



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO  
CROMOSSÔMICA 9p21 EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES  
SUBMETIDOS AO EXAME DE CATETERISMO CARDÍACO**

Kátia Gerhardt

Lajeado, março de 2014

Kátia Gerhardt

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO  
CROMOSSÔMICA 9p21 EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES  
SUBMETIDOS AO EXAME DE CATETERISMO CARDÍACO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário Univates, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Verônica Contini

Lajeado, março de 2014

Kátia Gerhardt

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO  
CROMOSSÔMICA 9p21 EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES  
SUBMETIDOS AO EXAME DE CATETERISMO CARDÍACO**

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário Univates como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Saúde.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Verônica Contini – orientadora  
Centro Universitário Univates

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Júlia Pasqualini Genro  
Centro Universitário Univates

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andressa de Souza  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Vanderlei Biolchi  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lajeado, março de 2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda equipe do Serviço de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born de Lajeado, em especial ao Dr. Marcelo Arendt e os enfermeiros Camila e Adelar, pela colaboração e auxílio na coleta das amostras sanguíneas e no auxílio na coleta dos dados dos pacientes pertencentes ao estudo.

Em especial as bolsistas e voluntárias do projeto que ajudaram em cada passo para a realização deste trabalho, dentre elas as meninas Fernanda, Camile, Thaís, Raquel e Pricila que juntamente comigo fizeram que este trabalho tão complexo e trabalhoso se tornasse possível, elas que auxiliaram diariamente nas coletas e as entrevistas no hospital, nas extrações, nas análises bioquímicas, nas genotipagens e enfim, que colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado em cada uma destas etapas.

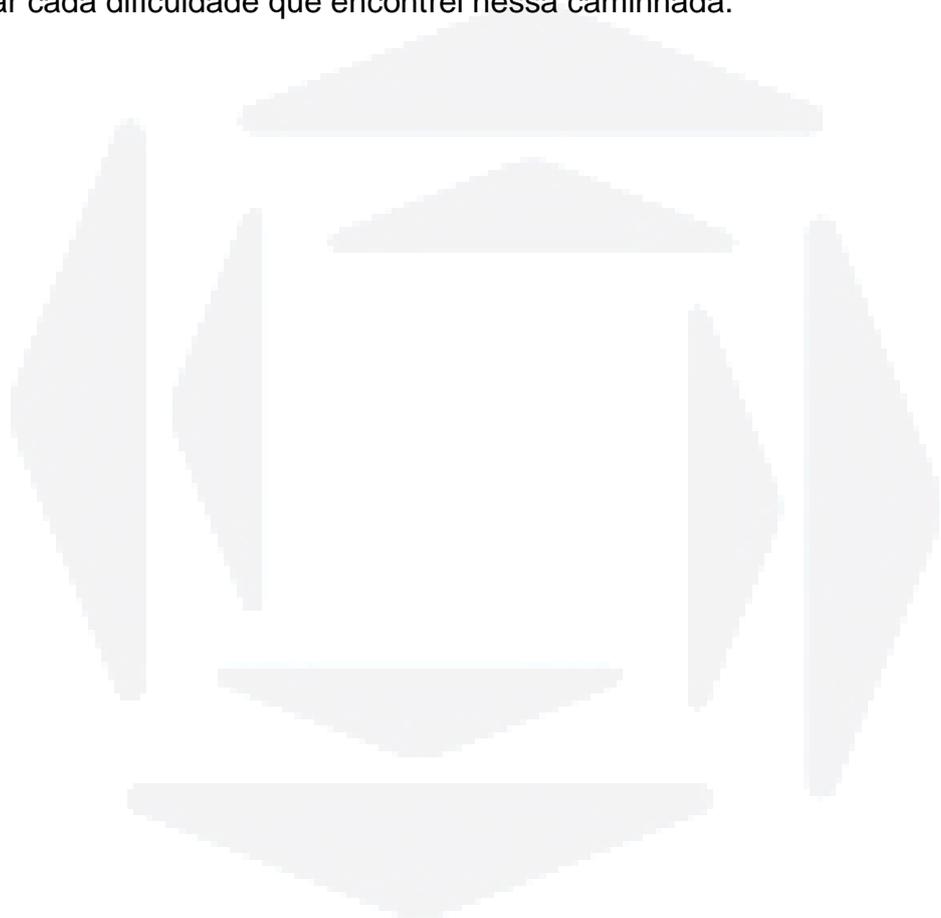
A minha orientadora Dra. Verônica Contini, pela paciência e persistência comigo para que este trabalho fosse sempre realizado em todos os aspectos da melhor forma possível. Com certeza sem o conhecimento dela todas nós do grupo dos cardiopatas não teríamos suporte técnico e científico para realizar cada etapa do nosso trabalho.

Também agradeço a minha família, em especial meu marido que sempre esteve ao meu lado me dando apoio e não deixando que eu desistisse em cada uma das minhas dificuldades. A meu querido filho, que soube entender cada minuto de ausência, tanto quando precisei me afastar para realizar os trabalhos das disciplinas assim como nas horas à noite para realizar as tarefas nos laboratórios. Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei e me deram força para persistir em meio às dificuldades no meio dessa caminhada. Ao meu irmão,

pelo apoio nas horas de estudo e pelo auxílio que necessitei durante os 24 meses do mestrado.

A todos os meus funcionários da farmácia que sempre foram pacientes e conseguiram segurar “todas as pontas” no trabalho quando tive que me ausentar para me dedicar na concretização deste trabalho.

Á Deus que me concedeu a vida e me deu força de vontade e paciência pra superar cada dificuldade que encontrei nessa caminhada.





*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*

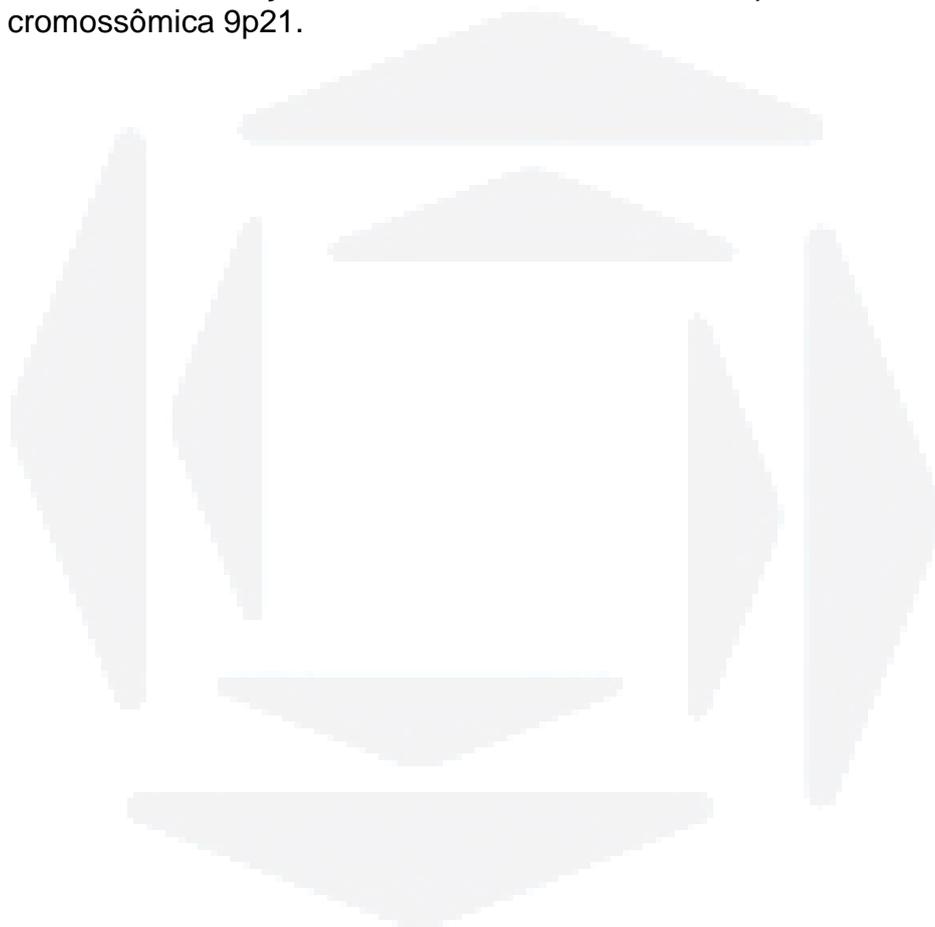
*(Leonardo da Vinci)*

## RESUMO

A doença arterial coronariana (DAC) caracteriza-se por depósitos de placas de gordura na parede das artérias coronárias, ocasionando assim a aterosclerose. A DAC é uma doença multifatorial, complexa e de alta incidência mundial, que resulta em elevado custo socioeconômico, envolvendo dispêndio com medicamentos, internações repetidas, perda de produtividade, aposentadorias precoces, cirurgias e, ocasionalmente, transplante cardíaco. Dentre os fatores de risco associados com a DAC, os estudos genéticos têm demonstrado que polimorfismos na região cromossômica 9p21 estão fortemente associados ao desenvolvimento da doença e suas complicações. Esta dissertação tem como objetivo investigar o papel de dois polimorfismos da região 9p21 rs10757274 e rs1333049 no desenvolvimento da DAC em uma amostra de pacientes submetidos ao exame de cateterismo cardíaco. A amostra foi constituída de 689 indivíduos adultos oriundos do Serviço de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born de Lajeado, RS. Os pacientes foram classificados em casos e controles com base na presença de estreitamento do lúmen do vaso das artérias coronárias, avaliadas por um cardiologista, de acordo com os laudos obtidos dos exames de cateterismo. Foram coletadas amostras de sangue para posteriores análises moleculares e bioquímicas, que serão realizadas nos Laboratórios do Centro Universitário Univates. As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas por contagem direta e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado através do teste do qui-quadrado. As análises estatísticas empregadas para comparar casos e controles envolveram o teste do qui-quadrado. Os efeitos dos polimorfismos nas variáveis clínicas dos pacientes foram avaliados através de modelos lineares gerais univariados. Não foi encontrada associação significativa entre os polimorfismos rs1333049 e rs10757274 em pacientes casos e controles com o risco de desenvolver DAC. Houve diferença significativa entre casos e controles em relação idade, sendo que os pacientes casos possuem idade média maior do que os controles. Também houve diferença significativa entre casos e controles em relação ao gênero, sendo que 57,8% dos indivíduos são do gênero masculino em casos. Observou-se uma diferença significativa de IMC aonde pacientes controles tiveram o IMC maior em relação aos casos. Referente aos parâmetros bioquímicos houve diferença significativa na comparação dos pacientes casos e controles nos níveis de HDL-colesterol, sendo significativamente menor em casos quando comparados com os pacientes controles. Também foi detectada uma diferença significativa no uso de medicamentos para dislipidemias, sendo maior em pacientes casos. Em nosso estudo, não encontramos nenhum efeito principal das variantes investigadas no risco de desenvolver DAC ou nas variáveis clínicas da

amostra. No entanto, detectamos uma interação significativa entre os alelos de risco dos polimorfismos e a classificação em casos e controles na determinação dos níveis de colesterol total e colesterol LDL. Em casos, a presença dos alelos de risco parece estar associada com níveis mais baixos de colesterol, diferente do observado para os indivíduos classificados como controles, que exibem efeito oposto. Não podemos excluir a importância dos polimorfismos da região 9p21 nos desfechos e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Estudos com amostras maiores e em diferentes populações devem ser realizados para avaliar a relação entre estes polimorfismos e o risco de desenvolver DAC.

