

## Análise de Risco Genético da Doença Arterial Coronariana em um Estudo Populacional em Portugal, Usando um Score de Risco Genético com 31 Variantes

*Genetic Risk Analysis of Coronary Artery Disease in a Population-based Study in Portugal, Using a Genetic Risk Score of 31 Variants*

Andreia Pereira,<sup>1</sup> Maria Isabel Mendonça,<sup>1</sup> Sofia Borges,<sup>1</sup> Sónia Freitas,<sup>1</sup> Eva Henriques,<sup>1</sup> Mariana Rodrigues,<sup>1</sup> Ana Isabel Freitas,<sup>2</sup> Ana Célia Sousa,<sup>1</sup> António Brehm,<sup>2</sup> Roberto Palma dos Reis<sup>3</sup>

Unidade de Investigação, Hospital Dr. Nélio Mendonça,<sup>1</sup> Funchal – Portugal

Laboratório de Genética Humana, Universidade da Madeira,<sup>2</sup> Funchal – Portugal

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa,<sup>3</sup> Lisboa – Portugal

### Resumo

**Fundamento:** O escore de risco genético pode quantificar a predisposição do indivíduo em desenvolver doença arterial coronariana; no entanto, sua utilidade como preditor de risco independente permanece inconclusiva.

**Objetivo:** Avaliar o incremento no valor preditivo de um escore de risco genético aos fatores de risco tradicionais associados à doença arterial coronariana.

**Métodos:** Trinta e três variantes genéticas previamente associadas à doença arterial coronariana foram analisadas em uma população caso-controle com 2888 indivíduos. Um escore de risco genético multiplicativo foi calculado e dividido em quartis, com o 1º quartil como a classe de referência. O risco coronário foi determinado por análise de regressão logística. Uma segunda regressão logística foi realizada com fatores de risco tradicionais e o último quartil do escore de risco genético. Com base nesse modelo, duas curvas ROC foram construídas com e sem o escore de risco e comparadas pelo teste de DeLong. A significância estatística foi considerada quando os valores de *p* eram inferiores a 0,05.

**Resultados:** O último quartil do score de risco genético multiplicativo revelou um aumento significativo no risco de doença arterial coronariana (OR = 2,588; IC 95%: 2,090-3,204; *p* < 0,0001). A curva ROC baseada nos fatores de risco tradicionais estimou uma AUC de 0,72, que aumentou para 0,74 quando o score de risco genético foi adicionado, revelando um ajuste melhor do modelo (*p* < 0,0001).

**Conclusões:** Em conclusão, um escore de risco genético com múltiplos loci foi associado a um risco aumentado de doença coronariana na nossa população. O modelo usual de fatores de risco tradicionais pode ser melhorado pela incorporação de dados genéticos. (Arq Bras Cardiol. 2018; [online].ahead print, PP.0-0)

**Palavras-chave:** Doença da Artéria Coronariana / história, Doença da Artéria Coronariana / morbidade, Mortalidade, Polimorfismo Genético, Epidemiologia, Fatores de Risco.

### Abstract

**Background:** Genetic risk score can quantify individual's predisposition to coronary artery disease; however, its usefulness as an independent risk predictor remains inconclusive.

**Objective:** To evaluate the incremental predictive value of a genetic risk score to traditional risk factors associated with coronary disease.

**Methods:** Thirty-three genetic variants previously associated with coronary disease were analyzed in a case-control population with 2,888 individuals. A multiplicative genetic risk score was calculated and then divided into quartiles, with the 1st quartile as the reference class. Coronary risk was determined by logistic regression analysis. Then, a second logistic regression was performed with traditional risk factors and the last quartile of the genetic risk score. Based on this model, two ROC curves were constructed with and without the genetic score and compared by the DeLong test. Statistical significance was considered when *p* values were less than 0.05.

**Results:** The last quartile of the multiplicative genetic risk score revealed a significant increase in coronary artery disease risk (OR = 2.588; 95% CI: 2.090-3.204; *p* < 0.0001). The ROC curve based on traditional risk factors estimated an AUC of 0.72, which increased to 0.74 when the genetic risk score was added, revealing a better fit of the model (*p* < 0.0001).

**Conclusions:** In conclusion, a multilocus genetic risk score was associated with an increased risk for coronary disease in our population. The usual model of traditional risk factors can be improved by incorporating genetic data. (Arq Bras Cardiol. 2018; [online].ahead print, PP.0-0)

**Keywords:** Coronary Artery Disease / history; Coronary Artery Disease / morbidity; Mortality; Polymorphism, Genetic; Epidemiology; Risk Factors.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Andreia Pereira •

Avenida Luís de Camões, nº 57. CEP 9004-514, Funchal – Portugal

E-mail: andreiapereira21@gmail.com

Artigo recebido em 14/06/2017, revisado em 12/10/2017, aceito em 22/02/2018

DOI: 10.5935/abc.20180107

## Introdução

A doença arterial coronariana (DAC) tornou-se um importante problema de saúde pública em todo o mundo, com crescente prevalência e alta morbidade e mortalidade. Fatores de risco tradicionais (FRTs) não são suficientes para identificar indivíduos assintomáticos em alto risco. Estudos epidemiológicos e estudos com famílias já mostraram que o fator genético responde por aproximadamente 50% da susceptibilidade à doença cardíaca.<sup>1</sup> O conhecimento da predisposição genética a doenças cardíacas é fundamental para sua prevenção e tratamento adequados.

Apesar de pouco se conhecer sobre a base genética da doença coronariana, houve progressos com a identificação de genes candidatos e estudos de associação genômica ampla (GWAS).<sup>2</sup> De fato, muitas variantes genéticas foram identificadas em várias regiões genômicas associadas com DAC.<sup>2</sup>

Até o momento, o risco atribuível a qualquer variante individual é baixo. No entanto, a descoberta e a combinação de múltiplos loci com efeitos relativamente baixos a um escore de risco genético (ERG) global permitiria a identificação de populações em alto risco e melhoraria a avaliação de risco individual.

Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um ERG com base em variantes comuns, previamente associados com DAC, avaliar se o escore é independente de FRTs e se melhora a capacidade preditiva de um modelo baseado somente nesses fatores.

## Métodos

### População do estudo

A população do estudo foi selecionada a partir do GENEMACOR (GENEs na população madeirense com doença arterial CORonariana), um estudo populacional caso-controle em desenvolvimento com 2888 participantes, 1566 casos (idade média  $53,3 \pm 8,0$  anos, 79,1% homens) e 1322 controles (idade média  $52,7 \pm 7,8$  anos, 76,4% homens). Os casos foram selecionados entre pacientes que receberam alta após serem internados por infarto do miocárdio / angina instável diagnosticados segundo critérios previamente descritos,<sup>3</sup> ou com DAC confirmada por angiografia com uma ou mais lesão coronariana de estenose  $\geq 70\%$  em uma ou mais artéria coronária importante ou seus ramos principais. A ausência de ateroma ou presença de ateroma sem alteração de fluxo foram excluídas das análises. O grupo controle foi composto de voluntários sadios, sem sintoma ou história de DAC, selecionados da mesma população. Todos os controles foram submetidos à avaliação clínica quanto a fatores de risco cardiovasculares convencionais, à eletrocardiografia (ECG) e, em casos de dúvida, a um teste de estresse (exercício), a um eco-stress ou à tomografia computadorizada para determinação do escore de cálcio. Casos e controles foram pareados por sexo e idade.

Como critérios de inclusão foi considerada idade limite de 65 anos e ser um residente permanente na Ilha da Madeira a fim de se evitar mistura genética. Análise de Componentes Principais (ACP) foi usada para análise de estratificação da

população quanto à possível mistura genética e detecção de *outliers* genéticos significativos ( $< 5\%$ ).<sup>4</sup>

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do hospital segundo Declaração de Helsinki e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento.

