

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

**EFEITOS DA VARIANTE rs2070744 DO GENE DA ENZIMA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) NA DOENÇA
ARTERIAL CORONARIANA**

Camila Dalacort Toffoli

Lajeado, janeiro de 2015.

Camila Dalacort Toffoli

**EFEITOS DA VARIANTE rs2070744 DO GENE DA ENZIMA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) NA DOENÇA
ARTERIAL CORONARIANA**

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

Orientadora: Dr^a. Verônica Contini

Coorientadora: Dr^a. Júlia Pasqualini
Genro

Lajeado, janeiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À força que me fez vida e move-me, mostrando soluções onde não as vejo; que me faz ver certeza no improvável, no impossível e vencer. Ao que me faz desejar saber mais para compreender melhor; a que não compreendo, não sei explicar, e que comumente chamo Deus.

À minha orientadora Prof. Verônica Contini, pelas horas de estudo juntas, pela paciência e dedicação com que me orientou em todas as etapas deste projeto.

À Prof. Júlia Pasqualini Genro, minha co-orientadora, obrigada pelo comprometimento, pelo apoio e pela força.

Agradeço também à todos os professores do mestrado, em especial à Prof Márcia Goettert, por abrir as portas do conhecimento.

A todos os colegas, especial à Luana Maria Wollinger e Camile Wunsch, pela ajuda na genotipagem.

Aos colegas de trabalho, pela compreensão, pela ajuda quando precisei me ausentar, em especial à Franciele Fozza, ao Leonardo Miranda, à Vanessa Pezzini e ao Vilmar Canteli. Muito obrigada pelo suporte e amizade.

Ao meu eterno professor, colega de trabalho, amigo e irmão que não tive, agradeço pelo auxílio e motivação na continuidade da formação na pós-graduação, obrigada Fabiano Chiesa.

Ao meu esposo Julnei, presente em todos os momentos. Pela paciência, por todo amor e carinho dessa vida como nunca imaginei que pudesse existir.

À minha família: pai e mãe que sempre me incentivaram, por todo suporte, integridade e valores éticos; às irmãs Caroline e Ana Rita (Adriano), por estarem ao meu lado sempre. Sem vocês minha vida teria muito menos cor e sabor!

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”. (Albert Einstein)

RESUMO

A Doença arterial coronariana (DAC) é uma doença multifatorial, representando uma das principais causas de morbidade e mortalidade global. Na última década, um grande número de trabalhos sobre a relação do óxido nítrico (ON) e DAC foram publicados. A diminuição do ON no endotélio pode causar disfunção, acelerar a aterosclerose e a progressão das doenças cardiovasculares e vários estudos têm identificado polimorfismos comuns no gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), responsável pela biossíntese de ON, os quais podem estar associados a aterosclerose e a doença arterial cardíaca. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar o papel de dois polimorfismos do gene eNOS (rs2070744 e rs1799983) na DAC. **Metodologia:** A amostra foi composta de 645 pacientes, maiores de 18 anos, submetidos ao exame de cateterismo cardíaco no Hospital Bruno Born de Lajeado, RS. Foram coletadas amostras de sangue para análises bioquímicas e extração de DNA, que foram realizadas nos Laboratório do Centro Universitário Univates. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e, com base em suas características clínicas, foram classificados em um Escore de Risco Global (ERG) de DAC, proposto pela Sociedade Brasileira de Cardiologia. A influência dos polimorfismos em variáveis clínicas foi avaliada através de modelos lineares univariados ou por Kruskal-Wallis. A associação dos genótipos com as variáveis categóricas foi investigada pelo teste do qui-quadrado ou por regressão logística binária. **Resultados:** De acordo com a pontuação no ERG, 435 pacientes (68%) foram classificados em alto risco, 166 em risco intermediário (26%) e 39 (6%) em baixo risco para a DAC. As frequências alélicas dos polimorfismos investigados no gene eNOS foram 0,69 (G) e 0,31 (T) para a variante rs1799983 e 0,59 (T) e 0,41 (C) para o rs2070744. Não foram detectados efeitos genéticos significativos do polimorfismo rs1799983 nas variáveis clínicas investigadas. Efeitos genéticos do rs2070744 foram encontrados nos valores de colesterol HDL ($p=0,002$) e na pontuação do ERG ($p=0,032$). Indivíduos homocigotos TT apresentaram valores de HDL maiores que indivíduos TC e CC e menor pontuação no ERG do que pacientes TC. Na análise categórica também se detectou um aumento do risco no ERG em indivíduos heterocigotos TC, quando comparados aos indivíduos TT ($p=0,028$). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que o polimorfismo rs2070744 no gene eNOS está associado com o risco aumentado de DAC na nossa amostra.