**Palavras chave:** doença coronariana, aterosclerose, polimorfismos genéticos, região cromossômica 9p21.



## ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is characterized by deposits of fat plates on the wall of the coronary arteries, causing atherosclerosis as well. The CAD is a multifactorial disease, complex and of high incidence worldwide, resulting in high social and economic cost, involving expenditure with medicines, repeated hospitalizations, loss of productivity, early retirements, surgeries and, occasionally, a heart transplant. Among the risk factors associated with the CAD, genetic studies have shown that polymorphisms in the chromosomal region 9p21 are strongly associated with the development of the disease and its complications. This dissertation aims to investigate the role of two polymorphisms of the region 9p21 rs10757274 and rs1333049 in the development of CAD in a sample of patients submitted to cardiac catheterization test. The sample was constituted of 689 adults from Hemodynamic service Bruno Born Hospital of Lajeado, Rio Grande do Sul. The patients were classified into cases and controls based on the presence of the vessel lumen narrowing of the coronary arteries, evaluated by a cardiologist, according to the reports obtained from cardiac catheterization exams. Blood samples were collected for further biochemical and molecular analysis, which will be carried out in the laboratories of the Univates University Center. Allele and genotype frequencies were estimated by direct count and the Hardy-Weinberg Equilibrium calculated through Chi-square test. The statistical analysis used to compare cases and controls surrounding the Chi-square test. The effects of polymorphisms on clinical variables of patients were assessed by univariate general linear models. No significant association was found between the rs1333049 and rs10757274 polymorphisms in patients cases and controls with the risk of developing CAD. Significant differences between cases and controls in respect of age and patients case possess middle ages greater than the controls. There were also significant differences between cases and controls in relation to the genre, with 57.8% of individuals are of the male gender in cases. There was a significant difference of BMI where patients had higher BMI controls in relation to cases. Referring to the biochemical parameters significant differences in the comparison of patients cases and controls on the levels of HDL cholesterol, being significantly lower in cases when compared with control patients. Was also detected a significant difference in the use of medicines for dyslipidemias, being greater in patients cases. In our study, we found no main effect of the investigated variants on risk of developing CAD or clinical sample variables. However, we detected a significant interaction between the risk alleles of polymorphisms and the classification in cases and controls in the determination of the levels of total cholesterol and LDL cholesterol. In some cases, the presence of risk alleles appear to be associated with lower levels of cholesterol, different from that observed for individuals classified as controls, which exhibit opposite effect. We cannot rule out the importance of polymorphisms in the region 9p21 in the outcomes

and the development of cardiovascular disease. Studies with larger samples and in different populations should be carried out to assess the relationship between these polymorphisms and the risk of developing CAD.

**Keywords:** coronary artery disease, atherosclerosis, genetic polymorphism, chromosomal region 9p21.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo patológico da aterosclerose.....	18
Figura 2 - Região cromossômica 9p21, RNA ANRIL e genes CDKN2A/B.....	25
Figura 3 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol total/ alelo de risco C para rs1333049.....	39
Figura 4 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol total/ alelo de risco C para rs1333049.....	39
Figura 5 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol total do alelo de risco G para rs10757274.....	40
Figura 6 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol total do alelo de risco G para rs10757274.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais da amostra em casos e controles.....	35
Tabela 2 - Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos rs1333049 e 10757274 .....	37
Tabela 3 - Relação entre as características clínicas e o alelo de risco para 1333049 em casos e controles.....	38
Tabela 4 - Relação entre as características clínicas e o alelo de risco para 10757274 em casos e controles.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC-A1 - complexo "*ATP Binding Cassete*" A1

APOA5 - Apolipoproteína A5

CAC - calcificação da artéria coronária

CETP - proteína de transferência do éster de colesterol

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DAC - Doença Arterial Coronariana

DM2 – diabetes melito tipo II

FH - Hipercolestoremia Familiar

HBB - Hospital Bruno Born

HDL - Lipoproteína de Alta Densidade

GWAS - *Genome-wide association study*

Hcy - Homocisteína

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IM – Infarto do Miocárdio

IDL - Lipoproteína de densidade intermediária

IMC – Índice de massa corpórea

Kb - Kilobase

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LCAT - lecitina-colesterol-acetiltransferase

LIPA - lipase A, ácido lisossomal, éster de colesterol

MAPT - methylthioadenosina fosforilase

MASS II - *Medical Angioplasty or Surgery Study II*

PA - Pressão Arterial

PCR – proteína C reativa

PD - Pressão Diastólica

PS – Pressão Sistólica

SCA – Síndrome Coronariana Aguda

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Tema.....	16
1.2 Problema.....	16
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 Objetivo geral.....	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	16
1.4 Justificativa.....	17
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.1 Doença arterial coronariana.....	18
2.2 Etiologia.....	20
2.3 Fatores genéticos.....	21
2.3.1 Região cromossômica 9p21.....	23
<b>3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 Amostra.....	32
3.2 Coleta de dados.....	33
3.3 Análises laboratoriais.....	33
3.4 Análises estatísticas.....	33
3.5 Considerações éticas.....	34
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
ANEXO A - Questionário Semi-Estruturado aplicado aos pacientes.....	53
ANEXO B – Emenda COEP.....	56
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	59



## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, e seu crescimento significativo nos países em desenvolvimento alerta para o potencial impacto nas classes menos favorecidas, as quais estão menos assistidas. No Brasil, constituem a principal causa de óbitos, correspondendo a aproximadamente 30% em adultos (BORGES et al., 2012).

Em apenas um ano, ocorreram cerca de 17,3 milhões de mortes causadas por doenças cardiovasculares, das quais 7,3 milhões secundárias à doença aterosclerótica coronariana e 6,2 milhões secundárias, as doenças vasculares cerebrais. Só no Brasil ocorrem mais de 900.000 casos de infarto agudo do miocárdio (IAM) por ano, com mais de 300.000 casos fatais (SOUZA et al., 2012).

A redução desses números, e a consequente diminuição da morbidade e mortalidade relacionadas à doença arterial coronariana (DAC) tem sido um dos principais objetivos das políticas de saúde pública no Brasil e no mundo. Entretanto, sabe-se que mais da metade das síndromes coronarianas agudas e mortes súbitas ocorrem em indivíduos previamente assintomáticos. Portanto, a capacidade de identificar, dentre os indivíduos assintomáticos, o subgrupo que apresenta maior risco de desenvolver eventos cardiovasculares no futuro representa uma etapa fundamental em qualquer estratégia voltada para a diminuição das taxas de eventos cardiovasculares (AZEVEDO et al., 2012).

Dentre as causas das doenças coronarianas, existe uma série de fatores de risco que contribuem para o seu aparecimento. De acordo com a sociedade Brasileira de Cardiologia, os fatores de risco mais evidentes no panorama nacional

de saúde cardiovascular no Brasil são a obesidade, o diabetes mellitus tipo II (DM2), a hipertensão, as dislipidemias e o tabagismo (BORGES et al., 2012).

Os principais fatores biológicos de risco tradicionais da doença cardiovascular foram primeiramente identificados através dos achados da coorte de Framingham (*Framingham Heart Study*). Esse estudo acompanhou, inicialmente, aproximadamente 6000 pessoas com o objetivo de identificar características comuns que poderiam contribuir para o desenvolvimento da doença cardiovascular, em indivíduos que ainda não haviam tido ocorrências cardíacas. A partir dos dados coletados pode-se estabelecer uma escala de risco de desenvolvimento de doença cardiovascular na próxima década de vida, baseada no gênero e na faixa etária, nos valores de pressão arterial sistólica, de colesterol total e colesterol HDL (lipoproteína de baixa densidade), no diagnóstico de diabetes e no conhecimento sobre o hábito tabagista (SÁ, 2012).

Apesar da identificação dos fatores de risco ambientais associados com a DAC, sabe-se que os fatores genéticos também desempenham um papel relevante no desenvolvimento da doença e suas complicações. De acordo com RENNERT (2012) e COMPANIONI (2011), um marcador genético para a DAC é o locus cromossômico 9p21, que seria um dos mais fortemente associados com a doença até o presente momento. Essa região cromossômica associada à DAC se estende ao longo de uma região superior a 100 kilobases (Kb), aonde os genes mais próximos, também localizados nesta região, são os *CDKN2A* e *CDK2B*, cujos produtos são proteínas reguladoras do ciclo celular, além de um RNA não-codificante, denominado *ANRIL* (MENDONÇA et al., 2011).

## 1.1 Tema

Investigação da influência de dois polimorfismos da região cromossômica 9p21 no desenvolvimento da doença arterial coronariana.

## 1.2 Problema

Existe relação entre os polimorfismos rs1333049 e rs10757274 da região cromossômica 9p21 e o desenvolvimento da DAC na amostra estudada?

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo geral:

O objetivo deste estudo é investigar o papel de dois polimorfismos da região cromossômica 9p21 (rs10757274 e rs1333049) com DAC em uma amostra de pacientes submetidos ao exame de cateterismo cardíaco.

### 1.3.2 Objetivos específicos:

1. Estabelecer a prevalência de casos de DAC na população atendida no Serviço de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born de Lajeado, RS.
2. Determinar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes participantes da pesquisa.
3. Determinar as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos rs1333049 e rs10757274 da região cromossômica 9p21.
4. Verificar se existe associação entre os polimorfismos rs1333049 e rs10757274 e o desenvolvimento de DAC.
5. Avaliar se existe influência dos polimorfismos rs1333049 e rs10757274 nos níveis de colesterol, triglicerídeos, glicose e pressão arterial destes pacientes.

#### 1.4 Justificativa

A diminuição da morbidade e mortalidade relacionadas à DAC tem sido um dos principais objetivos das políticas de saúde pública no Brasil e no mundo. Entretanto, sabe-se que mais da metade das síndromes coronarianas agudas e mortes súbitas ocorrem em indivíduos previamente assintomáticos (AZEVEDO et al., 2012).

É consenso na literatura que a incidência da doença cardiovascular no Brasil tem crescido exponencialmente, este fato nos leva a buscar cada vez mais respostas acerca do funcionamento e principalmente da influência da genética sobre as doenças cardiovasculares, visto que, fatores de risco ambientais são mais visíveis e de mais fácil controle.

Embora muitos estudos tenham estabelecido associações significativas entre a presença de determinados polimorfismos genéticos e o desenvolvimento da DAC, a maioria dessas associações não são definidas.

Nesse sentido é importante que estes resultados sejam produzidos em populações diferentes, a fim de verificar o real impacto destes polimorfismos no desenvolvimento da doença. Além disso, é importante estabelecer e confirmar as associações propostas até então.

Espera-se ser possível que futuramente possa se utilizar as variantes genéticas como ferramentas aliadas ao diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares, revertendo estas ferramentas em benefício para as populações.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doença arterial coronariana

A DAC caracteriza-se por depósitos de placas de gordura na parede das artérias coronárias, formando os chamados ateromas que, ao se desenvolverem, obstruem o fluxo sanguíneo. Esse processo gradual de formação de placas de ateroma é conhecido como aterosclerose, atingindo não só as artérias coronárias, mas também outras artérias do organismo (ROBBINS; CORTAN, 2010).

Figura 1 – Processo patológico da aterosclerose.



Fonte: Adaptado de SCHOENHAGEN; TUZCO, (2008).

Na figura 1 é possível visualizar uma imagem feita por imagem em 3D do processo patológico da aterosclerose, a aorta torácica ascendente e descendente, o

arco aórtico com seus ramos e as artérias coronárias. (SCHOENHAGEN; TUZCO, 2008).

Com o crescimento progressivo dos ateromas, estes podem levar a um prejuízo do fluxo de sangue até o miocárdio, processo chamado de isquemia miocárdica crônica. O sofrimento do músculo cardíaco devido ao processo de aterosclerose é conhecido como cardiopatia isquêmica, a qual pode levar com o tempo a uma dilatação e enfraquecimento do coração. Outra complicação grave da aterosclerose é a ruptura da placa de ateroma, liberando fragmentos que caem na corrente sanguínea, podendo levar à formação de coágulos sanguíneos sobre sua superfície (trombose), obstruindo a luz da artéria de forma abrupta e intensa. Nesta situação, ocorre um prejuízo significativo do fluxo de sangue, podendo levar a um quadro de angina do peito instável ou IAM, sendo ambos potencialmente fatais (ROBBINS; CORTAN, 2010).

Do ponto de vista fisiopatológico, a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco, como a elevação de lipoproteínas aterogênicas, lipoproteína de baixa densidade (LDL) colesterol, lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (DAVIES, 2000).

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos que por sua vez, captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados células espumosas e

são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (DAVIES, 2000; PESARO et al., 2004).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno. De acordo com a distribuição desses elementos, pode-se classificar as placas ateroscleróticas em dois tipos principais: estáveis ou instáveis (Sociedade Brasileira de cardiologia, 2007).

As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (Sociedade Brasileira de cardiologia, 2009).