### Coleta de dados

Os dados foram coletados de todos os indivíduos utilizando-se um formulário padrão que incluiu dados demográficos, características clínicas e fatores de riscos (sexo, idade, nível de atividade física, tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes, história familiar de DAC, índice de massa corporal) (IMC), frequência cardíaca e velocidade de onda de pulso (VOP).

Foram considerados “tabagistas” participantes fumantes ou aqueles que pararam de fumar há menos de 5 anos.<sup>5</sup>

Hipertensão essencial foi considerada quando os pacientes apresentavam esse diagnóstico na inclusão no estudo e/ou estavam em uso de medicamento anti-hipertensivo há mais de 3 meses, ou foram diagnosticados recentemente com pressão sanguínea sistólica ou diastólica  $\geq 140/90$  mmHg em pelo menos 3 ocasiões.<sup>6</sup>

Dislipidemia foi definida para a população controle como níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL)  $> 140$  mg/dL, lipoproteína de alta densidade (HDL)  $< 45$  mg/dL para mulheres e  $< 40$  mg/dL para homens, triglicérides  $> 150$  mg/dL e apolipoproteína (Apo) B  $> 100$  mg/dL. Os pacientes (em alto risco) foram considerados dislipidêmicos se os níveis de LDL fossem maiores que 100 mg/dL, HDL  $< 45$  mg/dL para mulheres e  $< 40$  mg/dL para homens, triglicérides  $> 150$  mg/dL, Apo B  $> 100$  mg/dL e colesterol não-HDL (colesterol total-HDL)  $> 130$  mg/dL.<sup>7</sup>

Todos os indivíduos foram classificados como diabéticos se estivessem em uso de hipoglicemiantes orais ou insulina, ou se seus níveis plasmáticos de glicose fossem superiores a 7,0 mmol/L ou 126 mg/dL.<sup>8</sup>

História familiar de doença cardiovascular (DCV) prematura foi considerada àqueles com pai ou irmão que receberam diagnóstico de DCV em idade inferior a 55 anos ou mãe ou irmã em idade inferior a 65 anos.

A definição de outros FRTs foi baseada com base em critérios padrões, como descrito anteriormente.<sup>9,10</sup>

### Análise bioquímica

As amostras de sangue foram extraídas após 12 horas de jejum. As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório central do hospital, de acordo com técnicas padrões. Para determinar os níveis de colesterol total, HDL, LDL, triglicérides e glicose, as amostras de sangue foram colocadas em tubos secos, centrifugados 30 minutos após coleta a 3500 g, e em seguida quantificadas por técnica enzimática por um analisador automático (Beckman Coulter). Os marcadores bioquímicos tais como lipoproteína-a – Lp(a), (Apo B), e proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) foram quantificadas por imunoturbidimetria também utilizando-se um sistema automático “AU 5400” (Beckman Coulter).

### Seleção de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

Foram utilizadas duas abordagens para identificar SNPs para ERGs. Na primeira abordagem, fizemos uma busca no banco de dados do *National Human Genome Research Institute* que incluiu SNPs identificados por GWAs e catalogados com base no fenótipo e/ou traço, pelas palavras chave: “doença arterial coronariana”, “doença coronariana”, “infarto do miocárdio”, e “infarto precoce”. A segunda abordagem incluiu SNPs identificados por abordagens de genes candidatos, incluídos em um ERG publicado para DAC.

Os critérios de inclusão incluíram genes descritos em estudos prévios com um *Odds Ratio* (OR) para DAC  $\geq 1,1$  e uma frequência do alelo menos comum (MAF, *minor allele frequency*)  $> 5\%$ . Genes com baixo equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,002$ ) (após correção de Bonferroni) foram excluídos.

No total, 33 SNPs foram selecionados de acordo com suas possíveis funções relacionadas à DAC – ciclo celular, migração celular e inflamação – rs1333049 (9p21.3), rs4977574 (CDKN2B), rs618675 (GJA4), rs17228212 (SMAD3), rs17465637 (MIA3), rs12190287 (TCF21), rs3825807 (ADAMTS7), rs11556924 (ZC3HC1), rs12526453 (PHACTR1); genes envolvidos no status pró-oxidativo (rs1801133 (MTHFR 677), rs1801131 (MTHFR 1298), rs705379 (PON 1), rs662 (PON 192), rs854560 (PON 55), rs6922269 (MTHFD1L)); genes associados com fatores de risco modificáveis tais como metabolismo lipídico, hipertensão e diabetes/obesidade – rs3798220 (LPA), rs2114580 (PCSK9), rs20455 (KIF6), rs7412/rs429358 (APOE), rs964184 (ZNF259), rs599839 (PSRC1), rs5186 (AT1R), rs699 (AGT), rs4340 (ACE), rs4402960 (IGF2BP2), rs1326634 (SLC30A8), rs266729 (ADIPOQ), rs7903146 (TCF7L2), rs17782313 (MC4R), rs1801282 (PPARG), rs1884613 (HNF4A), rs8050136 (FTO) e rs1376251 (TAS2R 50) (Tabela suplementar 1).

### Análises genéticas

As análises genéticas foram realizadas no laboratório de genética humana da Universidade da Madeira. O DNA genômico foi extraído de uma amostra de 80  $\mu\text{L}$  de sangue periférico utilizando-se um método padrão com fenol-clorofórmio. Um ensaio de genotipagem de SNPs pelo sistema TaqMan foi realizado utilizando-se sondas e *primers* marcados conforme fabricante (*TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems*).

Todas as reações foram realizadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real pelo sistema e programa Applied Biosystems 7300 (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*) sem nenhum conhecimento prévio dos dados clínicos dos indivíduos. A qualidade das técnicas de genotipagem foi controlada pela inclusão de um controle branco (non-template) em cada placa de 96 poços. Todos os ensaios TaqMan foram realizados com duplicatas (cegas), correspondendo a 20% das amostras. Alguns genótipos de SNPs foram confirmados aleatoriamente pelo procedimento convencional de sequenciamento direto do DNA, sendo que 10-15% de todas as amostras foram reamplificadas por sequenciamento. As taxas de acurácia (*call rates*) para SNPs no ERG foram 98-100%; uma taxa de 95% foi estabelecida como controle de qualidade.

### Cálculo do ESCORE DE RISCO GENÉTICO

Avaliamos vários modelos para elaborar o ERG com base em escores ponderados e não ponderados, considerando cada padrão de herança de cada locus gênico. Um escore aditivo (ERGA) foi gerado, isto é, para cada uma das 31 variantes, foi estabelecido um escore de 0, 1 e 2 com base na existência de 0, 1 ou 2 alelos de risco, calculando-se a soma acumulada dos alelos de risco nessas variantes. Cada indivíduo poderia receber um ERG de 0 a 62. Além disso, um ERG multiplicativo (ERGM) foi calculado, multiplicando-se o risco relativo para cada genótipo.

Para validar o cálculo do escore de risco, selecionamos uma amostra aleatória de 597 pacientes (20%).

### Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas em frequências e porcentagens e comparadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As variáveis contínuas foram expressas em média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana (1º quartil – 3º quartil) e comparadas pelo teste t para amostras não pareada ou o teste de Mann-Whitney, conforme apropriado. O teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene foram usados para testar normalidade e homogeneidade das variáveis. Todas as análises foram consideradas significativas se os valores de p fossem menores que 0,05.

Regressão logística binária foi usada para determinar o efeito (combinado e separado) das variáveis sobre o risco para DAC angiográfica. O ERG foi delineado como uma variável contínua e em quartis, usando-se o primeiro quartil como categoria de referência. As análises multivariadas foram usadas para ajuste do modelo quanto a 7 covariáveis também associadas com DAC.