Palavras chaves: Doença arterial coronariana, associação genética, enzima óxido nítrico sintase endotelial, eNOS.

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is a multifactorial disease, representing a major cause of morbidity and overall mortality. In the last decade, a large number of studies related to nitric oxide (ON) and CAD have been published. The reduction of ON in the endothelium may cause dysfunction, accelerate the progression of atherosclerosis and cardiovascular diseases and several studies have identified common polymorphisms in the gene of the endothelial nitric oxide synthase enzyme (*eNOS*), responsible for the biosynthesis of ON, which may be associated with artery atherosclerosis and heart disease. Objective: The objective of this study was to investigate the role of two polymorphisms in the *eNOS* gene (rs2070744 and rs1799983) in CAD. Methods: The sample consisted of 645 patients submitted to cardiac catheterism in the Hospital Bruno Born, Lajeado, RS. Blood samples were collected for biochemical analyzes and DNA extraction, which were conducted in the Laboratory of the University Center Univates. All patients included in the study signed an informed consent form and, based on their clinical characteristics, were ranked on a Score of Global Risk (SGR) of CAD, proposed by the Brazilian Society of Cardiology. The influence of the polymorphisms on clinical variables was evaluated by univariate linear models or Kruskal-Wallis test. The association between the genotypes and categorical variables was investigated by the chi-square test or by binary logistic regression. Results: According to the score SGR, 435 patients (68%) were classified as high risk, 166 at intermediate risk (26%) and 39 (6%) at low risk for CAD. Allele frequencies of the investigated polymorphisms in *eNOS* gene were 0.69 (G) and 0.31 (t) for the rs1799983 variant and 0.59 (T) 0.41 (C) for rs2070744. No significant genetic effects were detected for the polymorphism rs1799983 in the clinical variables. Genetic effects of rs2070744 were found in HDL cholesterol ($p = 0.002$) and in the SGR score ($p = 0.032$). Individuals homozygous TT had higher HDL levels than individuals TC and CC and lowest score in the SGR than TC patients. In the categorical analysis we also found an increased risk in the SGR for individuals heterozygous TC, when compared to TT subjects ($p = 0.028$). Conclusion: Our results suggest that the rs2070744 polymorphism in the *eNOS* gene is associated with increased risk of CAD in our sample.

Key words: coronary artery disease, genetic association, endothelial nitric oxide synthase, *eNOS*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atribuição de pontos de acordo com o risco cardiovascular: para mulheres.....	18
Tabela 2 – Atribuição de pontos de acordo com o risco cardiovascular: para homens.....	18
Tabela 3 – Risco cardiovascular global em 10 anos: para mulheres.....	19
Tabela 4 – Risco cardiovascular global em 10 anos: para homens.....	20
Tabela 5 – Resumo das principais conclusões da recente meta-análise do estudo de associação genômica da doença arterial coronariana, mostrando o polimorfismo de cada locus, o gene mais próximo, a localização cromossômica, frequência de alelo de risco, valor P e efeito das associações.....	22
Tabela 6 - Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos estudados...	29
Tabela 7 – Características clínicas e sócio demográficos da amostra de acordo com os genótipos.....	30
Tabela 8 – Características laboratoriais e pontuação no Escore de Risco Global de acordo com os genótipos.....	32
Tabela 9 – Influência dos polimorfismos no gene <i>eNOS</i> sobre o risco cardiovascular (baixo + intermediário <i>versus</i> alto).....	35
Tabela 10 – Influência do rs2070744 no gene <i>eNOS</i> sobre o risco cardiovascular (baixo + intermediário <i>versus</i> alto – modelo dominante).....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Causas genéticas ou ambientais no desenvolvimento e progressão da aterosclerose agem diretamente ou por meio de características intermediárias conhecidas.....16
- Figura 2 – Comparações *post hoc* (valor-P corrigido por Bonferroni) dos efeitos do rs2070744 no gene *eNOS* sobre o HDL e o Escore de Risco Global.....33
- Figura 3 – Efeitos do rs2070744 no gene *eNOS* sobre o HDL e o Escore de Risco Global a partir de um modelo dominante.....34