## 2.2 Etiologia

A doença cardiovascular é uma doença multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, bem como a interação entre eles. A história familiar, idade, gênero, diabetes, tabagismo, hipertensão, dislipidemia e obesidade têm sido considerados marcadores tradicionais da doença. O risco de desenvolver DAC aumenta com a idade e é, geralmente, maior em homens, embora o risco de mulheres aumente após a menopausa, o que é devido ao efeito antioxidante protetor do hormônio estrogênio nas mulheres. Há uma influência de fatores ambientais, como tabagismo, alimentação, sedentarismo, consumo de álcool e poluição, sendo o consumo de tabaco o principal fator de risco, entre os fatores ambientais (PRANAVCHAND; REDDY, 2013).

A história familiar, principalmente nos eventos agudos de DAC, como IAM e angina, tem sido reconhecida como um fator importante, muitas vezes de

suscetibilidade, no desenvolvimento e também no desfecho de casos de DAC (ROSAMOND et al., 2008).

Características sócio demográficas, assim como renda familiar e nível de escolaridade, também têm sido relacionados ao desenvolvimento de doença cardiovascular. É conhecido que os fatores de risco tendem a ocorrer com maior frequência e maior número em populações com menor poder econômico e cultural (POLANCZYK, 2005).

Também é consenso na literatura que as doenças cardiovasculares possuem componentes genéticos consideráveis, como evidenciado pelos estudos em famílias e com gêmeos. A herdabilidade estimada da DAC varia entre 40 e 60% (SAYOLS-BAIXERAS et al., 2014). Portanto, assim como observado em outras patologias complexas, a DAC resulta de efeitos acumulativos de um grande número de genes, os quais interagem de forma complexa entre si e com diversos fatores ambientais (MARIAN; BELMONT, 2011).

Estudos de avaliação de fatores de risco também apontaram marcadores não tradicionais, como os níveis elevados de homocisteína, fibrinogênio, proteína C-reativa e baixos níveis de colesterol HDL, insuficiência em coenzima Q10 (CoQ10), óxido nítrico e vitaminas, como D, K. Os componentes genéticos de alguns desses marcadores já foram estimados, sendo que as medidas de herdabilidade variam entre 20 e 90%, dependendo do marcador: LDL e VLDL (40-60%), HDL (45-75%), triglicerídeos (40-80%), IMC (índice de massa corporal) (25-60%), pressão arterial (50-70%), níveis de lipoproteína A (90%), níveis de homocisteína (Hcy) (45%), diabetes mellitus tipo II (40-80%), fibrinogênio (20-50%) e proteína C-reativa (PCR) (40%) (PRANAVCHAND; REDDY, 2013).

### **2.3 Fatores Genéticos**

Segundo SWERDLOW e colaboradores (2012), ao considerar a base genética da doença coronariana, é necessário estabelecer uma distinção entre suas causas mais raras, causas monogênicas, e mais comuns, ou seja, poligênicas, nas quais estão envolvidos vários fatores, entre eles, genéticos, comportamentais e ambientais. Embora a investigação sobre doenças coronarianas foi por décadas

tratada apenas como doença monogênica, sabe-se que a maioria dos casos de DAC são de etiologia complexa. Um exemplo de doença monogênica que predispõe à DAC precoce é a hipercolestoremia familiar (FH), causada por uma mutação no gene que codifica o receptor de LDL, a qual se caracteriza por concentrações elevadas de LDL no sangue.

Os primeiros estudos com genes candidatos partiram do princípio de que polimorfismos nos genes de relevância biológica para as doenças eram a primeira hipótese a priori, gerada a partir do conhecimento da patologia, aonde eram analisadas as relações entre as variantes genéticas e os fenótipos encontrados. (SAYOLS-BAIXERAS et al., 2014). ]

Estima-se que mais de 400 genes possam estar envolvidos na regulação de processos cardiovasculares, tais como a função endotelial, a coagulação, a inflamação, o metabolismo dos aminoácidos e dos lipídeos, sendo os genes do metabolismo das lipoproteínas os quais estão mais fortemente relacionados com a doença arterial coronária (SÁ, 2012).

Polimorfismos genéticos localizados nos genes envolvidos com o metabolismo dos lipídeos têm sido associados com o desenvolvimento da DAC. Dentre estes genes estão os genes da *ABC-A1* (complexo "ATP Binding Cassete" A1) o qual facilita a retirada do colesterol da célula pelo HDL, o gene *LCAT* (lecitina-colesterol-acetiltransferase) o qual codifica uma enzima que esterifica o colesterol livre, o gene da *APOA5* (apolipoproteína A5) que desempenha um papel importante na regulação dos níveis de triglicerídeos no plasma, o gene *CETP* (proteína de transferência do éster de colesterol), o qual transfere ésteres de colesterol entre as lipoproteínas, o gene *LIPA* (lipase A, ácido lisossomal, éster de colesterol) que catalisa a hidrólise de ésteres de colesterol e triglicerídeos, entre outros genes todos com funções regulatórias importantes na regulação das lipoproteínas (MARIAN, 2012).

Os estudos de associação se tornaram ferramentas eficazes para a seleção de polimorfismos e de marcadores genéticos e, vêm cada vez apresentando proporções maiores, eles conseguem avaliar a associação entre as variantes genéticas, e a ausência ou presença de uma patologia ou fenótipo específico. Atualmente estes estudos identificaram cerca de 40 locais diferentes no genoma que

conseguem explicar cerca de 6% da herdabilidade para DAC, dentre eles estão os genes principalmente envolvidos no metabolismo dos lipídeos, como por exemplo, os genes *APOA5*, *ABC-A1*, *CETP*, *LIPA* e *LCAT*. (SAYOLS-BAIXERAS et al., 2014).

Os estudos como a abordagem denominada *Genome-wide association study* (GWAS), ou estudos de varredura genômica, onde são analisados milhares de variantes ao longo do genoma, à procura de genes importantes para doenças multifatoriais, identificaram uma forte associação de DAC à região cromossômica 9p21, sendo esta região a primeira variável de risco descoberta por GWAS, também foi verificada por numerosos estudos de replicação como sendo o primeiro lugar comum para DAC e Infarto do Miocárdio (IM), tendo os polimorfismos rs1333049 aonde ocorre à troca de base G>C e rs10757274 A>G estes, fortemente associados à doença (SCHEFFOLD et al., 2011).

### 2.3.1 Região cromossômica 9p21

Estudos genéticos têm apontado um haplótipo de risco para doenças cardiovasculares na região cromossômica 9p21, que se localiza próxima ao conjunto de genes *CDKN2A* e *CDKN2B* e o gene metiltioadenosina fosforilase (*MTAP*) (PASMANT et al., 2007). Estudos de expressão gênica na região 9p21 mostram que os genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, codificadores das proteínas p15 e p16, que são quinases ciclina dependentes, são expressos no tecido aterosclerótico (SCOTT et al., 2007; STACEY et al., 2009).

O gene *MTAP* codifica uma enzima a fosforilase metiltioadenosina que contribui para o metabolismo das poliaminas, estas moléculas expressas em vários tecidos, inclusive no tecido do sistema cardiovascular, sendo também importantes na proliferação de células musculares lisas, as quais influenciam o processo aterogênico. Além disso, a supressão e a inativação de *MTAP* também foram associadas a diversos tipos de câncer (HOLDT et al., 2011).

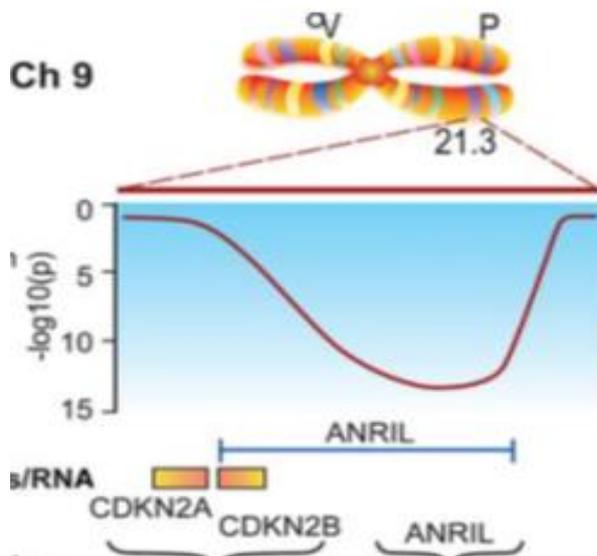
A região 9p21 é sobreposta, quase completamente, por um gene longo “antisense” e não codificante, denominado *ANRIL*, também denominado (*CDKN2B* –

AS) e localizado no locus INK4, entre o aglomerado de genes *CDKN2A/B*. Este tem sido associado com a doença cardiovascular, e, mais recentemente com vários tipos de câncer, diabetes, glaucoma, endometriose, entre outras patologias relacionadas com a proliferação celular e a senescência. Algumas das variantes de *splicing* deste RNA foram relatadas por ser tecido-específico, o que sugere a sua importância fisiológica e a complexidade de sua função reguladora (CONGRAINS et al., 2013).

O RNA *ANRIL* é formado por 20 éxons, os quais geram vários transcritos, dentre eles um longo DQ485353, e dois curtos DQ485454, e EU741058. O estudo realizado por Jarinova e colaboradores (2009) demonstrou que a expressão de variantes curtas do RNA *ANRIL* foi aumentada em 2,2 vezes, enquanto que a expressão de variantes longas deste RNA foi reduzida em 1,2 vezes nos indivíduos saudáveis homocigotos para o alelo de risco C do polimorfismo 1333049. A hipótese dos autores é que, esta e outras variantes alélicas na região 9p21, possam mediar o aumento da predisposição a DAC, as quais irão alterar os níveis de expressão de transcritos curtos e longos de *ANRIL*, que por sua vez podem afetar as vias de proliferação celular. Os níveis de expressão das variantes curtas e longas do RNA *ANRIL* foram correlacionados positivamente com a do *CDKN2B*, pois se acredita que os alelos de risco dos polimorfismos localizados na região 9p21 contêm potenciadores funcionais, os quais podem promover a expressão de *ANRIL*, que por sua vez estão associados a alterações na expressão dos *CDKN2A/B*.

O papel de *ANRIL* na modulação dos genes *CDKN2A/B* está diretamente envolvido na aterosclerose, os resultados sugeriram que este RNA *ANRIL* desempenha um papel na remodelação da matriz de resposta inflamatória, podendo com isto, ter um impacto no risco de doença cardiovascular (CONGRAINS et al., 2012a). Congrais e colaboradores (2012b) também sugerem que vários polimorfismos associados às doenças cardiovasculares localizadas na região cromossômica 9p21, podem afetar a expressão de *ANRIL*, conforme é demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Região cromossômica 9p21, RNA ANRIL e os genes *CDKN2A/B*



\*Sobreposição de ANRIL sobre *CDKN2A/B*

\*Genes responsáveis pela  
Proliferação celular e apoptose

Fonte: Adaptado de CROSSMAN et al. (2010)

Pesquisadores produziram ratos mutantes desprovidos de uma região de 70Kb no cromossomo 4, a qual corresponde a região cromossômica 9p21 em humanos. Cerca de metade dos ratos desenvolveram tumores e apresentaram um aumento duas vezes na proliferação *in vitro* de células de músculo liso da aorta. Com isso, acredita-se que deleções na região 9p21 estão associadas com alguns tumores e que este processo acelera o desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos suscetíveis, o que pode ocorrer devido à acumulação de trombo e formação de placas ambas causadas pela proliferação celular excessiva (CROSSMAN, 2010; VISEL, 2010).

Em um estudo caso-controle, realizado em uma população Portuguesa com 1406 indivíduos, sendo 723 doentes coronários e 683 controles, investigou-se o polimorfismo rs1333049, localizado na região cromossômica 9p21, constituía um fator de risco independente para DAC. Os resultados evidenciaram uma associação

significativa entre a presença do alelo C, tanto em homozigose como em heterozigose, e o de risco para a DAC (MENDONÇA et al., 2011).

De acordo com KUMAR e colaboradores (2011) a região cromossômica 9p21 também se mostrou significativamente associada com doenças cardiovasculares em um estudo realizado com uma população do Norte da Índia, a qual é responsável por maior incidência de DAC no mundo. Foram genotipados seis polimorfismos da região (rs10116277, rs10757274, rs1333040, rs2383206, rs2383207 e rs1994016), em 754 indivíduos, sendo 311 pacientes com DAC, confirmados por angiografia, e 443 controles. Os resultados indicaram que três desses polimorfismos (rs10116277, rs1333040 e rs2383206) foram significativamente associados com a DAC.