Desenvolvemos características de operação do receptor (curvas ROC) e calculamos a área sob a curva (AUC) para modelos de regressão logística incluindo FRTs com e sem o ERG (quartis). As curvas ROC foram comparadas em pares usando o teste DeLong.<sup>11</sup> A calibração do modelo foi testada pelo teste de Hosmer-Lemeshow. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Colinearidade entre as variáveis foi medida avaliando-se tolerância e fator de inflação da variância (FIV).

Associações dos SNPs com DAC foram consideradas significativas para  $p < 0,05$  e em conjunto com os modelos de ERG para  $p < 0,0015$  aplicando-se a correção de Bonferroni. Para MAF de 30%, o estudo apresentou poder de 70% para detectar um OR para DAC de 1,3 e  $> 90\%$  para OR  $> 1,35$ , para alfa bicaudal  $< 0,05$  para 2000 casos e 1000 controles. Esses cálculos foram realizados usando o programa *G power Statistical Power Analyses*.

O potencial do ERG em melhorar a estratificação de risco individual foi medido pelo método *net reclassification improvement* (NRI),<sup>12</sup> definido como a porcentagem de indivíduos em cada subgrupo que mudaram de categorias quando um novo modelo de ERG foi adicionado. Ainda, a melhora integrada de discriminação (*integrated discrimination improvement, IDI*), definida como a melhora incremental no valor prognóstico do ERG, foi comparada entre casos e controles. O NRI foi calculado para variáveis categóricas e não categóricas (contínuas)

utilizando-se o programa PredictABEL disponível em software R (versão 3.2.0). As análises estatísticas foram realizadas usando os programas SPSS versão 19.0 (IBM), o MedCalc versão 13.3.3.0 e o software R versão 3.1.2.

## Resultados

### Característica basal da população

A Tabela 1 apresenta as características basais de nossa população. Conforme o esperado, não houve diferença entre casos e controles quanto ao sexo e idade, pois esse era um dos critérios de seleção. Uma maior frequência de dislipidemia, diabetes, hipertensão, sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool, e história familiar de DCV prematura foi encontrada nos pacientes com DAC que nos controles ( $p < 0,0001$ ). Ainda, VOP, IMC e relação cintura-quadril foram mais frequentes nos controles, com diferença estatisticamente significativa (Tabela 1). Valores das outras variáveis bioquímicas analisadas – hemoglobina, leucócitos, fibrinogênio, homocisteína e PCR-us  $> 3$  foram significativamente mais elevados no grupo de pacientes com DAC que nos controles ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

### Cálculo e análise do escore de risco genético

Desvios do equilíbrio Hardy-Weinberg para os 33 genótipos em loci individuais foram avaliados pelo teste do qui-quadrado e valores de  $p < 0,02$  com correção de Bonferroni para todos os SNPs foram incluídos. A variante genética LPA foi excluída das análises devido ao baixo valor de  $p$  no modelo Hardy-Weinberg ( $p < 0,002$ ). O desequilíbrio de ligação para SNPs (mutuamente ajustados) ao longo dos genes foi avaliado. O gene CDKN2B foi excluído devido ao forte desequilíbrio de ligação com outro SNP selecionado, rs1333049, que reside na região 9p21. Os demais 31 SNPs foram incluídos na análise (Tabela Suplementar 1).

No presente estudo, o ERGM apresentou a maior AUC para avaliar o risco de DAC, com uma especificidade de 62,3% e sensibilidade de 54% (dados não apresentados) e, por isso, esse modelo foi calculado nas análises subsequentes (Tabela 2 Suplementar). O ERGM de 31 SNPs foi significativamente mais alto nos casos de DAC que nos controles ( $0,67 \pm 0,73$  vs  $0,48 \pm 0,53$ ;  $p < 0,0001$ ), mesmo após discriminação por quartil e sexo (Tabela 2).

Distribuição normal de alelos de risco na amostra total incluindo casos e controles está apresentada na Figura 1. Embora os pacientes com DAC apresentaram valores de ERGM mais baixos, alelos de risco foram mais prevalentes nesse grupo que nos controles. Nos pacientes com DAC, uma média de 27 alelos de risco foi observado em 52% dos indivíduos, e uma média de 26 alelos de risco foi observado em 52% dos controles (Figura 1).

Quando analisados em decis, o ERGM mostrou que o aumento no número de alelos de risco esteve significativamente associado com DAC como mostrado pelos valores de  $p$  interdecis – 1º decil: OR = 0,612 (0,439 – 0,853),  $p = 0,004$ ; 9º decil: OR = 0,957 (1,400 – 2,734),  $p < 0,0001$  e último decil: OR = 2,472 (1,755 – 3,482),  $p < 0,0001$  (Figura 2).

Análise de regressão logística foi realizada com quartis de ERGM, usando o primeiro quartil como categoria de referência. Os resultados mostraram um aumento no risco para DAC com significância estatística ao longo dos quartis (2º, 3º e 4º), com respectivos valores de ORs de IC de 1,372 (1,114 – 1,689), 1,878 (1,522 – 2,317) e 2,588 (2,090 – 3,204), respectivamente (dados não apresentados).

Um modelo preditivo multivariado para DAC, incorporando os quartis de ERGM e FRTs está apresentado na Tabela 3. O quarto quartil do ERGM apresenta contribuição intermediária ao fenótipo de DAC – OR = 2,727 (2,162 – 3,439), maior que dislipidemia – OR = 1,298 (1,023 – 1,646) e hipertensão – OR = 2,067 (1,744 – 2,450). A contribuição reduzida de dislipidemia no risco de DAC pode ser devido ao uso rotineiro de estatina nos pacientes com DAC. O ajuste para as variáveis de confusão (sexo, idade, frequência cardíaca, VOP, baixo nível de atividade física, IMC e história familiar de DAC) mostrou aumentos discretos no OR para os FRTs e segundo e terceiro quartis do ERGM.

Utilizamos o FIV para testar a multicolinearidade entre as variáveis incluídas no modelo de regressão logística ajustado pelo ERGM desenvolvido no estudo. A tolerância e o FIV foram  $> 0,1$  e  $< 10$ , respectivamente, mostrando ausência de colinearidade entre as variáveis incluídas no modelo.

Duas curvas ROC foram traçadas com base nos FRTs com e sem o ERGM (Figura 3). A primeira curva ROC estimou uma AUC de 0,72, aumentada para 0,74 quando o ERGM foi adicionado, revelando um melhor ajuste do modelo ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3).

O NRI e seu valor  $p$  foram usados para avaliar melhora na capacidade preditiva ocorrida após a adição de um conjunto de biomarcadores ao modelo de predição existente. A adição dos quartis de ERGM ao FRT melhorou a classificação do risco dos modelos (Tabela 4). Esse novo marcador forneceu um NRI contínuo de 31% (IC 95%: 23,8-38,3%;  $p < 0,0001$ ) com reclassificação de 14,6% dos pacientes com DAC e 16,4% dos indivíduos controles (Tabela 4).

NRI também foi calculado usando variáveis categóricas e aplicado neste estudo caso-controle, e definido como a porcentagem de indivíduos de cada grupo que mudaram de categoria na adição de um novo marcador (escore de quartil de DAC). Mudança para uma melhor categoria (maior entre os pacientes que nos controles) foi calculada para se avaliar o potencial impacto para o uso clínico. O NRI mostrou melhor capacidade de melhorar a classificação dos indivíduos ao promover a reclassificação de 19,5% dos pacientes da categoria de risco 50-75% à categoria de maior risco (75-100%). Ainda, 14,1% dos indivíduos saudáveis mudaram para uma categoria de menor risco, da categoria 25-50% para a categoria de risco  $< 25\%$  (Tabela 5).

Ainda, a inclusão de quartis de ERGM ao FRT resultou em um IDI de 2,5% (IC 95%: 1,9-3,1%;  $p < 0,0001$ ) (dados não apresentados).

