguladora. Adaptado de Watanabe et al¹¹⁹.

Os genes alvo de regulação pelo AHR codificam para XMEs, tais como: CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1^{96,115}. Este processo, para além de ser regulado pelo complexo de proteínas que estabiliza o AHR, é também regulado pelo *aryl hydrocarbon receptor regulator* (AHRR)¹²⁰. O AHRR é estruturalmente semelhante ao AHR e ao ARNT, pelo que pode inibir competitivamente o processo de dimerização, impedindo que a regulação dos genes alvo aconteça¹¹⁰. O complexo ARNT-AHRR é capaz de se ligar aos XREs presentes no promotor dos genes XMEs, contudo não promove a sua transcrição.

Estudos farmacogenómicos já descritos na área da hipertensão, sugerem que SNPs específicos na via reguladora do AHR podem ter influência na propensão para o desenvolvimento de doenças do foro CV, sejam SNPs no próprio gene do AHR, no AHRR, nas desidrogenases ou no ARNT^{121,122}.

No presente trabalho foi analisado um polimorfismo no ARNT, nomeadamente o C567G (rs 2228099), uma vez que pode ter relevância na etiologia da hipertensão e não foi estudado extensivamente quanto à sua relevância neste assunto. Este polimorfismo caracteriza-se pela troca de uma citosina (C) por uma guanina (G) na posição 567, exão 7, codão 189, do gene ARNT, localizado no cromossoma 1¹²³.

Este polimorfismo consiste numa variação silenciosa Val-Val (C > G) uma vez que, mesmo com a troca de nucleótidos, o aminoácido incorporado permanece a valina, não ocorrendo alteração estrutural da proteína final. Foi, no entanto, observado um aumento da expressão¹¹⁰ de mRNA do ARNT em

indivíduos com o genótipo heterozigota para a variante (C/G) e em indivíduos homozigotas para a variante (G/G), como demonstra a **Figura 26**.

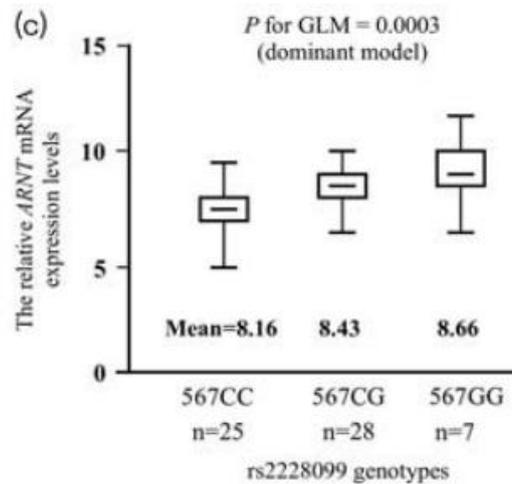


Figura 26: Comparação da expressão de RNA mensageiro dos diferentes genótipos do ARNT C567G. Adaptado de Polonikov et al ¹¹⁰.

Um aumento da expressão do mRNA do ARNT resultará num aumento da biodisponibilidade do mesmo na célula, expectando-se uma exacerbação de todos os processos por ele regulados. Esta exacerbação resultará numa ativação persistente e crónica do complexo ARNT-AHR, resultando na indução de várias XMEs, como o CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1, refletindo-se num aumento da atividade enzimática das mesmas^{96,124}.

Um estudo¹¹⁰ realizado em 2160 indivíduos, com e sem HTA, de nacionalidade russa aponta que o SNP do ARNT C567G apresentou, relativamente à hipertensão, um *odds ratio* (OR) de 1,21 para indivíduos que apresentavam um genótipo homozigota para a variante (GG), num intervalo de confiança de 95% ($P = 0,043$). O OR é uma razão que indica a relação entre dois fatores, isto é, a razão entre a probabilidade de um evento ocorrer num determinado grupo em relação a outro grupo¹²⁵. Neste caso avalia-se o risco de um indivíduo vir a desenvolver HTA quando apresenta o SNP C567G do ARNT, verificando-se que este influencia a predisposição para a doença¹¹⁰. Um valor de OR superior a 1,0 representa um risco acrescido para a amostra, enquanto um valor de OR inferior a 1,0 representa que a variável se apresenta como um fator protetor^{125,126}.

No presente trabalho foi também analisado um SNP no citocromo P450 1A2 (CYP1A2) na população tailandesa. Em termos taxonómicos, o gene *CYP1A2* encontra-se localizado no cromossoma 15 e caracteriza-se por pertencer à família 1, subfamília A, membro 2 dos citocromos P450¹²⁷. O gene que codifica este CYP tem cerca de 7,8kb, contemplando sete exões e seis intrões, resultando numa proteína com cerca de 515 aminoácidos com um peso molecular de 58,294 Daltons (Da). Mecanicamente, o CYP1A2 promove a catálise da reação de hidroxilação em ligações carbono-hidrogénio usando oxigénio molecular (O_2)¹²⁸. Ocorre a inserção de um átomo de oxigénio no substrato e em simultâneo ocorre a redução para uma molécula de água (H_2O) do outro átomo de oxigénio, através da doação de dois eletrões providenciados pela forma reduzida do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). Desta reação resulta um substrato hidroxilado, obtendo-se água (H_2O) e H^+ como subprodutos da reação^{128,129}.

Como é possível observar na **Figura 27**, o CYP1A2 possui estruturas de suporte bem como um núcleo catalítico, onde se posiciona o grupo heme. Podemos considerar três estruturas como o centro catalítico da enzima: a Volta BC, a Hélice I e a Hélice F¹¹⁸.

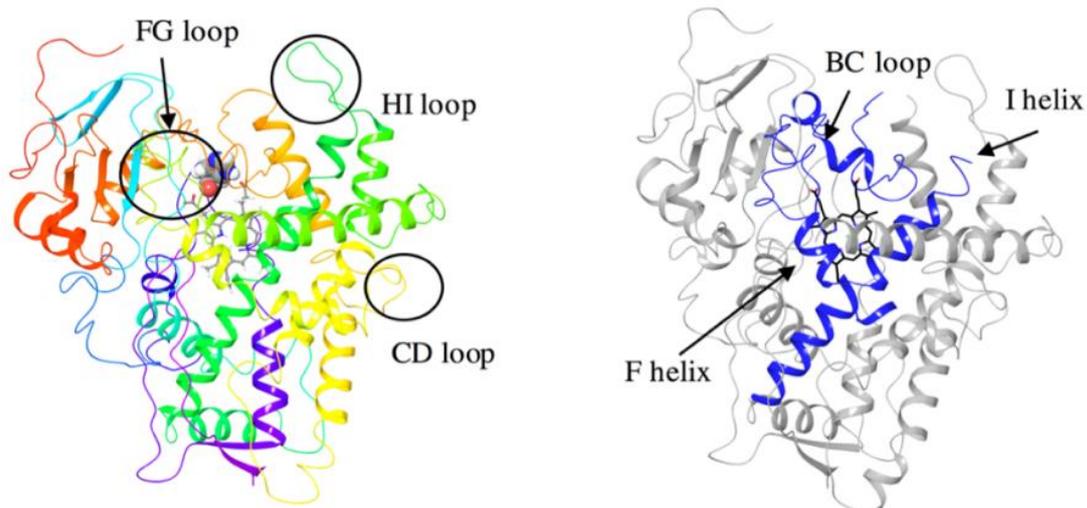


Figura 27: Representação gráfica da estrutura molecular do CYP1A2. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁹.

A Volta BC forma, juntamente com a Volta FG e a Hélice G, um canal cuja função é permitir a entrada do substrato no centro catalítico^{118,119}. Na **Figura 28**

encontram-se representados os resíduos de Leucina (Leu) - Leu116 e Leu261 - , Ácido Aspártico (Asp) – Asp119 – e Asparagina (Asn) – Asn257 localizados no referido canal. Estes resíduos de aminoácidos são capazes de estabelecer interações hidrofóbicas, tendo influência na abertura e fecho do canal e consequentemente na entrada de substratos¹¹⁹.

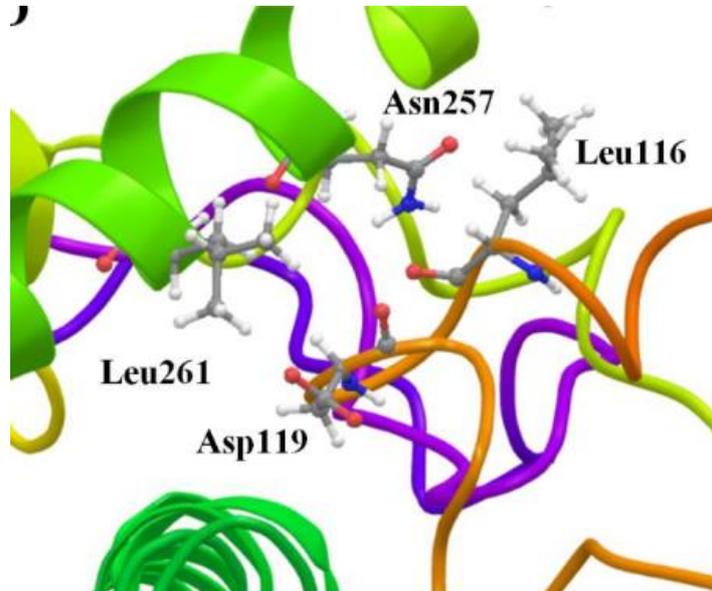


Figura 28: Conformação dos resíduos de aminoácidos que constituem o canal de entrada do substrato. Adaptado de Watanabe et al¹¹⁹.

A Hélice F mostrou ter a função de reconhecimento do substrato. Este reconhecimento deve-se à presença de um resíduo de Fenilalanina (Phe) – Phe226. A Hélice I contém um resíduo de Treonina (Thr) – Thr 321 – localizado em regiões conservadas do CYP, o que demonstra a sua importância no funcionamento da enzima. Este resíduo parece ser crucial na interação com o substrato, no processo de transferência de elétrons da reação catalítica¹¹⁹.

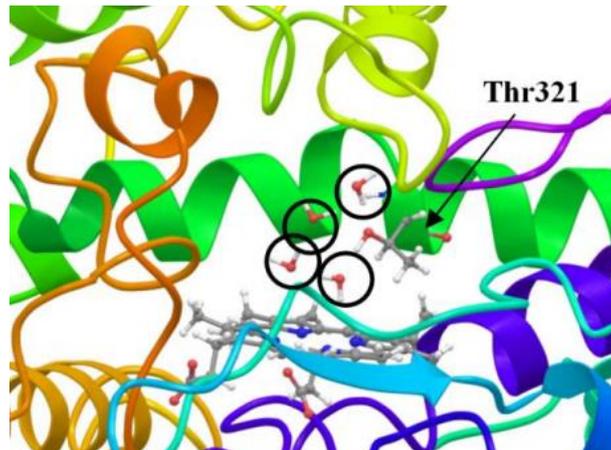


Figura 29: Pormenor dos resíduos de treonina presentes na Hélice I. Adaptado de Watanabe et al ¹¹⁹.

Observando a arquitetura conformacional do CYP1A2, é constatável que os seus substratos sejam moléculas estreitas e planares, com anéis poliaromáticos que consigam encaixar-se na estrutura catalítica estreita e planar do centro ativo do CYP^{124,130}.

Esta importante monooxigenase perfaz cerca de 13 a 15% do total de CYPs encontrado no organismo e está envolvido na biotransformação de vários compostos endógenos¹³⁰ - melatonina, estrogénios, estradiol, etc. – e também de compostos exógenos ou fármacos¹³¹ – clozapina, duloxetine, propranolol, etc. Em termos de distribuição, o CYP1A2 é expresso quase exclusivamente no fígado¹³², no entanto foi verificada alguma expressão do CYP no pulmão e no intestino¹³³.

Neste trabalho, o estudo do CYP1A2 teve como foco a análise da prevalência do polimorfismo no CYP1A2 C-163A (rs762551) na população tailandesa. Este polimorfismo caracteriza-se pela troca de uma citosina (C) por uma adenina (A) e localiza-se na região promotora do gene que codifica o CYP1A2, pelo que não se traduz numa alteração da estrutura proteica formada¹³⁴. No entanto, em indivíduos que apresentam alelos variantes (A) verificou-se um aumento da indução da enzima, constatando-se acréscimo da atividade enzimática do CYP1A2 em 1,6x como consequência^{110,135}. Paralelamente, em indivíduos não fumadores, mas portadores de alelos mutantes (A), verificou-se um aumento da atividade enzimática em 1,4x.¹³⁶

Indivíduos portadores do genótipo (AA), homocigotas para a variante são, portanto, considerados metabolizadores rápidos dos substratos do CYP1A2, enquanto portadores do genótipo (CC), homocigotas para a referência são considerados metabolizadores lentos dos mesmos substratos¹³⁷. Podemos então traçar uma relação entre a propensão do desenvolvimento de HTA e o genótipo do CYP1A2 que um individuo apresenta: alelos (AA) são considerados um fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de doenças, pelo aumento da sua atividade enzimática, que se traduz num maior número de substratos ativos. Por outro lado, alelos (CC) são considerados um fator protetor para o desenvolvimento de HTA, uma vez que se verifica uma diminuição da atividade enzimática, traduzindo-se num menor número de substratos na forma ativa¹¹⁰.

Além do metabolismo dos compostos supracitados, o CYP1A2 participa na bioativação de outros compostos exógenos. Um tipo de compostos mostra-se particularmente interessante para o assunto estudado neste trabalho: os PAHs. De forma geral, PAHs apresentam-se como compostos lipofílicos constituídos por dois a oito anéis de benzeno resultantes da combustão incompleta de matéria orgânica¹³⁸. Embora existam naturalmente no meio ambiente, pela combustão de madeira ou pela atividade vulcânica, são maioritariamente um subproduto de várias atividades de origem antropogénica¹³⁹.

A síntese destes compostos está sucintamente esquematizada na **Figura 30** e pode ser realizada a partir de hidrocarbonetos saturados em condições deficientes de oxigénio¹⁴⁰. Mecanicamente os dois principais processos de síntese que explicam a formação de PAHs são a pirossíntese e pirólise. Quando a reação atinge os 500 °C, ocorre a cisão da ligação carbono-hidrogénio e carbono-carbono, formando radicais livres^{140,141}. Estes radicais combinam-se com acetileno, condensando a estrutura aromática características dos PAHs, estrutura que também confere resistência a reações de lise por calor à molécula.

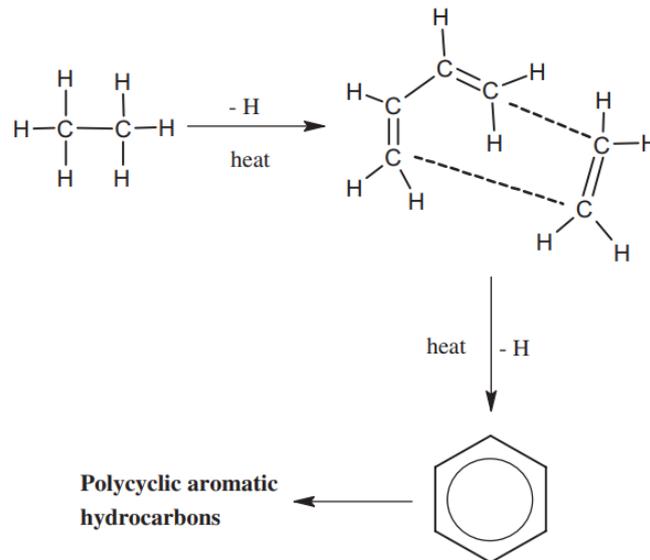


Figura 30: Síntese de PAHs por processos de pirossíntese e pirólise a partir de hidrocarbonetos saturados. Adaptado de Ravindra et al ¹⁴⁰.