ABDULAH e colaboradores (2008) também realizaram em seu estudo a avaliação de quatro variantes da região cromossômica 9p21 (rs10757274, rs2383206, rs2383207 e rs10757278), e demonstraram associação significativa entre estes polimorfismos e o desenvolvimento precoce de DAC e infarto do miocárdio, em uma população caucasiana nos Estados Unidos.

Também foi demonstrado recentemente, em um estudo de coorte, com dados utilizados da *Heinz Nixdorf Lembre Study* composto por 4.814 participantes, que as regiões 9p21 e 6q24 estariam fortemente associadas com calcificação da artéria coronária (CAC). Esta descoberta sugere que as duas regiões cromossômicas podem estar envolvidas no rendimento cardíaco, promovendo assim, o desenvolvimento de aterosclerose (PECHLIVANIS et al., 2013).

No Brasil, o estudo MASS II (*Medical Angioplasty or Surgery Study II*) investigou a associação dos polimorfismos rs1333049, rs10757274, rs10757278, rs2383206, da região cromossômica 9p21, com eventos cardiovasculares. Participaram 611 pacientes com doença coronariana grave. Dentre os achados, o estudo verificou que a variação genética na região cromossômica 9p21 pode interferir no sistema cardiovascular em diferentes ocasiões. Foram observadas diferenças significativas nas frequências genótípicas entre pacientes com doença estabelecida, em um ou mais vasos para os polimorfismos rs10757274, rs10757278 e rs1333049. Também foi observada uma associação entre o rs2383206 e maior incidência de mortalidade total e morte por causas cardíacas em pacientes com DAC (PEREIRA et al., 2012).

No Quadro 1 podemos verificar alguns estudos realizados em diferentes populações envolvendo os polimorfismos do nosso estudo, rs1333049 e rs10757274, e os achados das associações encontradas com as doenças cardiovasculares.



Quadro 1 – Estudos de associação entre as variáveis rs1333049 e rs10757274 da região cromossômica 9p21 em diferentes populações

Artigo:	Tamanho amostral	Etnia (país)	Fenótipo Avaliado	Variante genética	Principais achados	Referências
Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease.	1.714 pacientes	Canadá	950 pacientes com início precoce de DAC e 764 pacientes com início tardio de DAC.	rs1333049	Houve uma forte associação entre o alelo C e os pacientes com doença de início precoce, com três vasos acometidos. Não foi observada associação entre 9p21 e Infarto do Miocárdio nesta população.	Dandora et al. (2010)
Forearm vasodilator reactivity in homozygous carriers of the 9p21.3 rs1333049 G>C polymorphism.	97 homens	Europa	Fluxo sanguíneo do antebraço com reatividade de acetilcolina (ACh) e trinitrato de glicerol (GTN) em portadores do genótipo CC comparados com indivíduos de genótipo GG	rs1333049	Observou-se resistência vasodilatadora em portadores do genótipo CC, fornecendo assim evidência funcional, estando a variante C associada com um aumento do risco cardiovascular.	Aschauer et al. (2010)

Polymorphisms on chromosome 9p21 confer a risk for acute coronary syndrome in a Chinese Han population.	359 pacientes com suscetibilidade a IM e 398 controles	China	Pacientes com Síndrome Coronariana Aguda (SCA)	rs10757277 rs10757278 rs10757279 <u>rs1333049</u> rs1333047 rs10811656	Os polimorfismos em 9p21 foram associados com SCA na população Chinesa. O genótipo GG do rs10757278 foi ainda associado a resultados adversos cardíacos após ACS.	Zeng et al. (2013)
Higher incidence of death in multi-vessel coronary artery disease patients associated with polymorphisms in chromosome 9p21	611 pacientes inscritos no MASSII	Brasil	Comparou-se pacientes com DAC com pacientes com função ventricular preservada	<u>rs10757274</u> rs2383206 rs10757278 <u>rs1333049</u>	Observou-se diferenças significativas nas frequências genótípicas entre pacientes com mais vasos acometidos para o rs10757274, rs10757278 e rs1333049. O rs2383206 foi significativamente associado com risco de maior mortalidade.	Pereira et al. (2012)

Six sequence variants on chromosome 9p21.3 are associated with a positive family history of myocardial infarction: a multicenter registry	976 pacientes	Alemanha <a href="http://www.univates.br/bdu">www.univates.br/bdu</a>	Pacientes do sexo masculino, todos sintomáticos a Infarto Agudo do Miocárdio ou Síndrome Coronariana Aguda	<a href="#">rs1333049</a> <a href="#">rs1333040</a> <a href="#">rs10757274</a> <a href="#">rs2383206</a> <a href="#">rs10757278</a> <a href="#">rs2383207</a>	O estudo confirmou uma forte associação da região 9p21 com IM, particularmente em pacientes com história familiar positiva, assim, enfatizando a relevância patogênica desse loci como fator de risco cardiovascular.	Scheffold et al. (2011)
Associação independente da variante rs1333049, no locus 9p21, com a doença coronária numa população portuguesa	723 pacientes com DAC e 683 controles	Portugal	Pacientes com DAC e pacientes controles relacionado à variante de risco do rs1333049	rs1333049	60% dos doentes coronários e 53% dos controles apresentaram o alelo C. 35,7% dos doentes e 29,3% dos controles tinham o genótipo CC. O heterozigoto CG não atingiu significância estatística. Houve significância entre o alelo C e o risco para DAC na população portuguesa.	Mendonça et al. (2011)

Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population	416 pacientes com IM e 308 controles	Itália <a href="http://www.univates.br/bdu">www.univates.br/bdu</a>	Pacientes com IM	<u>rs10757274</u> rs2383206 rs2383207 rs10757278	Um haplótipo de risco (GGGG, P = 0,028) e um haplótipo de proteção (AAAA, P = 0,047) foram identificados. A análise demonstrou que os SNPs conferiram susceptibilidade a IM (P = 0,0007-0,013). Quando a coorte foi dividida em um grupo de pacientes com IM com uma história familiar e um grupo sem, a associação foi significativa apenas no grupo com a história familiar. Estes resultados indicam que 9p21 confere risco para o desenvolvimento de Infarto do Miocárdio.	Shen et al. (2008)
---	--------------------------------------	--	------------------	---	--	--------------------

## 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 3.1 Amostra

A amostra do estudo foi composta pelos pacientes atendidos no Serviço de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born de Lajeado (HBB), RS. Os critérios de inclusão nesse estudo são: a) brasileiros euro-derivados; b) maiores de 18 anos; c) submetidos ao exame de cateterismo cardíaco d) que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Posteriormente, esses indivíduos foram classificados com base na presença (caso) ou ausência (controle) de estreitamento (estenose) no lúmen do vaso das artérias coronárias, avaliadas por um médico cardiologista, de acordo com os laudos obtidos no exame de cateterismo. Dentre os critérios de exclusão estão os indivíduos que não aceitaram participar do projeto, os que estavam inconscientes ou não tiveram discernimento do que estava sendo proposto na pesquisa.

### 3.2 Coleta de dados

Após o consentimento na participação no estudo foram coletadas informações de todos os indivíduos incluídos no estudo, casos e controles. Essas informações foram coletadas através de um questionário semi-estruturado (ANEXO A), que inclui dados demográficos, história médica, histórico de doença cardiovascular na família, uso de medicações, consumo de álcool e tabaco e prática de atividades físicas. Também foi aferida a pressão arterial destes pacientes no bloco cirúrgico por um técnico de enfermagem habilitado, antes do preparatório para a realização do cateterismo. Durante a realização do exame de cateterismo também foram coletadas

amostras de sangue periférico para posterior extração de DNA e análises bioquímicas.

### 3.3 Análises laboratoriais

Os níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL e LDL, triglicerídeos e glicose das amostras foram determinados usando kits comerciais da marca BioClin®. As dosagens foram realizadas na automação de bioquímica BS-120 da Mindray®, do Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário UNIVATES. A fração do colesterol – LDL foi calculado através da fórmula de Friedewald:  $(LDL-C = CT - HDL-C - TG/5)$  (SPOSITO et al., 2007).

A extração de DNA foi realizada através de uma adaptação do método de Lahiri e Nurnberger (1991), aonde foi utilizada a técnica de precipitação de proteínas pelo método *salting-out*. Os polimorfismos rs1333049 e rs10757274 foram genotipados através do sistema de discriminação alélica taqman® (*Applied Biosystems, StepOne Real Time PCR System*). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES.

### 3.4 Análises estatísticas

A comparação das variáveis entre casos e controles foi realizada através do Teste t para amostras independentes ou através do teste do qui-quadrado. As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta e o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* calculado com base nessas frequências pelo teste do qui-quadrado. As frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles foram comparadas pelo teste do qui-quadrado. Os efeitos dos polimorfismos nas variáveis clínicas dos pacientes foram avaliados através de modelos lineares gerais univariados. Foi utilizado o programa estatístico SPSS 20.0 para realizar as análises.

### 3.5 Considerações éticas

Este projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Univates (COEP/UNIVATES), anexo B, para assegurar que os procedimentos propostos obedecem ao exigido pela resolução 466/12 do Ministério da Saúde, que regula a pesquisa envolvendo seres humanos, e todas as outras regulamentações da área. O sigilo à identidade dos sujeitos será garantido através da utilização de códigos, bem como foram tomadas todas as precauções para evitar ou minimizar possíveis desconfortos que a participação na pesquisa possa ocasionar.

As amostras de soro excedentes foram mantidas congeladas sob a responsabilidade da coordenadora do projeto de pesquisa, pelo período de 5 anos, quando serão descartadas seguindo as normas de biossegurança da Univates.

Os materiais obtidos durante o estudo, como ficha de coleta de dados e termos de consentimento também foram guardados pela coordenadora e serão incinerados após um período de 5 anos. Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C). O presente estudo foi aprovado pelo COEP/UNIVATES e pela Comissão Científica do Hospital Bruno Born (HBB).

## 4 RESULTADOS

A amostra do estudo foi constituída por 689 participantes, desses 398 (57,8%) são do gênero masculino e 291 (42,2%) são do gênero feminino. A idade média dos participantes é de 62,9 anos de idade. As características clínicas e laboratoriais e as comparações entre casos e controles estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais

	Todos (n=689)	Casos (n=386)	Controles (n=303)	Valor p
Idade (anos)	62,89(11,1)	64,68(10,64)	60,61 (11,15)	<0,001
Tabagismo (sim)	94,0 (13,7)	57,0 (14,8)	37,0 (12,2)	0,32
Uso de álcool (sim)	212,0 (30,8)	120,0 (31,1)	92,0 (30,4)	0,66
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,49(4,7)	27,00 (4,67)	28,11 (4,75)	<b>0,02</b>
Anos de estudo	5,93(3,7)	5,86 (3,71)	6,02 (3,49)	0,57
Gênero (masculino)	398 (57,8)	253 (65,5)	145 (47,9)	<0,001
<b>Variáveis Bioquímicas</b>				
Glicemia (mg/dl)	107,7 (36,6)	108,84 (37,42)	106,16 (35,61)	0,34
Colesterol total (mg/dl)	163,7 (49,1)	161,86 (47,01)	166,00 (51,44)	0,27
Colesterol HDL (mg/dl)	42,2 (13,1)	40,52 (12,10)	44,43 (14,05)	<0,001
Colesterol LDL (mg/dl)	98,4 (41,1)	97,61 (39,53)	99,50 (43,15)	0,55
Triglicerídeos (mg/dl)	114,9 (61,1)	118,63 (62,61)	110,30 (58,77)	0,08
<b>Uso de medicamentos</b>				
Diabetes (sim)	97 (14,2)	62 (16,2)	35 (11,6)	0,11
Dislipidemias (sim)	299 (43,6)	184 (48,0)	115 (38,1)	<b>0,01</b>
Doenças cardiovasculares (sim)	85 (12,4)	53 (13,8)	32 (10,6)	0,25
Hipertensão (sim)	500 (73,0)	282 (73,6)	218 (72,2)	0,74
<b>Pressão Arterial</b>				
Sistólica (mmHg)	142,1 (24,1)	143,31 (23,88)	140,65 (24,40)	0,15
Diastólica (mmHg)	77,3 (10,2)	77,53 (10,04)	77,02 (10,40)	0,52

Fonte: da autora (2014)

Os dados estão expressos como média e (desvio padrão) ou n e (%);

Abreviações: IMC, índice de massa corporal;

O valor de p refere-se à comparação entre casos e controles;

Referente aos parâmetros clínicos observou-se que houve diferença significativa entre casos e controles em relação à idade, sendo que os pacientes classificados como casos possuem idade média de 64,7 anos enquanto que os classificados como controles apresentaram idade média de 60,6 ( $p < 0,001$ ).