## Discussão

Anos atrás, polimorfismos em vias biológicas plausíveis, importantes na aterosclerose, foram genotipados para

Tabela 1 – Características basais da população estudada

Variáveis	Casos (n = 1566)	Controles (n = 1322)	Valor de p
Idade, anos	53,3 ± 8,0	52,7 ± 7,8	0,053
Sexo masculino, n (%)	1238 (79,1%)	1010 (76,4%)	0,087
Dislipidemia <sup>†</sup> , n (%)	1398 (89,3)	1103 (83,4)	0,0001
Colesterol total, mg/dL	180,0 (154,0 – 213,0)	205,0 (181,0 – 234,0)	< 0,0001
LDL, mg/dL	104,6 (82,8 – 128,7)	127,2 (104,7 – 152,3)	< 0,0001
HDL, mg/dL	41,0 (35,0 – 49,0)	48,0 (41,0 – 57,0)	< 0,0001
Triglicérides, mg/dL	141,0 (102,0 – 210,0)	121,0 (89,0 – 174,0)	< 0,0001
Apolipoproteína B, mg/dL	93,9 (75,5 – 113,3)	92,5 (43,0 – 115,8)	< 0,0001
Lipoproteína (a), mg/dL	20,4 (9,2 – 62,0)	12,8 (8,8 – 29,3)	< 0,0001
Diabetes, n (%)	533 (34,0)	175 (13,2)	< 0,0001
Glicose de jejum, mg/dL	106,0 (96,0 – 129,0)	99,0 (91,0 – 109,0)	< 0,0001
Hipertensão, n (%)	1114 (71,1)	700 (53,0)	< 0,0001
PAS, mmHg	137,9 ± 20,8	136,2 ± 18,1	0,024
PAD, mmHg	82,6 ± 11,8	83,9 ± 11,1	0,002
Frequência cardíaca, bpm	68,8 ± 12,5	72,3 ± 11,5	< 0,0001
VOP, m/s	8,6 ± 1,9	8,3 ± 1,7	< 0,0001
Tabagismo <sup>*</sup> , n (%)	730 (46,6)	309 (23,4)	< 0,0001
Nível de atividade física <sup>†</sup> , n (%)	573 (36,6)	761 (57,6)	< 0,0001
Álcool, g/dia	24,7 ± 49,7	18,2 ± 28,2	< 0,0001
IMC, kg/m <sup>2</sup>	28,6 ± 4,2	28,1 ± 4,5	0,007
Cintura/Altura	0,61 ± 0,06	0,59 ± 0,07	< 0,0001
História familiar, n (%)	373 (23,8)	167 (12,6)	< 0,0001
Hemoglobina, g/dl	14,6 (13,8 – 15,4)	14,7 (14 – 15,4)	0,001
Leucócitos, 10 <sup>3</sup> /μl	7,1 (6 – 8,3)	6,6 (5,6 – 7,8)	< 0,0001
Fibrinogênio, mg/dl	387 (337 – 444)	361 (315 – 409)	< 0,0001
Homocisteína, μmol/L	12,2 (10 – 14,9)	11,4 (9,7 – 13,6)	< 0,0001
PCR-us, mg/L > 3, n (%)	648 (41,4)	496 (37,5)	0,035

<sup>†</sup> Controles: LDL > 140 mg/dL, HDL < 40 para homens e < 45 para mulheres; triglicérides > 150 mg/dL, APO B > 100mg/dL. Casos: LDL > 100 mg/dL; triglicérides > 150 mg/dL, HDL < 40 mg/dL para homens e < 45 mg/dL para mulheres; APO B > 100 mg/dL, não-HDL > 130 mg/dL. \* Mais que 40min/semana; † Fumantes atuais ou que parou há menos de 5 anos; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; VOP: velocidade de onda de pulso; IMC: índice de massa corporal; PCR-us: proteína C reativa ultrasensível. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste do qui-quadrado. Variáveis contínuas foram apresentadas em média ± desvio padrão (teste t de Student) e variáveis bioquímicas em mediana (1º quartil – 3º quartil) (teste de Mann-Whitney). Significância estatística: p < 0,05.

determinar sua associação com DAC. Essa abordagem de genes candidatos revelou cerca de 30 loci de SNPs de alta confiabilidade com efeitos significativos sobre a aterosclerose.<sup>13</sup> Contudo, seguindo-se uma abordagem tradicional de genes candidatos, foram obtidos resultados conflitantes ou com fracas associações; estudos de replicação são necessários para validação consistente desses resultados.

Em 2004, Mendonça et al. genotiparam, pela primeira vez, polimorfismos I/D da enzima conversora de angiotensina (ECA) em uma população portuguesa, relatando resultados similares àqueles descritos na literatura.<sup>14</sup>

Após o desenvolvimento de microarranjos (arrays) de alta capacidade em 2008,<sup>15</sup> GWAS examinaram milhões de polimorfismos simultaneamente em várias subpopulações

étnicas com um delineamento caso-controle. O nível de significância mínima padronizado estabelecido em  $1 \times 10^{-5}$  deu confiabilidade à genética cardiovascular e a colocou em evidência.<sup>16</sup>

Em 2007, Samani et al.,<sup>17</sup> identificaram, pela primeira vez, loci cromossômicos fortemente associados com DAC no estudo *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC) (que envolveu 1926 pacientes com DAC e 2938 controles) e conduziram replicação no estudo *German MI (Myocardial Infarction) Family Study*.<sup>17</sup>

Nos anos seguintes, a associação de um número surpreendente de variantes genéticas com DAC foi identificada. A variante 9p21 foi a variante mais frequentemente relatada nas populações. O enorme consórcio do Wellcome

Tabela 2 – Distribuição do escore de risco genético multiplicativo (ERGM) para casos e controles por quartis e gênero

Variáveis	Casos (n = 1566)	Controles (n = 1322)	Valor de p
ERGM	0,67 ± 0,73	0,48 ± 0,53	< 0,0001
1º Quartil	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,05	
2º Quartil	0,33 ± 0,05	0,33 ± 0,05	
3º Quartil	0,52 ± 0,07	0,52 ± 0,07	< 0,0001
4º Quartil	1,35 ± 1,02	1,18 ± 0,88	
ERGM para homens	0,67 ± 0,77	0,48 ± 0,44	< 0,0001
ERGM para mulheres	0,65 ± 0,58	0,51 ± 0,74	0,006

ERGM expressos em média ± desvio padrão (teste t de Student). Significância estatística:  $p < 0,05$ .

