

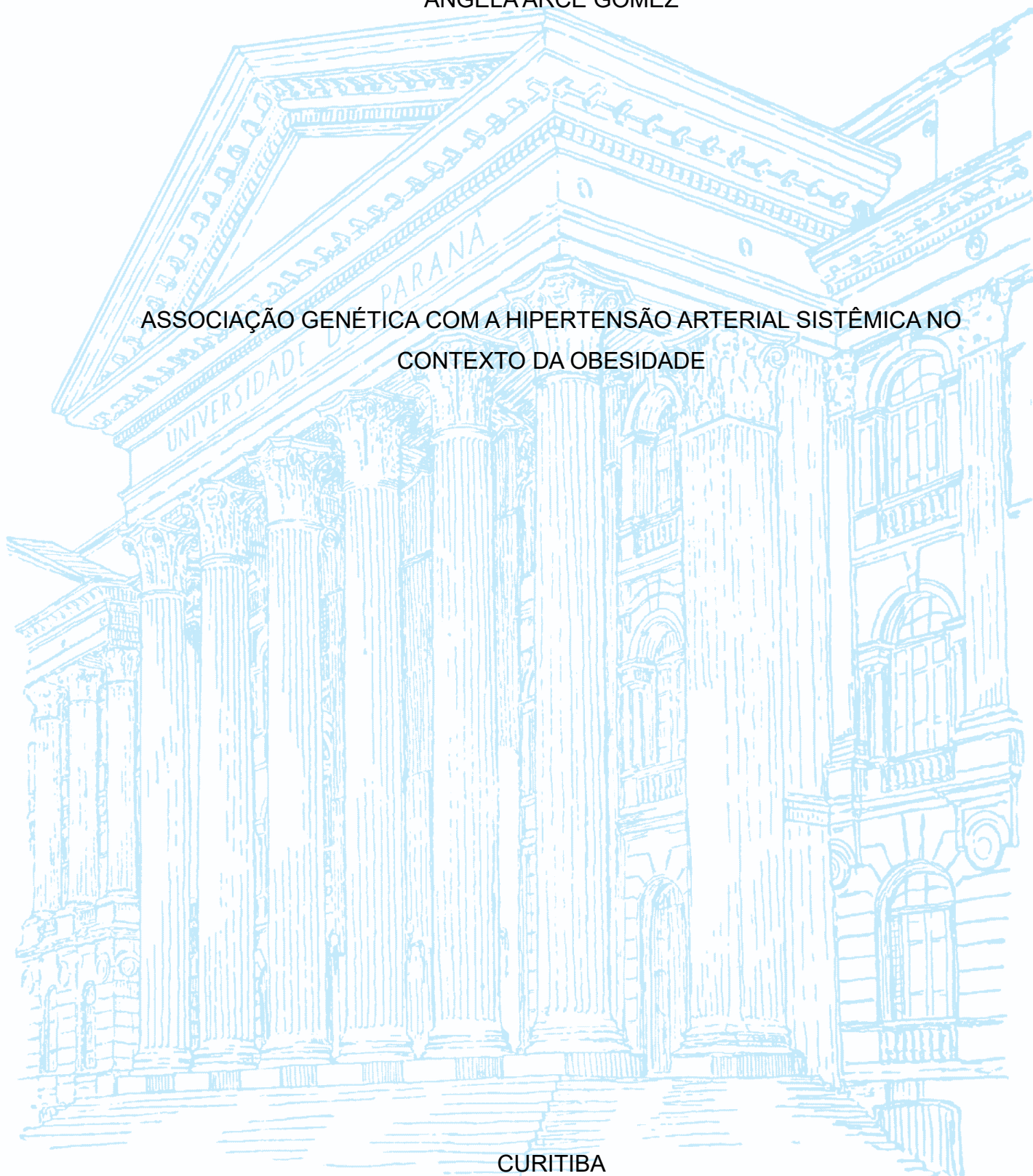
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA ARCE GOMEZ

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA NO
CONTEXTO DA OBESIDADE

CURITIBA

2023



ANGELA ARCE GOMEZ

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA NO
CONTEXTO DA OBESIDADE

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Drª Angelica Beate Winter Boldt

Coorientadora: Profª Drª Valéria Bumiller-Bini Hoch

CURITIBA

2023

TERMO DE APROVAÇÃO

ANGELA ARCE GOMEZ

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA NO CONTEXTO DA OBESIDADE

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.



Prof. Dr. Angelica B. W. Boldt

Genética - UFPR

Matrícula 203621

Prof^a Dr^a Angelica Beate Winter Boldt

Orientadora – Departamento de Genética, UFPR



Prof^a Dr^a Valéria Bumiller-Bini Hoch

Coorientadora – Departamento de Genética, UFPR

Curitiba, 06 de julho de 2023.

Esse trabalho é dedicado ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos pelo apoio, sem ele não seria possível essa longa caminhada.

Professora Dra. Angelica, pelas aulas inspiradoras de epigenética, Dra. Valéria, pela paciência, Dr. Eduardo pela ajuda essencial com a análise dos dados e Mestranda Priscila por todo o treinamento e acompanhamento nas práticas laboratoriais.

Dani, irmã e referência, Tide, companheiro da vida, Lissandra amiga dentro e fora da universidade.

E especialmente a minha mãe(*in memoriam*) Beatriz e meu pai Bento.

isso de querer
ser exatamente aquilo
que a gente é
ainda vai
nos levar além.

(PAULO LEMINSKI, 1989, 81.)

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição multifatorial, geralmente assintomática, que pode causar lesões arteriais, cerebrais e renais. No Brasil, afeta 56 milhões de adultos e a taxa de mortalidade, em 2021, era de 18,7 por 100 mil habitantes. Quando associada às doenças cardiovasculares, que são a principal causa de óbitos no Brasil, aumentam em 2,5 vezes a mortalidade. Os mecanismos da hipertensão essencial, que representa 95% dos casos de hipertensão, ainda não são totalmente compreendidos, no entanto, é sabidamente influenciada pela obesidade. A população menonita, por apresentar homogeneidade genética fornece modelo genético ideal para estudo, neste caso, de variantes relacionadas à hipertensão na presença de sobrepeso ou obesidade. Neste estudo foram analisados 138 indivíduos de Colônia Nova-RS, Witmarsun-PR e Curitiba-PR, com exomas sequenciados na plataforma illumina hiSeq, onde 49 eram obesos ou com sobrepeso e hipertensos e 89, eram obesos ou com sobrepeso sem hipertensão. Foi aplicado questionário adaptado da Pesquisa Nacional de Saúde 2013, com ênfase no histórico familiar de doenças complexas (ampliado a partir do módulo Q) e medições biométricas. Foram identificados 39 SNPs associados à hipertensão, destes, 9 apresentavam expressão diferencial em tecidos relacionados à hipertensão, sendo que 6 estavam associados ao aumento de predisposição a desenvolver hipertensão e 3 associados ao possível efeito protetivo em relação à hipertensão. As 9 variantes estão associadas a diferenças na expressão dos genes, na artéria aorta. Estes resultados, para serem validados, devem ser confrontados com número amostral maior e incluindo a população miscigenada brasileira.

Palavras-chave: Hipertensão Arterial Sistêmica; Obesidade; Sobrepeso; Síndrome Metabólica; Menonitas; População; Paranaense.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension is a multifactorial condition, usually asymptomatic, which can cause arterial, brain and kidney damage. In Brazil, it affects 56 million adults and the mortality rate, in 2021, was 18.7 per 100,000 inhabitants. When associated with cardiovascular diseases, which are the main cause of death in Brazil, they increase mortality by 2.5 times. The mechanisms of essential hypertension, which accounts for 95% of cases of hypertension, are still not fully understood, however, it is known to be influenced by obesity. The Mennonite population, due to its genetic homogeneity, provides an ideal genetic model for the study, in this case, of variants related to hypertension in the presence of overweight or obesity. In this study, 138 individuals from Colônia Nova-RS, Witmarsun-PR and Curitiba-PR were analyzed, with exomes sequenced on the illumina hiSeq platform, where 49 were obese or overweight and hypertensive and 89 were obese or overweight without hypertension. A questionnaire adapted from the 2013 National Health Survey was applied, with emphasis on family history of complex diseases (extended from the Q module) and biometric measurements. A total of 39 SNPs associated with hypertension were identified, of which 9 had differential expression in tissues related to hypertension, 6 of which were associated with an increased predisposition to develop hypertension and 3 associated with a possible protective effect in relation to hypertension. The 9 variants had repercussions, in different gradients, in the aorta artery. These results, to be validated, must be confronted with a larger sample number and including the mixed Brazilian population.

Keywords: Systemic Arterial Hypertension; Obesity; Overweight; Metabolic Syndrome; Mennonites; Paraná population.

TABELA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: TAXA DE MORTALIDADE POR HIPERTENSÃO ARTERIAL NO
PARANÁ.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTENSÃO.....	23
Tabela 2: VALORES DE REFERÊNCIA-GORDURA CORPORAL.....	25
Tabela 3: CLASSIFICAÇÃO E RISCO DA OBESIDADE.....	26
Tabela 4: OBESIDADE NO BRASIL.....	26
Tabela 5: MENONITAS*.....	33
Tabela 6: ASSOCIAÇÕES UNIVARIADAS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL, NA PRESENÇA DE SOBREPESO/ OBESIDADE.....	35
Tabela 7: ASSOCIAÇÕES MULTIVARIADAS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL NA PRESENÇA DE SOBREPESO/ OBESIDADE.....	36
Tabela 8: GENES E SNPs ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO.....	37
Tabela 9: SNPs ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO NA POPULAÇÃO MENONITA, NA PRESENÇA DE OBESIDADE OU SOBREPESO, E SUA ASSOCIAÇÃO À EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM TECIDOS RELACIONADOS A HIPERTENSÃO. .	39
Tabela 10: SNPs ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO NA POPULAÇÃO MENONITA, NA PRESENÇA DE OBESIDADE OU SOBREPESO, EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM TECIDOS RELACIONADOS À HIPERTENSÃO PRESENTE.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BalbC	- linhagem de camundongo albino
CON	- Colônia Nova
CWB	- Curitiba
CWI	- Colônia Witmarsum
DAC	- Doença Arterial Coronária
DALYs	- anos de vida ajustados para incapacidade
DAOP	- Doença Arterial Obstrutiva Periférica
DCNT	- Doenças Crônicas não Transmissíveis
DCV	- Doenças cardiovasculares
DM	- Diabetes Mellitus
DRC	- Doença Renal Crônica
HAS	- Hipertensão Arterial
HP	- Hiperaldosteronismo Primário
HW	- Hardy-Weinberg
IAM	- Infarto Agudo do Miocárdio
IC	- Insuficiência Cardíaca
IC 95%	- Índice de Confiança 95%
IMC	- Índice de Massa Corporal
Kg	- Quilograma
kg/m ²	- Quilograma por Metro Quadrado
LGMH	- Laboratório de Genética Molecular Humana
m _d	- Mediana
NCEP	- National Cholesterol Education Program
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PA	- Pressão Arterial
PAS	- Pressão Arterial Sistólica
RPKM	- Reads per kilo Base per Million Mapped Reads
rpm	- Rotação por Minuto
SM	- Síndrome Metabólica
SRA	- Sistema Renina-Angiotensina
SNP	- Single Nucleotide Polimorphism

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 JUSTIFICATIVA.....	19
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.2.1 Objetivos específicos.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS).....	22
2.2 OBESIDADE.....	24
2.4 MENONITAS E SUL-BRASILEIROS.....	26
2.3 REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.2 QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	30
3.3 COLETA DE DADOS BIOMÉTRICOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	30
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA.....	31
3.5 TIPAGEM GÊNICA.....	31
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição multifatorial, normalmente de herança poligênica, sensível a mecanismos epigenéticos e correlacionada positivamente à obesidade (ABESO), mas que também ocorre em sua ausência, que pode causar lesões arteriais, cerebrais e renais, caracterizada por elevação persistente da pressão arterial (PA), ou seja, pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg, medida com a técnica correta, em, pelo menos, duas ocasiões diferentes, na ausência de medicação anti-hipertensiva (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2020). No levantamento global publicado em 2017 pela revista The Lancet, foi relatado aumento em 28% na ocorrência de doença cardíaca hipertensiva, responsável por 893 mil mortes em 2016. (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2020). Outro estudo de tendência mundial sobre a HAS no período de 1975 à 2015, avaliou 19,1 milhões de adultos, e estimou um aumento de 90 % da patologia ao longo do período, principalmente nos países de baixa e média rendas. Os fatores associados a esse acréscimo são o envelhecimento da população e a maior exposição a outros fatores de risco. (MILLS, 2016; NCD-RisC, 2017). Atualmente, a HAS é um dos maiores problemas mundiais de saúde, com altos custos hospitalares. Dados da pesquisa de risco global da hipertensão estima que em 2025 haja 1,6 bilhão de pacientes no mundo. A hipertensão arterial é responsável por 10% de todo o custo global de saúde, com um gasto estimado em US\$ 370 bilhões de dólares por ano (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2016).