Houve uma proporção significativamente maior de homens em pacientes classificados como casos 65,5% se comparado com pacientes classificados como controles 47,9% ( $p < 0,001$ ). Casos e controles também diferiram no IMC médio aonde o IMC foi de 27,00 Kg/m<sup>2</sup> (+/-4,67) nos pacientes classificados como casos e de 28,11 Kg/m<sup>2</sup> (+/-4,75) nos classificados como controles ( $p = 0,02$ ).

Referente aos parâmetros bioquímicos houve diferença significativa na comparação dos pacientes casos e controles nos níveis de colesterol HDL ( $p < 0,001$ ), aonde o HDL encontra-se significativamente menor em pacientes casos 40,52 mg/dl (+/-12,10) quando comparados com os pacientes controles 44,43 mg/dl (+/-14,05).

Foi observado um alto percentual de pacientes que utilizam medicamentos para hipertensão, sendo 73,6% em casos e 72,2% em pacientes controles. Também foi detectada uma diferença significativa em relação ao uso de medicamentos para dislipidemias, sendo maior o uso em pacientes casos ( $p = 0,01$ ).

Dados genéticos estão disponíveis para 630 pacientes. Casos e controles não apresentaram diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos investigados, conforme é demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos em casos e controles

		Casos	Controles	p
rs1333049		n=351	n=279	
Genótipos	GG	78 (22,2%)	66 (23,7%)	0,66
	GC	171 (48,7%)	141 (50,5%)	
	CC	102 (29,1%)	72 (25,8%)	
Alelos	G	0,47	0,49	0,54
	C	0,53	0,51	
rs10757274		n=325	n=262	
Genótipos	AA	74 (22,8%)	66 (25,2%)	0,79
	AG	151 (46,5%)	118 (45,0%)	
	GG	100 (30,8%)	78 (29,8%)	
Alelos	A	0,46	0,48	0,51
	G	0,54	0,52	

Fonte: da autora (2014)

Para a avaliação dos efeitos dos polimorfismos nas variáveis clínicas, em casos e controles, os indivíduos foram agrupados em portadores e não portadores dos alelos de risco, para cada polimorfismo. Os resultados estão descritos nas tabelas 3 (rs1333049) e 4 (rs10757274). Foram detectadas interações significativas entre ambos os polimorfismos e a classificação em casos e controles nos níveis de colesterol total e o LDL-colesterol.

Os resultados das interações demonstram que, em indivíduos classificados como casos, o genótipo GG do rs1333049 está associado com níveis mais elevados de colesterol total e LDL-colesterol, enquanto que, nos indivíduos controles, esse genótipo apresenta efeito contrário, sendo associado com níveis mais baixos de colesterol total e LDL-colesterol (Tabela 3, Figuras 3 e 4). Da mesma forma, para o rs10757274, o genótipo AA está associado com níveis mais elevados de colesterol total e LDL-colesterol em casos e mais baixos em controles (Tabela 4, Figuras 5 e 6).

Tabela 3 - Relação das características clínicas com o alelo de risco rs13333049 caso/controlado

Variáveis clínicas	CC+ CG		GG		Valor p alelo C*	Valor p Genótipo CASO/CONTROLE
	Casos (n=272)	Controles (n=211)	Casos (n=76)	Controles (n=65)		
Glicemia (mg/dl)	107,96 (34,46)	106,22(33,91)	108,68 (48,04)	103,75(37,81)	0,80	0,65
Coolest. total (mg/dl)	160,26 (45,21)	168,51(54,85)	166,17 (48,72)	151,45(38,21)	0,23	<b>0,01</b>
Coolest. HDL (mg/dl)	40,50 (12,16)	44,62 (14,45)	40,36 (12,26)	44,09 (13,62)	0,79	0,87
Coolest. LDL (mg/dl)	95,20 (37,89)	101,68(46,10)	103,01 (39,92)	86,16 (30,17)	0,32	<b>0,003</b>
Triglicerídeos (mg/dl)	122,78 (66,80)	111,00(60,06)	113,96 (53,51)	106,00(57,30)	0,25	0,74
PS (mmHg)	143,66 (24,40)	140,16(23,93)	140,7 (23,93)	140,60(24,53)	0,59	0,47
PD (mmHg)	77,41 (10,30)	76,38 (10,15)	77,24 (9,76)	78,48 (11,09)	0,32	0,25

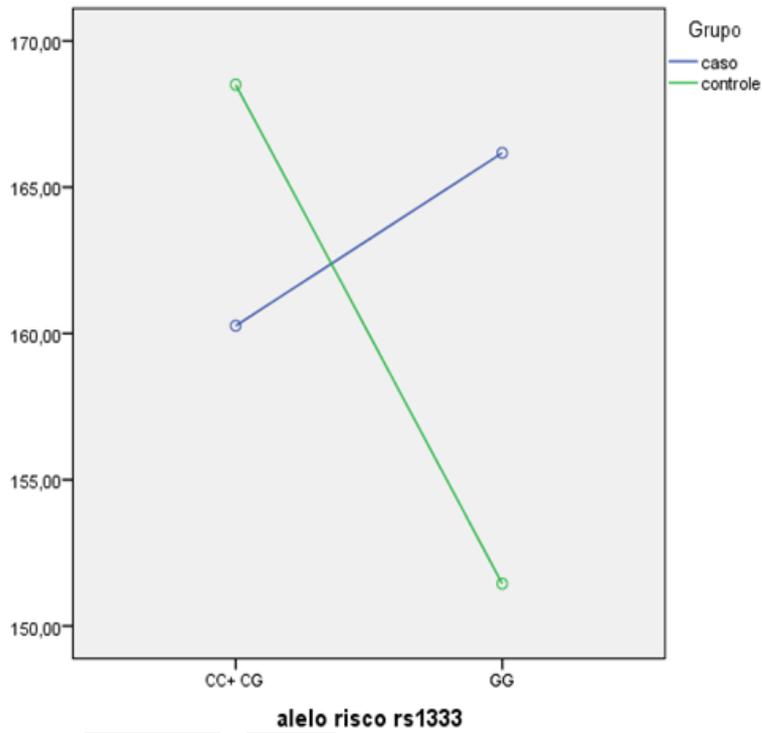
Fonte: autora (2014). PD – Pressão Diastólica, PS – Pressão Sistólica

Tabela 4 - Relação das características clínicas com o alelo de risco rs10757274 caso/controlado

Variáveis clínicas	GG + GA		AA		Valor p alelo G*	Valor p Genótipo CASO/CONTROLE
	Casos (n=250)	Controles (n=194)	Casos (n=72)	Controles (n=65)		
Glicemia (mg/dl)	107,15 (32,40)	103,64(27,38)	114,62 (53,80)	108,23(42,01)	0,08	0,68
Coolest. total (mg/dl)	162,63 (45,91)	165,82(49,69)	166,57 (49,49)	151,74(37,90)	0,27	<b>0,05</b>
Coolest. HDL (mg/dl)	40,88 (12,11)	43,96 (13,92)	40,61 (12,93)	44,02 (13,60)	0,93	0,89
Coolest. LDL (mg/dl)	96,91 (38,79)	99,49 (42,27)	103,53 (40,27)	86,96 (29,77)	0,44	<b>0,01</b>
Triglicerídeos (mg/dl)	124,18 (24,52)	111,81(59,94)	112,16 (54,87)	103,78(55,06)	0,09	0,74
PS (mmHg)	144,13 (24,52)	141,50(24,98)	142,36 (24,64)	141,13(24,29)	0,65	0,77
PD (mmHg)	77,93 (10,30)	76,75 (10,97)	76,32 (10,03)	79,01 (9,25)	0,74	0,06

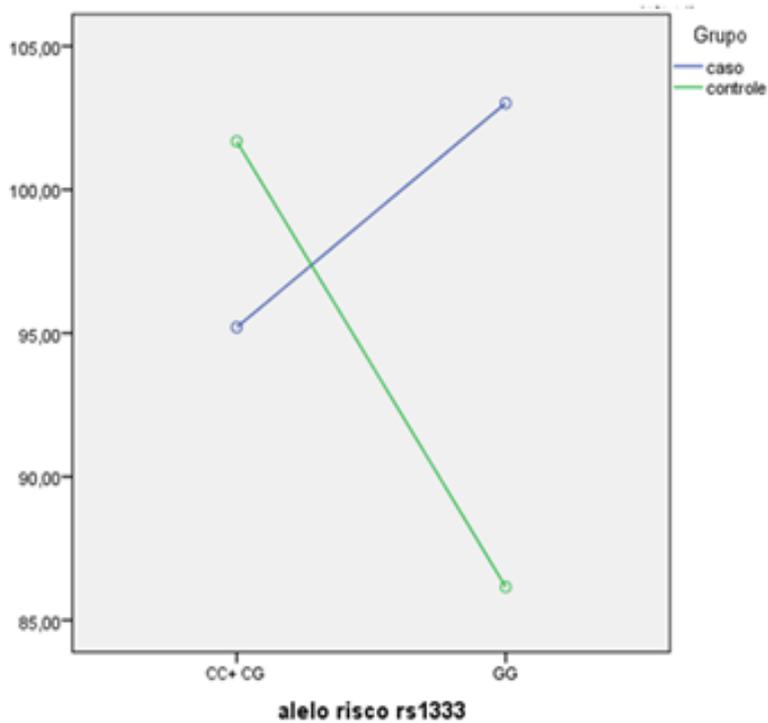
Fonte: autora (2014). PD – Pressão Diastólica, PS – Pressão Sistólica