LISTA DE SIGLAS

ALT: alanina aminotransferase

Apo A-1: apolipoproteína A-1

AST: aspartato aminotransferase

CK: creatinoquinase

CKMB: creatinoquinase fração MB

CT: colesterol total

DNA: ácido desoxirribonucleico

eNOS: enzima óxido nítrico sintase endotelial

ERG: escore de risco global

GWAS: Genome-wide association studies

HDL: lipoproteína de alta densidade

ICAM-1: moléculas de adesão intercelular

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LDL: : lipoproteína de baixa densidade

LDLm: lipoproteína de baixa densidade modificada

LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada

MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos

nNOS: óxido nítrico neuronal

NOS: óxido nítrico sintase

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

TNF: fator de necrose tumoral

VCAM-1: moléculas de adesão de células vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Tema.....	11
1.2 Problema.....	11
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo geral.....	12
1.3.2 Objetivos específicos.....	12
1.4 Justificativas.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Doença arterial coronaríaca.....	14
2.2 Óxido Nítrico, Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial e Doenças Cardiovasculares.....	23
2.3 Gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).....	24
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	27
3.1 Amostra.....	27
3.2 Análises laboratoriais.....	27
3.3 Análises estatísticas.....	28
4 RESULTADOS.....	29
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS	47

1. INTRODUÇÃO

A Doença arterial coronariana (DAC) é considerada uma das principais causas de mortalidade e é amplamente aceita como uma doença inflamatória crônica, resultado da formação de placas de ateroma na parede dos vasos sanguíneos. É uma doença complexa, que atua seletivamente na rede arterial, sendo consequência de uma ação combinada de fatores de risco, tanto genéticos quanto ambientais.

O óxido nítrico (ON) é uma das mais versáteis moléculas conhecidas, sendo considerado um importante regulador do sistema cardiovascular e endócrino-metabólico, atuando como mediador em muitas reações biológicas. Sua formação se dá sob a ação de enzimas específicas, conhecidas como óxido nítrico sintases, que atuam sobre o aminoácido L-arginina.

Sabe-se atualmente que o ON está envolvido e desempenha um papel importante na evolução da DAC. No entanto, existem poucos estudos que avaliam a influência de polimorfismos no gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enzima responsável pela biossíntese do ON, no desenvolvimento da doença. Os achados iniciais ainda são bastante controversos, o que ressalva a importância de um melhor entendimento do papel desse gene na fisiopatologia da doença.

1.1 Tema

Investigação do papel de polimorfismos no gene *eNOS* em uma amostra de pacientes submetidos ao exame de cateterismo cardíaco.

1.2 Problema

Existe influência dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 no gene *eNOS* na DAC na amostra estudada?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral:

O objetivo deste estudo é investigar o papel de dois polimorfismos no gene *eNOS* (rs1799983 e rs2070744) na DAC em uma amostra de pacientes submetidos ao exame de cateterismo cardíaco.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 no gene *eNOS* em uma amostra de 645 pacientes submetidos ao exame de cateterismo cardíaco no Hospital Bruno Born de Lajeado, RS;
- Avaliar se existe influência dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 em variáveis clínicas dos pacientes (uso de álcool e tabaco, parâmetros antropométricos, bioquímicos, pressão arterial e marcadores de função, lesão e inflamação);
- Verificar se existe associação entre os polimorfismos rs1799983 e rs2070744 e o risco de DAC na amostra investigada.