No Brasil, a HAS afeta em média 26,3% (56 milhões) dos adultos, e mais de 60% dos idosos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022), que teve como fonte dados da Pesquisa Nacional de Saúde, onde, em 2019, 26,4% das mulheres e 21,10% dos homens tinham diagnóstico médico autorreferido de hipertensão. Desde 2005 a doença isquêmica do coração e a doença cardiovascular são as principais causas de óbito no Brasil. (LINHA GUIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL-PR, 2018). Estudo transversal que analisou dados da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 observou risco aumentado, em até 2,4 vezes, para ocorrência de doença cardíaca, quando associada à hipertensão. (GONÇALVES, 2019). Em 2017, dados completos e

revisados do DataSUS mostraram a ocorrência de 1.312.663 óbitos totais no Brasil, com um percentual de 27,3% para as doenças cardiovasculares (DCV). A HAS estava associada indiretamente em 45% destas mortes cardíacas e diretamente em 13%. Essas doenças(DCV) representaram 22,6% das mortes prematuras no Brasil (entre 30 e 69 anos de idade). No período de uma década (2008 a 2017), foram estimadas 667.184 mortes atribuíveis à HAS no Brasil. Com relação à tendência do coeficiente de mortalidade por 100.000 habitantes de 2000 a 2018, foi observado um leve aumento no infarto agudo do miocárdio (IAM) e um importante aumento da HAS relatada de forma direta, com incrementos, respectivamente, de 25% e 128% (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL – 2020). Em termos de custos para o SUS, os gastos com HAS excedem os com obesidade e Diabetes Mellitus (DM). Em 2018, estimaram-se gastos de US\$ 523,7 milhões no SUS, com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos. Ao longo da última década, 77% dos custos com hospitalizações no SUS com doença arterial coronária(DAC) são representados por DCV associadas à HAS e aumentaram 32%, em reais, de 2010 a 2019, passando de R\$ 1,6 bilhão para R\$ 2,2 bilhões no período(DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL – 2020). Além do agravar doenças crônicas, a HAS, de maneira indireta impacta na qualidade de vida do paciente e de sua família, já que o indivíduo acaba por ter limitações de trabalho, afetando a renda familiar (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2018).

Os Menonitas compõem um grupo que por questões religiosas passaram a viver em comunidades fechadas levando ao aumento do número de casamentos consanguíneos e consequente aumento na taxa de homozigose. Assim, nesta população é observada maior predisposição à determinadas doenças hereditárias, tornando-os um grupo populacional interessante para estudos genéticos (JAWORSKI *et al.*, 1988; ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002). Em estudo anterior do nosso grupo, sobre a prevalência da HAS nas Populações Menonitas Sul Brasileiras, confirmou-se a associação, mesmo que não totalmente compreendida, entre HAS e obesidade. As taxas de hipertensão na população eram de 35,6% em Colônia Nova, 19,1% em Witmarsum e 16% em Curitiba, a média de IMC de CN era 28,22 kg/m² e ocorrência de obesidade 26,7% (SCHNITZLER TRENTINI, 2018). Espera-se que parte da diferença no índice de prevalência da HAS entre menonitas

seja consequência da distribuição de variantes genéticas, identificáveis por análise de exoma. A identificação desses polimorfismos(SNPs) poderá auxiliar a entender mecanismos da HAS e revelar novos alvos terapêuticos (SILVA, 2019).

1.1 JUSTIFICATIVA

A taxa de mortalidade por hipertensão arterial no Brasil atingiu o maior valor dos últimos dez anos, com a ocorrência de 18,7 óbitos por 100 mil habitantes em 2021 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). A taxa de mortalidade por 100.000 habitantes no Paraná, para hipertensão, em 2016, foi 24,5 (LINHA GUIA DE HIPERTENSÃO PARANÁ, 2020). A hipertensão arterial contribui direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular no Paraná. Para enfrentar as desigualdades na saúde e atender às necessidades da população, o sistema de saúde deve monitorar as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), e os fatores de risco para melhor implementar políticas públicas de saúde equitativas. A população paranaense é formada pela imigração multiétnica europeia, que por questões culturais, permaneceu isolada até parte do século XX (CAMARGO, 2007), por etnias indígenas Kaingang, Guarani e Xetá (REIS *et al.* 2016), afrodescendentes, árabes, japoneses, assim, é de se esperar que hajam particularidades epidemiológicas definidas pela distribuição de variantes genéticas e epigenéticas. É importante apontar que o Estado apresenta uma significativa disparidade na distribuição de renda (IBGE, 2019). Essa desigualdade tem reflexos nos padrões socioculturais de comportamento e nos hábitos alimentares da população.

Na população menonita, observou-se diferenças altamente significativas para a distribuição da intolerância a lactose (EPP-BOSCHMANN *et al.* 2016), doença celíaca, cuja prevalência é a segunda mais elevada do mundo (OLIVEIRA, 2022), dislipidemias (VIEIRA, 2020), câncer de pele não melanoma e de mama na população menonita (WEIHERMANN, 2020 e VILAÇA, 2017) comparando com a prevalência na população neobrasileira. Esta população, que apresenta origem frísia (europeia) e cerca de 500 anos de isolamento genético, além de oferecer

ótimo modelo de estudo, não requer número amostral muito grande devido à homogeneidade genética, consequência do isolamento.

A herança genética claramente desempenha um papel na obesidade, mas os mecanismos precisos estão longe de serem compreendidos e os fatores de risco genéticos são complexos. Eles incluem interações gene-gene, interações gene-ambiente e expressão gênica. (AGNEW,2015).

Por muito tempo, a pressão sanguínea foi conhecida por ser uma característica complexa influenciada por múltiplos fatores genéticos e ambientais (LIFTON, 1996). Sua herdabilidade varia de 30 a 50%, estimada em estudos de família e gêmeos (MIALL,1963). O sucesso inicial no entendimento da arquitetura genética da hipertensão revelou 12 genes que causam um tipo monogênico de hipertensão. Esses genes são membros de duas vias: manipulação renal de sódio e metabolismo de hormônios esteróides, o último dos quais inclui a atividade do receptor mineralocorticóide (EHRET, 2013). A herança da hipertensão monogênica nas famílias segue um padrão claro de segregação e as variantes casuais são tipicamente raras e de grande tamanho de efeito. No entanto, devido às baixas frequências dessas variantes, ainda há uma falta de compreensão clara da hipertensão essencial (PICKERING, 1965), que não tem causa evidente e é responsável por 95% dos casos de hipertensão (CARRETERO, 2000)(ZHENG, 2015).

Portanto, é de grande importância que tais particularidades sejam detectadas e descritas para os genes relacionados com o metabolismo e a HAS, a identificação da predisposição genética poderia auxiliar em estratégias de medicina preventiva e personalizada, de forma a subsidiar estratégias de saúde pública no Brasil (SCHNITZLER TRENTINI, 2018).

1.2 OBJETIVOS

Analisar a associação de variantes genéticas com a susceptibilidade a HAS na presença de obesidade ou sobrepeso na população menonita.

1.2.1 Objetivos específicos

1. Identificar fatores de risco associados a hipertensão arterial na presença da obesidade e sobrepeso, na população menonita sul-brasileira;

2. Identificar variantes genéticas associadas a HAS em indivíduos hipertensos com obesidade ou sobrepeso e indivíduos não hipertensos com obesidade ou sobrepeso, por meio de análise de exomas na população menonita sul-brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

HAS é uma condição multifatorial, normalmente assintomática, onde os níveis pressóricos elevados podem persistir por horas, dias ou períodos mais longos, geralmente definida como uma pressão sistólica igual ou superior a 140 mmHg e/ou pressão diastólica igual ou superior a 90 mmHg em adultos (TABELA 1). Esse aumento do nível pressórico pode ocasionar lesões vasculares de grande, médio e pequeno calibre, assim como lesões em alguns órgãos que recebem maior fluxo de irrigação sanguínea como cérebro e rins (7ª DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2016). A hipertensão é determinada pela resistência vascular periférica aumentada. Entretanto, como a pressão sanguínea é igual ao produto da resistência periférica total pelo débito cardíaco (L/min), elevações prolongadas no débito cardíaco também podem causar hipertensão. Além disso, o volume sanguíneo aumentado também pode causar hipertensão, especialmente em indivíduos com excesso de mineralocorticoides ou insuficiência renal (FRED M. KUSUMOTO, 2007). A hipótese mais aceita é a de que a hipertensão pode ser causada por um desequilíbrio nas interações desses mecanismos (revisto por SILVA, 2019). Ainda na década de 80, Gerald M. Reaven identificou que frequentemente havia associação de hipertensão, alterações na glicose e no colesterol à obesidade, que são critérios para Síndrome Metabólica. E estas, por sua vez, estavam associadas à resistência insulínica. A valorização da presença da Síndrome Metabólica se deu pela constatação de sua relação com doença cardiovascular. Quando presente, a SM está relacionada a uma mortalidade geral cerca de duas vezes maior que na população normal e mortalidade cardiovascular três vezes maior (ISOMAA, 2001).