Figura 3 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol total



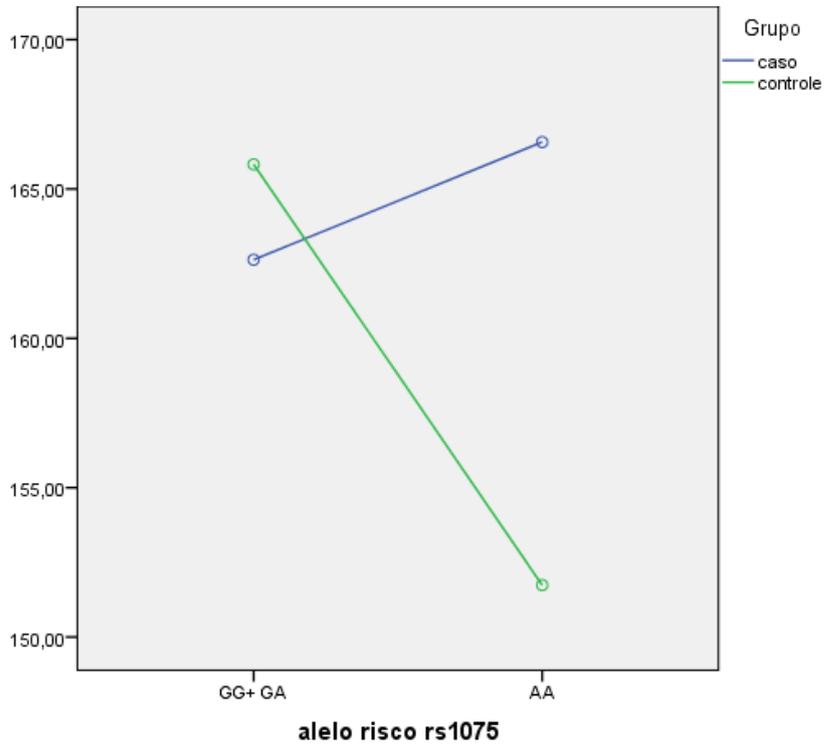
Fonte: Adaptado de SPSS 20.0

Figura 4 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol -LDL



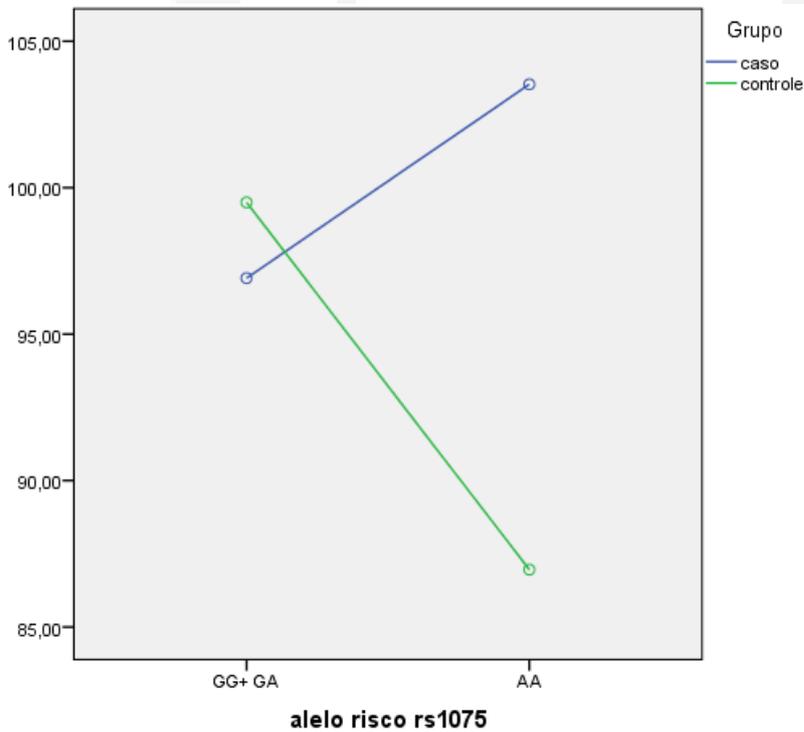
Fonte: Adaptado de SPSS 20.0

Figura 5 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol total



Fonte: Adaptado de SPSS 20.0

Figura 6 – Interação genótipo caso/controle nos níveis de colesterol –LDL



Fonte: Adaptado de SPSS 20.0

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram recrutados 689 pacientes do Serviço de Hemodinâmica em um hospital de médio porte, no interior do RS. Esses pacientes foram submetidos ao exame de cateterismo e foram classificados posteriormente, como casos e controles para DAC por um médico cardiologista que definiu essa classificação conforme a obstrução ou não das artérias, definidas pelo resultado deste exame. Foram classificados 386 pacientes como caso e 303 pacientes como controles.

Nossa amostra apresentou uma idade média de 62,9 anos. Os classificados como casos apresentam uma idade média de 64,7 anos, enquanto que os classificados como controles, a média de idade foi de 60,6 anos. A prevalência do gênero masculino foi maior em casos, sendo 65,5% em casos comparados com 47,9% em controles. Este resultado é consenso com a literatura, visto que o risco de vida para doenças cardiovasculares é em torno de 50% nos homens e 33% nas mulheres, e cerca de 96% de todos os eventos que ocorrem após 50 anos de idade (SWERDLOW et al, 2013).

Houve uma diferença significativa dos pacientes controles se comparados aos casos no IMC, sendo o IMC médio de 27,00 Kg/m<sup>2</sup> nos casos e de 28,11 Kg/m<sup>2</sup> nos controles. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1998), a classificação encontrada, de um modo geral para os pacientes do estudo, tanto em casos como em controles é definida como sobrepeso, estando o IMC de ambos os grupos entre 25 < 29,9 kg/ m<sup>2</sup>, podendo-se assim agrupar estes pacientes nos mesmos limites de obesidade.

O nosso estudo também demonstrou que os níveis de colesterol HDL estão significativamente menores em casos, quando comparados com os controles. Evidências sugerem que HDL- colesterol inibe a oxidação da lipoproteína de LDL - colesterol e, portanto, oferece proteção contra o risco de DAC (FERRI, 2009). O baixo nível de HDL - colesterol é um potente, e independente, preditor no risco de desenvolvimento de DAC, pois com este fato ocorre a perda dos efeitos antiaterogênicos, devido ao menor transporte reverso do colesterol, menor ação anti-inflamatória e perda das propriedades antitrombóticas (FREITAS et al., 2009). Nas demais variáveis bioquímicas não houve diferença significativa entre casos e controles.

Foi encontrada uma diferença significativa entre casos e controles no uso de medicamentos para dislipidemias, sendo observado um maior uso nos indivíduos casos. Este resultado é esperado, pois conforme citado anteriormente, estes indivíduos também apresentaram níveis de dislipidemia significativamente maiores em relação ao grupo controle, o que levaria a um maior uso de medicamentos. Também foi observado que todos os pacientes, de um modo geral, são normotensos, o que se justifica pelo fato de 73% dos pacientes fazerem o uso de medicamentos para hipertensão.

Nossos resultados não evidenciaram nenhuma associação entre os polimorfismos rs1333049 e rs10757274 com o risco de desenvolver DAC. Alguns autores sugerem que os alelos de risco desses polimorfismos estariam mais fortemente associados com eventos de doença coronariana em pessoas mais jovens do que com a doença cardíaca no geral (WANG et al., 2011). DANDORA e colaboradores (2010) também verificaram uma forte associação entre a porcentagem de pacientes com doença de início precoce e a variante de risco C para o polimorfismo rs1333049. Uma meta-análise realizada por Zhou e colaboradores (2012), que inclui 7 estudos de associação entre polimorfismos da região 9p21 em 7.123 pacientes com início precoce de DAC, detectou uma associação significativa para o rs2383207 ( $p < 0,0001$ ), o rs2383206 ( $p < 0,00001$ ), o rs10757278 ( $p < 0,00001$ ) e o rs10757274 ( $p = 0,02$ ).

Nossos resultados, que indicam que os polimorfismos investigados não influenciam no risco de desenvolver DAC, são contrários aos achados de Pereira e

colaboradores (2012), que verificaram, em uma amostra de 611 indivíduos brasileiros pertencentes ao MASS II, uma associação dos polimorfismos rs10757274, rs2383206, rs10757278 e rs1333049 em pacientes com múltiplos vasos acometidos. Scheffold e colaboradores (2011) também confirmaram, em um estudo com 976 alemães, uma forte associação de seis polimorfismos, incluindo o rs1333049 e o rs10757274, com IM, particularmente em pacientes com história familiar.

Aschauer e colaboradores (2010) também evidenciaram, em um estudo realizado com 97 homens caucasianos, que houve resistência vasodilatadora em portadores do genótipo CC para o polimorfismo rs1333049, estando esta variante associada com um aumento do risco cardiovascular. Em outro estudo Zeng e colaboradores (2013) investigaram, em uma população Chinesa, com 359 pacientes com suscetibilidade a IM e 398 controles, se seis polimorfismos em 9p21 estavam associados com Síndrome Coronariana Aguda (SCA). Eles verificaram que os polimorfismos foram associados significativamente com a SCA. Além disso, o genótipo GG do rs10757278 foi associado a resultados adversos cardíacos após a SCA.

A região 9p21 é considerada um marcador de risco para a DAC, confirmada em diversos estudos e populações. Em nosso estudo, não encontramos nenhum efeito principal das variantes investigadas no risco de desenvolver DAC ou nas variáveis clínicas da amostra. No entanto, detectamos uma interação significativa entre os alelos de risco dos polimorfismos e a classificação em casos e controles na determinação dos níveis de colesterol total e LDL-colesterol. Em casos, a presença dos alelos de risco parece estar associada com níveis mais baixos de colesterol, diferente do observado para os indivíduos classificados como controles, que exibem efeito oposto. Ainda não existem muitos estudos que evidenciam o efeito desses genótipos com o perfil lipídico, Ahmed e colaboradores (2013) associaram em seu estudo indivíduos portadores do genótipo CC, neste caso, homocigóticos para o alelo de risco, do polimorfismo rs1333049, com níveis menores de LDL-colesterol e triglicerídeos, para pacientes hipercolesterolêmicos em uma população paquistanesa. Este mesmo estudo também demonstrou uma forte associação do polimorfismo rs1333049 com IM e de pacientes com hipercolesterolemia familiar, o

qual, segundo os autores também pode ser usado como um marcador genético no rastreamento de IM para a população paquistanesa em geral.

Os estudos demonstraram que de um modo geral, o componente genético das doenças cardiovasculares tem sido cada vez mais investigado, evidenciando assim, novas associações entre os polimorfismos estudados da região 9p21, nas diferentes populações. Novos estudos com populações maiores devem ser realizados para que estes resultados sejam confirmados.

Nossos resultados devem ser compreendidos levando em consideração algumas limitações. O tamanho amostral mesmo não sendo pequeno, pode se tornar um limitador importante, devido ao fato, que estes polimorfismos são comuns na população em geral. Um número amostral ainda maior, talvez pudesse evidenciar uma associação significativa entre pacientes casos e controles, e o risco de desenvolver DAC. Outro aspecto é a formação do grupo controle, composto por pacientes que procuram um serviço de Hemodinâmica, o que pode acarretar em um aumento dos fatores de risco nesse grupo, já que os mesmos estão com diagnóstico prévio de alguma doença cardiovascular.

## 6 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou uma prevalência do gênero masculino e de uma média de idade maior nos pacientes casos se comparados com os controles. Também foi observado que os níveis de colesterol HDL estão significativamente menores em casos quando comparados com os controles, o que é esperado para uma amostra de cardiopatas, visto que, estes fatores são de risco para este grupo de pacientes.

Houve um maior índice de IMC em pacientes controles, o que não era esperado, pois IMC é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de DAC. No entanto, casos e controles ficaram com sobrepeso, ou seja, dentro do mesmo limite de obesidade.

De acordo com os estudos analisados pode-se observar que na maioria das populações houve associação entre os polimorfismos estudados e o risco de desenvolver diversas doenças cardiovasculares. Em nossa amostra não foi evidenciada nenhuma associação significativa entre os polimorfismos rs1333049 e rs10757274 com o risco de desenvolver DAC.

Também não detectamos nenhum efeito principal dos polimorfismos nas variáveis clínicas da amostra. Porém, encontramos uma interação entre os alelos de risco C para o rs1333049 e o G para rs10757274, e a classificação em casos e controles nos níveis de Colesterol total e LDL-colesterol.

No entanto, mesmo não tendo evidenciado associação em nosso estudo, não podemos excluir a importância dos polimorfismos da região 9p21 nos desfechos e

no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Estudos com amostras maiores e em diferentes populações devem ser realizados para avaliar a relação entre estes polimorfismos e o risco de desenvolver DAC.



## REFERÊNCIAS

- ABDULAH K.G; LI L.; SHEN G.Q.; HU Y.; YANG Y.; MACKINLAY K.G; Topol E.J.; WANG Q.K. Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest). **Ann Hum Genet**, v.72, n.5, p.654-7, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634771/> Acesso: 22 out. 2012.
- AHMED, Waqas; ALI, Imran Saeed; RIAZ, Moeen ; YOUNAS, Asma; SADEQUE, Ahmed; NIAZI, Asfandyar Khan; NIAZI, Saad Hameed; ALI, Syeda H. B.; AZAM, Maleeha; QAMAR, Raheel. Association of ANRIL polymorphism (rs1333049: C>G) with myocardial infarction and its pharmacogenomic role in hypercholesterolemia. **Gene**, v.515, n. 2, p.416-20, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111912015685> Acesso em: 25 Fev. 2014.
- ASCHAUER, Stefan; MITTERMAYER, Friedrich; WAGNER, Claudia C.; SCHMIDT, Wolfgang M.; BRUNNER, Martin; HASLACHER, Helmuth; WOLZT, Michael; MULLER, Markus. Forearm vasodilator reactivity in homozygous carriers of the 9p21.3 rs1333049 G>C polymorphism. **Eur J Clin Invest**, v.40,n.8, p.700-705, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649639> Acesso em: 14 de Fev. 2014.
- AZEVEDO, Clerio F.; ROCHITTE, Carlos E.; LIMA, João A.C. Escore de cálcio e angiotomografia coronariana na estratificação do risco cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 98, n. 6, 2012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2012000600012&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2012000600012&lng=pt) Acesso em: 25 Out. 2012.
- BORGES, Camila Feijó; BUSNELLO, Fernanda Michielin; PELLANDA, Lucia Campos. Identificação de fatores de risco cardiovascular em pais: cuidadores de crianças cardiopatas. **Arq Bras Cardiol**, v. 99, n. 4, p. 936-943, 2012. Disponível em: [http://www.arquivosonline.com.br/2012/AOP/aop08312\\_port.pdf](http://www.arquivosonline.com.br/2012/AOP/aop08312_port.pdf) Acesso em: 28 Out. 2012.
- COMPANIONI, O.; RODRIGUEZ Esparragón, F.; MEDINA Fernández-Aceituno, A.; PEREZ, Rodríguez J. C. Genetic variants, cardiovascular risk and genome-wide association studies. **Revista Española de Cardiología** (English Edition), v. 64, n.6, p. 509-514, 2011. Disponível em: <http://www.revespcardiol.org/en/linkresolver/genetic-variants-cardiovascular-risk-and/90020936/> Acesso em: 30 Out. 2012.
- CONGRAIS, Ada; KAMIDE, Kei ; KATSUYA, Tomohiro; YASUDA, Osamu; OGURO, Ryousuke; YAMAMOTO, Koichi; OHISHI, Mitsuru; RAKUGI, Hiromi. CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMCq. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 612–616, 2012a. Disponível

em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X12002835> Acesso em: 28 Out. 2012.