1.4 Justificativa

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que das 50 milhões de mortes, das últimas décadas, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 30% desta mortalidade. No Brasil, o crescimento da população idosa e o aumento da longevidade, associado a mudanças nos padrões alimentares e no estilo de vida, tem forte repercussão sobre o padrão de morbi-mortalidade. De acordo com o Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas no país em um ano. Segundo a Síntese de Indicadores Sociais de 2013, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), 4,2% (6,1 milhões) de pessoas, de 18 anos ou mais de idade, tiveram algum

diagnóstico médico de doença do coração, sendo que a região Sul apresentou uma estimativa maior que outras regiões, apresentando 5,4% de pessoas com doença cardiovascular.

Diversos fatores de risco ambientais para o desenvolvimento da DAC são atualmente reconhecidos e combatidos, como o uso de tabaco, a presença de diabetes mellitus, a hipertensão arterial, entre outros. De fato, a análise dessas variáveis de risco é comumente utilizada na criação de escores de risco de desenvolvimento da doença, os quais ajudam a prever riscos, identificar indivíduos em alto risco e desenvolver estratégias de prevenção. No entanto, sabe-se também que a DAC é claramente uma doença complexa, apresentando um componente genético, evidenciado pelos estudos de herdabilidade, bastante significativo, especialmente em casos mais precoces da doença. Com os avanços rápidos e crescentes das técnicas moleculares é possível esperar que, no futuro, marcadores genéticos de susceptibilidade possam também ser considerados e incluídos nos escores de estimativas de risco para o desenvolvimento da DAC. A inclusão das variáveis genéticas de risco poderá aperfeiçoar, e individualizar, a utilização dos escores de risco, levando a uma melhora na detecção precoce de casos e, conseqüentemente, melhorando o prognóstico dos pacientes. Além disso, espera-se também que, além da utilização em estratégias preventivas, uma melhor elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas doenças cardiovasculares possa contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêutico-farmacológicas.

Muitos estudos moleculares têm sido realizados, muitas variáveis genéticas de risco têm sido identificadas e muitas ainda apresentam resultados contraditórios, como os achados para os polimorfismos no gene *eNOS*, foco deste estudo. Apesar dos avanços, no entanto, a maioria das associações não é definitiva e nem conclusiva, especialmente considerando os efeitos pequenos e moderados esperados para doenças complexas. Portanto, torna-se bastante importante que muitos estudos, em diferentes populações, ainda sejam realizados, com o intuito de que se possa realizar, futuramente, análises conjuntas, com um grande número de dados, para confirmar e melhor compreender o real papel dos achados iniciais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença arterial coronariana

A DAC é a principal causa de morte e incapacidade em todo o mundo. Considerada uma doença inflamatória crônica complexa, é caracterizada pela remodelação e estreitamento das artérias coronárias que fornecem oxigênio para o coração. A situação de saúde no Brasil, provocada pela transição demográfica e epidemiológica, exige que o sistema de saúde brasileiro responda por uma carga de doenças e, entre elas, há um aumento das doenças crônicas pelo envelhecimento das pessoas e aumento dos fatores de risco, como o tabagismo, sedentarismo, sobrepeso e a má-alimentação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A DAC é clinicamente caracterizada por depósitos de placas de gordura na parede das artérias coronárias, ocasionando assim a aterosclerose (SWERDLOW et al, 2012), precursora de eventos cardiovasculares, que progride de forma insidiosa, sem sintomas, atingindo grande parte da árvore arterial, incluindo carótida e artérias coronárias (KASLIWAL et al, 2014). Ela pode ter várias manifestações clínicas, incluindo angina estável, síndrome coronariana aguda, e morte súbita cardíaca (SAYOLS-BAIXERAS et al, 2014). A manifestação patogênica da doença aterosclerótica envolve o desenvolvimento de lesões na camada íntima da artéria afetada, com um núcleo lipídico conhecido como ateroma. Em nível celular, o desenvolvimento da aterosclerose é descrito pela resposta inflamatória crônica a parede endotelial, onde o dano e a progressão da lesão ocorrem através da interação de lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monócitos e linfócitos T constituintes da parede arterial (RUDOLF & LEWANDROWSKI, 2014).