Também estão associados ao agravamento da hipertensão fatores genéticos e epigenéticos, classificação etária e étnica, ingestão elevada de sódio, potássio e álcool, sedentarismo, tabagismo, estresse psicoemocional, Diabetes Mellitus, além do uso de medicações que podem elevar a PA (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2020). Vale mencionar que em populações isoladas, mesmo nos grupos raciais com maior prevalência de

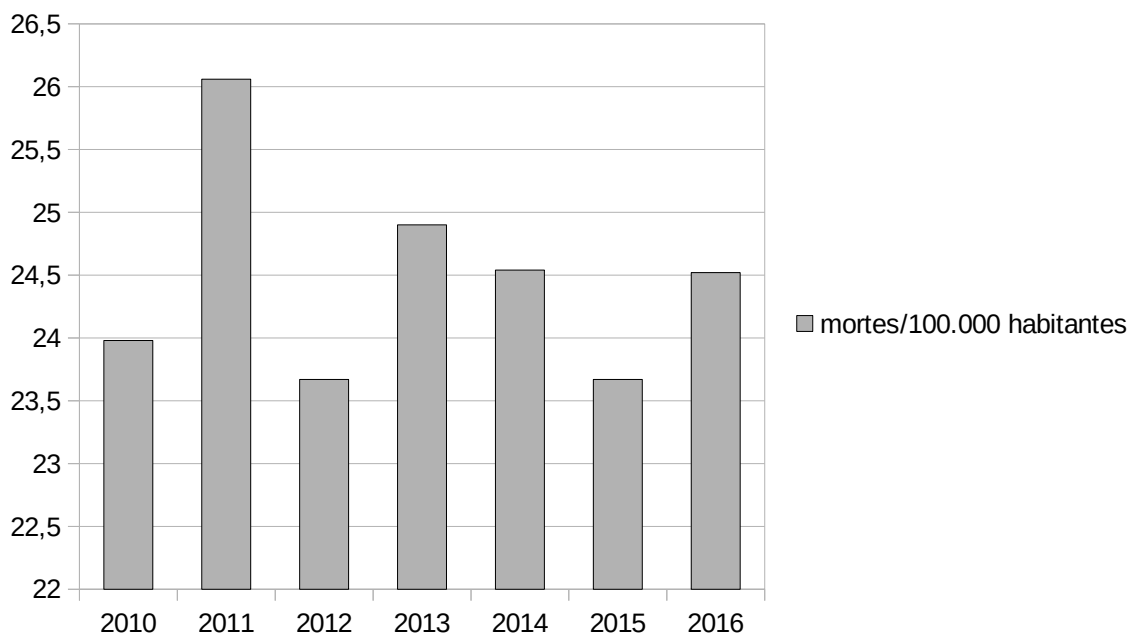
hipertensão, quando a ingestão de sódio é baixa, atividade física regular, a obesidade pouco frequente, os índices de hipertensão arterial são baixos e não há elevação significativa com a idade (VEIGA,1992). A pressão arterial elevada é o principal fator de risco modificável com associação independente, linear e contínua para doenças cardiovasculares (DCV), doença renal crônica (DRC) e óbito precoce. Além disso, apresenta impacto significativo nos custos médicos e socioeconômicos, decorrentes das complicações nos órgãos-alvo, fatais e não fatais, como: coração: doença arterial coronária (DAC), insuficiência cardíaca (IC), fibrilação atrial (FA) e morte súbita; cérebro: acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico (AVEI) ou hemorrágico (AVEH), demência; rins: DRC que pode evoluir para necessidade de terapia dialítica; e sistema arterial: doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL,2020).

Tabela 1: CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTENSÃO

Classificação	PAS(mmHg)	PAD(mmHg)
Normal	≤120	≤80
Pré - Hipertensão	121 - 130	81 - 89
Hipertensão estágio 1	140 - 150	90 - 99
Hipertensão estágio 2	160 - 179	100 - 109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Quando a PAS e a PAD situam-se em categorias diferentes a maior deve ser utilizada para a classificação da PA		
Considera-se hipertensão sistólica isolada se PAS ≥ 140 mm Hg e PAD < 90 mm Hg devendo a mesma ser classificada em estágios 1, 2 e 3 .		

FONTE: LINHA GUIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL - PR, 2018.

GRÁFICO 1: TAXA DE MORTALIDADE POR HIPERTENSÃO ARTERIAL NO PARANÁ.



FONTE: Fonte: SIM-PR base de 30/12/2016. População: 2010, censo IBGE, 2011-2016 estimativas.

2.2 OBESIDADE

O IMC (calculado através da divisão do peso em kg pela altura em metros elevada ao quadrado, kg/m^2) é o cálculo mais usado para avaliação da adiposidade corporal. O IMC é um bom indicador, mas não totalmente correlacionado com a distribuição da gordura corporal. Pode haver diferenças na composição corporal em função do sexo, idade, etnia, prática de atividade física, na presença de perda de estatura em idosos devido a cifose, em edemaciados, etc. O IMC não distingue massa gordurosa de massa magra, podendo ser menos preciso em indivíduos mais idosos, em decorrência da perda de massa magra e diminuição do peso, e superestimado em indivíduos com hipertrofia muscular. A circunferência abdominal, medida de maneira complementar ao IMC para distribuição de gordura, é importante na avaliação de sobrepeso e obesidade, porque a gordura visceral (intra-abdominal) é um fator de risco potencial para a doença cardiovascular, independentemente da gordura corporal total. Indivíduos com o mesmo IMC podem ter diferentes níveis de massa gordurosa visceral. A distribuição de gordura abdominal é claramente

influenciada pelo sexo: para algum acúmulo de gordura corporal, o homem tem, em média, o dobro da quantidade de gordura abdominal em relação à mulher antes da menopausa (Tabela 2). Além disso, o IMC não é indicador do mesmo grau de gordura em populações diversas, particularmente por causa das diferentes proporções corporais. Na população brasileira, tem-se utilizado a tabela proposta pela OMS para classificação de sobrepeso e obesidade (Tabela 3) e seu uso apresenta as mesmas limitações constatadas na literatura. Apresenta, no entanto, semelhante correlação com as comorbidades (SAVVA, 2013). Portanto, o ideal é que o IMC seja usado em conjunto com outros métodos de determinação de gordura corporal. A classificação adaptada pela OMS baseia-se em padrões internacionais desenvolvidos para pessoas adultas descendentes de europeus. Convenciona-se chamar de excesso de peso o IMC maior ou igual a 25 kg/m² (incluindo a obesidade). Os pontos de corte de <16 kg/m² (baixo peso grave), 16,0-16,9 (baixo peso moderado), 17,0-18,4 (baixo peso leve) também fazem parte da classificação internacional, mas não estão detalhados na Tabela 3 (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE 2016).

Tabela 2: VALORES DE REFERÊNCIA-GORDURA CORPORAL

Classificação /idade	18-25	26-35	36-45	46-55	
Excelente	13-17 %	13-18 %	15-19 %	18-22%	MULHERES
Bom	18-23 %	19-23 %	20-26 %	23-28 %	
Aceitável	24-25 %	24-26 %	27-29 %	29-31%	
Acima da média	26-30 %	27-35 %	30-36%	32-38 %	
Risco relacionado à obesidade	> 33 %	> 36 %	> 39 %	> 40 %	
Excelente	4-6%	8-11%	10-14%	12-16%	HOMENS
Bom	8-10%	12-15%	16-18%	18-20%	
Aceitável	14-16%	18-20%	21-23%	24-25%	
Acima da média	17-24%	22-24%	24-29%	26-30%	
Risco relacionado à obesidade	>26%	>28%	>30%	>32%	

FONTE: HAAS, 2016.

Tabela 3: CLASSIFICAÇÃO E RISCO DA OBESIDADE

IMC(KG/M ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/ CLASSE	RISCO DE DOENÇA
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

FONTE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL.

Tabela 4: OBESIDADE NO BRASIL

	Excesso de peso (imc ≥ 25)	Obesidade(imc ≥ 30)
Homens	57,10%	18,70%
Mulheres	53,90%	20,70%
Geral	55,40%	19,80%

FONTE: VIGITEL, 2019.

2.4 MENONITAS E SUL-BRASILEIROS

Os Menonitas são um grupo étnico-religioso Anabatista Cristão, originários da região da Frísia (Países Baixos). O movimento de mudanças na igreja foi iniciado na Suíça em 1525, chamado de reforma anabatista (DÜCK, A. S., 2005). Estes grupos anabatistas compartilham a crença do batismo adulto, são pacifistas e mantêm tradições alemãs, como a culinária, a criação de gado leiteiro, a língua . (PENNER e DÜCK, 1984, 2005). Os Menonitas são assim chamados em homenagem ao reformador anabatista holandês Menno Simons, que os liderou durante os anos iniciais. Devido ao isolamento social da comunidade menonita, houve tendência ao casamento dentro do grupo, resultando em um maior número de alelos em homozigose. Isso, por sua vez, aumentou a expressão de genes recessivos de origem comum com maior frequência (HARTL; CLARK, 2010). Mas, se os casamentos consanguíneos aumentam a probabilidade de homozigose em seus descendentes, está claro, também, que a elevação da taxa desses casamentos poderá perturbar o equilíbrio de Hardy e Weinberg, ao alterar as frequências genotípicas sem modificar as frequências alélicas desse sistema (BEIGUELMAN, 2008). O fenômeno da perda dos ancestrais indica, do ponto de

vista evolutivo, que a fraternidade na espécie humana não é um mero conceito espiritual, mas uma realidade genética (Stern, 1960). Por questões culturais, religiosas e políticas a população sofreu com a intolerância, que resultou em sensível redução populacional, em sucessivos eventos conhecidos como “efeito de gargalo”. Quanto menor a população, mais intensa a deriva genética, resultando em perda de diversidade genética, onde genes com menor frequência tendem a desaparecer e genes com maior frequência tendem a serem fixados (HARTL; CLARK, 2010). O primeiro evento aconteceu no século XVI, Devido aos seus princípios religiosos, vários menonitas da Flandres foram alvo de perseguição e condenados à morte durante a Inquisição espanhola que se estabeleceu naquela região (ANTÔNIA, 2015). Em situação semelhante aos belgas, os menonitas da Holanda refugiaram-se na Prússia, o que hoje é a Polônia. Maske (1999) considera que foi durante os quase 200 anos na Prússia que os menonitas solidificaram a formação de sua identidade como grupo étnico-religioso, e adotaram o Hochdeutsch (alemão) como língua pública do grupo, sem excluir o Plattdeutsch (dialeto formado a partir do alemão e do holandês) da esfera privada. Incorporaram também muitos elementos da cultura alemã. No final do século XVIII a Prússia vivia a apreensão com a agitação política na França às portas da Revolução Francesa de 1789 (PENNER, 1955). Com o controle governamental da Prússia, os colonos menonitas foram impedidos de possuir novas áreas e seus descendentes não tinham mais terras cultiváveis (DYCK, 1992), ocorre o segundo evento entre 1787 e 1868.

Em 1786, Catarina A Grande, czarina russa, convidou os menonitas da Alemanha e da Prússia, conhecidos por seu potencial de trabalho, a ocupar o sul da Rússia e colonizar as grandes estepes do Volga. Em troca, ofereceu terra, auxílio do governo, direito à administração dos próprios bens, isenção do serviço militar e liberdade religiosa (WISOTZKI, 1992).

Já o terceiro evento iniciou-se pela Revolução Russa (1917) e durante o stalinismo(1927-1953), de 60.000 menonitas russos, pelo menos 15.000 foram enviados a *Gulags* siberianos e quase dizimados. Moscou concedeu 6000 autorizações de saída, para os que conseguiram sair legalmente o destino foi Canadá, Brasil e Paraguai, mas dos que não conseguiram, muitos tiveram como fim, morte por fome, frio ou fuzilamento (SALIS, 2020).