CONGRAIS, Ada; KAMIDE, Kei ; OGURO, Ryouzuke; YASUDA, Osamu; MIYATA, Keishi; YAMAMOTO, Eiichiro; KAWAI, Tatsuo; KUSUNOKI, Hiroshi; YAMAMOTO, Hiroko; TAKEYA, Yasushi; YAMAMOTO, Koichi; ONISHI, Miyuki; SUGIMOTO, Ken; KATSUYA, Tomohiro; AWATA, Nobuhisa; IKEBE, Kazunori; GONDO, Yuichi; OIKE, Yuichi; OHISHI, Mitsuru; RAKUGI, Hiromi. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. **Atherosclerosis**, v.220, n.2, p.449-55, 2012b. Disponível em: [http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(11\)01086-0/fulltext](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(11)01086-0/fulltext) Acesso em: 24 Fev. 2014.

CONGRAIS, Ada; KAMIDE, Kei; OHISHI, Mitsuru; RAKUGI, Hiromi. ANRIL: Molecular Mechanisms and Implications in Human Health. **International Journal of Molecular sciences**, v.14, n.1, p.1278-92, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306151> Acesso em: 20 Nov. 2013.

CROSSMAN, David C. SNPs and coronary angiography: can vascular biology be done from angiograms? **European Heart Journal**, v. 31, p. 2977–2979, 2010. Disponível em: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/31/24/2977.full.pdf+html> Acesso em: 20 Out. 2012.

DANDORA, Sonny; STEWART, Alexandre F.R; CHEN, Li; WILLIAMS, Kathryn; ENTÃO, Derek, BRIEN, Ed O'; GLOVER Christopher; LEMAY, Michel; ASSOGBA, Olivia; VO, Lan; WANG, Yan Q.; LABINAZ, Marino; WELLS, George A.; MC PERSON, Ruth; ROBERTS, Robert. Gene Dosage of the Common Variant 9p21 Predicts Severity of Coronary Artery Disease. **JACC**, v. 56, n.6, p. 479-86, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109710019583> Acesso em: 13 Fev. 2014.

DAVIES M.J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83:361.6. FAN M.; DANDONA S.; Mc PHERSON R.; ALLAYEE H.; HANSEL S.L.; WELLS G.A.; ROBERTS R.; STEWART A.F. Two chromosome 9p21 haplotype blocks distinguish between coronary artery disease and myocardial infarction risk. **Circ Cardiovasc Genet**, v.4, n.6, p. 372-80, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729007>. Acesso em: 20 Out. 2013.

FERRI, Letícia. **Polimorfismos no gene paraoxonase1 como preditores de eventos cardiovasculares em pacientes com doença coronária estável**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Cardiologia. [tese] São Paulo: 2009.

FREITAS, Elizabete Viana de; BRANDÃO, Andréa A.; POZZAN, Roberto; MAGALHÃES, Maria E.; FONSECA, Flávia; PIZZI, Oswaldo; CAMPANA, Érika; BRANDÃO, Ayrton Pires. Importance of HDL-c for the Occurrence of Cardiovascular Disease in the Elderly. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, n. 3, 2009. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/abc/v93n3/en\\_a06v93n3.pdf](http://www.scielo.br/pdf/abc/v93n3/en_a06v93n3.pdf) Acesso em: 13 Fev. 2014.

HOLDT L.M.; SASS K.; GABEL G.; BERGERT H.; THIERY J.; TEUPSER D. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15,INK4b), CDKN2A (p16,INK4a), p14(ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque. **Atherosclerosis**, v. 2, n.214, p.264-70, 2011. Disponível em: [http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(10\)00447-8/fulltext](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(10)00447-8/fulltext) Acesso em: 2 Nov. 2012.

KUMAR, J.; YUMNAM, S.; BASU, T.; GHOSH, A.; GARG, G.; KARTHIKEYAN, G.; SENGUPTA, S. Association of polymorphisms in 9p21 region with CAD in North Indian

population: replication of SNPs identified through GWAS. **Clinical Genetics**, v.79, p.588-593, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718794> Acesso em: 13 Mar. 2013.

JARINOVA, Olga; STEWART, Alexandre F.R.; ROBERTS, Robert; WELLS, George; LAU, Paulina; NAING, Thet; BUERKI, Christine; MCLEAN, Bradley W.; COOK, Richard C.; PARKER, Joel S.; MCPHERSON, Ruth. Functional Analysis of the Chromosome 9p21.3 Coronary Artery Disease Risk Locus. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.29, n.10, p.1671-1677, 2009. Disponível em: <http://atvb.ahajournals.org/content/29/10/1671.long> Acesso em: 8 Fev. 2014.

MARIAN A, J. The enigma of Genetic Etiology of Atherosclerosis in the Post-GWAS Era. **Curr Atheroscler Rep**, v.14, p.295–299, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3389254/> Acesso em: 23 Set. 2012.

MARIAN A, J.; BELMONT M.D. Strategic Approaches to Unraveling Genetic Causes of Cardiovascular Diseases. **Circ Res**, 2011; v. 108, n.10, p.1252–1269, 2011 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566222> Acesso em: 15 Mar. 2013.

MENDONÇA, Isabel; REIS, Roberto P. dos; PEREIRA, Andréia; CAFÉ, Hugo; SERRÃO, Marco; SOUSA, Ana Célia; FREITAS, A. Isabel; GUERRA, Graça; FREITAS, Sonia; FREITAS, Carolina; ORNELAS, Ilídio; BREHM, António; ARAÚJO, J. José. Associação independente da variante rs1333049, no locus 9p21, com a doença coronária, numa população portuguesa. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 30, n.6, p.575-591, 2011. Disponível em: <http://www.spc.pt/DL/PC/artigos/1334.pdf> Acesso em: 31 Out. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation**, Geneva. World Health Organization, 1998.

PECHLIVANIS, Sonali; MUHLEISEN, Thomas W; Mohlenkamp, Stefa; Schadendorf, Dirk; ERBEL, Raimund; JOCKEL, Karl-Heinz; HOFFMANN, Per; NOTHEN, Markus M. SCHERAG, André; MOEBUS, Susanne. Risk loci for coronary artery calcification replicated at 9p21 and 6q24 in the Heinz Nixdorf Recall Study. **BMC Med Genet**, v. n.8, p. 14-23, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23394302/> Acesso em: 17 Out. 2013.

PEREIRA-GIOLI L.; SANTTOS P.; FERREIRA N.E.; HUEB W.A., KRIGER J.E., PEREIRA A.C. Higher incidence of death in multi-vessel coronary artery disease patients associated with polymorphisms in chromosome 9p21. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 12, n.61, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469382/> Acesso em: 20 Out. 2013.

PESARO, Antonio Eduardo Pereira; SERRANO Jr.; NICOLAU, C. Vicente. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.50, n.2, p.214-220, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v50n2/20786.pdf> Acesso em: 31 Out. 2012.

POLANCZYK, Carisi Anne. Fatores de Risco Cardiovascular no Brasil: os Próximos 50 Anos! **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 3. Porto Alegre, março 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v84n3/a01v84n3.pdf> Acesso em: 22 Out. 2012.

PRANAVCHAND, R.; REDDY, M. Current status of understanding of the genetic etiology of coronary heart disease. **J Postgrad Med**, v.59, n.1, p.30-41, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525056> Acesso em: 9 Mar. 2013

RENNER, Wilfried and HOFFMANN Michael M. Insight from genome-wide association studies into coronary heart disease. **Future Medicine Pharmacogenomics**, p. 361-363, 2012. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/pgs.11.186> Acesso em: 2 Nov. 2012.

ROBBIN & CORTAN. Bases Patológicas das doenças. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

ROSAMOND, W. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v.117, n.4, p.25–146, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086926> Acesso em: 30 Set. 2013.

SÁ, Ana Carolina Marques. **O Papel dos Polimorfismos Genéticos na Doença Cardíaca Isquêmica**. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto: UP, 2012.

SAYLOS-BAIXERAS, Sergi; LLUÍS-GANELLA, Carla; LUCAS G., ELOUSA Roberto. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. **Appl Clin Genet**, v. 7, p. 15-32, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920464/> Acesso em: 10 Fe. 2014.

SCHEN, Gong-Qing; RAO, Shaoqi; MARTINELLI, Nicola; LI, Lin; OLIVIERI, Oliviero; CORRCHER, Roberto; ABDULLAH, Kalil; HAZEN, Stanley; SMITH, Jonathan; BARNARD, John; PLOW, Edward; GIRELLI, Domenico; WANG, Qing. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. **J Hum Genet**, v.53, n.2, p.144-55, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/jhg/journal/v53/n2/full/jhg2008217a.html> Acesso em: 17 Fev. 2014.

SCHEFFOLD, Thomas; KULLMANN, Silke; ENORME, Andreas; BINNER, Priska; OCHS, Hermann R.; SCHOLS, Wolfgang; THALE, Joachin; MOTZ, Wolfgang; HEGGE, Franz; STELBRINK, Christoph ; DORSEL, Thomas; GULKER, Hartmut; HEUER, Hubertus; DINH, Wilfried; STLOLL, Monika; HALTERN. Six sequence variants on chromosome 9p21.3 are associated with a positive family history of myocardial infarction: a multicenter registry. **BMC Cardiovasc Disord**, v.11, n.9, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385355> Acesso em: 2 Fev. 2013.

SCHOENHAGEN, Paul; TUZCU, Murat E. Métodos por Imagem da Aterosclerose em Estudos de Progressão/Regressão: Marcador Substituto ou Janela Direta para o Processo Patológico da Aterosclerose? **Arq Bras Cardiol**, v.91, n.6, p.418-431, 2008.

SCOTT L.; MOHLEK L.; BONNYCASTLE L.; WILLER C; LI Y; DUREN W. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science**, v.316, n. 5829, p.1341–5, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17463248> Acesso em: 12 Set 2012.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência cardíaca crônica. **Arq Bras Cardiol**, v.93 (supl.1), p.1-71, 2009.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 88 (suplemento I), Abr/2007.

SOUSA, Marcos Roberto de; ROCHA, Ricardo M.; PAOLA, Angelo Amato Vincenzo de; KOHLER, Ilmar; FEITOSA, Gilson S.; SCHNEIDER, Jamil Cherem; FEITOSA, Gilson S. Filho; NICOLAU, José Carlos; FERREIRA, João F. Monteiro; MORAES, Nelson Siqueira de. I Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre processos e competências para a formação em cardiologia no Brasil: resumo executivo. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 98, n. 2, fev. 2012. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2012000200001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2012000200001). Acesso em: 27 Out. 2012.

SPOSITO, Andrei C. et al . IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 88, supl. 1, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066782X2007000700002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066782X2007000700002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 30 Mar. 2014.

STACEY S.N.; SULEM P.; MASSON G.; GUDJONSSON S.A.; THORLEIFSSON G.; JAKOBSDOTTIR M. New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. **Nat Genet**, v.41, n.8, p.909-14, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578363> Acesso em: 27 Jan. 2013.