Uma vez que apresentam lipofilicidade, têm a capacidade de atravessar facilmente a membrana celular por um processo de difusão passiva¹⁴². Após metabolismo da forma inativa dos PAHs, estes compostos encontram-se na sua forma ativa e exercem os seus efeitos, no **Quadro 6** resumidos¹⁴³. O metabolismo destes compostos resulta em compostos reativos fenólicos, catecóis e quinonas.

Aumento dos processos de coagulação sanguínea
Aumento do risco de trombose
Aumento da pressão arterial
Disfunção endotelial e da homeostasia do cálcio
Inflamação local e sistémica
Desregulação do desenvolvimento cardiovascular
Aumento do desenvolvimento de células espumosas

Quadro 6: Resumo dos efeitos da exposição PAHs em processos relacionados com doenças cardiovasculares. Adaptado de Holme et al ¹⁴³.

A exposição a PAHs pode desencadear processos inflamatórios nas células do endotélio ou no pulmão, causadas pela indução e libertação de citocinas¹⁴⁴. Como foi mencionado anteriormente, o processo inflamatório é uma condicionante muito negativa na formação da placa aterosclerótica, pela

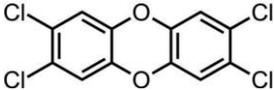
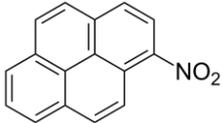
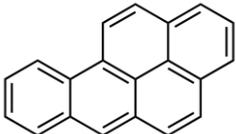
aceleração do processo como um todo⁴⁸. Outra forma em que os PAHs estão envolvidos diretamente no agravamento da formação da placa aterosclerótica é através da formação de espécies reativas de oxigénio¹⁴³. Ocorrem reações de redução nas LDL e, como consequência, cria-se um ambiente propício à formação de células espumosas e à deterioração do endotélio^{43,46}. Estudos apontam que inalação de partículas de fumo proveniente de combustão de madeira está associada a um aumento da aderência de monócitos às células endoteliais¹⁴⁵, com um aumento da migração para o subendotélio de células responsáveis pelos processos inflamatórios.

Também foram verificadas alterações anatómicas e fisiológicas ao nível do coração, observando-se disfunção cardíaca e dilatação ventricular esquerda¹⁴⁶, caracterizada por dilatação do miocárdio e consequente estreitamento do mesmo. Esta patologia culmina com o aumento do volume do ventrículo e, pelo aumento do espaço ventricular, o músculo cardíaco não consegue realizar uma correta contração, verificando-se um comprometimento da distribuição de sangue pelo corpo¹⁴⁷.

A homeostasia do cálcio na sua forma iónica, importante regulador da correta permeabilidade das células endoteliais e do processo aterosclerótico⁴², também é afetada pela exposição a PAHs. Verificou-se que, após contacto e inalação de PAHs, ocorria um aumento da concentração de Ca^{2+} no interior das células endoteliais face ao normal^{148,149}. Este aumento de concentração parece estar envolvido com a inibição dos recetores β_2 -adrenérgicos, impossibilitando o efluxo de cálcio. Foi também verificado uma dessensibilização dos recetores β_2 -adrenérgicos para a epinefrina e, em contraste, uma grande afinidade para PAHs ($K_d = 10 \text{ nM}$)¹⁵⁰.

Os PAHs podem surtir efeito direto na PA de um indivíduo, através da interação com o óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS). Verificou-se uma indução da HTA mediada pela inativação das funções do eNOS, importante regulador do tónus vascular e da PA^{151,152}. Inibindo a atividade do eNOS, ocorre a supressão da vasodilatação através do ciclo do NO, resultando num aumento da PA e do tónus vascular⁴⁸. Estudos revelaram ainda que PAHs podem ter influência na alteração dos padrões circadianos da PA e que pode induzir estados isquémicos.

No **Tabela 1** encontram-se resumidos alguns dos efeitos mais relevantes surgidos no organismo pela exposição a PAHs e as suas estruturas moleculares.

Nome do Composto	Estrutura Molecular	Efeitos	Referências
TCDD		Cardiomiopatias; Lesões Cardíacas; Aterosclerose; Aumento do risco CV	153–157
1-nitropireno		Aumento da [Ca ²⁺] no endotélio; Indução de citocinas pró-inflamatórias	158,159
Benzo(a)pireno		Indução de citocinas pró-inflamatórias; Aumento do risco de ataque isquémico; Indução do AhR; Promoção da aterosclerose; Aumento da acumulação lipídica nos macrófagos; Aumento do influxo de monócitos para o endotélio;	159,160,169,170,161–168

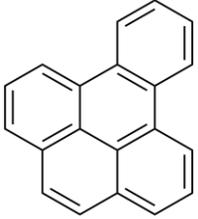
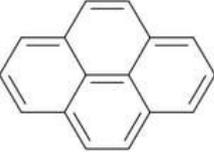
		Aumento da [Ca ²⁺] nas células do endotélio	
3-hidroxibenzo(a)pireno		Aumento da PA diastólica	171,172
3-hidroxibenzo(a)antraceno		Aumento da PA diastólica	171,173
Benzo(e)pireno		Aumento da [Ca ²⁺] nas células do endotélio	167,168,174
Pireno		Aumento da [Ca ²⁺] nas células do endotélio	168,175,176

Tabela 1: Sumário dos efeitos no organismo resultantes da exposição a PAHs específicos.

Para além da exposição a PAHs provenientes de hábitos tabágicos passivos e ativos, existem também exposição quotidiana e rotineira através da inalação de partículas aéreas provenientes de várias atividades de origem antropogénica^{139,140}. A deterioração da qualidade do ar na Tailândia tem mostrado ser um problema recorrente e difícil de combater, uma vez que é uma temática cuja discussão se tem arrastado há vários anos, com vários estudos publicados^{74,177}. Muito deste decréscimo da qualidade do ar prende-se com os efeitos de fogos florestais, combustão de biomassa e de outros resíduos provenientes da atividade do setor agropecuário¹⁷⁸. Para além disso, emissões de PAHs provenientes de tráfego de veículos, atividade industrial e aquecimento de domicílios são também parte do problema.

Os níveis de poluição que se verificam no território tailandês seguem padrões previsíveis, acentuando a presença da sazonalidade da mesma. Em Bangkok, capital da Tailândia, registaram-se os níveis mais altos de poluição

entre novembro e fevereiro, verificando-se esta repetição ano após ano¹⁷⁹. O método mais comum para avaliar a qualidade do ar é o Índice de Qualidade do Ar (AQI)¹⁸⁰. Este índice é baseado na medição da emissão de partículas inaláveis com diâmetro inferior a 2,5 μm ($\text{PM}_{2,5}$) e 10 μm e (PM_{10}), ozono, dióxido de nitrogénio, dióxido de enxofre e monóxido de carbono¹⁸¹. O AQI está dividido em seis escalões, com grau crescente de severidade no que concerne à qualidade do ar da região, esta escala compreende um intervalo de valores entre 0 e 500.

É possível observar a olho nu os efeitos da poluição no ambiente tailandês, onde pequenas partículas suspensas no ar formam uma névoa que sobrevoa algumas das cidades mais poluídas¹⁷⁹. Devemos, no entanto, entender que nem todas as fontes destas partículas têm a mesma importância em todas as regiões do país – nas cidades, a combustão de combustíveis fósseis por parte de veículos e da indústria tem um papel muito maior na contribuição da poluição¹⁷⁷, do que em zonas mais rurais, onde as atividades do setor agrário têm uma quota-parte maior do problema¹⁷⁸. Na **Figura 31** é possível observar os níveis de $\text{PM}_{2,5}$ registados na zona de Bangkok entre julho de 2019 e junho de 2020.

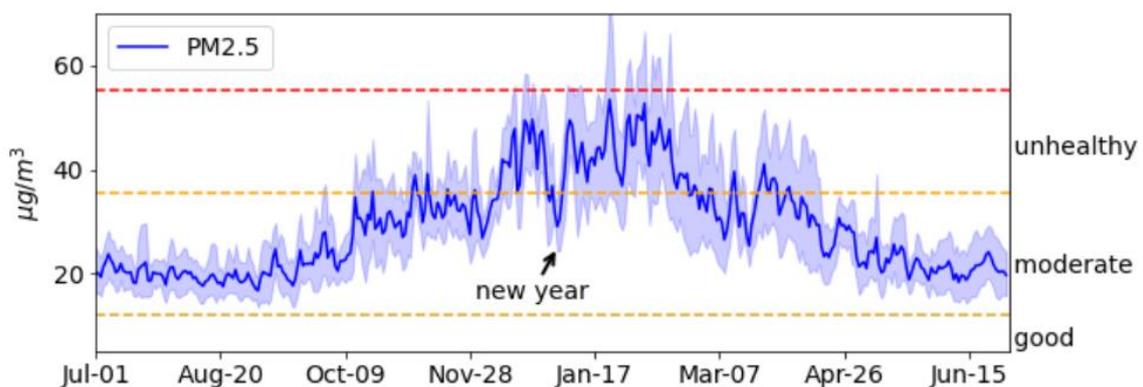


Figura 31: Registo dos níveis de $\text{PM}_{2,5}$ na região de Bangkok entre julho de 2019 e junho de 2020. Adaptado de Fotiou et al ¹⁷⁹.

Os níveis de $\text{PM}_{2,5}$ na região de Bangkok nunca se encontram em níveis considerados ótimos¹⁷⁹, estando no mínimo em níveis moderados acima do recomendado, sendo que o valor da concentração média anual de $\text{PM}_{2,5}$ registou os 22.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ¹⁸². Verifica-se ainda que, entre novembro e março os valores se encontram numa situação crítica. Este gráfico é, portanto, um indicativo de que o fator ambiental na propensão para o desenvolvimento da HTA na população tailandesa tem uma importância acrescida, uma vez que os tailandeses parecem

estar em contacto com estes compostos no seu dia a dia, podendo surtir todos os efeitos acima citados.

No panorama geral do país, a Tailândia encontra-se entre os 106 países mais poluídos no ano de 2020, segundo a escala AQI, ocupando a 34ª posição, com um índice médio nacional de 70, correspondendo a um risco moderado¹⁸². Analisando os extremos, verificou-se que a cidade mais poluída segundo a escala de AQI é a cidade de *Mueang Lamphun*, com valor de AQI de 174, correspondendo a uma concentração de PM_{2,5} de 101 µg/m³. A cidade menos poluída segundo a escala de AQI é a cidade de *Satun*, com valor de AQI de 33, correspondendo a uma concentração de PM_{2,5} de 8 µg/m³.

2. Métodos Laboratoriais

2.1. PCR-RFLP

De modo a caracterizar a frequência de polimorfismos nos genes ARNT e CYP1A2 na população estudada, foram desenhados e otimizados métodos de genotipagem para cada um dos *single nucleotide polymorphism* (SNPs) relevantes para o estudo em causa. Foi usada a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste na junção de várias técnicas: PCR, análise de restrição e eletroforese¹⁸³.

PCR, *Polymerase Chain Reaction*, é uma técnica sobejamente utilizada em biologia molecular com a finalidade de amplificar várias cópias de uma região específica do DNA, *in vitro*¹⁸⁴. O DNA amplificado por PCR pode ter diversas finalidades, entre elas a sua sequenciação, visualização por eletroforese em gel, ou clonagem num plasmídeo.

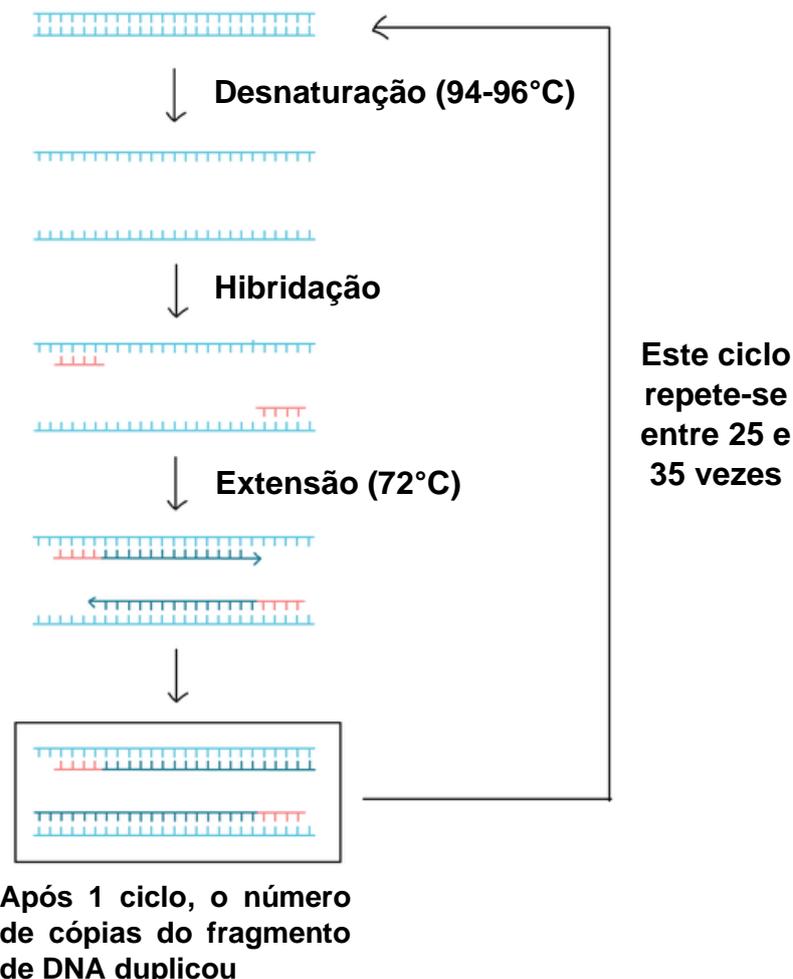
Na **Figura 32** encontram-se representadas as três etapas básicas no processo do PCR:

Desnaturação: com a finalidade de separar as cadeias complementares do DNA, aquecemos a solução até uma temperatura de 94-96 °C, obtendo assim duas cadeias de ssDNA (*single strand DNA*) que servirão de molde para as etapas seguintes¹⁸⁵. Esta separação dá-se através da quebra das ligações por ponte de hidrogénio entre as bases complementares do DNA¹⁸⁶. A desnaturação inicial tende a ser mais morosa do as desnaturações que ocorrem nos ciclos seguintes.

Hibridação: etapa que especifica qual a região do DNA que se pretende amplificar. Esta especificidade é proporcionada pelos fragmentos iniciadores (*primers*) utilizados na reação, que são complementares a zonas específicas da região do DNA que se pretende amplificar¹⁸⁷. Ao diminuir a temperatura da reação, é favorecida a formação de pontes de hidrogénio entre os primers e as zonas complementares presentes no DNA molde. Normalmente são adicionados *primers* em grande concentração, de forma a aumentar a probabilidade de

ligação à zona complementar pretendida para a amplificação, ao invés das sequências ssDNA voltarem a hibridar uma com a outra¹⁸⁸. A temperatura de *annealing* (T_m) é dependente da sequência e do tamanho dos *primers* utilizados.