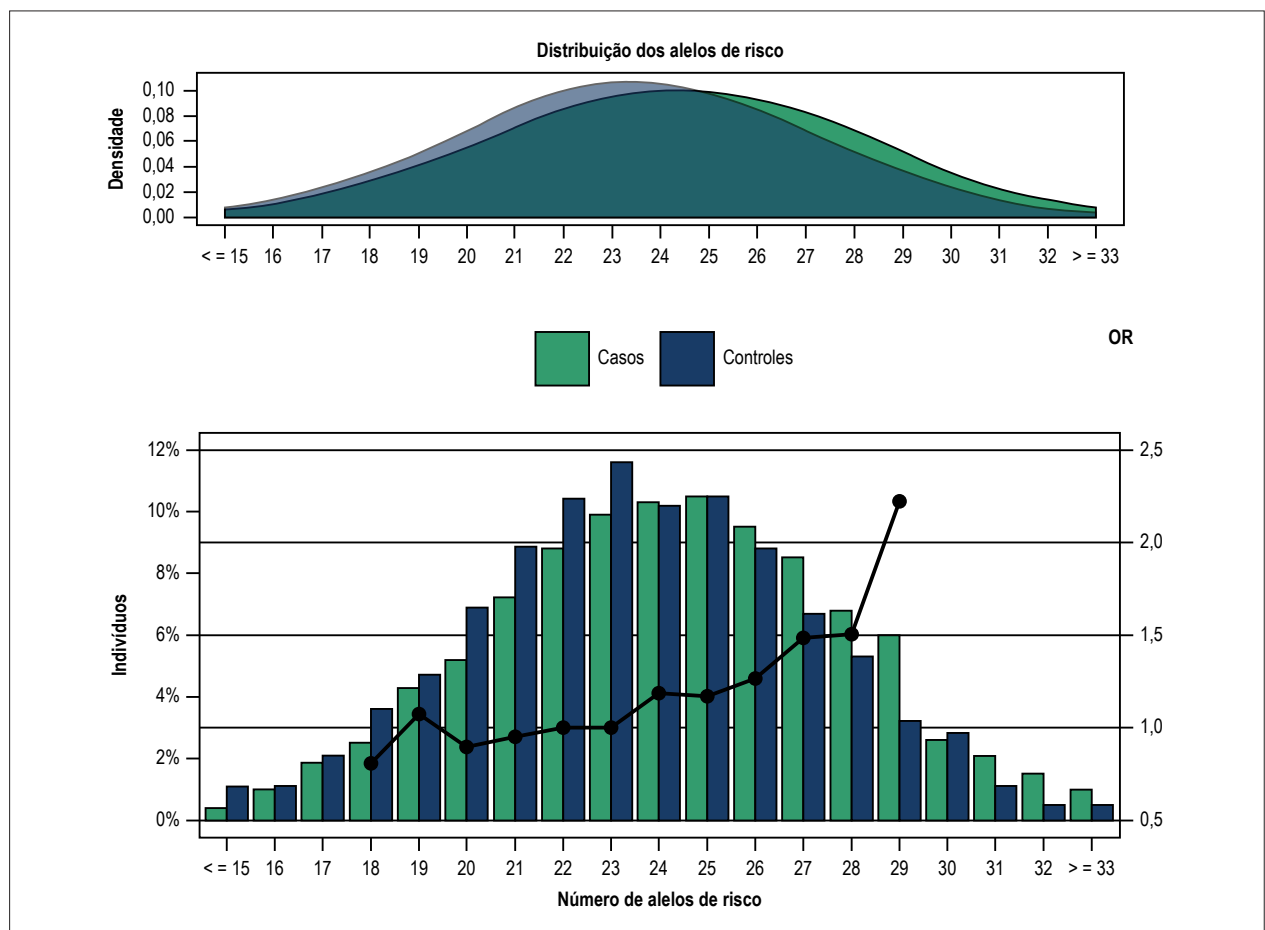
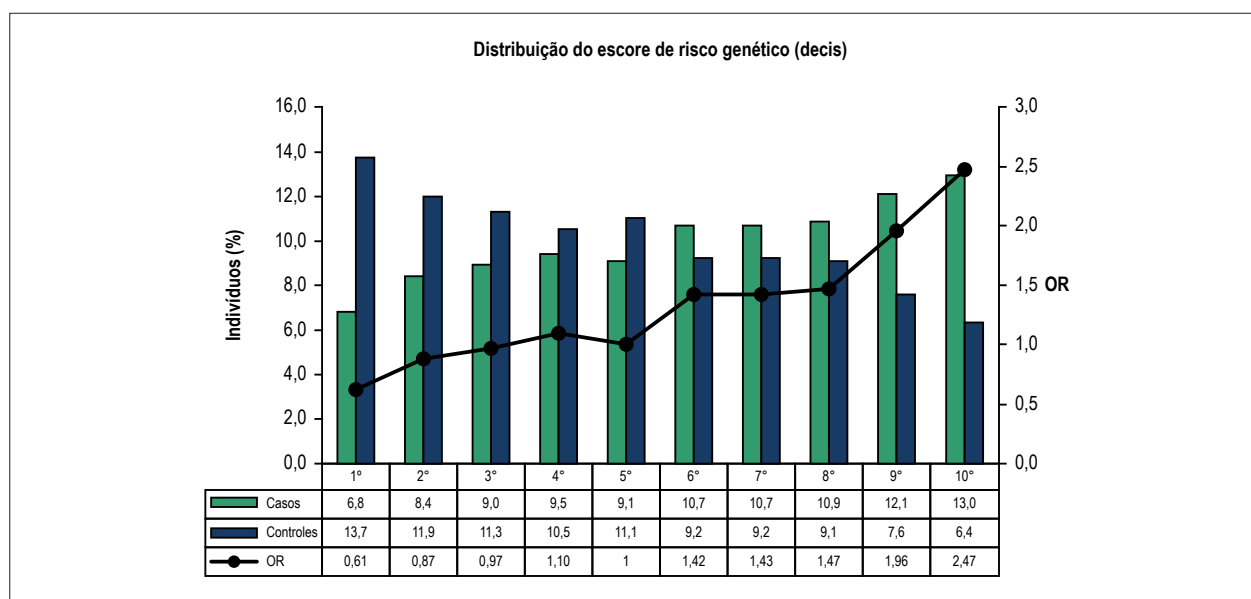


Figura 1 – Distribuição dos alelos de risco por casos e controles. Um modelo de regressão logística foi usado para determinar o risco de doença arterial coronariana pelo número de alelos de risco em comparação ao número de alelos de referência (23 alelos, em relação à mediana dos controles). Cada ponto representa o odds ratio (obtido por análise de regressão) para doença arterial coronariana.

Trust, juntamente com três outros grupos europeus de pesquisadores, reuniram-se no projeto CARDIOGRAM que confirmou, em uma grande amostra (> 22000 casos) de indivíduos de ascendência europeia, um aumento de 29% no risco de infarto do miocárdio por cópia da variante rs1333049 9p21 ( $p = 2 \times 10^{-20}$ ).<sup>18</sup>

Nosso grupo de pesquisadores reproduziu essa análise da variante 9p21 na população portuguesa e encontrou uma prevalência de 35,7% do genótipo CC nos pacientes com DAC, com um OR ajustado de 1,34,  $p = 0,010$ . O OR ajustado para FRT do genótipo CC foi de 1,7 ( $p = 0,018$ ) e do genótipo CG, encontrou-se um OR



**Figura 2** – Distribuição do escore de risco genético em decis por casos e controles. Utilizou-se um modelo de regressão logística com o 5º decil para os controles como classe de referência.

**Tabela 3** – Análise multivariada realizada com escore de risco genético multiplicativo (ERGM) e fatores de risco tradicionais

Variáveis	OR* (IC 95%)	Valor de p	OR* (IC 95%)	Valor de p
ERGM (Quartis)	-----	-----	-----	< 0,0001
2º	1,355 (1,082 – 1,698)	0,008	1,406 (1,107 – 1,786)	0,005
3º	1,934 (1,539 – 2,429)	< 0,0001	2,006 (1,575 – 2,554)	< 0,0001
4º	2,727 (2,162 – 3,439)	< 0,0001	2,657 (2,083 – 3,389)	< 0,0001
Tabagismo	3,440 (2,887 – 4,100)	< 0,0001	3,651 (3,030 – 4,401)	< 0,0001
Diabetes	3,138 (2,559 – 3,847)	< 0,0001	3,436 (2,763 – 4,273)	< 0,0001
Hipertensão	2,067 (1,744 – 2,450)	< 0,0001	2,187 (1,816 – 2,633)	< 0,0001
Dislipidemia	1,298 (1,023 – 1,646)	0,032	1,344 (1,044 – 1,731)	0,022
Constante	0,186	< 0,0001		

Teste de Wald (forward) (SPSS vs. 19.0); Controles: LDL > 140 mg/dL, HDL < 40 para homens e < 45 para mulheres; triglicérides > 150 mg/dL, APO B > 100mg/dL. Casos: LDL > 100 mg/dL; triglicérides > 150 mg/dL, HDL < 40 mg/dL para homens e < 45 mg/dL para mulheres; APO B > 100 mg/dL, não-HDL > 130 mg/dL. OR\*: odds ratio ajustado para idade e sexo; OR: Odds ratio ajustado para sexo, idade, frequência cardíaca, velocidade de onda de pulso, estilo de vida sedentário, índice de massa corporal, e história familiar. IC: intervalo de confiança. Significância estatística: p < 0,05.