No Brasil, aproximadamente 1.200 menonitas chegaram no estado de Santa Catarina em 1930, fundando a Colônia Krauel, porém, devido as adversidades topográficas encontradas na região, eles procuraram outros locais no Brasil para instalação de suas colônias. Em 1931, um grupo de Menonitas passaram a viver na região onde atualmente estão localizados os bairros do Xaxim, Boqueirão e Água Verde/Vila Guaíra na cidade de Curitiba-PR. Em 1949, diversas famílias, principalmente da Colônia do Krauel, foram para o estado do Rio Grande do Sul, onde fundaram a Colônia Nova, nas proximidades da cidade de Aceguá-RS. Já em 1951, 74 famílias, totalizando 455 pessoas, que residiam em Curitiba adquiriram a Fazenda Cancela, no município de Palmeira-PR, onde fundaram a Colônia Witmarsum (PAULS JR, 1980). (revisto por SILVA, 2019). Levantamento feito pela Conferência Mundial Menonita mostra que a população atual menonita no Brasil(mapa global) é de 15.557 num total de 173 congregações. A população sul-brasileira, diferente da menonita, é caracteristicamente miscigenada e foi composta por três principais ondas migratórias (povoamento, colonização e branqueamento) (SANTOS, 2002; PENA *et al.*, 2011). A fase de povoamento ocorreu com as populações nativas americanas, que apresentam origem asiática e vieram por meio de uma única leva de migração através do Estreito de Bering (SALZANO, 2011; CASTRO E SILVA *et al.*, 2019). Já a fase de colonização começa com a chegada dos portugueses a partir de 1500, que iniciaram a miscigenação com os nativos (CUNHA, 1992). Entre os séculos XVI e início do século XIX, aproximadamente 4 milhões, entre homens, mulheres e crianças, do sul e oeste do continente africano foram escravizados e trazidos para o Brasil (IBGE, 2000; SANTOS, 2002). A partir dos anos 1890, diferentes etnias europeias emigraram para substituir a mão-de-obra escravizada no Brasil, e causaram o que foi conhecido como “branqueamento” da população brasileira. Entre 1884 e 1939, foi registrada a chegada de aproximadamente 1 milhão de italianos, além de portugueses, espanhóis, e, em menor número, alemães, poloneses e japoneses (SANTOS, 1997; SANTOS 2002). A miscigenação resultante aumentou o componente genético europeu no sul, que é o mais alto do país (77,7%, comparado a 61% no nordeste), e diminuiu o africano nesta região (13%, comparado a 19% no nordeste). A ancestralidade ameríndia é maior no norte (19,4%), mantendo-se relativamente uniforme nas outras regiões (PENA *et al.*, 2011).

2.3 REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A artéria aorta é a maior e a principal artéria da circulação sistêmica. Esse grande vaso apresenta três porções que são aorta ascendente, arco aórtico e aorta descendente (NASCIMENTO, 2020). Vários sistemas contribuem para a regulação da pressão sanguínea arterial. Um deles, o sistema barorreceptor, é exemplo de mecanismo de controle de ação rápida. Nas paredes da região de bifurcação das artérias carótidas, no pescoço e também no arco da aorta, no tórax, encontram-se vários receptores nervosos, chamados barorreceptores, estimulados pelo estiramento da parede arterial. Quando a pressão arterial sobe demais, os barorreceptores enviam salvas de impulsos nervosos para o tronco cerebral. Esses impulsos inibem o centro vasomotor que, por sua vez, diminui o número de impulsos transmitidos por esse centro, por meio do sistema nervoso simpático, para o coração e vasos sanguíneos. A redução desses impulsos ocasiona a diminuição da atividade de bombeamento do coração e, também, a dilatação dos vasos sanguíneos periféricos, permitindo o aumento do fluxo sanguíneo pelos vasos. Ambos os efeitos diminuem a pressão arterial, trazendo-a de volta ao valor normal. Inversamente, pressão arterial abaixo do normal reduz o estímulo dos receptores de estiramento, permitindo ao centro vasomotor atividade mais alta, causando, assim, vasoconstrição e aumento do bombeamento cardíaco, com elevação da pressão arterial de volta ao normal (HALL, 2011).

As adrenais são glândulas pares e se localizam nos polos superiores dos rins (NASCIMENTO, 2020). A aldosterona é secretada pelas células da zona glomerulosa do córtex adrenal. Os estímulos mais importantes para a aldosterona são concentração de potássio extracelular aumentada e níveis de angiotensina II elevados, o que ocorre, geralmente, em condições associadas à depleção de sódio e de volume ou pressão sanguínea baixa. A secreção aumentada de aldosterona, associada a essas condições, causa retenção de sódio e de água nos túbulos renais, ajudando a aumentar o volume do líquido extracelular e restaurar a pressão sanguínea aos níveis normais (HALL, 2011).

O Sistema Renina-angiotensina (SRA) clássico é uma série de interações enzima-substrato nas quais a proteína substrato angiotensinogênio, secretado pelo fígado é

processada em uma reação de duas etapas pela conversão de renina(rim) e angiotensina enzima (ECA)(pulmão) para produzir hormônios peptídicos funcionais chamados angiotensina I (Ang-I) e angiotensina II (Ang-II), respectivamente. A Ang-II é a molécula mais funcional do SRA e desempenha um papel ativo em muitos processos fisiológicos e patológicos. Aumenta a pressão arterial principalmente por vasoconstrição, inflamação, secreção de vasopressina e aldosterona, estresse oxidativo, proliferação celular e ativação imunológica por meio de receptores tipo I (AT1) da superfície celular. Além disso, a Ang-II contribui para a regulação da pressão arterial modulando o sistema nervoso autônomo nos níveis central e periférico(DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL,2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo transversal entre os menonitas, contou com aprovação ética do projeto “Levantamento Epidemiológico dos Fenótipos e Doenças Complexas Existentes nas Comunidades Menonitas” (protocolos 2.247.952-CAAE 55297916.6.0000.0102), 338 exomas extraídos das colônias Nova (Aceguá-RS), Witmarsum (Palmeira-PR), e Curitiba(CWB). E teve como meta, analisar associação genética com a hipertensão no contexto da obesidade ou sobrepeso em menonitas não miscigenados.

3.2 QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa por divulgação em redes sociais, como instagram e no site do projeto. Após o devido esclarecimento, os participantes responderam questionário adaptado da Pesquisa Nacional de Saúde 2013, com ênfase no histórico familiar de doenças complexas (ampliado a partir do módulo Q), aplicado presencialmente ou preenchido online.

3.3 COLETA DE DADOS BIOMÉTRICOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Na visita pessoal nas próprias residências dos participantes previamente selecionados através de questionário, depois do devido esclarecimento e

consentimento/assentimento, as medidas biométricas individuais de cada participante foram mensuradas, sendo elas preensão palmar, peso, altura, circunferência da cintura, porcentagem de água, massa muscular, óssea e de gordura, e pressão arterial, utilizando dinamômetro digital, balança eletrônica portátil, fita métrica e aparelho de pressão digital. Os resultados foram devolvidos aos participantes, com acompanhamento de nutricionistas envolvidos no projeto, de forma online. Os indivíduos foram convidados a fornecerem duas amostras de sangue: 5 mL de sangue venoso em frasco com EDTA (Ácido Etileno-diaminotetracético) e 3 mL em frasco sem anticoagulante. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, as amostras sem anticoagulante foram subdivididas em 3 alíquotas de soro, e armazenadas a -80°C para utilização da amostra. Já as amostras com EDTA foram subdivididas em plasma e camada leuco-plaquetária, e foram armazenadas a -80°C para utilização da amostra.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue, através de kits comerciais. O DNA foi ressuspendido em água MiliQ e armazenado em freezer -20°C. A quantidade e integridade do DNA foram avaliadas em nanodrop e eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

3.5 TIPAGEM GÊNICA

Os exomas de 338 indivíduos menonitas brasileiros residentes em Colônia Nova, RS (n = 200), Witmarsum/Palmeira (n = 1) e de Curitiba, PR (n = 137) foram sequenciados na plataforma Illumina HiSeq. O sequenciamento foi feito em parceria com os pesquisadores Fabiana L. Lopes e Francis McMahon do *National Institute of Mental Health* e Alan Shuldiner da empresa Regeneron (Estados Unidos da América). Foi mantido o sigilo em relação à identidade dos indivíduos. Para este primeiro agrupamento de exomas, os dados brutos foram convertidos ao formato VCF (*Variant Call Format*) e alinhados ao genoma de referência GRCh38/hg38, a última atualização para o assembly de referência humano (MORALES,2022),

verificando-se a qualidade do sequenciamento por meio do software ForestQC (Li *et al.*, 2019).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos fatores independentemente associados com a presença da hipertensão arterial em indivíduos com sobrepeso ou obesidade utilizou modelos univariados para selecionar variantes com o objetivo de construir um modelo reduzido. Os não-menonitas e menonitas miscigenados foram excluídos das análises. Para a criação de modelos multivariados, foram selecionadas as associações univariadas com valores de p corrigidos $< 0,30$ e utilizou-se o método manual de stepwise (direções: Backward e Forward) para a criação do modelo multivariado, o qual gerou o melhor modelo de regressão multivariada (modelo final). O modelo final de regressão multivariada apresentou as variáveis independentemente associadas com os fenótipos. Estas variáveis massa muscular, idade e autopercepção de saúde foram utilizadas como covariáveis na correção nas análises de associação de variantes genéticas presentes nos exomas da população menonita. A hipótese de distribuição normal entre os grupos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Estas análises foram realizadas na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022) usando os seguintes pacotes: dplyr (WICKMAN *et al.*, 2021) e gtsummary (SJOBERG *et al.*, 2021). Os valores de p corrigidos (p_{corr}) para a múltipla testagem foram ajustados pelo método de “*False discovery rate*” ou FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) usando o pacote stats na linguagem R® 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022). Valores de $p_{corr} < 0,05$ foram considerados significativos.

Para as análises de associação genética caso-controle, cálculos da frequência alélica e do equilíbrio de Hardy-Weinberg o programa PLINK 1.9 (CHANG, C. C. *et al.*, 2015; PURCELL; CHANG, [s. d.]) foi utilizado com os modelos dominante, recessivo e aditivo para cada variante associado. O valor de p foi corrigido utilizando o método de permutação de Monte Carlo pelo programa PLINK 1.9. Nesta análise exploratória, o valor de p corrigido $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A seleção inicial das variantes foi baseada nas vinte

primeiras variantes (Top 20) com menor valor de p para cada modelo (dominante, recessivo e aditivo).

As frequências alélicas da população menonita foram comparadas às de diferentes populações pelo teste exato de Fisher ou teste do qui-quadrado bicaudais. As populações menonita e europeia não-finlandesa foram comparadas para identificar variantes cujas frequências sofreram um possível efeito fundador, em relação a população ancestral. A população finlandesa é excluída por ser considerada geneticamente isolada da europeia (SANTOS,2022). Já a comparação entre as populações menonita e Amish permite identificar efeitos da deriva genética, resultantes dos 300 anos de separação, a partir da população anabatista original. As frequências alélicas das populações europeias não finlandesas (non-FIN EURO) e Amish foram obtidas a partir do site: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (KARCZEWSKI *et al.*, 2020). Já as frequências alélicas da população brasileira foram extraídas do site: <http://abraom.ib.usp.br> (NASLAVSKY *et al.*, 2022). Os testes foram realizados na linguagem R (versão 4.2.2). Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Para análise estatística foram considerados 138 indivíduos menonitas não miscigenados com exoma sequenciado, 89 obesos ou com sobrepeso e 49 obesos ou com sobrepeso e hipertensão. Assim o segmento da população analisado permaneceria na condição de isolamento genético. Em paralelo, foi realizada contagem direta dos casos, para isso, foram considerados indivíduos com dados tanto para peso como hipertensão. (TABELA 5).

Tabela 5: MENONITAS*

Menonitas n = 196	Obesidade + HAS	Sobrepeso + HAS	total (por colônia)	Obesidade sem HAS	Sobrepeso sem HAS	Total (por colônia)
	caso**			controle**		
CON(n=118)*	18 (15,2%)	19 (16%)	37(31,2%)	17 (14,4%)	42 (35,6%)	59(50%)
CWB(n=78)*	3 (3,8%)	9 (11,5%)	12(15,3%)	7 (9%)	23(29,5%)	30(38%)
total (menonitas)	21(10,70%)	28(14,28%)	49(25%)	24(12,24%)	65(33,16%)	89(45,4%)

(n=196)

**Somente foram incluídos indivíduos com exomas onde havia informação concomitante de peso/sobrepeso e HAS.*

*** pode haver variação no número de caso / controle para análise no PLINK.*

FONTE: planilha versão 37.