Extensão: nesta etapa, a temperatura da reação é novamente elevada, de forma a estender ou copiar as regiões de dsDNA formadas pelo ssDNA da amostra juntamente com os *primers*¹⁸⁹. Para isso é utilizada uma DNA polimerase que, quando se liga na região 3' dos *primers*, move-se pelo DNA no sentido 5' → 3' adicionando os nucleótidos complementares à cadeia de DNA da amostra¹⁹⁰. Esta etapa pode variar quanto à celeridade do processo uma vez que, dependendo do tamanho do fragmento que se pretende amplificar, a Taq polimerase pode demorar mais tempo para copiar o DNA. Esta etapa é normalmente realizada a uma temperatura padrão de 72 °C, que corresponde à temperatura ótima de atividade da Taq polimerase¹⁹¹.



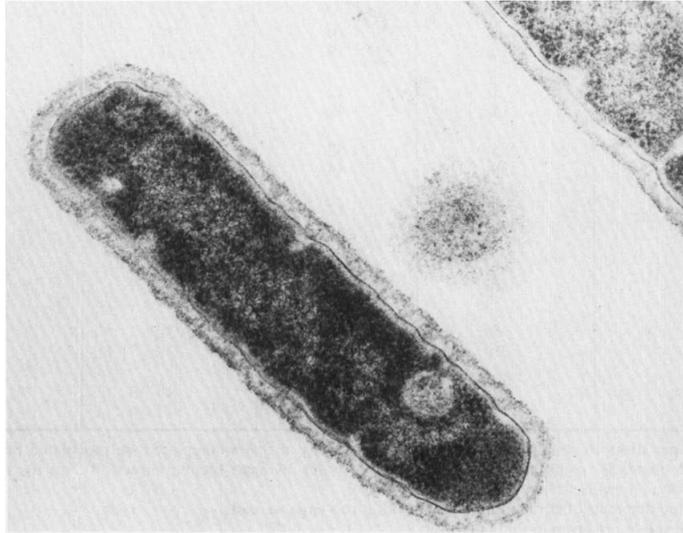


Figura 34: *Thermus aquaticus*. Adaptado de Jackson et al¹⁹³.

Anteriormente, na fase de hibridação, foi mencionado que a especificidade da zona que se pretende amplificar deriva dos *primers* utilizados¹⁸⁸. Os *primers* nada mais são do que sequências curtas de ssDNA com cerca de 20 nucleótidos de comprimento, podendo variar. São usados 2 *primers* – *forward* e *reverse* - em cada PCR, especificamente desenhados para flanquearem a região de interesse que se pretende amplificar¹⁹⁴. Uma vez emparelhados com a sequência da amostra, permitem a ligação da Taq polimerase, que irá exercer a sua função.

Para formar novas sequências de dsDNA a partir de uma sequência de ssDNA da amostra, a Taq polimerase necessita de um meio rico em desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTPs)¹⁸⁴, cuja estrutura molecular se encontra representada na **Figura 35**. Estes nucleótidos irão servir como os blocos de construção das novas cadeias de dsDNA e são formados por uma base azotada (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), uma ribose (desoxirribose) e três grupos fosfato¹⁹⁵.

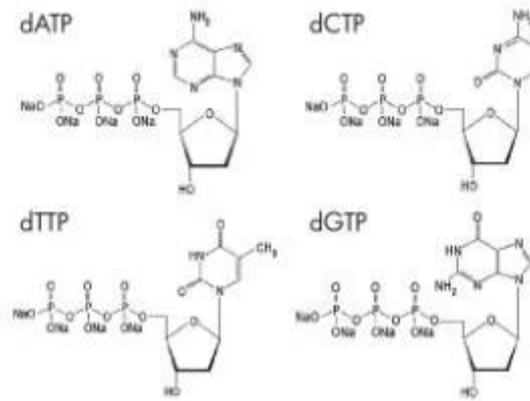


Figura 35: Representação da estrutura molecular dos dNTPs. dATP - desoxiAdenosina Trifosfato; dCTP - desoxiCitidina Trifosfato; dTTP - desoxiTimidina Trifosfato; dGTP - desoxiGuanosina Trifosfato. Adaptado de Ménomá et al¹⁹⁵.

É necessário criar um ambiente propício ao funcionamento e otimização da atividade da Taq polimerase, para tal o PCR decorre numa solução contendo um tampão e sais¹⁸⁴. A grande maioria dos tampões para PCR incluem na sua constituição tris(hidroximetil)aminometano.HCl (Tris-HCl) e Cloreto de Potássio (KCl), cuja função é manter o pH da solução estável durante a reação, uma vez que flutuações podem interferir na atividade da Taq polimerase¹⁹⁶.

Também é adicionado cloreto de magnésio ($MgCl_2$) à mistura reacional, uma vez que é um co-fator necessário à atividade da Taq polimerase¹⁹⁷. No entanto, para grandes concentrações de $MgCl_2$, ocorre um decréscimo na especificidade, correndo o risco de amplificar locais que não são os desejados para o trabalho laboratorial em causa. Este sal também tem a função de auxiliar os *primers* na fase de hibridação, uma vez que ao ligar-se aos grupos fosfato do DNA, com carga negativa, diminui a repulsão eletrostática entre as cadeias de DNA molde e os *primers*¹⁹⁸. Para além de garantir a estabilidade, o tampão também deve conferir densidade à mistura reacional, de modo a facilitar o carregamento das amostras num gel de agarose para eletroforese¹⁹⁹.

2.2. Eletroforese

A eletroforese em gel é uma técnica laboratorial amplamente utilizada em biologia molecular. Analisando a etimologia da palavra (*electro* + *phoresis*) obtemos “mover com eletricidade”, que, em termos científicos significa o

movimento de moléculas como DNA, RNA ou proteínas por ação de um campo elétrico através de um suporte, neste caso um gel de agarose²⁰⁰. Através deste procedimento é possível separar fragmentos de DNA em função da sua dimensão. Numa tina de eletroforese existem dois polos, negativo e positivo, que criam um diferencial de cargas nas extremidades da tina²⁰¹. Esta diferença de cargas cria uma corrente elétrica, responsável pela separação das moléculas através das suas características: tamanho e carga²⁰². Moléculas com carga são atraídas para o polo com carga oposta, isto é, moléculas carregadas positivamente irão deslocar-se para o polo negativo e vice-versa. Em moléculas com carga neutra não se observa movimento.

Nos estudos com DNA, uma vez que este possui carga negativa pela presença do grupo fosfato, as moléculas vão deslocar-se no sentido do polo positivo²⁰³. Numa situação em que não existissem obstáculos, os fragmentos de DNA mover-se-iam sensivelmente à mesma velocidade em direção ao polo positivo. Este resultado não é favorável, uma vez que se pretende a seriação dos fragmentos por tamanho, para tal é usado um gel de agarose com características porosas²⁰⁴. Quando os fragmentos de DNA atravessam os poros e canais do gel, fragmentos com tamanho reduzido irão ter menor dificuldade em deslocar-se, sendo que fragmentos com maiores dimensões irão deslocar-se a uma menor velocidade^{202,205}.

Para realizar a eletroforese neste trabalho laboratorial, utilizou-se um gel de agarose a 1%. Na extremidade do polo negativo, existem poços onde serão colocadas as amostras para a eletroforese. Neste processo, o tampão utilizado continha uma substância que aumentava a densidade da mistura reacional, de forma que as amostras, uma vez colocadas no gel não se diluíssem no tampão de eletroforese²⁰⁶. A visualização dos fragmentos de DNA no gel depende da presença de um corante fluorescente, de forma que o resultado possa ser observado à luz ultravioleta (UV): 100-400 nm. Este composto pode ser incorporado no gel quando da sua preparação, adicionado às amostras ou utilizado para corar o gel após a eletroforese.

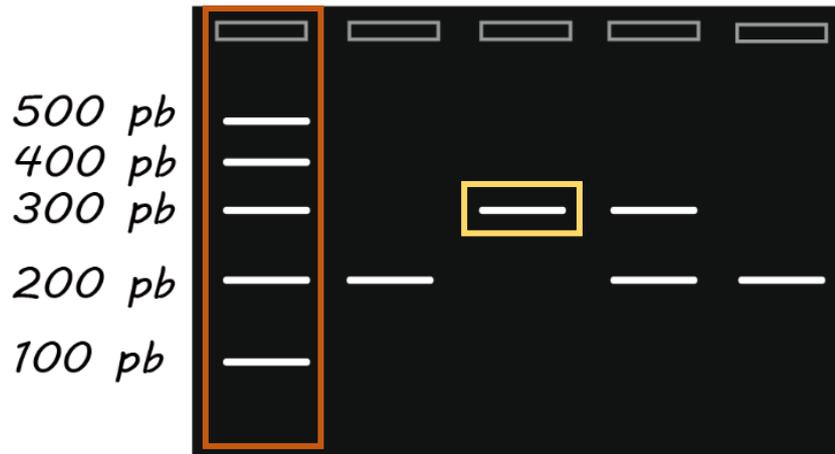


Figura 36: Representação de um gel de eletroforese sob luz UV, com pormenor do marcador de massa molecular (a laranja) e de uma banda de DNA (a amarelo). Adaptado de Johansson et al²⁰⁷.

Observando um gel, fragmentos de DNA com o mesmo comprimento formam uma "banda" no gel²⁰⁷. Em cada banda alojam-se milhões de fragmentos de DNA, que se deslocaram à mesma velocidade através do gel devido ao seu tamanho similar. Bandas mais próximas do polo positivo representam fragmentos de DNA de menor tamanho do que bandas mais próximas do polo negativo²⁰⁸. De forma a obter-se uma melhor estimativa para o tamanho dos fragmentos observados, aplicam-se no gel, em simultâneo com as amostras, um marcador de massa molecular, uma mistura de fragmentos de DNA cujo tamanho foi previamente determinado, como está representado na **Figura 36**.

2.3. Análise de Restrição dos Fragmentos Amplificados

Os métodos laboratoriais utilizados no âmbito deste trabalho incluíram um passo adicional ao PCR: a digestão dos fragmentos de DNA obtidos com uma enzima de restrição. Enzimas de restrição são proteínas sintetizadas por bactérias e isoladas em laboratório, cuja função é clivar fragmentos de DNA com sequências específicas²⁰⁹. Cada enzima de restrição reconhece uma pequena sequência de nucleótidos, clivando-as em dois fragmentos de dsDNA. Uma vez que a presença de um polimorfismo pode afetar o reconhecimento dessa sequência pelo enzima de restrição, esta análise permite a distinção entre fragmentos de DNA com ou sem a variação que se pretende analisar, sendo

possível a determinação do genótipo do indivíduo dador para esse local polimórfico.

Esta metodologia, designada por PCR-RFLP tem diversas vantagens: é de fácil execução, relativamente barata, não tem limitação quanto ao tamanho dos fragmentos a utilizar e é altamente específica para o polimorfismo a analisar. É ainda capaz de distinguir entre indivíduos homocigóticos ou heterocigóticos numa população²¹⁰.

2.4. Participantes

Este estudo contou com a participação de indivíduos de uma amostra da população Tailandesa (n=72). Amostras de sangue periférico foram obtidas por punção digital, após declaração escrita de consentimento informado por parte de todos os participantes, cujo anonimato foi garantido. Cada amostra foi depositada em papel de filtro e, após secagem, armazenada sob vácuo. Na fase de otimização dos protocolos de genotipagem, utilizou-se DNA preparado a partir de amostras de sangue recém obtidas. Analisaram-se neste estudo amostras disponíveis no âmbito de projetos em curso no Laboratório de Farmacogenómica e Toxicologia Molecular (CCMAR/CBMR).

2.5. Procedimento Experimental

2.5.1. Extração de DNA

No caso das amostras em papel de filtro, uma pequena porção do papel de filtro impregnado com a amostra foi colocada num *ependorf*, adicionando-se 200 µL de água milliQ autoclavada para que se desse a ressolubilização do DNA. Uma alíquota desta solução de DNA foi utilizada para o procedimento de genotipagem.

No caso das amostras recém-obtidas, a 5µl de sangue foram adicionados 1000 µl de água milliQ autoclavada, tendo-se centrifugado durante 1 minuto, a cerca de 10,000g, de forma a eliminar a hemoglobina, uma vez que esta interfere no PCR²¹¹. Após eliminar o sobrenadante, ao sedimento celular foram adicionados 20 µL de hidróxido de sódio a 0,2 M (NaOH). Realizou-se assim uma lise alcalina, que rompe a parede celular, permitindo que o DNA fique em solução²¹². Após repousar à temperatura ambiente, adicionou-se 180 µL de Tris-HCl (pH 7,5) de modo a neutralizar o meio.

2.5.2. Teste de genotipagem PCR-RFLP para o SNP ARNT C567G

A reação para a identificação do SNP ARNT C567G decorreu num volume total de 25 µL, tendo a mistura reacional a composição presente na **Tabela 2**.

Componente	V _{total} = 25 µL	[Stock]	[Final]
Tampão (GoTaq Green Buffer)	5,00 µL	5x	1x
dNTP	2,50 µL	10,0 mM	1,0 mM
Primer FW	0,375 µL	50,0 µM	0,75 µM
Primer RV	0,375 µL	50,0 µM	0,75 µM
DNA genómico	10,0 µL	10 ng – 500 ng	-
Taq DNA polimerase	0,20 µL	5,0 U/5µL	0,04 U/µL
H ₂ O	4,05 µL	-	-
MgCl ₂	2,50 µL	25,0 mM	2,50 mM

Tabela 2: Constituintes da mistura reacional para a caracterização do polimorfismo ARNT C567G.

Os *primers* utilizados para amplificar o fragmento de DNA possuíam as seguintes sequências:

- **ARNT C567G Primer forward** (pFW):

5'-CTTACGGAGAGATGCATGTGGCCTG-3' (%CG = 56,0%)

- **ARNT C567G Primer reverse** (pRV):

5'-TGCACCTGATCATAGAGTGTGC-3' (%CG = 50,0%)

O PCR foi realizado sob as condições apresentadas na **Tabela 3**.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Desnaturação inicial	95	120
Desnaturação	95	30
Hibridação	65	30
Extensão	72	30
(30 ciclos)		
Extensão final	72	120
Hold	4 - 10	-

Tabela 3: Condições experimentais do termociclador (Tpersonal (Biometra™)) no processo de PCR para a caracterização do polimorfismo ARNT C567G.

Após amplificação, para cada amostra, o produto de PCR foi digerido com uma enzima de restrição, *BsmAI* (10 U/μL, ThermoFisher Scientific™) através do seguinte procedimento: para um tubo *ependorf* foram transferidos 10,0 μL de produto de amplificação, aos quais se adicionou 10 μL de mistura reacional, perfazendo um volume final de 20 μL. A mistura reacional foi preparada de acordo com a **Tabela 4**.

Reagente	Volume (μL)
	1x
H ₂ O	7,5
Tampão Tango 10x	2,0
<i>BsmAI</i> 10 U/μL	0,5

*Tabela 4: Mistura reacional para digestão enzimática por *BsmAI* dos produtos de PCR para o procedimento experimental do ARNT C567G.*

A mistura reacional foi incubada uma primeira vez a 37 °C durante cerca de 16 horas e posteriormente foi incubada a 80 °C durante 20 minutos de forma a desnaturar a enzima de restrição.