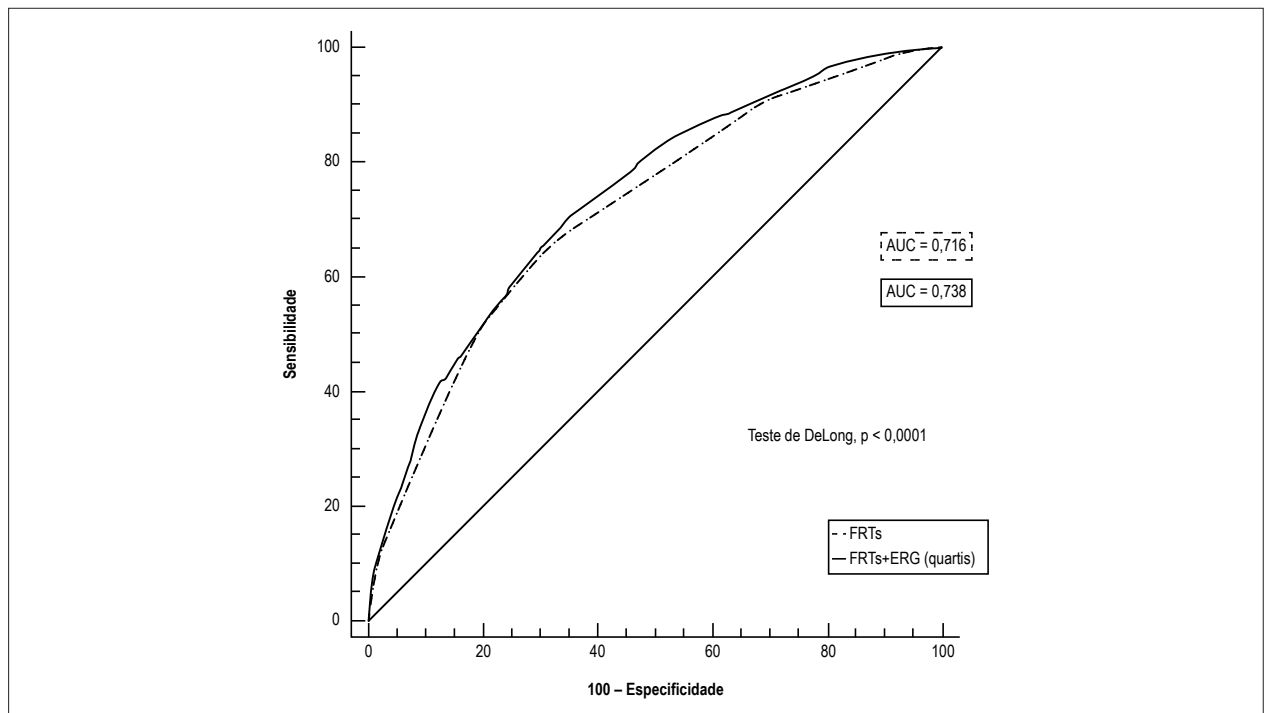
de 1,5 (p = 0,048). Os autores concluíram que, apesar de o mecanismo subjacente ao risco não ser conhecido, encontrou-se resultado consistente desse alelo de risco na estratificação de risco para DAC, mesmo em populações muito diferentes. A presença de genótipo CC ou CG parece, então, ser útil na predição do risco de se desenvolver DAC na população portuguesa.<sup>19</sup>

A meta-análise de GWAS para DAC mais recente identificou 46 associações significativas e 104 associações potenciais com risco aumentado para DAC.<sup>20,21</sup>

Em nosso estudo, observamos um aumento contínuo e gradual no risco de DAC com o aumento do número de alelos para risco de DAC. Indivíduos no decil mais baixo estão naturalmente protegidos, ao passo que aqueles no

decil superior do ERG apresentaram um risco de 2,472 (1,755 – 3,482). Apesar de haver sobreposição na distribuição do escore de casos e controles, o ERG está significativamente associado com o risco para DAC, e pode ser utilizado na identificação de indivíduos com maior risco, em termos de estilo de vida e intervenções terapêuticas.

Nossos resultados são similares a de outros estudos em populações caucasianas em que o ERG com 13, 29 ou 109 NPs<sup>22-24</sup> eram independentes, e promoveram um pequeno aumento no poder preditivo de FRTs observado por aumentos na AUC, mudanças no index-C ou métodos estatísticos discriminatórios mais modernos como medidas de reclassificação ou de discriminação melhorada (improved discrimination).



**Figura 3** – Curvas ROC baseadas no modelo basal (fatores de risco tradicionais, FRTs) e após inclusão do escore de risco genético (ERG) (quartis) na predição de risco para doença arterial coronariana. As duas curvas são baseadas nos modelos de regressão logística incorporando-se fatores de risco tradicionais (diabetes, dislipidemia, tabagismo e hipertensão) com e sem o escore de risco genético. AUC: área sob a curva. O teste de DeLong usado na comparação entre as duas AUCs ( $p < 0,0001$ )

**Tabela 4** – Índice de reclassificação líquida livre de categorias (*category-free net reclassification index, cfNRI*) após adição dos quartis do escore de risco genético

Grupo	n	Maior risco n (%)	Menor risco n (%)	p (cfNRI)	cfNRI (%)	cfNRI (IC 95%)
Pacientes com DAC	1566	897 (57,3%)	669 (42,7%)	< 0,0001	14,6%	(9,7-19,5%)
Controles sadios	1322	553 (41,8%)	769 (58,2%)	< 0,0001	16,4%	(11,2-21,8%)
Total	2888	---	---	< 0,0001	31%	(23,8-38,3%)

DAC: doença arterial coronariana; IC: intervalo de confiança; para essa análise, utilizou-se a função "improveProb" do programa R "Hmisc".

Relatamos um OR mais alto para o 4º quartil do ERG (2,59) comparado ao OR de 1,66 relatado por Ripatti et al.,<sup>22</sup> no quartil mais elevado. Ao se comparar o peso relativo do ERG na análise logística multivariada, encontramos um OR um pouco mais baixo para tabagismo, hipertensão e dislipidemia. No estudo de Ripatti et al.,<sup>22</sup> um ERG ponderado também mostrou-se um preditor independente mesmo após ajuste por idade, sexo e FRTs em uma população do norte europeu. O risco relativo do ERG baseado em 13SNPs também foi mais baixo que aquele de dislipidemia em comparação aos efeitos da hipertensão.<sup>22</sup>

Neste estudo, conseguimos aumentar o poder de definição dos FRTs. Por exemplo, adotamos uma definição ampla de dislipidemia, incluindo os níveis de Apo B conforme indicado nas diretrizes de 2016.<sup>7</sup> Além disso, nós só consideramos como "ex-fumantes" os indivíduos com mais de 5 anos sem fumar, a fim de considerar um risco de DCV semelhante ao de um não fumante.<sup>5</sup>

Thanassoulis et al.,<sup>24</sup> demonstraram que, ao adicionar um ERG baseado em 13 SNPs, 89 SNPs associados com fatores de risco modificáveis não aumentaram o poder do ERG – HR 1,01 (IC 95% CI 0,99–1,03;  $p = 0,48$ ). Esse fato revelou que a fraca associação de polimorfismos com fatores de risco para DAC na análise do ERG poderia estar mascarada por um efeito relativamente mais forte de outros polimorfismos. Diante da ausência de uma associação significativa dos perfis lipídicos com risco para DAC, Jansen et al. relataram em 2015 que vários SNPs associados com diabetes mellitus tipo 2 estavam relacionados com o risco para DAC.<sup>25</sup> Recentemente, em uma análise de associação genômica ampla, Webb et al.,<sup>26</sup> identificaram 6 novos loci significativamente associados com DAC. O estudo confirmou presença de pleiotropia entre perfil lipídico, fenótipo de pressão sanguínea, índice de massa corporal, diabetes e tabagismo.<sup>26</sup> Nosso ERG reúne SNPs relacionados a fatores de riscos e a fatores que não são de risco, corroborando interações entre genótipos e fenótipos.