Foram selecionadas as variáveis associadas à hipertensão na presença de sobrepeso ou obesidade, com p corrigido $< 0,03$, nas regressões logísticas univariadas (TABELA 6).

Com as regressões multivariadas obteve-se um modelo reduzido de variáveis independentes associadas à hipertensão arterial em indivíduos com sobrepeso ou obesidade(TABELA 7). Estas variáveis: massa muscular, idade e autopercepção de saúde foram utilizadas como covariáveis na correção nas análises de associação de variantes genéticas presente nos exomas.

**Tabela 6: ASSOCIAÇÕES UNIVARIADAS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL, NA
PRESENÇA DE SOBREPESO/ OBESIDADE.**

Variável	OR ¹	IC 95% ¹	p	pcorr ²
Índice de massa corporal (IMC)	1.28	1.21, 1.36	<0.001	<0.001
Idade (anos)	1.07	1.05, 1.10	<0.001	<0.001
Massa muscular	0.74	0.66, 0.82	<0.001	<0.001
Porcentagem de gordura corporal	1.11	1.07, 1.16	<0.001	<0.001
Risco muito elevado de complicações cardiometabólicas (Razão cintura/quadril)	6.43	3.03, 14.9	<0.001	<0.001
Ocupação em agronegócio	2.68	1.59, 4.47	<0.001	<0.001
Escala de autopercepção da saúde	1.57	1.22, 2.02	<0.001	0.002
Diagnóstico de diabetes do tipo II	3.46	1.61, 7.23	0.001	0.004
Origem geográfica (Colônia Menonita)	0.65	0.48, 0.87	0.004	0.014
Ocupação do lar	2.16	1.25, 3.66	0.005	0.016
Experimentou cigarro	1.98	1.22, 3.25	0.006	0.018
Autopercepção negativa de saúde	2.01	1.21, 3.43	0.008	0.021
Pratica atividade física moderada ou vigorosa	0.51	0.31, 0.84	0.008	0.021
Como classifica o ambiente familiar na infância	1.61	1.12, 2.32	0.010	0.024
Familiar próximo com Hipertensão arterial	3.06	1.39, 8.12	0.012	0.025
Miscigenação	0.23	0.05, 0.65	0.016	0.032
Trabalhou em local fechado	0.42	0.19, 0.84	0.022	0.043
Ocupação na área da educação	0.42	0.16, 0.93	0.051	0.093
Sexo masculino	1.57	0.97, 2.53	0.063	0.11
Ocupação na área da saúde	0.32	0.05, 1.09	0.12	0.20
Ocupação religiosa	2.41	0.63, 7.85	0.16	0.25
Rota migratória avó materna	0.89	0.71, 1.09	0.30	0.45
Ocupação na área do comércio	1.32	0.55, 2.89	0.50	0.72
Fumantes no ambiente de trabalho	1.40	0.38, 4.20	0.57	0.79
Trabalho em contato com fumaca	1.15	0.63, 2.02	0.63	0.82
Rota migratória avó paterna	0.94	0.73, 1.19	0.64	0.82
Rota migratória avô materno	0.96	0.76, 1.20	0.75	0.92
Distúrbios da Tireoide	1.10	0.52, 2.15	0.79	0.92
Quantos dias por semana realiza atividade física moderada ou vigorosa	0.98	0.86, 1.12	0.81	0.92
Quantidade de fumantes no ambiente de trabalho	0.93	0.35, 2.01	0.87	0.93

¹Odds Ratio, 95% Confidence interval

²False discovery rate correction for multiple testing

Tabela 7: ASSOCIAÇÕES MULTIVARIADAS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL NA PRESENÇA DE SOBREPESO/ OBESIDADE.

Variável	Estatísticas descritivas		Regressão logística multivariada			
	Controle n = 178	Caso n = 83	OR ²	IC 95% ²	p	pcorr ³
Idade (anos) ¹	51 (14)	67 (11)	1.10	1.06 - 1.15 0.76 -	<0.001	<0,001
Massa Muscular ² Escala da autopercepção da saúde ²	21.5 (18.8 - 24.1) 3.00 (2.00 - 3.00)	18.4 (15.7 - 20.4) 3.00 (2.00 - 3.00)	0.87 1.66	0.99 1.03 - 2.79	0,040 0,043	0,043 0,043

¹Média (Desvio Padrão)
²Mediana (Intervalo interquartil)
³Correção da taxa de falsa descoberta para teste múltiplos
Autopercepção de saúde 1. Excelente 2. Muito Boa 3. Boa 4. Regular 5. Ruim

FONTE: estatísticas realizadas em linguagem r 4.2.2.

Foi encontrada associação em 39 SNPs (TABELA 8) com distribuição genotípica em equilíbrio de Hardy-Weinberg(HW), exceto para rs198913, rs2272363, rs2272362, rs2229642, rs2296740, rs2296741 que apresentam a distribuição genotípica fora do equilíbrio de HW ($p_{HW} < 0,05$ no grupo controle). Destes, 32, estão associados com a predisposição a desenvolver hipertensão e 7, associados a possível efeito protetivo.

Tabela 8: GENES E SNPs ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO

	Gene	Localização	SNP	MAF caso	MAF controle	Modelo	OddsRatio	IC 95%	p
1	COQ8A	1:226984589:C:T	rs12593	0,52	0,49	rec	19,83	3.07 - 128.2	0,0017
	COQ8A	1:226984589:C:T	rs12593	0,52	0,49	add	6,94	2.14 - 22.48	0,0012
2	CDC42BPA/ COQ8A	1:226985202:G:A	rs2297415	0,52	0,5	add	6,82	2.1 - 22.12	0,0014
3	CDC42BPA/ COQ8A	1:226985234:C:G	rs2297416	0,48	0,49	add	6,8	2.09 - 22.13	0,0015
4	CDC42BPA/ COQ8A	1:226986444:T:C	rs7552783	0,46	0,48	add	0,1	0.02 - 0.39	0,0010
5	CDC42BPA/ COQ8A	1:226986509:T:C	rs3738725	0,46	0,48	add	0,1	0.02 - 0.39	0,0010
6	PTCHD3	10:27403378:A:G	rs11599425	0,15	0,04	dom/ add	42,49	4.29 - 421.3	0,0014
7	SLC29A3	10:71361888:C:A	rs2487067	0,49	0,35	rec	19,13	3.1 - 118.1	0,0015
8	TH	11:2166625:G:C	rs12419447	0,46	0,37	rec	17,11	2.83 - 103.6	0,0020
9	TH	11:2167955:G:A	rs4074905	0,43	0,32	add	5,98	2 - 17.93	0,0014
	TH	11:2167955:G:A	rs4074905	0,43	0,32	rec	17,11	2.83 - 103.6	0,0020
10	KRT8	12:52900597:T:C	rs8608	0,52	0,48	rec	15,8	2.79 - 89.44	0,0018
11	KRT8	12:52904985:A:G	rs1065306	0,4	0,43	dom	0,04	0.01 - 0.27	0,0009
12	KRT8	12:52905051:T:G	rs2070910	0,4	0,42	dom	0,04	0.01 - 0.27	0,0009
13	C1QTNF9-AS1	13:24315912:G:A	rs11425228 2	0,25	0,14	dom/ add	29,72	3.93 - 224.9	0,0010
14	ZC3H13	13:46044891:T:C	rs962694	0,44	0,38	rec	29,46	3.96 - 218.9	0,0010
15	OR10G3	14:21570784:A:G	rs4982462	0,61	0,45	rec	20,46	3.14 - 133.3	0,0016
16	CTSH	15:78925289:A:G	rs2289695	0,18	0,09	add	23,42	3.42 - 160.1	0,0013
	CTSH	15:78925289:A:G	rs2289695	0,18	0,09	dom	27,24	3.65 - 203.3	0,0013
17	CTSH	15:78932341:C:T	rs2289700	0,2	0,1	add	23,49	3.37 - 163.5	0,0014
	CTSH	15:78932341:C:T	rs2289700	0,2	0,1	dom	27,08	3.57 - 205.4	0,0014
18	ZNF469	15:78932341:C:T	rs12598474	0,4	0,3	rec	110,7	7.95 - 1541	0,0005
19	ZNF469	16:88435563:T:A	rs3812956	0,4	0,29	rec	110,7	7.95 - 1541	0,0005
20	SLC1A5	19:46775681:G:A	rs1060043	0,12	0,06	dom/ add	43,1	4.43 - 419.6	0,0012
	FKRP	19:46775681:G:A	rs1060043	0,12	0,06	dom/ add	43,1	4.43 - 419.6	0,0012
21	PXDN	2:1680151:G:T	rs72763569	0,2	0,14	add	36,17	4.29 - 304.7	0,0010
	PXDN	2:1680151:G:T	rs72763569	0,2	0,14	dom	41,74	4.66 - 373.9	0,0009
22	DAW1	2:227902915:G:T	rs2946931	0,56	0,42	rec	29,65	4.15 - 211.8	0,0007
23	TM4SF18	3:149322237:G:A	rs74464774	0,15	0,1	add	22,53	3.47 - 146.3	0,0011
	TM4SF18	3:149322237:G:A	rs74464774	0,15	0,1	dom	24,69	3.8 - 160.6	0,0008

	Gene	Localização	SNP	MAF caso	MAF controle	Model o	OddsRati o	IC 95%	p
24	NR3C2	4:148114298:T:C	rs1879829	0,5	0,49	dom	0,05	0.01 - 0.31	0,0014
25	CAPSL	5:35904787:C:A	rs1345827	0,54	0,41	rec	18,32	2.96 - 113.2	0,0018
26	CAPSL	5:35921164:G:A	rs3734107	0,54	0,42	rec	18,32	2.96 - 113.2	0,0018
27	ITPR3	6:33671983:G:C	rs3736893	0,39	0,35	rec	26,76	3.38 - 211.9	0,0019
28	ITPR3	6:33674179:T:C	rs7769838	0,33	0,3	rec	28	3.54 - 221.7	0,0016
29	ITPR3	6:33685671:C:T	rs749338	0,37	0,48	dom	0,02	0 - 0.22	0,0013
30	IP6K3	6:33723020:A:G	rs4711341	0,39	0,48	dom	0,02	0 - 0.22	0,0014
31	CPNE5	6:36742492:A:G	rs3752480	0,24	0,15	dom/ add	31,71	4.15 - 242.5	0,0009
32	CPNE5	6:36743785:G:C	rs9380594	0,24	0,15	dom/ add	31,71	4.15 - 242.5	0,0009
33	TMEM200A	6:130365968:CA: C	rs67212512	0,25	0,15	add	19,02	3.24 - 111.6	0,0011
	TMEM200A	6:130365968:CA: C	rs67212512	0,25	0,15	dom	64,65	5.89 - 709.6	0,0007
34	TMEM200A	6:130440659:C:T	rs12200105	0,27	0,2	dom/ad	32,16	4.06 - 255	0,0010
35	CCL24	7:75813446:G:A	rs41364146	0,08	0,02	dom/ add	42,39	4.32 - 416	0,0013
36	MYL10	7:75813446:G:A	rs876825	0,57	0,46	add	10,33	2.48 - 42.99	0,0013
	MYL10	7:75813446:G:A	rs876825	0,57	0,46	rec	23,71	3.83 - 146.6	0,0007
37	ORAI2	7:102436230:G:T	rs1133471	0,54	0,46	rec	26,18	3.7 - 185.2	0,0011
38	FBXO25	8:407362:A:G	rs13259702	0,48	0,31	add	13,39	3.11 - 57.67	0,0005
	RALGDS	9:133098713:G:A	rs886017	0,6	0,46	add	12,31	2.82 - 53.84	0,0009
39	RALGDS	9:133098713:G:A	rs886017	0,6	0,46	rec	14,04	2.79 - 70.64	0,0014

Para análise de expressão gênica, foram selecionados tecidos, com registro na literatura, relacionados à modulação da pressão arterial. A artéria aorta, adrenais e fígado(HALL, 2017).