A preparação das misturas reacionais descritas na **Tabela 2** e na **Tabela 4**, foi realizada sob a forma de uma *master mix*, contendo os reagentes necessários ao total das amostras em análise, de forma a reduzir os erros de pipetagem e a variabilidade inter-amostra na sua composição.

2.5.3. Teste de genotipagem PCR-RFLP para o SNP CYP1A2 C-163A

A reação para a identificação do SNP CYP1A2 C-163A decorreu num volume total de 25 µL, a composição da mistura reacional encontra-se na **Tabela 5**.

Componente	V _{total} = 25 µL	[Stock]	[Final]
Tampão (GoTaq Green Buffer)	5,00 µL	5x	1x
dNTP	2,50 µL	10,0 mM	1,0 mM
Primer FW	0,25 µL	50,0 µM	0,50 µM
Primer RV	0,25 µL	50,0 µM	0,50 µM
DNA genómico	10,0 µL	10 ng – 500 ng	-
Taq DNA polimerase	0,20 µL	5,0 U/5µL	0,04 U/µL
H ₂ O	4,80 µL	-	-
MgCl ₂	2,00 µL	25,0 mM	2,0 mM

Tabela 5: Constituintes da mistura reacional para a caracterização do polimorfismo CYP1A2 C-163A

Os *primers* utilizados para amplificar o fragmento de DNA possuíam as seguintes sequências:

- **CYP1A2 C-163A Primer forward** (pFW):

5'-ATACCCAGCATGCATGCTGTGC-3' (%_{CG} = 54,55%)

- **CYP1A2 C-163A Primer reverse** (pRV):

5'-CTGGGACAATGCCATCTGTACC-3' (%CG = 54,55%)

O PCR foi realizado sob as condições apresentadas na **Tabela 6**.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Desnaturação inicial	94	120
Desnaturação Hibridação Extensão (35 ciclos)	92,5 68 a 64 (b) 72	20 a 30 (a) 30 30 a 45 (c)
Extensão final	72	120
Hold	4 - 10	-

Tabela 6: Condições experimentais do termociclador (Tpersonal (Biometra™)) no processo de PCR para a caracterização do polimorfismo CYP1A2 C-163A. (a): 5 ciclos iniciais com 20 s de desnaturação, os restantes ciclos com 30 s; (b): touchdown - decréscimo de 1 °C a cada 5 ciclos nos primeiros 15 ciclos, depois decréscimo de 1 °C a cada 10 ciclos nos seguintes 20 ciclos; (c): 15 ciclos iniciais com 30 s de extensão, depois 10 ciclos com 40 s de extensão e depois 10 ciclos com 45 s de extensão.

Após amplificação, para cada amostra, o produto de PCR foi digerido com uma enzima de restrição, *MvaI* (10 U/μL, ThermoFisher Scientific™) através do seguinte procedimento: para um tubo *ependorf* foram transferidos 10,0 μL de produto de amplificação, aos quais se adicionou 10 μL de mistura reacional, para um volume final de 20 μL. A mistura reacional foi preparada de acordo com a **Tabela 7**.

Reagente	Volume (μL)
	1x
H ₂ O	7,5
Tampão Tango 10x	2,0
<i>MvaI</i> 10 U/μL	0,5

*Tabela 7: Mistura reacional para digestão enzimática por *MvaI* dos produtos de PCR para o procedimento experimental do CYP1A2 C-163A.*

A mistura reacional foi incubada uma primeira vez a 37 °C durante cerca de 16 horas e posteriormente foi incubada a 80 °C durante 20 minutos de forma a desnaturar a enzima de restrição.

A preparação das misturas reacionais descritas na **Tabela 5** e na **Tabela 7**, foi realizada sob a forma de uma *master mix*, contendo os reagentes necessários ao total das amostras em análise, de forma a reduzir os erros de pipetagem e a variabilidade inter-amostra na sua composição.

O restante procedimento foi semelhante para os dois polimorfismos analisados. Foram pipetados 10,0 µL de cada amostra digerida para um poço num gel de agarose 1% em TAE (Tris-Acetato-EDTA) a 2% (V/V), deixando a eletroforese correr a uma voltagem de 100 V durante cerca de 1h e 30 min. Concluído o processo da eletroforese, deu-se o início do procedimento de coloração do gel por *GreenSafe* (NZYTech). A coloração do gel foi realizada numa tina contendo tampão TAE e *GreenSafe* em proporção de acordo com o manual de boas práticas do corante²¹³. Este corante liga-se aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência na ordem dos 530nm quando ligado ao DNA, permitindo observar a localização das bandas sob luz UV. O gel é corado sob agitação durante 30 min, sendo posteriormente observado no transiluminador de UV (Alphalmager, Innotech).

3. Resultados e Discussão

3.1. ARNT C567G

Através da observação dos géis de agarose sob a luz UV podemos aferir três genótipos nos indivíduos que constituem a nossa amostra: homocigotas para a referência (C/C), heterocigotas (C/G) e homocigotas para a variante (G/G). Nos indivíduos cujo genótipo é (C/C) é de esperar duas bandas no gel com aproximadamente 187 e 74 pares de bases (pb), respetivamente. Nos indivíduos com o genótipo (C/G) esperam observar-se três bandas no gel com 261pb, 187pb e 74pb. Nos indivíduos heterocigotas, a banda com 261pb representa o alelo com G, enquanto as bandas com 187pb e 74pb representam o alelo com C. Para os indivíduos cujo genótipo é (G/G) espera observar-se apenas uma banda com 261pb.

A enzima de restrição utilizada na digestão dos fragmentos de DNA para o polimorfismo ARNT C567G, a *BsmAI* cliva fragmentos que contenham a sequência 5'-GTCTC**N**-3', como é o caso da sequência de referência neste polimorfismo: 5'-GTCTG-3' – ao reconhecer esta sequência, cliva o fragmento de DNA em dois. No caso da sequência com o polimorfismo (5'-CTCTG-3'), uma vez que o **G** é substituído por um **C**, a enzima não vai reconhecer a sequência e não vai exercer a sua função, permanecendo com fragmentos intactos de dsDNA.

A nossa amostra era constituída por 72 indivíduos ($n_{total}= 72$). No processo de amplificação constatou-se que 10 amostras não amplificaram sendo que, para efeitos estatísticos, a população em estudo é constituída por 62 indivíduos ($n_{amplificados}= 62$). Como se pode observar na **Tabela 8**, identificaram-se 20 indivíduos como homocigotas para a referência (C/C), 16 como heterocigotas (C/G) e 26 indivíduos como homocigotas para a variante (G/G).

C/C	C/G	G/G
20	16	26

Tabela 8: Caracterização genotípica dos indivíduos incluídos no estudo do polimorfismo ARNT C567G.

Podemos definir alelos como as variantes de genes localizados numa mesma posição ou *locus* num cromossoma, sendo herdados dois alelos para cada gene, 1 de cada progenitor. Cada par de alelos representa um genótipo específico de um gene, podendo refletir-se em determinados fenótipos nos organismos. Uma forma de perceber a incidência de uma variante genética numa população é através do cálculo da frequência alélica dessa mesma variante²¹⁴. O cálculo da frequência alélica (FA) para o alelo variante (G) foi realizado com recurso à **Equação 4**²¹⁵:

$$FA = \frac{n^{\circ} \text{ de indivíduos (G/G)} \times 2 + n^{\circ} \text{ de indivíduos (C/G)}}{n_{\text{amplificados}} \times 2} \quad \text{Equação 4}$$

Na **Tabela 9** encontram-se representados os resultados dos cálculos da frequência alélica para a variante (FA_G) de 54,8% e o valor da frequência alélica para a referência (FA_C) de 45,2%. Observou-se que, para a nossa população (n=62), mais de metade dos indivíduos apresentava o alelo variante.

Frequências Alélicas	
C	G
0,452	0,548
45,2%	54,8%

Tabela 9: Frequências alélicas determinadas para o polimorfismo ARNT C567G na população em estudo.

De forma a perceber a distribuição genotípica nesta população, foi também avaliada a incidência de cada um dos três genótipos possíveis para o SNP ARNT C567G, através do cálculo da frequências genotípicas. Os resultados estão representados na **Tabela 10**.

Frequências Genotípicas	C/C	C/G	G/G
	0,323	0,258	0,419
	32,3%	25,8%	41,9%

Tabela 10: Frequências genotípicas determinadas para o polimorfismo ARNT C567G na população em estudo.

Na amostra populacional utilizada no trabalho experimental, verificou-se que a maioria das amostras era homocigota para a variante (G/G), constituindo 41,9% da amostra. O segundo genótipo mais prevalente na amostra corresponde ao genótipo homocigota para a referência (C/C), constituindo 32,3% da amostra. Estes dados corroboram a frequência alélica da variante, uma vez que 67,7% dos indivíduos eram portadores de alelos variantes.

Para o SNP estudado, existem apenas dois alelos possíveis: a referência (C) e a variante (G). Sabendo isto, a soma das frequências alélicas tem obrigatoriamente de constituir 100% da população²¹⁶, como é evidenciado na **Equação 5**.

$$F_{Ac} + F_{AG} = 1,0 \quad \text{Equação 5}$$

Uma vez que as amostras pertencem a organismos diploides, teremos de elevar toda a equação ao quadrado²¹⁷, como podemos observar na **Equação 6**, e no seu respetivo desenvolvimento.

$$\begin{aligned} (F_{Ac} + F_{AG})^2 &= 1,0^2 \\ \Leftrightarrow CC^2 + 2CG + GG^2 &= 1,0 \end{aligned} \quad \text{Equação 6}$$

Estas equações são as premissas da teoria genética populacional de *Hardy-Weinberg*, amplamente utilizadas com o propósito de estudar a variação genética numa população em equilíbrio, isto é, a variação genética numa

população deverá manter-se constante de geração em geração na ausência de fatores disruptivos²¹⁸. Entendam-se como fatores disruptivos todas as variáveis que tenham a capacidade de influenciar mudanças ou viés no equilíbrio: mutações, seleção natural, acasalamento não aleatório, deriva genética ou migração de novos alelos no *pool* genético²¹⁹. Seleção natural / acasalamento não aleatório perturbam o equilíbrio ao introduzirem um viés preferencial que afeta as frequência genotípicas na população, uma vez que certas características se demonstram mais vantajosas nos organismos que as detêm.

A lei também tem como premissa uma população numerosa, uma vez que em populações mais diminutas podem ocorrer, ao acaso, sobreposições nas frequências alélicas para um determinado gene, ocorrendo deriva genética²²⁰. Quando o acasalamento é aleatório numa população grande sem fatores disruptivos, a lei de *Hardy-Weinberg* prevê que tanto as frequências genotípicas como as frequências alélicas se mantenham constantes²²¹. De notar que, mesmo não se conseguindo aplicar na totalidade a uma situação real, a lei de *Hardy-Weinberg* constitui uma aproximação muito fidedigna, marcando-se como uma ferramenta muito útil nos estudos populacionais até aos dias de hoje²¹⁷.

Na **Equação 6** vemos representadas as três possibilidades genotípicas para este SNP, sendo que CC^2 (ou p^2) representa a probabilidade de um indivíduo ser homocigota para a referência, $2CG$ (ou $2pq$) representa a probabilidade de um indivíduo ser heterocigota e GG^2 (ou q^2) representa a probabilidade de um indivíduo ser homocigota para a variante^{216,221}. Na **Tabela 11** então calculadas as frequências genotípicas esperadas/previstas pela lei de *Hardy-Weinberg*.

Frequências Esperadas	p^2	$2pq$	q^2
	0,20	0,50	0,30
	20%	50%	30%

Tabela 11: Frequências genóticas esperadas para o polimorfismo ARNT C567G na população em estudo. p – Frequência alélica da referência; q – frequência alélica da variante.

De forma a perceber o significado estatístico dos resultados, foi realizado o teste do χ^2 , verificando se ocorreram desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Na **Tabela 12** encontra-se o valor obtido de χ^2 foi calculado com recurso à **Equação 7**, com 2 graus de confiança, uma vez que existem 3 genótipos possíveis.

$$\chi^2 = \sum \frac{(Freq. Obs - Freq. Esp)^2}{Freq Esp} \quad \text{Equação 7}$$

		C/C	C/G	G/G
Teste do χ^2 - ARNT C567G	Freq. Obs	20,00	16,00	26,00
	Freq. Esp	12,65	30,71	18,65
	χ^2	4,278	7,046	2,901
Σ		14,225		

Tabela 12: Teste do χ^2 aplicado ao polimorfismo ARNT C567G. Freq. Obs – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra (n=62); Freq. Esp – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra (n=62)

Para um grau de confiança de 2, o valor de χ^2 que apresenta significado estatístico, isto é $P \leq 0,05$, é $\chi^2 = 5,99$. O valor de χ^2 obtido, é vastamente superior ($\chi^2 = 14,225$), rejeitando a hipótese nula do teste: a distribuição de genótipos encontra-se de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Estes resultados indicam-nos, com 99% de certeza, que a amostra não se encontra em equilíbrio com a equação de *Hardy-Weinberg*, tendo ocorrido um desvio genético nesta população.

3.2. CYP1A2 C-163A

Através da observação dos géis de agarose sob a luz UV podemos aferir três genótipos nos indivíduos que constituem a nossa amostra: homocigotas para a referência (C/C), heterocigotas (C/A) e homocigotas para a variante (A/A). Nos indivíduos cujo genótipo é (C/C) é de esperar duas bandas no gel com aproximadamente 207 e 177 pares de bases (pb). Nos indivíduos com o genótipo (C/A) esperam observar-se três bandas no gel com 384pb, 207pb e 177pb. Nos indivíduos heterocigotas, a banda com 384pb representa o alelo com A, enquanto as bandas com 207pb e 177pb representam o alelo com C. Para os

indivíduos cujo genótipo é (A/A) espera observar-se apenas uma banda com 384pb.

A enzima de restrição utilizada na digestão dos fragmentos de DNA para o polimorfismo CYP1A2 C-163A, a *MvaI* cliva fragmentos que contenham a sequência 3'-CC▼WGG-5', como é o caso da sequência na cadeia de DNA complementar à sequência de referência neste polimorfismo: 5'-GGGCC-3' – ao reconhecer esta sequência, cliva o fragmento de DNA em dois. No caso da sequência com o polimorfismo (5'-GGGCA-3'), uma vez que o **C** é substituído por um **A**, a enzima não vai reconhecer a sequência e não vai exercer a sua função, permanecendo com fragmentos intactos de dsDNA.

A amostra inicial era constituída por 72 indivíduos ($n_{total}= 72$), tendo-se verificado que 5 amostras não amplificaram. Assim, para efeitos estatísticos, a população em estudo é constituída por 67 indivíduos ($n_{amplificados}= 67$). Como se pode observar na **Tabela 13**, identificaram-se 20 indivíduos como homocigotas para a referência (C/C), 20 indivíduos como heterocigotas (C/A) e 27 indivíduos como homocigotas para a variante (A/A).