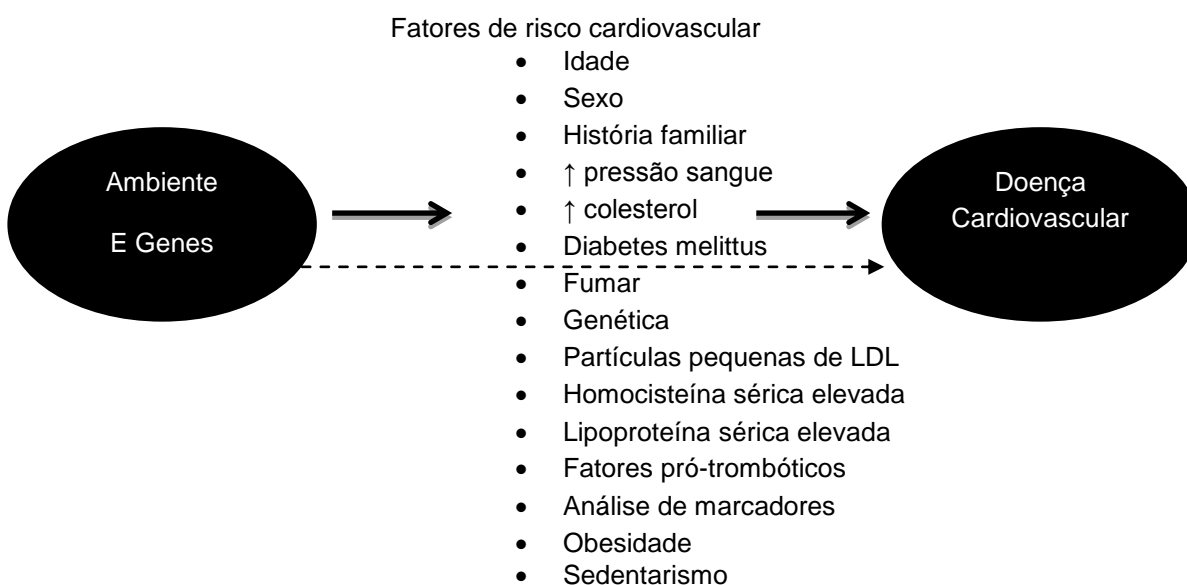
O principal fator envolvido no desencadeamento da lesão arterial é evidenciado pela presença da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (STEINBERG, 1997). As LDL possuem características aterogênicas e, presentes em altas concentrações no plasma, penetram com maior facilidade na parede dos vasos, aumentando a geração de ânions superóxido pelo

endotélio, o que promove modificações na estrutura da LDL, originando a lipoproteína de baixa densidade modificada - LDLm (RAJMAN et al, 2001). A LDLm infiltra-se na camada íntima, onde pode sofrer oxidação causada por enzimas presentes, originando a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) (GLEISSNER et al, 2007). Estas lipoproteínas depositadas nas paredes dos vasos desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), quimiocinas (MCP-1 e IL-8) (APOSTOLAKIS et al, 2009; SHIN et al, 2002), moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão de células vascular (VCAM-1), selectina de plaquetas e de células endoteliais, e migração e adesão de leucócitos (SAYOLS-BAIXERAS et al, 2014). Os leucócitos, por sua vez, diferenciam-se em macrófagos, que reconhecem a molécula de LDLox, promovendo sua endocitose, formando as células espumosas, aumentando o processo inflamatório local e, com isso, perpetuando a resposta inflamatória e promovendo a formação da placa aterosclerótica (SCOTT, 2004; HANSSON et al, 2002).