Tabela 9: SNPs ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO NA POPULAÇÃO MENONITA, NA PRESENÇA DE OBESIDADE OU SOBREPESO, E SUA ASSOCIAÇÃO À EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM TECIDOS RELACIONADOS A HIPERTENSÃO

Gene	SNP	Alelo Associado	Efeito/região	Tecidos (eQTLs)		
				AORTA	ADRENAL	FÍGADO
COQ8A	rs12593	T	missense	-	-	-
CDC42BPA	rs2297415	A	downstream	-	-	-
COQ8A	rs2297415	A	intrônico	-	-	-
CDC42BPA	rs2297416	C	downstream	-	-	-
COQ8A	rs2297416	C	intrônico	-	-	-
CDC42BPA	rs7552783	T	intrônico	-	-	-
COQ8A	rs7552783	T	intrônico	-	-	-
CDC42BPA	rs3738725	T	sinônimo	-	-	-
COQ8A	rs3738725	T	sinônimo	-	-	-
PTCHD3	rs11599425	G	intrônico	ns	ns	ns
SLC29A3	rs2487067	C	intrônico	-	-	-
TH	rs12419447	C	intrônico	-	-	-
TH	rs4074905	G	intrônico	-	-	-
KRT8	rs8608	T	sinônimo	+	-	-
KRT8	rs1065306	G	sinônimo	+	-	-
KRT8	rs2070910	G	intrônico	+	-	-
C1QTNF9-AS1	rs114252282	A	intrônico	-	-	-
ZC3H13	rs962694	T	intrônico	-	-	-
OR10G3	rs4982462	G	intrônico	ns	ns	ns
CTSH	rs2289695	G	nonsense	+	-	-
CTSH	rs2289700	T	missense	+	-	-
ZNF469	rs12598474	C	missense	ns	ns	ns
ZNF469	rs3812956	A	missense	ns	ns	ns
SLC1A5	rs1060043	A	sinônimo	-	-	-
FKRP	rs1060043	A	parada	-	-	-
PXDN	rs72763569	T	intrônico	Não encontrado	Não encontrado	Não encontrado
DAW1	rs2946931	T	nonsense	+	-	-
TM4SF18	rs74464774	A	intrônico	ns	ns	ns
NR3C2	rs1879829	C	intrônico	ns	ns	ns
CAPSL	rs1345827	A	intrônico	ns	ns	ns
CAPSL	rs3734107	A	intrônico	ns	ns	ns
ITPR3	rs3736893	G	intrônico	+	+	-
ITPR3	rs7769838	T	intrônico	+	+	-
ITPR3	rs749338	T	sinônimo	Não encontrado	Não encontrado	Não encontrado
IP6K3	rs4711341	G	sinônimo	+	-	-
CPNE5	rs3752480	G	intrônico	-	-	-
CPNE5	rs9380594	C	intrônico	-	-	-
TMEM200A	rs67212512	C	upstream	0	0	0
TMEM200A	rs12200105	T	sinônimo	0	0	0
CCL24	rs41364146	A	intrônico	0	0	0
MYL10	rs876825	T	intrônico	ns	ns	ns
ORA12	rs1133471	G	splice	-	-	-
FBXO25	rs13259702	G	intrônico	-	-	-
RALGDS	rs886017	A	sinônimo	-	-	-

(+) – eQTLs positivo (-) – eQTLs negativo ns – eQTLs não significante

Tabela 10: SNPs ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO NA POPULAÇÃO MENONITA, NA PRESENÇA DE OBESIDADE OU SOBREPESO, EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM TECIDOS RELACIONADOS À HIPERTENSÃO PRESENTE

gene	variante	aorta	adrenal	fígado	Efeito	OD rec	OD dom	OD add
KRT8	rs8608	↑			sinônimo	15,8	-	-
KRT8	rs1065306	↑			sinônimo	-	0,04	-
KRT8	rs2070910	↑			5 prime UTR	-	0,04	-
CTSH	rs2289695	↓			3 prime UTR	-	27,24	23,42
CTSH	rs2289700	↓			missense	-	27,08	23,49
DAW1	rs2946931	↓			intrônico	29,65	-	-
ITPR3	rs3736893	↓	↓		intrônico	26,76	-	-
ITPR3	rs7769838	↓	↓		intrônico	28	-	-
IP6K3	rs4711341	↓			sinônimo	-	0,02	-

↑ - EXPRESSÃO AUMENTADA

↓ - EXPRESSÃO DIMINUÍDA

5 DISCUSSÃO

O isolamento exerce impacto evolutivo nas populações pequenas, uma vez que esses grupos não conseguem sustentar o equilíbrio estável na distribuição genotípica, conforme previsto pela Lei de Hardy-Weinberg. Mesmo na ausência de migração, mutação e seleção, e assumindo que ocorra panmixia, esse efeito se manifesta (BEIGUELMAN, 2008). Nessas populações reduzidas, a variação aleatória das frequências gênicas ao longo das gerações pode provocar a eliminação ou, ao contrário, a fixação casual de um gene, independentemente de

seu coeficiente seletivo. Em outras palavras, nos pequenos isolados, um gene com alto valor adaptativo pode desaparecer, enquanto outro, com baixo valor adaptativo pode ser fixado. Tal fenômeno, que, em inglês, é denominado genetic drift, foi chamado, em português, durante algum tempo, de oscilação genética, e depois, renomeado, mais apropriadamente, por Freire-Maia (1974), de deriva genética (BEIGUELMAN, 2008). A distribuição das frequências de certos genes em algumas populações humanas tem grande probabilidade de ter sido consequência da deriva genética, a qual deve ter tido papel evolutivo muito mais relevante do que a seleção natural nas populações primitivas, constituídas por pequenos isolados genéticos, cujo tamanho efetivo não deveria exceder a 100. Nesses pequenos isolados existia a possibilidade de um único indivíduo, altamente fecundo, ou com descendentes muito fecundos, provocar a predominância de um ou mais genes na população originária de tais isolados, ainda que um desses genes conferisse baixo valor adaptativo a seus portadores. Quando se reconhece a existência desse processo, costuma-se falar em efeito do fundador. Nas populações primitivas também era frequente a diminuição abrupta de seu tamanho, pela redução do número de pessoas em consequência de guerras, epidemias, fome e outras catástrofes, dizimando famílias, independentemente do valor adaptativo de seus genes. As frequências gênicas dos sobreviventes nem sempre correspondiam à da população original, de modo que a população oriunda deles podia mostrar uma composição genética diversa da que existia anteriormente. Esse efeito, decorrente do “estreitamento da passagem” de genes de uma população original para outra por intermédio de uma geração reduzida por uma catástrofe, que afetou uma parte do isolado e que, evidentemente, nada tem a ver com o processo de seleção natural, costuma ser denominado efeito do gargalo (BEIGUELMAN, 2008).

A população que deu origem aos Menonitas brasileiros, foi impactada por 3 efeitos gargalo nos séculos XVI, XVIII e XX. Entre as colônias analisadas, CN, WIT e CWB, todas foram afetadas de alguma forma, por pelo menos, mais dois eventos, deriva genética e efeito fundador. Havendo possibilidade de ocorrer novo evento, com a saída, para cidades maiores, de membros mais jovens destas colônias, como foi comentado no documentário, “Witmarsum-o Brasil dos Menonitas”. (GUEBUR, 2009). Na amostra da população analisada, 31,2%, em Colônia Nova(RS), eram hipertensos na presença de obesidade ou sobrepeso. Em CWB, eram 15,3%

hipertensos na presença de obesidade ou sobrepeso. Os valores de ocorrência de hipertensão nessa população, para CWB e CN, são semelhantes aos da pesquisa sobre associação entre HAS e obesidade, desenvolvida anteriormente pelo LGMH. Sabendo que a taxa de hipertensão nacional é 26,3% e considerando a comunidade com um todo, a ocorrência de hipertensão nos menonitas analisados, é 25%, estando dentro da média nacional. A explicação para amplitude, na ocorrência de hipertensão, entre CN e CWB, poderia ser a classificação etária dos participantes da pesquisa, que em CN é mais elevada.

Com a verificação dos níveis de expressão gênica em tecido-específico, que utilizou banco de dados do GTEx Portal, foi possível identificar regiões que são afetadas quando um gene é expresso. Esse sinal é dado pelo eQTLs (expressão de loci de características quantitativas) (GTEx portal, 2023). Dos 39 SNPs, 9 foram eQTL positivo para aorta e/ou adrenal. A variante rs8608(gene KRT8), com mutação sinônima, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m, com o alelo não associado, em homozigose(CC; M_d0,38). A variante rs1065306(gene KRT8), com mutação sinônima, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m, com alelo associado, em homozigose (GG; M_d0,69). A variante rs2070910(gene KRT8), com mutação na região 5 prime UTR, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m com alelo associado em homozigose (GG; m_d 0,71). A variante rs2289695 (gene CTSH), com mutação na região 3 prime UTR, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m com alelo não associado em homozigose (AA; m_d 0,09). A variante rs2289700(gene CTSH), com mutação missense, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m com o alelo não associado em homozigose (CC; m_d 0,08). A variante rs2946931(gene DAW1), com mutação na região intrônica, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m com alelo não associado em homozigose do (GG; m_d 0,16). A variante rs3736893(gene ITPR3), com mutação na região intrônica, com repercussão na aorta expressa maiores níveis de RNA_m com alelo associado em homozigose (GG; m_d 0,32), e com repercussão na adrenal, expressa maiores níveis de RNA_m com alelo associado em homozigose (GG; m_d 0,28). A variante rs7769838(gene ITPR3), com mutação na região intrônica, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m, com alelo associado em homozigose (TT; m_d 0,29), e com repercussão na adrenal expressa maiores níveis

de RNA_m do alelo associado em homozigose(TT;m_d 0,37). A variante rs4711341(gene IP6K3), com mutação sinônima, com repercussão na aorta, expressa maiores níveis de RNA_m com alelo associado em homozigose do (AA;m_d 0,16).