C/C	C/A	A/A
20	20	27

Tabela 13: Caracterização genotípica dos indivíduos incluídos no estudo do polimorfismo CYP1A2 C-163A

Na **Tabela 14** encontram-se representados os resultados dos cálculos da frequência alélica para a variante (FA_A) de 55,2% e o valor da frequência alélica para a referência (FA_C) de 44,8%. Observou-se que, para a nossa população ($n=67$), mais de metade dos indivíduos apresentava 1 ou mais alelos variantes.

Frequências Alélicas	
C	A
0,448	0,552
44,8%	55,2%

Tabela 14: Frequências alélicas determinadas para o polimorfismo CYP1A2 C-163A na população em estudo.

De forma a perceber a distribuição dos vários genótipos na nossa população, foi também avaliada a incidência de cada uma das três variantes possíveis no estudo do CYP1A2 C-163A, através do cálculo da frequências genotípicas. Os resultados estão representados na **Tabela 15**.

Frequências Genotípicas	C/C	C/A	A/A
	0,2985	0,2985	0,403
	29,85%	29,85%	40,3%

Tabela 15: Frequências genotípicas determinadas para o polimorfismo CYP1A2 C-163A na população em estudo.

Na amostra populacional utilizada no trabalho experimental, verificou-se que a maioria das amostras era homozigota para a variante (A/A), constituindo 40,3% da amostra. São igualmente prevalentes na amostra o genótipo homozigota para a referência (C/C), e o genótipo heterozigota, constituindo 29,85% da amostra. Estes dados corroboram a frequência alélica da variante, uma vez que 70,15% da amostra continha alelos com a variante.

De modo a aferir se, para este SNP, a distribuição dos vários genótipos estava de acordo com a lei de *Hardy-Weinberg*, foram calculadas as frequências genotípicas esperadas, na **Tabela 16** representados.

Frequências Esperadas	p^2	$2pq$	q^2
	0,200	0,495	0,305
	20,0%	49,5%	30,5%

Tabela 16: Frequências genotípicas esperadas para o polimorfismo CYP1A2 C-163A na população em estudo.

De forma a entender o significado estatístico dos resultados, foi realizado o teste do χ^2 , verificando se ocorreram desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Na **Tabela 17** encontra-se o valor obtido de χ^2 foi calculado com recurso à **Equação 7**, com 2 graus de confiança, uma vez que existem 3 genótipos possíveis.

		C/C	C/A	A/A
Teste do χ^2 - CYP1A2 C-163A	Freq. Obs	20,00	20,00	27,00
	Freq. Esp	13,43	33,13	20,43
	χ^2	3,211	5,206	2,1107
	Σ	10,528		

Tabela 17 - Teste do χ^2 aplicado ao polimorfismo do CYP1A2 C-163A. Freq. Obs – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra ($n=67$); Freq. Esp – Frequências genotípicas observadas em proporção com a amostra ($n=67$)

Para um grau de confiança de 2, o valor de χ^2 que apresenta significado estatístico, isto é $P \leq 0,05$, é $\chi^2 = 5,99$. O valor de χ^2 obtido, é vastamente superior ($\chi^2 = 10,528$), rejeitando a hipótese nula do teste: a distribuição de genótipos

encontra-se de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Estes resultados indicam-nos, com 99% de certeza, que a amostra não se encontra em equilíbrio com a equação de *Hardy-Weinberg*, tendo ocorrido um desvio genético nesta população.

3.3. Cruzamento de dados

Uma vez que foram testados ambos os polimorfismos numa mesma população de amostras, é interessante verificar como se distribuem os SNPs. De notar que para esta análise se considerou uma população total de 57 amostras, uma vez que em 15 amostras não se verificou amplificação no total dos dois procedimentos experimentais ($n_{\text{amplificado}} = 57$). Como é possível observar na **Tabela 18**, verificou-se que 92,98% da população apresenta pelo menos um dos polimorfismos, ARNT C567G ou CYP1A2 C-163A.

		CYP1A2 C-163A		
		C/C	C/A	A/A
ARNT C567G	C/C	4 (7,02%)	5 (8,77%)	8 (14,04%)
	C/G	5 (8,77%)	4 (7,02%)	6 (10,52%)
	G/G	10 (17,54%)	6 (10,52%)	9 (15,80%)

Tabela 18: Cruzamento de resultados genotípicos obtidos de ambos os polimorfismos em estudo, ARNT C567G e CYP1A2 C-163A.

De entre todas as possibilidades, a combinação de genótipos mais comum aparenta ser indivíduos homocigotas para a variante do ARNT C567G (G/G) e homocigotas para a referência do CYP1A2 C-163A (C/C), representando 17,54% da amostra com um total de 10 indivíduos. As combinações de genótipos mais incomuns são de indivíduos heterocigotas para ambos os SNPs ou

indivíduos sem polimorfismos em qualquer dos dois SNPs estudados, cada um representando apenas 7,02% da população.

O objetivo deste trabalho foi estudar a incidência destes SNPs nos genes CYP1A2 e ARNT na população tailandesa, e discutir o seu potencial papel no risco acrescido para o desenvolvimento de HTA, bem como a influência dos estilos de vida, nomeadamente os hábitos tabágicos, e do ambiente.

Os resultados obtidos evidenciam um claro desequilíbrio do que era espectável pela lei de *Hardy-Weinberg*, pelo que podemos interpretar os valores obtidos como um desvio no *pool* genético.

Para o polimorfismo ARNT C567G, verificou-se um aumento da frequência genotípica observada dos indivíduos homozigotas para a referência (C/C) em 12,3%, face ao esperado. A mesma tendência manteve-se nos indivíduos homozigotas para a variante (G/G), onde se verificou um aumento da frequência genotípica observada em 11,9%, face ao espectável pela equação de *Hardy-Weinberg*. Nas amostras representativas dos indivíduos heterozigotas (C/G) quebrou-se a tendência, uma vez que, face ao que esperaria pela equação de *Hardy-Weinberg*, se verificou uma redução em 24,2% da frequência genotípica. A distribuição de genótipos do ARNT C567G observada nesta amostra está de acordo com a hipótese inicial, uma vez que se previa que a população tailandesa tivesse uma grande percentagem de indivíduos homozigotas para a variante (G/G). No entanto é de notar que a percentagem observada de indivíduos com pelo menos um alelo variante (67,7%) foi inferior ao esperado (80,0%), uma vez que se verificou um percentagem significativa de indivíduos homozigotas para a referência (C/C).

Para o polimorfismo CYP1A2 C-163A, verificou-se um aumento da frequência genotípica observada dos indivíduos homozigotas para a referência (C/C) em 9,85%, face ao esperado. A mesma tendência foi observada para os indivíduos homozigotas para a variante (A/A), onde se verificou um aumento da frequência genotípica observada em 9,80%, face ao espectável pela equação de *Hardy-Weinberg*. Nas amostras representativas dos indivíduos heterozigotas (C/A) quebrou-se a tendência, uma vez que, face ao que esperaria pela equação de *Hardy-Weinberg*, se verificou uma redução em 24,2% da frequência

genotípica. A distribuição de genótipos do CYP1A2 C-163A observada nesta amostra está de acordo com a hipótese inicial, uma vez que se antecipava uma grande percentagem de indivíduos homozigotas para a variante (A/A) na população tailandesa. Todavia, a percentagem observada de indivíduos com pelo menos um alelo variante (70,2%) foi inferior ao esperado (80,0%), verificando-se uma percentagem de significativa de indivíduos homozigotas para a referência (C/C).

De forma a tentar perceber se os resultados obtidos pela nossa amostra se assemelhavam a alguns dos resultados obtidos noutros estudos descritos na literatura, compararam-se as frequências alélicas entre as populações alvo desses estudos. O resultado da comparação é mensurável através da análise do valor de P obtido, que nos indica se as frequências alélicas das duas populações são significativamente diferentes. Esta análise foi realizada para ambos os polimorfismos estudados no presente trabalho e encontram-se descritos na **Tabela 19** e na **Tabela 20**.

População	ARNT C567G		Valor de P	Referências
	Frequência Absoluta			
	C	G		
República Checa	963	481	< 0,0001	222
Rússia	1620	962	0,0001	110
China	181	129	0,0167	223
Estados Unidos da América	1065	1465	0,5607	224
Japão	472	744	0,2002	225

Tabela 19: Comparação das frequências alélicas de estudos descritos na literatura com os resultados obtidos no presente estudo do ARNT C567G através do teste do χ^2 com correção de Yates.

Através dos resultados presentes na **Tabela 19** podemos constatar que, quanto ao SNP no ARNT C567G, a nossa amostra se considera estatisticamente diferente das amostras da população dos estudos da República Checa²²², da Rússia¹¹⁰ e da China²²³ – uma vez que o valor de P obtido foi $\leq 0,05$. Do mesmo modo, verificou-se que as amostras dos estudos realizados na população norte-americana²²⁴ e japonesa²²⁵ não apresentam diferenças significativas quando

comparadas às amostras do presente estudo, uma vez que o valor de P obtido foi $> 0,05$.

O mesmo teste foi realizado para o SNP no CYP1A2 C-163A, na **Tabela 20** apresentados. Os resultados obtidos no presente estudo, quando comparados com outros estudos descritos na literatura, permitem verificar se existem similaridades entre as amostras. A nossa amostra considera-se estatisticamente diferente das amostras da população de ambos os estudos realizados na Grécia^{226,227}, Canadá²²⁸, China²²⁹, Austrália²³⁰, Rússia^{110,231}, Suécia²³², Chile²³³, Jordânia²³⁴ e Suíça²³⁵. Por outro lado, a nossa amostra não mostrou ser estatisticamente diferente das amostras da população japonesa²³⁶ e da população brasileira²³⁷, uma vez que o valor de P obtido foi $> 0,05$.

População	CYP1A2 C-163A		Valor de P	Referências
	Frequência Absoluta C	A		
Grécia	213	401	0,0359	226
Grécia	281	523	0,0364	227
Canadá	60	142	0,0068	228
China	548	276	$< 0,0001$	229
Austrália	11	33	0,0318	229
Japão	95	165	0,1397	236
Rússia	234	584	0,0003	231
Suécia	132	316	0,0014	232
Brasil	51	89	0,1992	237
Rússia	1369	2937	0,0021	110
Chile	140	418	$< 0,0001$	233
Jordânia	305	569	0,0341	234
Suíça	3344	7560	0,0006	235

Tabela 20: Comparação das frequências alélicas de estudos descritos na literatura com os resultados obtidos no presente estudo do CYP1A2 C-163A através do teste do χ^2 com correção de Yates.

Embora exploratórios, os resultados obtidos no presente estudo e a sua comparação com outros trabalhos descritos na literatura podem servir de base para a clarificação da etiologia e prevalência da HTA na população tailandesa. Esta prevalência pode dever-se a diversos fatores que, no seu conjunto, aumentam a propensão para o desenvolvimento da HTA. Os vários fatores têm sido listados ao longo deste trabalho: elevadas frequências de SNPs relevantes

na população tailandesa, os hábitos tabágicos preocupantes e a poluição ambiental sentida no território tailandês.

Se nos indivíduos em que se verifica pelo menos um alelo variante num dos SNPs estudados, ARNT C567G e CYP1A2 C-163A, se observa um aumento da atividade enzimática do CYP1A2 em cerca de 60,0%, existirá uma maior biodisponibilidade das formas ativas no organismo. Exposição a PAHs provenientes do fumo do tabaco ou de PM_{2,5} da atmosfera por parte destes indivíduos irá surtir consequências maiores do que em indivíduos que se classificam como metabolizadores lentos, uma vez que PAHs são substratos do CYP1A2 e a sua ativação irá despoletar todos os efeitos anteriormente mencionados. Podemos, portanto, assumir que em indivíduos classificados como metabolizadores lentos do CYP1A2, existirá uma menor quantidade de formas ativas de PAHs no organismo, enquanto que, em indivíduos classificados como metabolizadores rápidos do CYP1A2, existirá uma maior quantidade de formas ativas de PAHs no organismo.

É de notar que indivíduos heterozigotas (C/A) do CYP1A2 C-163A se classificam como metabolizadores lentos. No entanto, observou-se que quando associado a um alelo variante do SNP do ARNT C567G, ocorreu um aumento da expressão da enzima, culminando com um aumento da atividade enzimática do CYP1A2, considerando-se uma associação de risco para o desenvolvimento de HTA (OR= 1,38, $P= 0,0003$)¹¹⁰.

4. Trabalho Futuro

Ao analisar a metodologia experimental utilizada no presente estudo, alguns aspetos menos positivos tornaram-se evidentes. Uma vez que não temos acesso aos dados pessoais dos voluntários do estudo não é possível organizar as amostras quanto ao sexo, idade, índice de massa corporal e outros parâmetros relevantes. Seccionar as amostras por grupo iria permitir que se estabelecessem mais relações entre variáveis pessoais das amostras e os SNPs estudados. No caso de fatores como a idade e sexo dos voluntários, seria particularmente interessante confirmar se a frequência dos SNPs correspondia com os dados estatísticos presentes na **Figura 14**, isto é, se indivíduos do sexo masculino apresentam uma maior frequência alélica de alelos variantes do que indivíduos do sexo feminino.

É desconhecida qualquer condição clínica dos participantes – doenças crónicas, historial familiar, comorbilidades e hábitos de estilo de vida. Para este estudo seria particularmente interessante aferir quais dos participantes já se encontravam diagnosticados com HTA e a existência de histórico familiar de HTA, de modo a traçar uma relação mais clara entre os SNPs e a HTA. Outra forma de eliminar este problema seria desenvolver um estudo com um grupo de indivíduos já diagnosticados com HTA e um grupo de controlo, da qual fariam parte indivíduos que não estivessem diagnosticados com HTA.

Uma vez que os hábitos tabágicos demonstram ser um fator importante na temática das doenças do foro CV, deveriam aferir-se também os hábitos tabágicos dos indivíduos do estudo. Informações como a data de início dos hábitos tabágicos, número médio de cigarros consumidos diariamente e tentativas de cessação tabágica trariam profundidade ao estudo. No caso de não serem fumadores, os indivíduos sob estudo deveriam reportar se convivem regularmente com outros indivíduos fumadores, por exemplo familiares próximos. O fator ambiental também parece contribuir fortemente para o problema de propensão para o desenvolvimento de HTA. No estudo deveria ser anotado a área de residência e a área do local de trabalho dos indivíduos em estudo, de forma a traçarem-se relações entre a exposição prolongada a PM_{2,5} e o aumento da PA.

O tamanho da amostra poderá ser apontado como um fator negativo, pelo seu tamanho reduzido face à população da qual se pretendem retirar elações. Uma vez que a população tailandesa é bastante numerosa, num futuro estudo dever-se-ia aumentar o número de amostras estudadas de forma que a amostra seja uma percentagem mais representativa da população original.

Uma metodologia de estudo epidemiológico passível de ser implementada de forma a minimizar os pontos fracos do presente estudo poderia ser através do desenho de uma metodologia com base numa coorte. Estudos de coorte caracterizam-se pelo acompanhamento de dois ou mais grupos distintos desde o momento da exposição a um ou mais fatores relevantes até ao resultado dessa exposição, comparando os seus efeitos em cada um dos grupos²³⁸. Se um grupo, com determinadas características comuns obteve uma frequência mais elevada de um resultado do que outros grupos com outras características, podem ser criadas associações entre a exposição e as características de cada grupo²³⁹. Um estudo de coorte retrospectivo parece ser adequado às necessidades do tipo de estudo em causa. Em estudos de coorte retrospectivos existe primeiramente a recolha de dados clínicos dos indivíduos em estudo, para todos os grupos. No caso do presente estudo, deveria procurar-se formar dois grupos de indivíduos, os indivíduos cuja HTA já esteja diagnosticada e indivíduos com PA considerada normal, estes últimos fariam parte do grupo de controlo.