A DAC tem uma etiopatogenia complexa e origem multifatorial, influenciada por fatores ambientais e fatores genéticos, que modulam o risco da doença, tanto individualmente como através da interação com os fatores ambientais (SAYOLS-BAIXERAS et al, 2014). Na literatura, alguns fatores ambientais têm sido diretamente relacionados com a progressão, evolução e complicações da doença arterial (Figura 1). Entre os principais, incluem-se o tabagismo, a obesidade, a hipertensão arterial, a dislipidemia e diabetes. Um estudo realizado por LIMA (2012), em pacientes brasileiros submetidos à revascularização miocárdica, concluiu que a hipertensão arterial, a obesidade e o sedentarismo foram os fatores de risco mais frequentes encontrados nestes pacientes, sendo que a maior parte deles (79,5%) apresentou no mínimo três fatores de risco. O excesso de gordura corporal também contribui para o risco de desenvolver uma série de problemas de saúde, incluindo pressão alta, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. De acordo com resultados do *Framingham Heart Study*, o risco relativo, ajustado à idade, para doença cardiovascular é maior para os homens com sobrepeso e obesidade (21% e 46%, respectivamente) e mulheres (20% e 64%, respectivamente), comparando com indivíduos com peso normal (WILSON, et al, 2002). Ainda,

entre os fatores de risco, estima-se que, para cada aumento de 20 mmHg, na pressão sistólica, e 10 mmHg, na pressão diastólica, há um aumento de duas vezes no risco de morte por doença isquêmica do coração, sendo esta associada a menor expectativa de vida e início mais precoce de doenças cardiovasculares (LUCERO, et al, 2014). Da mesma forma, o tabagismo é considerado um dos maiores fatores de risco para as doenças cardiovasculares, tanto em homens como em mulheres. A nicotina, o monóxido de carbono e os gases oxidantes presentes na fumaça do tabaco são os principais agentes envolvidos na agressão do endotélio vascular (RODGMAN, 2009) e a doença coronariana aumenta em razão direta com o aumento do número de cigarros fumados por dia (LUDVIG, 2005; TONSTAD et al, 2003).

Figura 1- Causas genéticas ou ambientais no desenvolvimento e progressão da aterosclerose agem diretamente ou por meio de características intermediárias conhecidas



Fonte: adaptada pelo autor com base em SAYOLS-BAIXERAS et al, 2014

Um evento coronariano agudo é a primeira manifestação da doença aterosclerótica e a identificação dos indivíduos assintomáticos, que estão mais predispostos, é importante para a prevenção efetiva, com a correta definição das metas terapêuticas (LUCERO, et al 2014). Nesse sentido, com o intuito de estimar a gravidade da doença cardiovascular, foram desenvolvidos escores de risco e algoritmos, os quais identificam o risco global de desenvolvimento da

doença, baseados em grandes estudos populacionais que identificaram os principais fatores de risco para a DAC (WILSON et al, 1998). A Sociedade Brasileira de Cardiologia, através da V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, recomenda a utilização de um escore de risco global (ERG) para avaliar o risco de DAC em 10 anos (XAVIER et al, 2013). De acordo com esse ERG, que inclui as variáveis sexo, idade, níveis de colesterol-HDL e colesterol total, pressão arterial sistólica, tabagismo e presença de diabetes mellitus, os pacientes atingem uma pontuação que corresponde ao risco da doença, diferentes para mulheres e homens, sendo, então, classificados em baixo risco, intermediário ou alto risco. (Tabelas 1 e 2).