**Tabela 5 – Tabela de reclassificação comparando-se risco predito para doença arterial coronariana com e sem os quartis do escore de risco genético**

Risco predito (sem ERG)	Reclassificação do risco predito (com ERG)				% aumento	% redução
	< 25%	25-50%	50-75%	75-100%		
<b>Pacientes com DAC (n = 1566)</b>						
< 25%	6	11	0	0	0,7%	0%
25-50%	44	335	123	0	7,9%	2,8%
50-75%	0	59	471	305	19,5%	3,8%
75-100%	0	0	9	203	0%	0,6%
NRI dos pacientes com DAC			20,9%			
<b>Controles sadios (n = 1322)</b>						
< 25%	65	36	0	0	2,7%	0%
25-50%	186	504	88	0	6,7%	14,1%
50-75%	0	60	268	79	6%	4,5%
75-100%	0	0	1	35	0%	0,1%
NRI controles			3,3%			
NRI total			24,2%			

DAC: doença arterial coronariana; NRI: Net Reclassification Improvement (melhora na reclassificação).

### Limitações do estudo

A principal utilidade clínica do ERG em nossa população observada foi uma melhora discreta na estratificação de risco. Comparado à estratificação de FRTs, o ERG parece ser uma melhor ferramenta para identificação de indivíduos em risco aumentado (maior que a média) para DAC. O número e o tipo de SNPs incluídos no estudo foram limitados e um número maior de SNPs de hits genéticos deve ser incluído em estudos futuros. No entanto, até o momento, a maior capacidade de se analisar múltiplos SNPs no ERG não foi traduzida em maior capacidade de predição de risco.

Finalmente, o presente estudo não incluiu análises gene-gene ou gene-ambiente. Tais análises aumentariam a significância estatística e, por isso, sua inclusão, bem como a de FRTs no ERG melhoraria nossa capacidade de prever o risco individualmente e com precisão.

### Conclusões

Um ERG baseado em múltiplas variantes de risco genético associou-se com risco aumentado de DCV em uma população portuguesa. Um ERG calculado com os 31 SNPs estudados apresentou associação significativa com DAC, e 25% dos indivíduos que carregam os alelos de maior risco têm, aproximadamente, 2,5 vezes maior risco para DAC em comparação àqueles situados no quartil mais baixo. O ERG promoveu uma pequena melhora na capacidade preditiva de risco em comparação ao modelo inicial, e pode melhorar a estratificação de risco individual. Esses resultados destacam o valor potencial de se incluir a informação genética aos modelos tradicionais.

### Agradecimentos

Agradecemos à Elsa Sousa, quem realizou todos os procedimentos administrativos, e à Rita Freitas (CIDEHUS,

Universidade de Évora, Portugal), quem revisou o manuscrito quanto à análise estatística.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Pereira A; Obtenção de dados: Pereira A, Freitas AI, Sousa AC, Brehm A; Análise e interpretação dos dados e Análise estatística: Pereira A, Freitas S, Henriques E, Rodrigues M; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Pereira A, Mendonça MI, Borges S, Brehm A, Reis RP.

### Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Andreia Pereira pela Universidade Nova de Lisboa.

### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do SESARAM, EPE sob o número de protocolo 50/2012. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

## Referências

1. Lawrence C, Boerwinkle E. Gene-environment interactions and gene therapy in atherosclerosis. *Cardiol Rev*. 1994;2:130-7.
2. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
3. Myocardial infarction redefined. A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2000;21(18):1502-13.
4. Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. *WIREs Computacional Statistics*. 2010;2:433-59.
5. Mons U, Müezziner A, Gellert C, Schöttker B, Abnet CC, Bobak M, et al; CHANCES Consortium. Impact of smoking and smoking cessation on cardiovascular events and mortality among older adults: meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies of the CHANCES consortium. *BMJ*. 2015;350:h1551.
6. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289(19):2560-72. Erratum in: *JAMA*. 2003;290(2):197.
7. Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
8. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3160-7.
9. National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. NHLBI Obesity Education Initiative. Bethesda (MD); 2000. NIH Publication Number: 00-4084.
10. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement: validation and clinical application studies. *Hypertension*. 1995;26(3):485-90.
11. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988;44(3):837-45.
12. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med*. 2011;30(1):11-21.
13. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol*. 2004;3(4):227-35.
14. Mendonça I, Freitas AI, Sousa AC, Gomes S, Faria P, Drumond A, et al. Polymorphism of the ACE gene is associated with extent and severity of coronary disease. *Rev Port Cardiol* 2004;23(12):1605-11.
15. Keating BJ, Tischfield S, Murray SS, Bhargava T, Price TS, Glessner JT, et al. Concept, design and implementation of a cardiovascular gene-centric 50 k SNP array for large-scale genomic association studies. *PLoS One*. 2008;3(10):e3583.
16. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 2008;9(5):356-69.
17. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al; WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007;357(5):443-53.
18. Preuss M, König IR, Thompson JR, Erdman J, Absher D, Assimes TL, et al; CARDIoGRAM Consortium. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(5):475-83.
19. Mendonça I, dos Reis RP, Pereira A, Café H, Serrão M, Sousa AC, et al. Associação independente da variante rs1333049, no locus 9p21, com a doença coronária, numa população portuguesa. *Rev Port Cardiol*. 2011;30(6):575-91.
20. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al; CARDIoGRAMplusC4D Consortium. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013;45(1):25-33.
21. Roberts R. Genetics of coronary artery disease. *Circ Res*. 2014;114(12):1890-903.
22. Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, Havulinna AS, Silander K, Sharma A, et al. A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet*. 2010;376(9750):1393-400.
23. Vaarhorst AA, Lu Y, Heijmans BT, Dollé ME, Böhringer S, Putter H, et al. Literature-based genetic risk scores for coronary heart disease: the Cardiovascular Registry Maastricht (CAREMA) prospective cohort study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(2):202-9.
24. Thanassoulis G, Peloso GM, Pencina MJ, Hoffman U, Fox CS, Cupples LA. A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and coronary artery calcium: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(1):113-21.
25. Jansen H, Loley C, Lieb W, Pencina MJ, Nelson CP, Kathiresan S, et al; CARDIoGRAM consortium. Genetic variants primarily associated with type 2 diabetes are related to coronary artery disease risk. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):419-26.
26. Webb TR, Erdmann J, Stirrups KE, Stitzel NO, Masca NG, Jansen H, et al. Systematic evaluation of pleiotropy identifies 6 further loci associated with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(7):823-36.