SWERDLOW, Daniel I.; HOLMES, Michael V.; HARRISON, Seamus; HUMPHRIES, Steve E. The genetics of coronary heart disease. **British Medical Bulletin**, v.102, p. 59-77, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577178> Acesso: 14 Jan. 2013.

VISEL Axel; YIWEN, Zhu; MAY, Dalit; AFZAL, Veena; GONG, Elaine; ATTANASIO, Catia; BLOW, Matthew J.; COHEN, Jonathan C.; RUBIN, Edward M.; PENNACCHIO, Len A. Targeted Deletion of the 9p21 Noncoding Coronary Artery Disease Risk Interval in Mice. **Nature**, v.464, n.7287, p.409-412, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2938076/> Acesso em: 08 Fev. 2014.

ZENG, Qiang; YUAN, Ying; WANG, Shuxia; SUN, Jing; ZHANG, Tao; QI, Ming. Polymorphisms on Chromosome 9p21 Confer a Risk for Acute Coronary Syndrome in a Chinese Han Population. **Pode J Cardiol**, v.29, n.8, p.940-4, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0828282X12014833> Acesso em: 16 Fev. 2014.

ZHOU- Li T.; QIN Lin; ZHENG D.C.; CANÇÃO Z.K.; YE L. Meta-analysis of genetic association of chromosome 9p21 with early-onset coronary artery disease. . **Gene**, v.510, n.2, p.185-8, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975211> Acesso em: 16 Fev. 2013.

WANG W.; PENG W.H.; LU L.; ZHANG R.Y.; ZHANG Q.; WANG L.J.; CHEN Q.J.; SHEN W.F. Polymorphism on chromosome 9p21.3 contributes to early-onset and severity of coronary artery disease in non-diabetic and type 2 diabetic patients. **Chin Med J**, v. 124, n.1, p.66-71, 2011.



**ANEXOS**

## ANEXO A – Questionário semi-estruturado aplicado aos pacientes

Centro Universitário UNIVATES

Associação entre polimorfismos genéticos e marcadores moleculares e o desenvolvimento de doença coronariana e infarto do miocárdio em uma população gaúcha.

Nome: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ETNIA:

Dados sócio-demográficos:

A. Endereço: \_\_\_\_\_

B. Cidade: \_\_\_\_\_ C. Residência: 1.( )Rural 2. ( )Urbana

D. Telefone para contato: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Outro telefone: (\_\_\_\_)

\_\_\_\_\_

E. Estado civil: 1.( ) Solteiro(a) 2. ( )Casado(a)/vive com companheiro(a)

F. Sexo: 1. ( )Feminino 2. ( )Masculino G. Idade: \_\_\_\_\_

H. Anos de estudo: \_\_\_\_\_

I. 1. ( )Analfabeto 2. ( )Ensino fundamental incompleto (1° grau incompleto) 3. ( )Ensino fundamental completo (1° grau completo) 4. ( )Ensino médio (2° grau incompleto) 5.( )Ensino médio completo (2° grau completo) 6.( )Ensino superior incompleto (3° grau incompleto)

7. ( )Ensino superior completo (3° grau completo) 8.( )Pós-graduação

J. Profissão/Ocupação: 1.( )Aposentado 2.( )Do lar 3.( )Comerciante 4. ( )Autônomo

5.( )Outro. Qual? \_\_\_\_\_

K. Plano de saúde: 1.( )SUS 2. ( )Particular. Qual? \_\_\_\_\_

Tabagismo:

L. Fuma: 1.( )Sim 2.( )Não

M. Abstinência ao fumo: 1.( ) Não fuma há menos de um ano 2.( ) Entre um e dez anos

3.( )10 a 20 anos 4.( ) 20 a 30 anos 5.( )30 a 40 anos 6.( ) mais de 40 anos 7.( )Não se aplica

N. Tem contato com fumantes ativos (sendo você fumante passivo)? 1.( )Sim 2.( )Não

O. Qual ambiente de contato com fumantes? 1.( ) domicílio 2.( )bares, ambientes de lazer

3.( )ambiente laboral 4.( )locais públicos abertos e/ou fechados 5. ( ) outro

\_\_\_\_\_ 6.( )Não se aplica

P. Se fuma, quantos cigarros por dia: 1.( )Nenhum 2.( )um a 10 cigarros 3.( )10 a 20 cigarros

4.( )20 a 30 cigarros 5.( )30 ou mais cigarros

Alcoolismo e outras drogas:

Q. Consome bebidas alcoólicas regularmente: 1.( )Sim 2.( )Não

R. Frequência: 1.( )até duas vezes por sem 2.( )3 a 4 vezes por semana 3. ( )5 a7 dias por semana

S. Se já foi alcoolista, qual é o tempo de abstinência ao álcool: 1.( ) Não bebe há menos de um ano 2.( ) entre um e dez anos 3.( )10 a 20 anos 4.( ) 20 a 30 anos 5.( )30 a 40 anos 6.( ) mais de 40 anos 7.( )NA

T. Utiliza alguma das seguintes drogas: 1. ( ) maconha 2. ( )cocaína 3.( )crack

4.( )outra\_\_\_\_\_

História familiar:

U. Tem história de doença cardiovascular na família? 1.( )Sim 2.( )Não

V. Qual é a doença:

\_\_\_\_\_

X. Qual é o parentesco? 1.( )Mãe 2.( )Pai 3. ( )Irmãos 4.( )Avós por parte de mãe 5.( )Avós por parte de pai 6.( )Tios 7.( )Primos

Y. Atividade física regular: 1.( )1Xsem 2.( )2Xsem 3.( )3 a 4Xsem 4.( )5 a 7Xsem

## INFORMAÇÕES MÉDICAS

AA. Diagnóstico/sintomas anteriores ao cateterismo:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

AB. Indicação do cateterismo:

\_\_\_\_\_

AC. Resultado do cateterismo:

\_\_\_\_\_



**ANEXO B – Emenda Comitê de Ética em Pesquisa da Univates (COEP/UNIVATES)**

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Centro Universitário UNIVATES

**PROJETO DE PESQUISA**

Título: Marcadores genéticos e moleculares associados à doença coronariana e infarto do miocárdio.

Pesquisador: Luciana Weidlich Versão: 2

Instituição: Centro Universitário UNIVATES CAAE: 01464812.0.0000.5310

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Número do Parecer: 20280

Data da Relatoria: 21/05/2012

**Apresentação do Projeto:**

O projeto intitulado: Associação entre polimorfismos genéticos e marcadores moleculares e o desenvolvimento de doença coronariana e infarto do miocárdio em uma população gaúcha, encontra-se bem descrito e apresenta bons antecedentes científicos que o justificam.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos propostos são claros e factíveis

**Objetivo Primário:**

O objetivo deste estudo é verificar se existe associação entre dois polimorfismos genéticos da região 9p21 e o desenvolvimento de doença arterial coronariana e ocorrência de infarto do miocárdio em uma população do estado do Rio Grande do Sul.

#### Objetivo Secundário:

1. Estabelecer a prevalência de casos de doença arterial coronariana (DAC) na população atendida no Serviço

de Cardiologia do Hospital Bruno Born, em Lajeado.

2. Determinar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com DAC e dos pacientes que forem atendidos durante ou após evento de IM, no Serviço de Cardiologia do Hospital Bruno Born.

3. Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo rs1333049 da região cromossômica 9p21, em pacientes com DAC e em controles

4. Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo rs10757274 da região cromossômica 9p21, em pacientes com DAC e em controles

5. Verificar se existe associação entre o polimorfismo rs1333049 e a recorrência de IM.

6. Comparar a frequência dos polimorfismos e desfechos entre os casos citados e controles sem DAC

7. Comparar as frequências dos dois polimorfismos entre casos e controles para verificar a possibilidade de associação destas variantes com os desfechos analisado.

8. Analisar a presença de marcadores cardíacos e inflamatórios nas amostras coletadas.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos, em virtude da pesquisa, são inexistentes tendo em vista que a amostra de sangue que será utilizada para a coleta de dados será a mesma utilizada para o procedimento médico o qual os participantes da pesquisa serão submetidos. Quando aos benefícios, pode-se afirmar que o atingimento dos objetivos trará conhecimentos que associados a outros poderá contribuir para futuros diagnósticos de grupos de indivíduos com características idênticas.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia a ser empregada é adequada para o atendimento dos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLe está adequado, redigido em linguagem acessível e contemplando a todos os requisitos legais.

Recomendações:

Sem comentários.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Anexar documento folha de rosto com a assinatura do Patrocinador (UNIVATES, via PROPEX) bem como a autorização para uso dos laboratórios pela pró-reitoria ao invés de pela própria proponente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

As pendências existentes na primeira versão foram atendidas. Sugiro a aprovação.

LAJEADO, 10 de Maio de 2012.

Assinado por: Cátia Viviane Gonçalves

## **ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **Estudo: Associação entre polimorfismos genéticos e marcadores moleculares e o desenvolvimento de doença coronariana e infarto do miocárdio em uma população gaúcha.**

A doença coronariana (entupimento dos vasos do coração) é uma das principais causas de doenças do coração, tendo como consequência angina (dores no peito), infarto do miocárdio (ataque cardíaco), e outras manifestações. Atualmente se sabe que, além dos hábitos de vida das pessoas, existe influência de fatores genéticos na ocorrência desta doença.

Este estudo pretende avaliar algumas características genéticas em pessoas que tem doença coronariana e em pessoas que não tem esta doença, para saber se estas características realmente são associadas à ocorrência destas doenças cardíacas. Para isso será pesquisada uma região do código genético, ou seja, com uma amostra de sangue será feito um exame para identificar um pequeno pedacinho da sua genética, que pode estar relacionado à maior facilidade de desenvolver doença coronariana.

E também serão realizados exames básicos de laboratório, para a dosagem de colesterol, glicose, enzimas, entre outros. Estes resultados serão analisados pelos pesquisadores, no Centro Universitário Univates, e podem futuramente contribuir para o melhor diagnóstico, prevenção e tratamento de casos de doença coronariana. Se você aceitar participar deste estudo, na hora do cateterismo, o médico que fará o procedimento vai coletar uma amostra de sangue (igual à coletada para exames de laboratório).

Esta coleta será feita na mesma “picada” que o médico faz para o exame, ou seja, você não será picado mais uma vez para participar da pesquisa, não provocando nenhum desconforto além do previsto pelo exame de cateterismo. Também serão realizadas algumas perguntas para você, em entrevista em local reservado, sobre informações importantes para o estudo, levando em torno de 15 min.

A participação na pesquisa não envolve nenhum tipo de gasto financeiro por parte do participante, e nem traz riscos à sua saúde, visto que os procedimentos serão feitos no mesmo momento e local do exame de cateterismo. Os desconfortos previstos seriam somente o tempo de responder às perguntas da entrevista e o possível constrangimento diante de alguma pergunta, sendo que a entrevista pode ser interrompida e retomada mais tarde, se necessário. Ainda, o participante não terá nenhum benefício financeiro por participar deste estudo. Os desconfortos relativos ao exame de cateterismo já foram ou serão explicados pela equipe do hospital.

Você deve saber que pode solicitar esclarecimentos sobre a sua participação no estudo a qualquer momento, e também de que é livre para retirar o seu consentimento, se assim o desejar, sem nenhum impacto sobre o seu atendimento no hospital. As informações obtidas neste estudo serão analisadas pela equipe de pesquisadores, garantindo o sigilo dos nomes e informações, ou seja, o seu nome nunca será divulgado, e os seus resultados serão analisados em conjunto com os de outros participantes, não sendo possível identificar nenhum participante individualmente.

Este projeto de pesquisa foi analisado quanto ao atendimento de exigências éticas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univates, sendo aprovado.

Aceitando participar do estudo, você deve assinar este termo em duas vias (ficando uma com você e outra com os pesquisadores).

Declaração do participante:

Declaro que li o termo acima, e que tive todas as informações necessárias sobre o projeto, e assim, aceito participar, como voluntário, deste estudo.

---

Nome do Voluntário

---

Assinatura do Voluntário

---

Nome do pesquisador Entrevistador  
Entrevistador

---

Assinatura do pesquisador

---

Nome da Testemunha

---

Assinatura da testemunha