Após a formação dos grupos do estudo, dever-se-ia fazer uma recolha de dados clínicos relevantes junto dos profissionais de medicina familiar que acompanham os indivíduos do estudo – idade, género, IMC, hábitos tabágicos, histórico de monitorizações da PA e histórico familiar de doenças crónicas. Para além destes dados, deveriam aferir-se os locais de residência e de trabalho dos indivíduos. Posteriormente, proceder-se-ia à análise das variações na PA ao longo do tempo, começando no momento da exposição até à atualidade, de acordo com a metodologia retrospectiva dos estudos de coorte.

O passo seguinte seria a genotipagem dos indivíduos, de acordo com os métodos laboratoriais utilizados no presente estudo, de forma a agruparmos os indivíduos em vários grupos, consoante a presença de SNPs relevantes para a HTA. Uma vez recolhidos todos os dados, poderiam criar-se relações causais

entre a presença de alelos variantes e hábitos tabágicos/exposição a PAHs ambientais com o aumento da propensão para o desenvolvimento de HTA.

A presença de um desequilíbrio no *pool* genético que se traduz no aumento da propensão para o desenvolvimento de HTA na população tailandesa acarreta a implementação de algumas medidas por parte dos sistemas de saúde.

A implementação de métodos de genotipagem de genes alvos relevantes para a HTA na população iria permitir identificar quais os indivíduos que se encontram em maior risco de desenvolver a patologia, possibilitando aos profissionais de saúde uma forma mais clara de monitorizar potenciais fatores de risco. Indivíduos com alelos variantes de SNPs no ARNT C567G e/ou no CYP1A2 C-163A necessitam ter cuidados acrescidos com os seus hábitos de vida, comparativamente a indivíduos com alelos de referência. A sensibilização para os riscos do tabaco e a promoção de planos de cessação tabágica devem ser especialmente direcionados para estes indivíduos, através de campanhas de saúde pública ou até mesmo por parte de profissionais de saúde.

Como foi discutido anteriormente, o sistema nacional de saúde tailandês tem enfrentado algumas dificuldades no controlo e gestão da HTA⁷⁰. Problemas como taxas de diagnóstico aquém do patamar ótimo ou a dificuldade de acesso a cuidados de saúde justificam a elevada percentagem de indivíduos não diagnosticados ou a falta de adesão à terapêutica.

Uma forma de melhorar a qualidade do diagnóstico da HTA é através da aposta na correta formação dos profissionais de saúde, com o objetivo de obter diagnósticos mais precisos e garantir que os protocolos estabelecidos são cumpridos de acordo com as boas práticas. Aumentar o número de equipamentos e a qualidade dos mesmos é crucial de forma a evitar grandes filas de espera nos centros de saúde, uma vez que o tempo de espera revelou ser um dos principais fatores para os baixos números de diagnóstico, para além de introduzir viés nos resultados das medições na forma de valores acima do normal.

O aumento dos locais de monitorização é também um passo crucial no processo de melhoria ao acesso a serviços de saúde. Implementação de serviços de monitorização da PA na rede de farmácias comunitárias, no restante

setor privado e até mesmo nos locais de trabalho iria permitir uma maior variedade nos locais de monitorização por todo o território tailandês, aliviando a pressão no setor público e reduzindo os tempos de espera nos centros de saúde e hospitais. De forma a padronizar o procedimento de monitorização e evitar a ocorrência de erros sistemáticos (operacionais ou de método), deveriam ser criados protocolos universais com a descrição da correta técnica de medição, que seriam aplicados por todos os locais de monitorização da PA.

Algumas farmácias comunitárias tailandesas encontram-se desde 2001 em diversos projetos-piloto que visam estudar os benefícios da monitorização da PA e de outros parâmetros na população²⁴⁰. Os resultados mostram que este tipo de serviços tem um impacto grande na gestão da HTA, uma vez que os farmacêuticos comunitários podem intervir de diversas formas: monitorização de valores, educação sobre hábitos de vida saudáveis, medidas não-farmacológicas e informação acerca da correta utilização da terapêutica farmacológica. A rede de farmácias comunitárias deve, portanto, ser incluída nos planos de serviços de saúde do SNS tailandês, uma vez que a longo prazo parecem ser uma mais-valia para a saúde pública da população.

5. Conclusão

A incerteza na etiologia da HTA aliada à elevada incidência desta doença crónica na população tailandesa fez do presente estudo uma pesquisa relevante para a elucidação epidemiológica sobre este assunto. Verificou-se que a frequência alélica de alguns SNPs relevantes para a o desenvolvimento de HTA, ARNT C567G e CYP1A2 C-163A, se apresenta bastante elevada na população estudada, estando de acordo com a hipótese inicial.

A técnica laboratorial utilizada, PCR-RFLP, foi ao encontro das necessidades do estudo, uma vez que era necessário distinguir os vários genótipos das amostras, para ambos os SNPs de forma a entender a gravidade da exposição a PAHs. A fácil interpretação, a possibilidade de trabalhar com várias amostras ao mesmo tempo e a simplicidade do protocolo parece ser bastante adequada a estudos populacionais, cuja dimensão da amostra tem tendência a ser elevada.

Uma vez que na literatura existem poucos estudos direcionados a estes SNPs na população tailandesa, não foi possível fazer uma estimativa sobre o resultado que seria possível obter através de dados empíricos, no entanto especulavam-se grandes percentagem de alelos variantes para ambos os SNPs. Em concordância com o especulado, verificou-se que tanto para o ARNT C567G como para o CYP1A2 C-163A, a prevalência de alelos variantes era maioritária na população, estando de acordo com o que era esperado.

A presença de uma grande percentagem de alelos variantes em pelo menos um dos SNPs analisados no presente estudo, aliada à elevada percentagem de indivíduos fumadores e à delicada situação ambiental que se sente no território tailandês, formam um cenário muito específico que aumenta a propensão desta população para um risco aumentado de HTA.

A população tailandesa encontra-se mais exposta a PAHs - seja pelo tabagismo, fumo passivo ou pela presença de PAHs na atmosfera derivados de diversas atividades antropogénicas. Para além da exposição a PAHs, grande parte da população poderá ser considerada um metabolizador rápido destes compostos, aumentando a biodisponibilidade das suas formas ativas no

organismo. Os efeitos dos PAHs a nível CV estão amplamente estudados na literatura, interferindo com diversos mecanismos fisiológicos que vão afetar a homeostasia da normal PA a curto e longo prazo, podendo mesmo ser irreversível, culminando com o desenvolvimento de HTA.

Os resultados obtidos, para ambos os SNPs refletem um desvio no *pool* genético face ao esperado pela equação de *Hardy-Weinberg*, isto indica-nos que a população tem vindo a evoluir de forma que, neste caso, existam uma maior quantidade de alelos variantes. Ao comparar estes resultados com outras populações, verificamos que a proporção de alelos variantes é também estatisticamente diferente das demais populações, indicando também que o impacto da exposição a PAHs pode estar aumentado na população tailandesa.

Embora exploratórios, esperamos que os resultados presentes neste estudo possam servir como um ponto de partida para a compreensão da etiologia da HTA na população tailandesa, através da relação entre SNPs e o fatores ambientais/estilos de vida. De forma a fortalecer os resultados obtidos no presente estudo, acreditamos que mais estudos devem ser conduzidos. Aspectos como uma maior dimensão da amostra, estudos realizados com indivíduos hipertensos ou até mesmo estudos de coorte regressivos podem ser conduzidos de forma a fortalecer a relação entre os SNPs (ANRT C567G e CYP1A2 C-163A) e o desenvolvimento de HTA.

A gestão da HTA por parte do SNS tailandês apresenta algumas falhas. Acreditamos que os resultados presentes neste estudo possam servir de força motriz para aumentar o número de políticas de saúde relacionadas com o diagnóstico, acesso ao medicamento e a monitorização da HTA. A inclusão da rede de farmácias comunitárias e de unidades de saúde pertencentes ao sistema de saúde privado como locais de monitorização da PA iria facilitar o acesso deste serviço de saúde por parte da população, com a vantagem de aliviar a pressão nos hospitais públicos e centros de saúde, como demonstram os estudos piloto implementados desde 2001.

A genotipagem da população tailandesa quanto ao ARNT e ao CYP1A2 poderá vir a tornar-se uma prática comum, uma vez que ao determinar os genótipos quanto a estes SNPs, indivíduos com alelos variantes poderão estar

mais consciencializados para hábitos de risco, podendo refletir-se na escolha de hábitos de vida mais saudáveis. Para além da realização de campanhas de saúde pública que alertem para os riscos do tabaco ao nível CV, a promoção da cessação tabágica juntos dos indivíduos fumadores é uma estratégia que requer alguma urgência, uma vez que a percentagem de indivíduos fumadores é bastante elevada.

O presente trabalho apresenta dados preliminares bastante promissores quanto ao estudo da prevalência de alelos variantes em SNPs no ARNT C567G e no CYP1A2 C-163A na população tailandesa, evidenciando a importância de fatores étnicos no estudo da prevalência e da etiologia da HTA nas populações. Demonstrou também a importância que o impacto ambiental apresenta como um fator de risco para a saúde pública, pelo que devem ser tomadas medidas de forma a reduzir a emissão de PAHs atmosféricos, uma vez que estes compostos apresentam, demonstradamente, capacidade de afetar homeostasia da PA.

Se as expectativas se mostrarem corretas, as descobertas deste estudo poderão proporcionar novos conhecimentos ao nível da epidemiologia, etiologia e gestão da HTA, possibilitando uma redução do número de óbitos relacionados com doenças do foro CV a longo prazo.

BIBLIOGRAFIA

1. Saxena, T., Ali, A. O. & Saxena, M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **16**, 879–887 (2018).
2. Gareth Beevers, Gregory Y H Lip, E. O. The pathophysiology of hypertension. *ABC Hypertens.* **322**, 912–916 (2001).
3. Vincent, J. L. Understanding cardiac output. *Crit. Care* **12**, 12–14 (2008).
4. Bouzinova, E. V., Wiborg, O., Aalkjaer, C. & Matchkov, V. V. Role of peripheral vascular resistance for the association between major depression and cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **65**, 299–307 (2015).
5. Park, C. *et al.* Elevated blood pressure in adolescence is attributable to a combination of elevated cardiac output and total peripheral resistance evidence against a hyperkinetic State. *Hypertension* **72**, 1103–1108 (2018).
6. Ichinose, M., Nakabayashi, M. & Ono, Y. Difference in the integrated effects of sympathetic vasoconstriction and local vasodilation in human skeletal muscle and skin microvasculature. *Physiol. Rep.* **7**, 1–16 (2019).
7. Nabih-Ali, M., El-Dahshan, E. S. A. & Yahia, A. S. A review of intelligent systems for heart sound signal analysis. *J. Med. Eng. Technol.* **41**, 553–563 (2017).
8. Seeley, Rod R., Trent D. Stephens, and P. T. *Seeley'S Anatomy And Physiology 6th edition.* (2003).
9. Jamali, A. Study of the influence of different inflow configurations on Computational Fluid Dynamics in mechanical heart valve prostheses. (2017).
10. Lesley, Triscott, J. & Dobbs, B. Secondary Hypertension: Discovering the Underlying Cause. *Am. Fam. Physician* **96**, 453–461 (2017).
11. Flack, J. M. & Adekola, B. Blood pressure and the new ACC/AHA

- hypertension guidelines. *Trends Cardiovasc. Med.* **30**, 160–164 (2020).
12. Sociedade Europeia de Cardiologia. Recomendações de Bolso de 2018 da ESC. *Recom. Bols. da ESC* (2018).
 13. Martin, C. A. & Mcgrath, B. P. White-coat hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **41**, 22–29 (2014).
 14. Muntner, P. *et al.* Measurement of blood pressure in humans: A scientific statement from the american heart association. *Hypertension* vol. 73 (2019).
 15. Monitorização da Hipertensão Arterial. *Sociedade Portuguesa de Hipertensão* https://www.sphta.org.pt/pt/base8_detail/24/92.
 16. Mikael, L. de R. *et al.* Envelhecimento Vascular e Rigidez Arterial. *Arq. Bras. Cardiol.* **109**, 253–258 (2017).
 17. Parati, G. *et al.* European society of hypertension practice guidelines for ambulatory blood pressure monitoring. *J. Hypertens.* **32**, 1359–1366 (2014).
 18. Bloomfield, D. A. & Park, A. Decoding white coat hypertension. *World J. Clin. Cases* **5**, 82 (2017).
 19. CUF. MAPA - Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial. <https://www.cuf.pt/marcacoes/exames/cardiologia-mapa-monitorizacao-ambulatoria-da-pressao-arterial>.
 20. Khazan, E., Anastasia, E., Hough, A. & Parra, D. Pharmacist-managed ambulatory blood pressure monitoring service. *Am. J. Heal. Pharm.* **74**, 192–195 (2017).
 21. Uhlig, K., Patel, K., Ip, S., Kitsios, G. D. & Balk, E. M. Self-Measured Blood Pressure Monitoring in the Management of Hypertension. *Ann. Intern. Med.* **159**, 185 (2013).
 22. Anstey, D. E., Moise, N., Kronish, I. & Abdalla, M. Masked Hypertension: Whom and How to Screen? *Curr. Hypertens. Rep.* **21**, 19–22 (2019).
 23. DeLalio, L. J., Sved, A. F. & Stocker, S. D. Sympathetic Nervous System

- Contributions to Hypertension: Updates and Therapeutic Relevance. *Can. J. Cardiol.* **36**, 712–720 (2020).
24. Hart, E. C. & Charkoudian, N. Sympathetic neural mechanisms in human blood pressure regulation. *Curr. Hypertens. Rep.* **13**, 237–243 (2011).
 25. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 289, Catechol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Catechol>.
 26. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 439260, Norepinephrine.
 27. Goldstein, D. S. Catecholamines 101. *Clin. Auton. Res.* **20**, 331–352 (2010).
 28. Rodrigues, A. C. Z. *et al.* The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. *Acta Physiol.* **225**, 0–2 (2019).
 29. Kurian, T., Ambrosi, C., Hucker, W., Fedorov, V. V. & Efimov, I. R. Anatomy and electrophysiology of the human AV node. *PACE - Pacing Clin. Electrophysiol.* **33**, 754–762 (2010).
 30. Murphy, C. & Lazzara, R. Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* **46**, 9–18 (2016).
 31. Patel, S., Rauf, A., Khan, H. & Abu-Izneid, T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **94**, 317–325 (2017).
 32. Kurtz, A. How can juxtaglomerular renin-producing cells support the integrity of glomerular endothelial cells? *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **471**, 1161–1162 (2019).
 33. Brown, M. J. Renin: Friend or foe? *Heart* **93**, 1026–1033 (2007).
 34. Romero, C. A. & Carretero, O. A. Tubule-vascular feedback in renal autoregulation. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **316**, F1218–F1226 (2019).