Dos alelos em que houve expressão diferencial nos tecidos escolhidos (aorta, adrenal ou fígado). A variante do gene KRT8, rs8608, quando em homozigose, aumenta em 15 vezes a possibilidade ocorrência de hipertensão. Este gene é um membro da família das queratinas tipo II agrupadas no braço longo do cromossomo 12. As queratinas tipo I e tipo II heteropolimerizam-se para formar filamentos de tamanho intermediário no citoplasma das células epiteliais. O produto desse gene tipicamente dimeriza com a queratina 18 para formar um filamento intermediário em células epiteliais simples de camada única. Esta proteína desempenha um papel na manutenção da integridade estrutural celular e também atua na transdução de sinal e diferenciação celular. Mutações nesse gene causam cirrose criptogênica. Estudo realizado com cultivo celular, casos clínicos e com BalbC mostrou que a cisplatina atenuou a capacidade promotora de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) na migração e invasão de células de câncer de pulmão, através da supressão do efeito das CAFs em genes relacionados à metástase, incluindo Twist1, receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), MMP2 e via de sinalização AKT. A queratina 8 (KRT8) foi identificada como alvo da cisplatina. A regulação positiva do KRT8 em CAFs é responsável pelo efeito inibitório da cisplatina sobre o potencial de metástase de células de câncer de pulmão através da supressão da via AKT. A estimulação da AKT pelo ativador de AKT SC79 reverteu o efeito do KRT8 na migração celular. É importante ressaltar que o estudo in vivo também mostrou que as CAFs aumentaram significativamente o crescimento tumoral, e a cisplatina efetivamente revogou o efeito promotor das CAFs no crescimento do tumor (LI,2023). Os haplótipos variantes do gene CTSH, rs2289695 e rs2289700,quando em heterozigose, aumentam em 27 vezes a possibilidade da ocorrência de hipertensão, quando em homozigose, há incremento nessa possibilidade de ocorrência. As catepsinas são cisteínoproteases lisossomais que pertencem à família das peptidases semelhantes à papaína e desempenham papéis importantes na degradação da matriz extracelular. Um aumento na expressão gênica da catepsina ou na atividade elastolítica dessas proteases tem

sido encontrado em animais e humanos com IC hipertensiva ou cardiomiopatia dilatada idiopática. As catepsinas exibem pronunciadas atividades elastolíticas e collagenolíticas in vitro e in vivo. Por outro lado, estudos em camundongos deficientes catepsina L revelaram que essa protease é importante para a manutenção da estrutura cardíaca e que sua deficiência resulta em comprometimento lisossomal, bem como no consequente desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada. Essas várias observações demonstraram, assim, a importância das catepsinas na remodelação cardíaca (CHENG,2008). A variante do gene DAW1, rs2946931, quando em homozigose, aumenta em 29 vezes a possibilidade de ocorrência de hipertensão. Participa da montagem externa do braço de dineína. Previsão de localização em cílios e região extracelular (Alliance of Genome Resources, 2022). O sistema cardiovascular é exposto a sinais bioquímicos e biomecânicos. Vários sensores para esses sinais têm sido descritos e contribuem para o desenvolvimento cardiovascular, manutenção da integridade dos vasos durante a vida adulta e patogênese. Nos últimos 10 anos, cílios primários, cobertos por membrana, protrusões celulares semelhantes a bastonetes, foram descobertos em vários tipos celulares do sistema cardiovascular. Os cílios primários são organelas sensoriais envolvidas em várias vias de sinalização chave (de desenvolvimento) e na química e mecanosensorial em uma miríade de tipos celulares. No sistema cardiovascular embrionário e adulto, eles têm demonstrado funcionar como sensores de tensão de cisalhamento em células endoteliais e podem atuar como sensores de tensão em células musculares lisas e cardiomiócitos e como quimiossensores em fibroblastos. (HEIDEN,2011). O defeito é resultado de um déficit na quantidade de braços de dineína e o diagnóstico tardio pode resultar em hipertensão (MATOS,2020). Os haplótipos variantes do gene ITPR3, rs3736893 e rs7769838, quando em homozigose, aumentam em 26 e 28 vezes a possibilidade de ocorrência de hipertensão. Foi descrito o papel dos receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato, uma família de canais de liberação intracelular de Ca^{2+} localizados na membrana do retículo endoplasmático, na regulação da vasodilatação e pressão arterial usando modelos de camundongos geneticamente modificados. A deleção de todos os 3 subtipos de receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato em células endoteliais de camundongos levou à

hipertensão, com reduções na concentração plasmática de NO e na vasodilatação induzida por acetilcolina(LIN,2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos achados associados à hipertensão, nos menonitas, o gene KRT8 e seus haplótipos, rs8608 (sinônimo) associado a possível predisposição ao desenvolvimento de hipertensão, enquanto rs1065306 (sinônimo) e rs2070910(5prime-UTR) associados ao possível efeito protetivo, todos com expressão aumentada na aorta. O gene KRT8, pode estar associado à migração celular (LI,2023).

O gene CTSH e seus haplótipos rs2289695 (3prime-UTR) e rs2289700(missense) associados a possível predisposição ao desenvolvimento de hipertensão, ambos com expressão diminuída na aorta. O gene CTSH, pode estar associado a remodelação cardíaca (CHENG,2008).

O gene DAW1 e seu haplótipo rs2946931 (intrônico), associados a possível predisposição ao desenvolvimento de hipertensão com expressão diminuída na aorta. O gene DAW, pode estar associado a sensores de tensão em células musculares lisas e cardiomiócitos(HEIDEN,2011).

O gene ITPR3 e seus haplótipos rs3736893 e rs7769838 associados a possível predisposição ao desenvolvimento de hipertensão com expressão diminuída na aorta e adrenal. O gene ITPR3 pode estar associado a canais de liberação intracelular de Ca²⁺(LIN,2019).

Das 39 variantes genéticas associadas à hipertensão na população menonita, destas, 9 também associadas à expressão dos genes na artéria aorta. Estes resultados deverão ser confirmados ainda, com aumento do tamanho amostral incluindo a população miscigenada brasileira.

REFERÊNCIAS

AGNEW, Bruce. The Benefits of Communication, 2015.

Disponível em: [Genomic knowledge is power in the fight against obesity \(genome.gov\)](http://www.genome.gov).

AMODEO, Celso; MULINARI, Rogério A. Hipertensão arterial sistêmica secundária. Diretrizes de Hipertensão VI, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-28002010000500009>.

ANTÔNIA, Ariane; COSTA, Malcolm; IAROCZINSKI, Adriane. A IMIGRAÇÃO MENONITA NO PARANÁ E SUA INFLUÊNCIA NA FORMAÇÃO CULTURAL E SOCIOECONÔMICA DE CURITIBA. **Maiêutica**, v. 3, n.1, 2015.

ARCOS-BURGOS, M; MUENKE, M. Genética dos isolados populacionais. **Genética Clínica**, v. 61, p. 233-247, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.610401.x>.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE 2016- 4 edição. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Disponível em: [Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf \(abeso.org.br\)](http://www.abeso.org.br/Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf).

BEIGUELMAN, Bernardo. **GENÉTICA DE POPULAÇÕES HUMANAS**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 235p.

BOLDT, ABW, PETZL-ERLER, ML. A new strategy of mannose-binding lectin gene haplotyping. **Human Mutation**, v.19, p.296 - 306, 2002.

BOLDT, A.B.W; CULPI, L; TSUNETO L.T; SOUZA, I.R; KUN, J.F.J; PETZL-ERLER, M.L. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus.. **Human Immunology** , v.67, p.722 - 734, 2006.

BROOKES, A. J. The essence of SNP. *Gene*. v.234, p. 177–186, 1999.

CAMARGO, Geraldo Leão Veiga de. PARANISMO: ARTE, IDEOLOGIA E RELAÇÕES SOCIAIS NO PARANÁ. 1853 – 1953. Orientador: Prof. Dr. Luiz Geraldo Santos Silva. 213 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em História. UFPR, Paraná, Curitiba, 2007.

CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101(3):329–335. doi:[10.1161/01.CIR.101.3.329](https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.3.329).

CAVALCANTI, A.M.; KUSMA, S.Z.; CHOMATAS, E.R.D.V.; IGNÁCIO, S.A.; MENDES, E.V.; MOYSÉS, S.T.; PECOITS-FILHO, R. Noncommunicable diseases and their common risk factors in Curitiba, Brazil: results of a cross-sectional, population-based study. **Rev Panam Salud Publica**, v. 42, e57, 2018.

CHENG, X. W. *et al.* Superoxide-Dependent Cathepsin Activation Is Associated with Hypertensive Myocardial Remodeling and Represents a Target for Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Treatment. **The American Journal of Pathology**, v. 173, No. 2, 2008. Disponível em: DOI: 10.2353/ajpath.2008.071126.

CHOQUET, H. A large multiethnic GWAS meta-analysis of cataract identifies new risk loci and sex-specific effects. **Nat Commun** .2014..Disponível em: doi: 10.1038/s41467-021-23873-8 .

Conferência Mundial Menonita. Disponível em: [Global map | Mennonite World Conference \(mwc-cmm.org\)](https://www.mwc-cmm.org/).

CUNHA, M. C. (org.). **História dos índios do Brasil**. São Paulo: Companhia das Letras, 1992.

DEMIRCI, Erkan *et al*. Melhora da Pressão Arterial após Jejum Intermitente na Hipertensão: O Sistema Renina-Angiotensina e o Sistema Nervoso Autônomo Podem Funcionar ? **Arq. Bras. Cardiol**, v.120(5), 2023. Disponível em: DOI: [10.36660/abc.20220756](https://doi.org/10.36660/abc.20220756).

DÜCK, E. S. Witmarsum, uma comunidade trilingue: Plautdietsch, Hochdeutsch e Português. 2005. 152 f. Dissertação (Mestrado em estudos linguísticos), . Universidade Federal do Paraná, 2005, Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/2981>.

EHRET, G.B.; CAULFIELD, M.J. Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. **Eur Heart J** 34(13):951–961.2013. doi: [10.1093/eurheartj/ehs455](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs455)

EPP-BOSCHMANN S, BOLDT ABW, SOUZA IR, PETZL-ERLER ML, MESSIAS-REASON IJ. The frequency of the LCT*–13910C>T polymorphism

associated with lactase persistence diverges among Euro-Descendant groups from Brazil. **Med Princ Pract**, v. 25, p.18–20, 2016.

Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**. v. 390, n.10100, p. 1151-210, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9).

GLOBAL ANABAPTIST MENNONITE ENCYCLOPEDIA ONLINE. Disponível em: [Global Anabaptist Mennonite Encyclopedia Online \(Website\) – GAMEO](#).

GONÇALVES, R.P.F.; Haikal D.S.; Freitas M.I.F., Machado Í.; Malta D.C., Self-reported medical diagnosis of heart disease and associated risk factors: National Health Survey. **Rev Bras Epidemiol**. 2019;22(Suppl 02):E190016.SUPL.2. Disponível em: doi: 10.1590/1980-549720190016.supl.2.

GORDON, R.D.; ZIESAK, M.D.; TUNNY, T.J.; STOWASSER, M; Klemm, S.A. Evidence that primary aldosteronism may not be uncommon: 12% incidence among antihypertensive drug trial volunteers. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 20(5), p. 296-8, 1993.

GORLOV, I. P.; GORLOVA, O. Y.; SUNYAEV, S. R. *et al*. Shifting paradigm of association studies: value of rare singlenucleotide polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 82, p.100–112, 2008.

GUEBUR, Camila *et al*. **Witmarsum o Brasil dos Menonitas**, Trabalho de Conclusão de Curso, Jornalismo, Universidade Anhembí Morumbi, 2009. Disponível em: [\(258\) Witmarsum: O Brasil dos Menonitas. Parte III. - YouTube](#) .

HAAS, A, N; BULSO JÚNIOR, Orlando; BITTENCOURT, Débora. Características antropométricas de mulheres praticantes do método Pilates em duas cidades gaúchas. **Fisioterapia Brasil**. v. 19, n. 3, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.33233/fb.v19i3.492>.

HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier Editora, 2011.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Endocruzamento**. In: **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 271–289.

HEIDEN, K.V.D. Capítulo Três - Papel dos Cílios Primários como Detectores de Fluxo no Sistema Cardiovascular. **Revista Internacional de Biologia Celular e Molecular**. v.290 p.87-119, 2011.

ISOMAA B., ALMGREN P., TUOMI T., FORSÉN B., LAHTI K., NISSÉN M., TASKINEN MR, GROOP L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 24(4), p. 683-689, abril. 2001, Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diacare.24.4.683>.

JARDIM, P.C.B.V.; JARDIM, T. de S.V.; SOUZA, W.K.S.B. de. Qual(ais) o(s) antagonistas dos canais de cálcio mais indicado(s) no tratamento da hipertensão arterial? **Rev Bras Hipertens** v. 20(2), p.78-82, 2013.

JARDIM, P.C.B.V; CARNEIRO, O; CARNEIRO, S B; BAIOCCHI, M. N. PRESSÃO ARTERIAL EM COMUNIDADE NEGRA ISOLADA REMANESCENTE DE QUILOMBO-NORTE DE GOIÁS – KALUNGA. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 58(4), p. 289-93, 1992.