São considerados de baixo risco aqueles com probabilidade menor que 5% de apresentarem os principais eventos cardiovasculares (DAC, acidente vascular cerebral, doença arterial obstrutiva periférica ou insuficiência cardíaca), em 10 anos. Os pacientes classificados nesta categoria e que apresentem histórico familiar de doença cardiovascular prematura são classificados em risco intermediário. Homens com risco calculado entre $\geq 5\%$ e $\leq 20\%$, e mulheres com risco calculado $\geq 5\%$ e $\leq 10\%$, são considerados de risco intermediário. Em alto risco, são considerados os indivíduos com risco calculado $>20\%$, para homens, e $>10\%$, para mulheres, no período de 10 anos. Nas tabelas 1 e 2 estão descritas as pontuações atribuídas aos fatores de risco considerados para mulheres e homens, respectivamente. As tabelas 3 e 4 apresentam a conversão da pontuação em porcentagem de risco, em mulheres e homens, respectivamente.

Tabela 1: Atribuição de pontos de acordo com o risco cardiovascular global para mulheres

Pontos	Idade (anos)	HDL-C	CT	PAS (não tratada)	PAS (tratada)	Fumo	Diabetes
-3				<120			
-2		60+					
-1		50-59			<120		
0	30-34	45-49	<160	120-129		Não	Não
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35		140-149	120-139		
3			200-239		130-139	Sim	
4	40-44		240-279	150-159			Sim
5	45-49		280+	160+	140-149		
6					150-159		
7	50-54				160+		
8	55-59						
9	60-64						
10	65-69						
11	70-74						
12	75+						
pontos							Total

Fonte: Xavier et al 2013. Abreviações: HDL: lipoproteína de alta densidade, CT: colesterol total, PAS: pressão arterial sistêmica

Tabela 2: Atribuição de pontos de acordo com o risco cardiovascular global para homens

Pontos	Idade (anos)	HDL-C	CT	PAS (não tratada)	PAS (tratada)	Fumo	Diabetes
-2		60+		<120			
-1		50-59					
0	30-34	45-49	<160	120-129	<120	Não	Não
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35	200-239	140-159	120-139		
3			240-279	160+	130-139		Sim
4			280+		140-149	Sim	
5	40-44				150-159		
6	45-49				160+		
7							
8	50-54						
9							
10	55-59						
11	60-64						
12	65-69						
13							
14	70-74						
15	75+						
pontos							Total

Fonte: Xavier et al 2013. Abreviações: HDL: lipoproteína de alta densidade, CT: colesterol total, PAS: pressão arterial sistêmica

Tabela 3: Risco cardiovascular global em 10 anos: mulheres

Pontos	Risco (%)	Pontos	Risco (%)
≤ -2	<1	13	10,0
-1	1,0	14	11,7
0	1,2	15	13,7
1	1,5	16	15,9
2	1,7	17	18,5
3	2,0	18	21,6
4	2,4	19	24,8
5	2,8	20	28,5
6	3,3	21+	>30
7	3,9		
8	4,5		
9	5,3		
10	6,3		
11	7,3		
12	8,6		

Fonte: Xavier et al, 2013.

Tabela 4: Risco cardiovascular global em 10 anos: homens

Pontos	Risco (%)	Pontos	Risco (%)
≤ -3 ou menos	<1		
-2	1,1	13	15,6
-1	1,4	14	18,4
0	1,6	15	21,6
1	1,9	16	25,3
2	2,3	17	29,4
3	2,8	18	>30
4	3,3		
5	3,9		
6	4,7		
7	5,6		
8	6,7		
9	7,9		
10	9,4		
11	11,2		
12	13,2		

Fonte: Xavier et al 2013.

Diversos estudos epidemiológicos de história familiar genética e estudos com gêmeos apontam para um componente poligênico significativo no desenvolvimento da DAC (PEDEN & FARRALL, 2011). A hereditariedade de alguns fenótipos associados com a arteriosclerose já foram determinados, sendo que, geralmente, as estimativas variam de 40% a 55% (PEDEN & FARRALL, 2011). Para eventos coronarianos fatais, estima-se uma herdabilidade de em 0,57 para homens e 0,38 para mulheres (ZDRAVKOVIC et al, 2002).