35. Kentaro Trerattanavong; Jiatong Chen. Biochemistry, Renin. *StatPearls* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556056/>.
36. Benigni, A., Cassis, P. & Remuzzi, G. Angiotensin II revisited: New roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol. Med.* **2**, 247–257 (2010).
37. Seccia, T. M., Caroccia, B., Maiolino, G., Cesari, M. & Rossi, G. P. Arterial Hypertension, Aldosterone, and Atrial Fibrillation. *Curr. Hypertens. Rep.* **21**, (2019).
38. Repetto, H. A. Hormona antidiurética, 2014. *Arch. Argent. Pediatr.* **12**, 153–159 (2014).
39. Souilhol, C. *et al.* Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 52–63 (2020).
40. Baeyens, N., Bandyopadhyay, C., Coon, B. G., Yun, S. & Schwartz, M. A. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *J. Clin. Invest.* **126**, 821–828 (2016).
41. Saqr, K. M. *et al.* Physiologic blood flow is turbulent. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
42. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **114**, 1852–1866 (2014).
43. Guo, L. *et al.* CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 1106–1124 (2018).
44. Rahman, M. S. & Woollard, K. Atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1003**, 121–144 (2017).
45. Herbin, O. *et al.* Monocyte adhesion and plaque recruitment during atherosclerosis development is regulated by the adapter protein chat-H/SHEP1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1791–1801 (2016).
46. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V.

- & Orekhov, A. N. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* **95**, 1153–1165 (2017).
47. Badimon, L. & Vilahur, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* **276**, 618–632 (2014).
48. Magenta, A. *et al.* Atherosclerotic plaque instability in carotid arteries: MiR-200c as a promising biomarker. *Clin. Sci.* **132**, 2423–2436 (2018).
49. Kern, R., Szabo, K., Hennerici, M. & Meairs, S. Characterization of Carotid Artery Plaques Using Real-time Compound B-mode Ultrasound. *Stroke* **35**, 870–875 (2004).
50. Dilsizian, V. & Jadvar, H. Science to practice: Does FDG differentiate morphologically unstable from stable atherosclerotic plaque? *Radiology* **283**, 1–3 (2017).
51. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* **451**, 914–918 (2008).
52. Dildar Konukoglu; Hafize Uzun. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Panminerva Med.* **54**, 39–44 (2012).
53. Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S. & Zuckerbraun, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit. Care Clin.* **36**, 307–321 (2020).
54. Napoli, C. & Ignarro, L. J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 1103–1108 (2009).
55. Düsing, R. Treatment Targets in Hypertension. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **142**, 1420–1429 (2017).
56. Mahmood, S. *et al.* Non-pharmacological management of hypertension: in the light of current research. *Defin. Physiol. Princ. Themes, Concepts Cardiovasc. Respir. Ren. Physiol.* 1–187 (2018).
57. Unger, T. *et al.* 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension* **75**, 1334–1357 (2020).
58. Williams, B. *et al.* 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of

- arterial hypertension. European Heart Journal* vol. 39 (2018).
59. Aronow, W. S. Treatment of resistant hypertension. *Future Cardiol.* **16**, 353–356 (2020).
 60. Brunton, L., Lazo, J. & Parker, K. *The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th edition. Side Effects of Drugs Annual* vol. 40 (2006).
 61. Fay, K. S. & Cohen, D. L. Resistant Hypertension in People With CKD: A Review. *Am. J. Kidney Dis.* **77**, 110–121 (2021).
 62. Oparil, S. *et al.* Hypertension. 1–47 (2019).
 63. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity Frequency Measures.
<https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson3/section2.html>.
 64. Mills, K. T., Stefanescu, A. & He, J. The global epidemiology of hypertension. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 223–237 (2020).
 65. WHO - World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs).
[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
 66. Zhou, B. *et al.* Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet* **389**, 37–55 (2017).
 67. Mohsen Ibrahim, M. Hypertension in Developing Countries: A Major Challenge for the Future. *Curr. Hypertens. Rep.* **20**, (2018).
 68. Mills, K. T. *et al.* Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-based Studies from 90 Countries. 1–19 (2016).
 69. Worldometer. Thailand Population. <https://www.worldometers.info/world-population/thailand-population/> (2021).
 70. WHO. Hypertension care in thailand. 1–59 (2019).
 71. Laohasiriwong, W., Puttanapong, N. & Singsalasang, A. Prevalence of hypertension in Thailand: Hotspot clustering detected by spatial analysis.

- Geospat. Health* **13**, 20–27 (2018).
72. WHO - World Health Organization. *NONCOMMUNICABLE DISEASES - COUNTRY PROFILES 2018. Heart of Africa: Clinical Profile of an Evolving Burden of Heart Disease in Africa* (2018).
 73. IHME. IHME country profiles. <http://www.healthdata.org/thailand>.
 74. Thawornchaisit, P. *et al.* Health risk factors and the incidence of hypertension: 4-Year prospective findings from a national cohort of 60 569 Thai Open University students. *BMJ Open* **3**, 1–10 (2013).
 75. McCormack, J., Redburg, R. & Roberts, B. Blood Pressure Medicines for Five Years to Prevent Death, Heart Attacks, and Strokes. *The NNT* www.thennt.com/nnt/anti-hypertensives-to-prevent-death-heart-attacks-and-strokes/ (2014).
 76. Buranakitjaroen, P. Hypertension audit in clinical practice based in Thailand (HABIT). *J. Med. Assoc. Thai.* **94 Suppl 1**, 57–65 (2011).
 77. Montrivade, S. *et al.* Hypertension Subtypes among Thai Hypertensives: An Analysis of Telehealth-Assisted Instrument in Home Blood Pressure Monitoring Nationwide Pilot Project. *Int. J. Hypertens.* **2020**, (2020).
 78. Vallée, A., Safar, M. E. & Blacher, J. Essential hypertension: Definitions, hemodynamic, clinical and therapeutic review. *Press. Medicale* **48**, 19–28 (2019).
 79. Institute for Health Metrics and Evaluation. Data on total and proportional deaths from CVDs, tobacco use and proportion of total tobacco deaths due to CVDs. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.
 80. WHO - World Health Organization. FACTSHEET 2018 THAILAND. *J. Korean Soc. Res. Nicotine Tob.* (2019).
 81. Aungkulanon, S. *et al.* Smoking prevalence and attributable deaths in Thailand: Predicting outcomes of different tobacco control interventions. *BMC Public Health* **19**, 1–11 (2019).
 82. Phetphum, C. & Noosorn, N. Prevalence of secondhand smoke exposure

- at home and associated factors among middle school students in Northern Thailand. *Tob. Induc. Dis.* **18**, 1–8 (2020).
83. NHGRI. Enzyme. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Enzyme>.
 84. Martínez Cuesta, S., Rahman, S. A., Furnham, N. & Thornton, J. M. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys. J.* **109**, 1082–1086 (2015).
 85. Tipton, K. & Boyce, S. History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics* **16**, 34–40 (2000).
 86. Thomas H. Rushmore & A.-N. Tony Kong. Pharmacogenomics, Regulation and Signaling Pathways of Phase I and II Drug Metabolizing Enzymes. *Curr. Drug Metab.* **3**, 481–490 (2005).
 87. Almazroo, O. A., Miah, M. K. & Venkataramanan, R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin. Liver Dis.* **21**, 1–20 (2017).
 88. Klotz, L. O. & Steinbrenner, H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biol.* **13**, 646–654 (2017).
 89. Rekka, E. A., Kourounakis, P. N. & Pantelidou, M. Xenobiotic Metabolising Enzymes: Impact on Pathologic Conditions, Drug Interactions and Drug Design. *Curr. Top. Med. Chem.* **19**, 276–291 (2019).
 90. Croom, E. *Metabolism of xenobiotics of human environments. Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 112 (Elsevier Inc., 2012).
 91. Koppel, N., Rekdal, V. M. & Balskus, E. P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science (80-.).* **356**, 1246–1257 (2017).
 92. Orellana, M. & Guajardo, V. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Rev. Med. Chil.* 85–94 (2004).
 93. Brignac-Huber, L. M., Park, J. W., Reed, J. R. & Backes, W. L.

- Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 1859–1866 (2016).
94. Achour, B., Barber, J. & Rostami-Hodjegan, A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and their intercorrelations: A meta-analysis. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1349–1356 (2014).
 95. Zhang, H. feng *et al.* Variation in the expression of cytochrome P450-related miRNAs and transcriptional factors in human livers: Correlation with cytochrome P450 gene phenotypes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **412**, 115389 (2021).
 96. Xu, C., Li, C. Y.-T. & Kong, A.-N. T. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 249–68 (2005).
 97. Feuk, L., Carson, A. R. & Scherer, S. W. Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 85–97 (2006).
 98. MedlinePlus. What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)? <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/genomicresearch/snp/> (2020).
 99. Shastry, B. S. Single Nucleotide Polymorphisms: Impact on Gene Function & Phenotype. *Single Nucleotide Polymorphisms Methods Protoc.* **578**, 1–22 (2009).
 100. D’Onofrio, D. J. & Abel, D. L. Redundancy of the genetic code enables translational pausing. *Front. Genet.* **5**, 1–16 (2014).
 101. Zhang, Z., Miteva, M. A., Wang, L. & Alexov, E. Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput. Math. Methods Med.* **2012**, (2012).
 102. Ramírez-Bello, J. & Jiménez-Morales, M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac. Med. Mex.* **153**, 238–250 (2017).
 103. Prabhakar, N. R. & Semenza, G. L. Oxygen sensing and homeostasis.

- Physiology* **30**, 340–348 (2015).
104. Choudhry, H. & Harris, A. L. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab.* **27**, 281–298 (2018).
 105. Yang, S. L., Wu, C., Xiong, Z. F. & Fang, X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol. Med. Rep.* **12**, 2411–2416 (2015).
 106. Ebersole, J. L. *et al.* Hypoxia Inducible Transcription Factors, HIF1A and HIF2A, Increase in Aging Mucosal Tissues. *Int. J. Lab. Hematol.* (2018).
 107. Bagali, S., A. Hadimani, G., S. Biradar, M. & K. Das, K. Introductory Chapter: Primary Concept of Hypoxia and Anoxia. *Hypoxia and Anoxia* 3–12 (2018).
 108. Chen, C. & Lou, T. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **8**, 46691–46703 (2017).
 109. Wu, D., Potluri, N., Lu, J., Kim, Y. & Rastinejad, F. Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature* **524**, 303–308 (2015).
 110. Polonikov, A. V. *et al.* A comprehensive contribution of genes for aryl hydrocarbon receptor signaling pathway to hypertension susceptibility. *Pharmacogenet. Genomics* **27**, 57–69 (2017).
 111. Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. & Coumoul, X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open* **7**, 1–9 (2018).
 112. Moorthy, B., Chu, C. & Carlin, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: From metabolism to lung cancer. *Toxicol. Sci.* **145**, 5–15 (2015).
 113. Zhang, C. *et al.* Role of polycyclic aromatic hydrocarbons as a co-factor in human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *BMC Cancer* **19**, 1–10 (2019).
 114. Kudo, I. *et al.* The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex. *J. Biochem.* **163**, 223–232 (2018).
 115. Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.* **338**, 311–317 (2005).
116. Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. & Hankinson, O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science (80-.)*. **256**, 1193–1195 (1992).
 117. Seok, S. H. *et al.* Structural hierarchy controlling dimerization and target DNA recognition in the AHR transcriptional complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 5431–5436 (2017).
 118. Watanabe, Y. *et al.* Prediction of three-dimensional structures and structural flexibilities of wild-type and mutant cytochrome P450 1A2 using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* **68**, 48–56 (2016).
 119. Watanabe, Y. *et al.* Effect of the Arg456His mutation on the three-dimensional structure of cytochrome P450 1A2 predicted by molecular dynamics simulations. *J. Phys. Conf. Ser.* **1136**, (2018).
 120. Sakurai, S., Shimizu, T. & Ohto, U. The crystal structure of the AhRR–ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **292**, 17609–17616 (2017).
 121. Harper, P. A., Wong, J. M. Y., Lam, M. S. M. & Okey, A. B. Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 161–187 (2002).
 122. Haarmann-Stemann, T. & Abel, J. The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): Structure, expression, and function. *Biol. Chem.* **387**, 1195–1199 (2006).
 123. SNP Database. ARNT rs2228099.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2228099>.
 124. Zhou, S. F., Wang, B., Yang, L. P. & Liu, J. P. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab. Rev.* **42**, 268–354 (2010).
 125. Simon, S. D. Understanding the odds ratio and the relative risk. *J. Androl.* **22**, 533–536 (2001).

126. Andrade, C. Understanding relative risk, odds ratio, and related terms: As simple as it can get. *J. Clin. Psychiatry* **76**, e857–e861 (2015).
127. UniProt. Cytochrome P450 1A2. <https://www.uniprot.org/uniprot/P05177>.
128. Badawi, A. F., Cavalieri, E. L. & Rogan, E. G. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16 α -hydroxylation of 17 β -estradiol. *Metabolism*. **50**, 1001–1003 (2001).
129. Lee, A. J., Cai, M. X., Thomas, P. E., Conney, A. H. & Zhu, B. T. Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms. *Endocrinology* **144**, 3382–3398 (2003).
130. Koonrungsesomboon, N., Khatsri, R., Wongchompoo, P. & Teekachunhatean, S. The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* **18**, 760–768 (2018).
131. Gunes, A. & Dahl, M. L. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: Influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* **9**, 625–637 (2008).
132. The Human Protein Atlas. CYP1A2 tissue expression. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140505-CYP1A2/tissue>.
133. Wei, C., Caccavale, R. J., Kehoe, J. J., Thomas, P. E. & Iba, M. M. CYP1A2 is expressed along with CYP1A1 in the human lung. *Cancer Lett.* **171**, 111 (2001).
134. National Center for Biotechnology Information. CYP1A2 rs762551. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs762551>.
135. Sachse, C., Brockmüller, J., Bauer, S. & Roots, I. Functional significance of a C→A polymorphism in intron I of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **47**, 445–449 (1999).
136. Djordjevic, N. of C. by heavy coffee consumption is associated with the C.-163C>A polymorphism, Ghotbi, R., Jankovic, S. & Akillu, E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 -

- 163C>A polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **66**, 697–703 (2010).
137. SelfDecode. CYP1A2 -163C>A. <https://selfdecode.com/snp/rs762551/>.
138. Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E. & Brown, R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* **60**, 71–80 (2013).
139. Pulimeno, M., Piscitelli, P., Colazzo, S., Colao, A. & Miani, A. Indoor air quality at school and students' performance: Recommendations of the UNESCO Chair on Health Education and Sustainable Development & the Italian Society of Environmental Medicine (SIMA). *Heal. Promot. Perspect.* **10**, 169–174 (2020).
140. Ravindra, K., Sokhi, R. & Van Grieken, R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* **42**, 2895–2921 (2008).
141. Wild, S. R. & Jones, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* **88**, 91–108 (1995).
142. Zeligler, H. I. Lipophilic chemical exposure as a cause of cardiovascular disease. *Interdiscip. Toxicol.* **6**, 55–62 (2013).
143. Holme, J. A., Brinchmann, B. C., Refsnes, M., Låg, M. & Øvrevik, J. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* **18**, 1–18 (2019).
144. Pope, C. A. *et al.* Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated with Endothelial Injury and Systemic Inflammation. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2018).
145. Forchhammer, L. *et al.* Expression of adhesion molecules, monocyte interactions and oxidative stress in human endothelial cells exposed to wood smoke and diesel exhaust particulate matter. *Toxicol. Lett.* **209**, 121–128 (2012).
146. Bradley, J. M., Cryar, K. A., El Hajj, M. C., El Hajj, E. C. & Gardner, J. D.