JAWORSKI, M. A., SLATER, J. D., SEVERINI, A., HENNIG, K. R., MANSOUR, G., MEHTA, J. G., JESKE, R., SCHLAUT, J., PAK, C. Y., & YOON, J. W. . Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community. **Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 138(11), p. 1017–1025, 1988.

KUNITOMO, M *et al* .Beneficial Effect of Coenzyme Q10 on Increased Oxidative and Nitrative Stress and Inflammation and Individual Metabolic Components Developing in a Rat Model of Metabolic Syndrome .**J Pharmacol Sci.** 107, p.128 – 137 ,2008.

KUSUMOTO, Fred M.; GOLDSCHLAGER, Nora F. **Cardiac Pacing for the Clinician**. 2 Ed. Springer Science & Business Media, 2007.

LI, Xueqin *et al*. A capacidade promotora do potencial de metástase de fibroblastos associados ao câncer foi atenuada pela cisplatina via KRT8 moduladora. **OncoTargets and Therapy**, 13:, p. 2711-2723, 2020 Disponível em: DOI: [10.2147/OTT.S246235](https://doi.org/10.2147/OTT.S246235).

LIFTON RP (1996) Molecular genetics of human blood pressure variation. **Science** 272(5262):676–680. doi:[10.1126/science.272.5262.676](https://doi.org/10.1126/science.272.5262.676).

[LIN,Q *et al* .Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Endothelial Cells Play an Essential Role in Vasodilation and Blood Pressure Regulation](#).**Journal of the American Heart**,v.8, i.4,2019.

Linha guia de hipertensão arterial. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de atenção à Saúde. 2 ed.52p. Curitiba, 2018. Disponível em: [HIPER_R_6.indd \(documentador.pr.gov.br\)](#).

MATOS, Giulia Beatriz Correia; FARIA, Mariana Soares; COSTA, Tiago Almeida; SOBRAL, Larissa Dantas; CHAGAS, Isabella Santana Santos Chagas. Relato de caso: discinesia ciliar primária associada à síndrome de Kartagener. **residpediatr**, v.12, n.2, p.330, 2022.

MIALL WE; OLDHAM PD (1963). The hereditary factor in arterial blood-pressure. **Br Med J** 1(5323):75–80. doi:[10.1136/bmj.1.5323.75](https://doi.org/10.1136/bmj.1.5323.75).

Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, *et al.* Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries. **American Heart Association**, v. 134, n. 6, p. 441-450, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912>.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 populationbased measurement studies with 19·1 million participants. **Lancet**. ;389(10064), p.37-55, 2017.

Ministério da Saúde. Você sabe o que é hipertensão?. Disponível em: [Você sabe o que é hipertensão? — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/comunicacao/infograficos/2018/08/08-09-2018/08-09-2018-01.pdf). Acesso em: 17 maio 2023.

Ministério da Saúde. Estatísticas. Disponível em: [Estatísticas — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/comunicacao/infograficos/2018/08/08-09-2018/08-09-2018-01.pdf) . Acesso em: 17 maio 2023.

Ministério da Saúde. Relatório. Disponível em: [Relatório aponta que número de adultos com hipertensão aumentou 3,7% em 15 anos no Brasil — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](http://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/comunicacao/infograficos/2018/08/08-09-2018/08-09-2018-01.pdf). Acesso em: 17 maio 2023.

MORALES, Joanela *et al.* A joint NCBI and EMBL-EBI transcript set for clinical genomics and research. **Nature**, v.604, p. 310-315, 2022.

NASCIMENTO JÚNIOR, BRAZ JOSÉ DO. **ANATOMIA HUMANA SISTEMÁTICA BÁSICA**. 1ª Edição, UNIVASF, Petrolina, PE, 228 p. 2020.

Organização Mundial da Saúde. Disponível em: [A healthy lifestyle - WHO recommendations](#).

OLIVEIRA, LC., DORNELLES, AC., NISIHARA, RM., SANTOS, PI., CIPOLLA, GA., EPP-BOSCHMANN, S., MESSIAS-REASON, IJT., CAMPOS, FR., PETZL-ERLER, ML., BOLDT ABW. High Celiac Disease Prevalence and a HLA*DQ8 Founder Effect In Mennonites From South Brazil. Manuscrito a ser submetido à revista Life, 2022.

Painel de Indicadores de Saúde – Pesquisa Nacional de Saúde. Disponível em: [Painel de Indicadores – PNS \(fiocruz.br\)](#).

PAULS JR, P. **Mennoniten in Brasilien: Gedenkschrift zum 50 Jahr-Jubilaum ihrer Einwanderung 1930-1980**. Palmeira: Witmarsum, 1980.

PENA, S. D. J. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **Plos One**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>.

PENNER, H.; GERLACH, H.; QUIRING, H. **Weltweite Bruderschaft. Ein mennonitisches Geschichtsbuch**. 1984.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE - módulo Q. Disponível em: [PNS – Pesquisa Nacional de Saúde – 2013 – DATASUS \(saude.gov.br\)](#) .

PICKERING, G (1965) Hyperpiesis: high blood-pressure without evident cause: essential hypertension. **Br Med J** 2(5468):959–968 .

Quero Viver Bem. Disponível em: [Percentual De Gordura – Como Calcular? Qual A Quantidade Ideal? \(queroviverbem.com.br\)](#) .

REIS, E. C.; RODRIGUES, I.C. Etnocentrismo: diversidades Indígenas no Paraná. Os Desafios da Escola Paranaense na Perspectiva do Professor PDE. Paraná, v.1, p. 2-25, 2016. Disponível em: [Etnocentrismo:diversidades indígenas no Paraná \(diaadiaeducacao.pr.gov.br\)](#). Acesso em: 17 maio 2023.

SALIS, André Ulysses de. O Silêncio do Leste: refugiados do stalinismo no Paraná, São Paulo. 2020. 234f. Tese (Doutorado em História)-Programa de Estudos Pós-Graduados em História, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2020.Disponível em: <https://tede2.pucsp.br/handle/handle/23238>.

SALZANO, F.M. The Prehistoric Colonization of the Americas: Evidence and Models. **Evo Edu Outreach**, v.4, p.199–204, 2011. Disponível em: [DOI: 10.1007/s12052-011-0330-9](#).

SANTOS, S. A. A formação do mercado de trabalho livre em São Paulo: tensões raciais e marginalização social. Tese de Mestrado, Departamento de Sociologia, Universidade de Brasília, 1997.

SANTOS, S. A. Historical roots of the "whitening" of Brazil. *Latin American Perspectives*, v. 29, n. 1, p. 61–82, 2002.

SANTOS, A.C.C. dos. ONDE OS RAROS SÃO COMUNS: Relatos, estratégias e reflexões acerca dos "clusters" em genética médica populacional . Tese para doutorado. UFRS, 2022.

SAVVA SC, LAMNISOS D, KAFATOS AG. Predicting cardiometabolic risk: waist- to-height ratio or BMI. A meta-analysis. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 6, p. 403- 419, 2013. Disponível em: doi: 10.2147/DMSO.S34220.

7ª DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2016. Disponível em: [05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf \(cardiol.br\)](#)

SILVA, Marlucci Aparecida. Estudo de Associação de Genes do Eixo Renina-Angiotensina-aldosterona com a Hipertensão Arterial Sistêmica em Populações Menonitas Sul Brasileiras. Orientadora: Prof(a). Dr(a). Márcia Holsbach Beltrame. 2019. Monografia (Graduação) -Curso de Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2019.

SILVA, Raquel Cabezas da. Parâmetros populacionais e forenses da população do Sul de Portugal - Atualização dos dados genéticos dos loci STR usados na casuística forense. Universidade de Lisboa, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. Disponível em: [Sociedade Brasileira de Hipertensão - | Sociedade Brasileira de Hipertensão \(sbh.org.br\)](#) .

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Disponível em: [Página Inicial | cardiol](#) .

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em: [Home - Sociedade Brasileira de Diabetes](#) .

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ESTUDOS DA OBESIDADE. I Diretriz Brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica [I Brazilian guidelines on diagnosis and treatment of metabolic syndrome]. **Arq Bras Cardiol**, v. 84 Suppl 1, p.1-28, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Disponível em: [SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia](#). Acesso em junho 2023.

STERN, C. **Principles of Human Genetics**. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1960.

TABANGIN, M. E.; WOO, J. G.; MARTIN, L. J. The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. **BMC Proceedings**, v. 3 (Suppl 7):S41, 2009.

TRENTINI, Jonathan Ricardo Schnitzler. Hipertensão Arterial Sistêmica Em Uma População Menonita Brasileira – Uma Análise Genética e Epidemiológica. Orientadora: Profª. Drª. Angelica Beate Winter Boldt. 2018. Monografia (Graduação) – Curso de Graduação em Medicina, Universidade Federal do Paraná, 2018.

VILAÇA, B.M.; FELISBERTO, D.G. Epidemiologia e análise do efeito fundador na predisposição ao câncer de mama e ovário nas comunidades menonitas. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel da Medicina)- Universidade Federal do Paraná, 2017.

WEIHERMANN, V. Câncer de pele não melanoma na população menonita brasileira: epidemiologia e variantes genéticas associadas. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel da Medicina)- Universidade Federal do Paraná, 2018.

XI, B. et al. The common SNP (rs9939609) in the FTO gene modifies the association between obesity and high blood pressure in Chinese children. *Mol Biol Rep* 40, p. 773–778 (2013). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2113-y>.

Zhang, L; Ashizawa, T; Peng, D. Primary coenzyme Q10 deficiency due to COQ8A gene mutations. *Mol Genet Genomic Med*. 2020; v.8, e1420. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mgg3.1420>.

ZHENG, J; RAO, D.C.; SHI, G. An update on genome-wide association studies of hypertension. *Appl Inform* (Berl). 2015;2(1):10.

REFERÊNCIAS – ANÁLISE ESTATÍSTICA

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**. Series B (Methodological), [s. l.], v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2346101>.

Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. **GigaScience**, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>

GONZALEZ, J. R. et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. Versão 2.0-17. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/SNPAssoc/index.html>. Acesso em: 14 out. 2022.

JAWAID, Wajid. EnrichR: Provides an R Interface to “Enrichr”. Versão R package version 3.1. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=enrichR>.

KARCZEWSKI, Konrad J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, [s. l.], v. 581, n. 7809, p. 434–443, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2308-7>.

KULESHOV, Maxim v. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W90–W97, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw377>.

Li, J., Jew, B., Zhan, L., Hwang, S., Coppola, G., Freimer, N. B., & Sul, J. H. (2019). ForestQC: Quality control on genetic variants from next-generation sequencing data using random forest. **PLOS Computational Biology**, 15(12), e1007556. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007556>

NASLAVSKY, Michel S. *et al.* Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1004, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-28648-3>.

McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>.

Purcell, S., & Chang, C. (n.d.). PLINK 1.9 (1.9). www.cog-genomics.org/plink/1.9/.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Versão 4.2.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

SHIN, Ji-Hyung *et al.* LDheatmap: An R Function for Graphical Display of Pairwise Linkage Disequilibria Between Single Nucleotide Polymorphisms. Versão 1.0-6. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/LDheatmap/index.html>. Acesso em: 14 out. 2022.

SINNWELL, JP; SCHAID, DJ. Haplo.stats. Versão 1.8.9. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html>. Acesso em: 14 out. 2022.

SJOBERG, Daniel, D. *et al.* Reproducible Summary Tables with the gtsummary Package. **The R Journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 570, 2021.

WICKMAN, H *et al.* dplyr: A Grammar of Data Manipulation. CRAN Repository, [s. l.], 2021.