**Tabela Suplementar 1 – Lista das 33 variantes genéticas associadas com doença arterial coronariana, usadas para o desenvolvimento do escore de risco genético na população do estudo**

ID SNP	Gene mais próximo	Cr	Posição	OR Genotípico (IC95%)	Valor de p	OR Alélico (IC95%)	Valor de p	MAF (%)	Mecanismo de ação potencial
rs1333049	9p21.3	9	22125504	1,147 (1,036-1,270)*	0,008	1,155 (1,041-1,282)	0,007	45,8	Celular
rs4977574	CDKN2B	9	22098575	1,161 (1,049-1,286)*	0,004	1,172 (1,056-1,302)	0,003	42,0	Celular
rs618675	GJA4	1	34922761	1,143 (0,792-1,649)*	0,475	1,046 (0,918-1,191)	0,502	19,6	Celular
rs17228212	SMAD3	15	65245693	1,202 (0,888-1,629)*	0,234	1,025 (0,910-1,155)	0,684	25,3	Celular
rs17465637	MIA3	1	222650187	1,088 (0,971-1,220)*	0,148	1,088 (0,971-1,220)	0,147	28,6	Celular
rs12190287	TCF21	6	134256218	1,230 (1,100-1,375)*	< 0,0001	1,226 (1,098-1,368)	0,0003	32,7	Celular
rs3825807	ADAMTS7	15	76876166	1,073- (0,967-1,191)*	0,185	1,074 (0,967-1,194)	0,181	41,2	Celular
rs11556924	ZC3HC1	7	130023656	1,227 (1,058-1,423)*	0,007	1,157 (1,037-1,290)	0,009	34,3	Celular
rs1332844	PHACTR1	6	12927312	1,113 (1,003-1,235)*	0,044	1,113 (1,003-1,236)	0,043	44,3	Celular
rs2114580	PCSK9	1	55167236	1,079 (0,821-1,417)*	0,587	0,974 (0,866-1,096)	0,665	26,3	Lipídios
rs3798220	LPA	6	160540105	1,484 (1,212-1,816)*	< 0,0001	2,167 (1,452-3,235)	< 0,0001	2,1	Lipídios
rs20455	KIF6	6	39357302	1,129 (0,896-1,424)*	0,306	1,060 (0,949-1,184)	0,302	32,8	Lipídios
rs7412/ rs429358 <sup>1</sup>	APOE <sup>1</sup>	19	44908822/ 44908684	1,261 (1,062-1,497)*	0,008	1,231 (1,056-1,435)	0,008	13,4	Lipídios
rs964184	ZNF259	11	116778201	1,131 (0,986-1,298)*	0,078	1,130 (0,986-1,295)	0,079	17,7	Lipídios
rs599839	PSRC1	1	109279544	1,059 (0,933-1,203)*	0,375	1,058 (0,933-1,201)	0,379	21,4	Lipídios
rs1801133	MTHFR 677	1	11796321	1,178 (1,017-1,365)*	0,029	1,114 (0,998-1,243)	0,055	33,5	Oxidação
rs1801131	MTHFR 1298	1	11794419	0,944 (0,816-1,093)*	0,443	0,958 (0,854-1,075)	0,465	28,0	Oxidação
rs705379	PON -108	7	96324583	1,135 (0,950-1,355)*	0,163	1,068 (0,962-1,184)	0,217	46,4	Oxidação
rs662	PON 192	7	95308134	0,836 (0,652-1,072)*	0,157	0,927 (0,828-1,037)	0,186	30,1	Oxidação
rs854560	PON 55	7	95316772	1,161 (1,044-1,290)*	0,006	1,161 (1,044-1,290)	0,006	40,4	Oxidação
rs6922269	MTHFD1L	6	150931849	1,067 (0,804-1,416)*	0,653	0,996 (0,887-1,118)	0,943	27,3	Oxidação
rs5186	AT1R	3	148742201	1,245 (0,906-1,710)*	0,177	1,062 (0,942-1,198)	0,323	24,7	SRA
rs699	AGT	1	230710048	0,932 (0,798-1,090)*	0,380	0,969 (0,873-1,076)	0,552	42,9	SRA
rs4340	ACE	17	61565892	1,165 (1,001-1,355)*	0,048	1,083 (0,973-1,205)	0,143	38,1	SRA
rs4402960	IGF2BP2	3	185793899	1,124 (0,876-1,443)*	0,358	1,020 (0,911-1,141)	0,736	30,8	Diab/Obes
rs1326634	SLC30A8	8	117172544	1,213 (0,914-1,609)*	0,181	1,081 (0,961-1,217)	0,195	25,8	Diab/Obes
rs266729	ADIPOQ	3	186841685	1,209 (1,041-1,403)*	0,013	1,165 (1,030-1,318)	0,015	23,3	Diab/Obes
rs7903146	TCF7L2	10	112998590	0,961 (0,862-1,072)*	0,480	0,962 (0,863-1,072)	0,482	35,3	Diab/Obes
rs17782313	MC4R	18	60183864	1,314 (0,931-1,855)*	0,120	1,016 (0,896-1,152)	0,806	21,6	Diab/Obes
rs1801282	PPARG	3	12351626	1,427 (0,717-2,843)*	0,309	1,164 (0,970-1,396)	0,102	8,8	Diab/Obes
rs1884613	HNF4A	20	44351775	1,159 (0,987-1,360)*	0,072	1,106 (0,960-1,273)	0,163	16,2	Diab/Obes
rs8050136	FTO	16	53782363	1,194 (1,026-1,390)*	0,022	1,129 (1,016-1,255)	0,025	39,7	Diab/Obes
rs1376251	TAS2R 50	12	11030119	1,556 (0,767-3,155)*	0,217	1,080 (0,920-1,267)	0,349	11,9	Diab/Obes

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; Cr: cromossomo; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; MAF: frequência do alelo menos comum; SRA: sistema renina-angiotensina; Diab/Obes: Diabetes/Obesidade; \*Modelo aditivo; #Modelo recessivo; #Modelo dominante; \*Resultante de um haplótipo. A tabela apresenta a os loci de susceptibilidade para doença arterial coronariana, ORs genotípico e alélico e valores p para o principal SNP dentro de cada locus obtidos de estudos de associação genômica ampla e estudos de genes candidatos. ORs genotípicos apresentados para os modelos aditivo, recessivo e dominante. O mecanismo de ação potencial baseia-se no que já se sabe sobre a função do gene, incluindo fatores "celulares" (genes associados com ciclo celular, migração celular e inflamação); "Oxidação" (genes envolvidos no status pró-oxidativo e fatores de risco modificáveis tais como metabolismo dos "Lipídios" ("SRA") e Diabetes/Obesidade).

**Tabela Suplementar 2 – Regressão logística e respectivos odds ratio (OR), e curvas ROC com respectivas áreas sob a curva (AUC) para os modelos de escore de risco genético**

Modelos de ERG	OR (IC95%)	Valor de p <sup>1</sup>	AUC (IC95%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor de p <sup>2</sup>
Multiplicativo	1,78 (1,52 – 2,10)	< 0,0001	0,61 (0,59 – 0,62)	54,0	62,3	< 0,0001
Aditivo	1,06 (1,04 – 1,09)	< 0,0001	0,56 (0,54 – 0,58)	58,7	50,5	< 0,0001
Ponderado (Melhor OR)	1,02 (0,94 – 1,10)	0,660	0,57 (0,55 – 0,59)	41,0	70,3	< 0,0001
Ponderado (Beta)	2,23 (1,88 – 2,65)	< 0,0001	0,60 (0,58 – 0,61)	43,0	71,5	< 0,0001
Ponderado (OR da literatura)	1,35 (1,12 – 1,62)	0,001	0,54 (0,52 – 0,55)	53,4	54,1	0,008
Ponderado (clássico)	3,01 (2,32 – 3,89)	< 0,0001	0,59 (0,57 – 0,61)	59,4	54,4	< 0,0001

ROC: Característica de Operação do Receptor; AUC: Área sob a curva; ERG: escore de risco genético; IC: Intervalo de Confiança; Valor de P<sup>1</sup>: obtido por regressão logística para avaliar OR; valor p<sup>2</sup>: obtido pela curva ROC para verificar a significância estatística da área sob a curva. Significância estatística  $p < 0,05$ .