- Exposure to diesel exhaust particulates induces cardiac dysfunction and remodeling. *J. Appl. Physiol.* **115**, 1099–1106 (2013).
147. Dini, F. L. *et al.* Left Ventricular Mass and Thickness: Why Does It Matter? *Heart Fail. Clin.* **15**, 159–166 (2019).
148. Mayati, A. & Eric Le Ferrec. Aryl Hydrocarbon Receptor-Independent Up-Regulation of Intracellular Calcium Concentration by Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Endothelial HMEC-1 Cells. *Env. Toxicol.* **27**, 18 (2012).
149. Mayati, A. *et al.* Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a β 2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 4041–4052 (2012).
150. Mayati, A. *et al.* Benzo(a)pyrene triggers desensitization of β 2-adrenergic pathway. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
151. Anazawa, T. *et al.* Effect of exposure to cigarette smoke on carotid artery intimal thickening: The role of inducible NO synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1652–1658 (2004).
152. Eckers, A. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor promotes aging phenotypes across species. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
153. National Center for Biotechnology Information. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15625>.
154. Zhang, N. The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **2**, 91–95 (2011).
155. Kim, J. B. *et al.* TCF21 and the environmental sensor aryl-hydrocarbon receptor cooperate to activate a pro-inflammatory gene expression program in coronary artery smooth muscle cells. *PLoS Genet.* **13**, 1–29 (2017).
156. Sato, S. *et al.* Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through

- the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229**, 10–19 (2008).
157. Vogel, C. F. A. *et al.* Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1536–1541 (2005).
158. National Center for Biotechnology Information. 1-Nitropyrene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21694>.
159. Mayati, A. *et al.* Calcium signaling and β 2-adrenergic receptors regulate 1-nitropyrene induced CXCL8 responses in BEAS-2B cells. *Toxicol. Vitro.* **28**, 1153–1157 (2014).
160. National Center for Biotechnology Information. Benzo[a]pyrene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2336>.
161. Burstyn, I. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons and fatal ischemic heart disease. *Epidemiology* **16**, 744–750 (2005).
162. Friesen, M. C. *et al.* Chronic and acute effects of coal tar pitch exposure and cardiopulmonary mortality among aluminum smelter workers. *Am. J. Epidemiol.* **172**, 790–799 (2010).
163. Jacobs, L. *et al.* Acute changes in pulse pressure in relation to constituents of particulate air pollution in elderly persons. *Environ. Res.* **117**, 60–67 (2012).
164. Aboutabl, M. E., Zordoky, B. N. M. & El-Kadi, A. O. S. 3-Methylcholanthrene and benzo(a)pyrene modulate cardiac cytochrome P450 gene expression and arachidonic acid metabolism in male Sprague Dawley rats. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 1808–1819 (2009).
165. Yang, H. *et al.* Overexpression of Antioxidant Enzymes in ApoE-Deficient Mice Suppresses Benzo(a)pyrene-Accelerated Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **23**, 1–17 (2009).
166. Podechard, N. *et al.* Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* **177**, 130–137 (2008).

167. Curfs, D. M. J. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons induce an inflammatory atherosclerotic plaque phenotype irrespective of their DNA binding properties. *FASEB J.* **19**, 1290–1292 (2005).
168. Knaapen, A. M. *et al.* The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **621**, 31–41 (2007).
169. Gentner, N. J. & Weber, L. P. Intranasal benzo[a]pyrene alters circadian blood pressure patterns and causes lung inflammation in rats. *Arch. Toxicol.* **85**, 337–346 (2011).
170. Podechard, N., Le Ferrec, E., Rebillard, A., Fardel, O. & Lecureur, V. NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc. Res.* **82**, 361–370 (2009).
171. Alhamdow, A. *et al.* Early markers of cardiovascular disease are associated with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
172. National Center for Biotechnology Information. 3-Hydroxybenzo(a)pyrene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25890>.
173. National Center for Biotechnology Information. 3-Hydroxybenz[a]anthracene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/115265>.
174. National Center for Biotechnology Information. Benzo[e]pyrene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9128>.
175. Brinchmann, B. C. *et al.* Evidence of selective activation of aryl hydrocarbon receptor nongenomic calcium signaling by pyrene. *Biochem. Pharmacol.* **158**, 1–12 (2018).
176. National Center for Biotechnology Information. Pyrene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31423>.
177. Janta, R. *et al.* Ambient PM_{2.5}, polycyclic aromatic hydrocarbons and

- biomass burning tracer in Mae Sot District, western Thailand. *Atmos. Pollut. Res.* **11**, 27–39 (2020).
178. Pongpiachan, S., Tipmanee, D., Khumsup, C., Kittikoon, I. & Hirunyatrakul, P. Assessing risks to adults and preschool children posed by PM_{2.5}-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) during a biomass burning episode in Northern Thailand. *Sci. Total Environ.* **508**, 435–444 (2015).
179. Fotiou, S. & Perkins, M. Deciphering the Black Box of Air Pollution Data In Thailand. *United Nations - Economic and Social Commission for Asia and the Pacific* 6 <https://www.unescap.org/blog/deciphering-black-box-air-pollution-data-thailand> (2021).
180. Szyszkowicz, M. The Air Quality Health Index and all emergency department visits. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26**, 24357–24361 (2019).
181. AirNow. Air Quality Index (AQI) Basics. <https://www.airnow.gov/aqi/aqi-basics/>.
182. IQAir. Air quality in Thailand - Air quality index (AQI) and PM_{2.5} air pollution in Thailand. <https://www.iqair.com/thailand>.
183. Aquilante, C. L., Zineh, I., Beitelshes, A. L. & Langae, T. Y. Common laboratory methods in pharmacogenomics studies. *Am. J. Heal. Pharm.* **63**, 2101–2110 (2006).
184. Wang, T. Y., Wang, L., Zhang, J. H. & Dong, W. H. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet. Mol. Res.* **10**, 519–525 (2011).
185. Baumforth, K. R. N., Nelson, P. N., Digby, J. E., O’Neil, J. D. & Murray, P. G. Demystified ... the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* **52**, 1–10 (1999).
186. Ishmael, F. T. & Stellato, C. Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **101**, 437–443 (2008).
187. Vieux, E. E., Kwok, P. Y. & Miller, R. D. Primer design for PCR and

- sequencing in high-throughput analysis of SNPs. *Biotechniques* **32**, 1–4 (2002).
188. Tefferi, A. *et al.* Primer on medical genomics. Part II: Background principles and methods in molecular genetics. *Mayo Clin. Proc.* **77**, 785–808 (2002).
189. Schnell, S. & Mendoza, C. Enzymological considerations for a theoretical description of the quantitative competitive polymerase chain reaction (QC-PCR). *J. Theor. Biol.* **184**, 433–440 (1997).
190. Zhao, G. & Guan, Y. Polymerization behavior of Klenow fragment and Taq DNA polymerase in short primer extension reactions. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **42**, 722–728 (2010).
191. Datta, K. & LiCata, V. J. Thermodynamics of the binding of *Thermus aquaticus* DNA polymerase to primed-template DNA. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5590–5597 (2003).
192. Raeymaekers, L. Basic Principles of Quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.* **15**, 115–122 (2000).
193. Jackson, T. J., Ramaley, R. F. & Meinschein, W. G. *Thermomicrobium*, a new genus of extremely thermophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**, 28–36 (1973).
194. VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619–626 (2008).
195. Ménová, P., Cahová, H., Vrábel, M. & Hocek, M. Synthesis of Base-Modified dNTPs Through Cross-Coupling Reactions and Their Polymerase Incorporation to DNA. *Methods Mol. Biol.* **1973**, 39–57 (2019).
196. Common stock solutions, buffers, and media. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **Appendix 2**, 1–13 (2001).
197. Schmidt, G., Stiverson, J., Angen, Ø. & Yu, Z. Number of PCR Cycles and Magnesium Chloride Concentration Affect Detection of tet Genes

- Encoding Ribosomal Protection Proteins in Swine Manure. *Adv. Microbiol.* **04**, 780–787 (2014).
198. Medrano, R. F. V. & De Oliveira, C. A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol. Biotechnol.* **56**, 599–608 (2014).
199. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* 1–5 (2012).
200. Kraus, J. & Wolter, F. Electrophoresis: Past, Present and Future. 1–6 (2009).
201. Slater, G. W. DNA gel electrophoresis: The reptation model(s). *Electrophoresis* **30**, (2009).
202. Slater, G. W. *et al.* Theory of DNA electrophoresis (~ 1999-2002 1/2). *Electrophoresis* **23**, 3791–3816 (2002).
203. Pasciak, P., Krawczyk, M. J., Gudowska-Nowak, E. & Kulakowski, K. Diffusion of DNA molecules in gel at high electric fields. *J. Biol. Phys.* **31**, 365–373 (2005).
204. Koontz, L. *Agarose gel electrophoresis. Methods in Enzymology* vol. 529 (Elsevier Inc., 2013).
205. Hill, R. J. Electrokinetics of nanoparticle gel-electrophoresis. *Soft Matter* **12**, 8030–8048 (2016).
206. Promega Corporation. Certificate of Analysis GoTaq® Flexi DNA Polymerase. 4–5 (2012).
207. Johansson, B. G. Agarose gel electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **29**, 7–19 (1972).
208. Armstrong, J. A. & Schulz, J. R. Agarose gel electrophoresis. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* **2015**, 7.2.1-7.2.22 (2015).
209. Szybalski, W., Kim, S. C., Hasan, N. & Podhajski, A. J. Class-II restriction enzymes - a review. *Gene* **100**, 13–26 (1991).

210. Hashim, H. O. & Al-Shuhaib, M. B. S. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *J. Appl. Biotechnol. Reports* **6**, 137–144 (2019).
211. Sidstedt, M. *et al.* Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 2569–2583 (2018).
212. Tamura, K. & Aotsuka, T. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.* **26**, 815–819 (1988).
213. NZYTech. GreenSafe Premium: Product Details. 0–1 (2020).
214. Taylor, P. D. Allele-Frequency Change in a Class-Structured Population. *Am. Nat.* **135**, 95–106 (1990).
215. Nature Education. Allele Frequency.
<https://www.nature.com/scitable/definition/allele-frequency-298/> (2014).
216. Nature Education. Hardy-Weinberg Equation.
<https://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equation-299/> (2014).
217. Stark, A. E. & Seneta, E. A reality check on hardy-weinberg. *Twin Res. Hum. Genet.* **16**, 782–789 (2013).
218. Mayo, O. A Century of Hardy – Weinberg Equilibrium. **11**, 249–256 (2021).
219. Nature Education. Hardy-Weinberg Equilibrium.
<https://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equilibrium-122/> (2014).
220. Trikalinos, T. A., Salanti, G., Khoury, M. J. & Ioannidis, J. P. A. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am. J. Epidemiol.* **163**, 300–309 (2006).
221. Edwards, A. W. F. G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics* **179**, 1143–1150 (2008).

222. Martina, A. *et al.* Selected genetic polymorphisms associated with hypoxia and multidrug resistance in monoclonal gammopathies patients. *Klin. Onkol.* **31**, 213–229 (2018).
223. Hung, W. T., Lambert, G. H., Huang, P. W., Patterson, D. G. & Guo, Y. L. Genetic susceptibility to dioxin-like chemicals' induction of cytochrome P4501A2 in the human adult linked to specific AhRR polymorphism. *Chemosphere* **90**, 2358–2364 (2013).
224. Ayelet Ziv-Gal *et al.* Genetic polymorphisms in the aryl hydrocarbon receptor–signaling pathway and sleep disturbances in middle-aged women. *Sleep Med.* **14**, 883–887 (2013).
225. Fujisawa, T. X. *et al.* Association of Aryl hydrocarbon receptor-related gene variants with the severity of autism spectrum disorders. *Front. Psychiatry* **7**, 1–8 (2016).
226. Siokas, V. *et al.* CYP1A2 rs762551 polymorphism and risk for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Sci.* **42**, 175–182 (2021).
227. Siokas, V. *et al.* CYP1A2 rs762551 and ADORA2A rs5760423 Polymorphisms in Patients with Blepharospasm. *J. Mol. Neurosci.* **70**, 1370–1375 (2020).
228. Guest, N., Corey, P., Vescovi, J. & El-Soheemy, A. *Caffeine, CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. Medicine and Science in Sports and Exercise* vol. 50 (2018).
229. Song, Y. L., Wang, L., Ren, J. C. & Xu, Z. H. CYP1A2-163C/A (rs762551) polymorphism and bladder cancer risk: a case-control study. **15**, (2016).
230. Grgic, J. *et al.* CYP1A2 genotype and acute effects of caffeine on resistance exercise, jumping, and sprinting performance. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **17**, 1–11 (2020).
231. Tsepokina, A., Shmulevich, S., Ponasenko, A. & Shabaldin, A. Genetic predisposition to the development of congenital heart diseases: Role of xenobiotic biotransformation genes. *Birth Defects Res.* **113**, 579–588 (2021).

232. Simonsson, M. *et al.* CYP1A2 - a novel genetic marker for early aromatase inhibitor response in the treatment of breast cancer patients. *BMC Cancer* **16**, 1–12 (2016).
233. Rojo, M. *et al.* Functionally Significant Coumarin-Related Variant Alleles and Time to Therapeutic Range in Chilean Cardiovascular Patients. *Clin. Appl. Thromb.* **26**, (2020).
234. Al-Eitan, L. N., Rababa’H, D. M., Alghamdi, M. A. & Khasawneh, R. H. Association of CYP gene polymorphisms with breast cancer risk and prognostic factors in the Jordanian population. *BMC Med. Genet.* **20**, 1–12 (2019).
235. Guessous, I. *et al.* Caffeine intake and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake protect non-smokers from hypertension. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3283–3292 (2012).
236. Ishii, M., Ishii, Y., Nakayama, T., Takahashi, Y. & Asai, S. 13C-caffeine breath test identifies single nucleotide polymorphisms associated with caffeine metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **35**, 321–328 (2020).
237. Trujillo-Paolillo, A., Salinas-Souza, C., Dias-Oliveira, I., Petrilli, A. S. & Toledo, S. R. C. CYP Genotypes Are Associated with Toxicity and Survival in Osteosarcoma Patients. *J. Adolesc. Young Adult Oncol.* **9**, 621–627 (2020).
238. Grimes, D. A. & Schulz, K. F. Cohort studies: Marching towards outcomes. *Lancet* **359**, 341–345 (2002).
239. SUSANA M. FERNANDES & ANTÓNIO VAZ CARNEIRO. Tipos de Estudos Clínicos II: Estudos de Coorte. *Rev Port Cardiol* **24**, 1151–1158 (2005).
240. Asayut, N., Sookaneknun, P., Chaiyasong, S. & Saramunee, K. Outcomes, costs and stakeholders’ perspectives associated with the incorporation of community pharmacy services into the National Health Insurance System in Thailand: a systematic review. *Int. J. Pharm. Pract.* **26**, 16–27 (2018).