Até recentemente, a grande maioria dos estudos que investigam a influência das variantes genéticas no desenvolvimento da DAC fez uso de uma abordagem do tipo caso-controle, comparando a frequência de determinadas variantes, em genes candidatos, entre doentes e não doentes. Esses estudos

têm partido do pressuposto que genes que codificam proteínas envolvidas na fisiopatologia da doença podem estar envolvidos na susceptibilidade genética à DAC e muitos genes já foram associados com o desenvolvimento da doença. No entanto, a compreensão da arquitetura genética da DAC melhorou consideravelmente após o ano de 2007, quando o primeiro estudo de varredura genômica (GWAS, do inglês *genome wide association study*) da doença foi publicado, relacionando consistentemente o locus 9p21 com infarto do miocárdio e DAC (HELGADOTTIR et al, 2007; MCPHERSON et al, 2007). Posteriormente, esse achado foi replicado em diversos estudos. No início de 2013, uma meta-análise de vários GWAS identificou um conjunto final de cerca de 40 variantes genéticas associadas com a DAC, algumas delas relacionadas com o metabolismo lipídico, a pressão sanguínea e a inflamação, explicando cerca de 6% da herdabilidade estimada da doença (DELOUKAS et al, 2013, SAYOLS-BAIXERAS et al, 2014) (TABELA 5).

Tabela 5 - Resumo das principais conclusões da recente meta-análise do estudo de associação genômica da doença arterial coronariana, mostrando o polimorfismo de cada locus, o gene mais próximo, a localização cromossômica, frequência de alelo de risco, valor P e efeito das associações

rs	localização gene no locus	Cromossomo	alelo risco/não risco	valor P	OR
rs602633	<i>SORT1</i>	1	C/A (0.77)	1.47×10^{-25}	1.12
rs17114036	<i>PPAP2B</i>	1	A/G (0.91)	5.80×10^{-12}	1.11
rs4845625	<i>IL6R</i>	1	T/C (0.47)	3.64×10^{-10}	1.09
rs67258870	<i>WDR12</i>	2	C/T (0.11)	1.16×10^{-15}	1.12
rs515135	<i>APOB</i>	2	G/A (0.83)	2.56×10^{-10}	1.03
rs2252641	<i>ZEB2-ACO74093</i>	2	G/A (0.46)	5.30×10^{-8}	1.06
rs1561198	<i>VAMP5-VAMP8-GGCX</i>	2	A/G (0.45)	1.22×10^{-10}	1.07
rs6544713	<i>ABCG5-ABCG8</i>	2	T/C (0.30)	2.12×10^{-9}	0.96
rs9818870	<i>MRAS</i>	3	T/C (0.14)	2.62×10^{-9}	1.07
rs7692387	<i>GUCY1A3</i>	4	G/A (0.81)	2.65×10^{-11}	1.13
rs1878406	<i>EDNRA</i>	4	T/C (0.15)	2.54×10^{-8}	1.09
rs273909	<i>SLC22A4-SLC22A5</i>	5	C/T (0.14)	9.62×10^{-10}	1.11
rs12190287	<i>TCF21</i>	6	C/G (0.59)	4.94×10^{-13}	1.07
rs2048327	<i>SLC22A3-LPAL2-LPA</i>	6	G/A (0.35)	6.86×10^{-11}	1.06
rs9369640	<i>PHACTR1</i>	6	A/C (0.65)	7.53×10^{-22}	1.09
rs10947789	<i>KCKN5</i>	6	T/C (0.76)	9.81×10^{-9}	1.01
rs4252120	<i>PLG</i>	6	T/C (0.73)	4.88×10^{10}	1.07
rs11556924	<i>ZC3HC1</i>	7	C/T (0.65)	6.74×10^{-17}	1.09
rs2023938	<i>HDAC9</i>	7	G/A (0.10)	4.94×10^{-8}	1.13
rs264	<i>LPL</i>	8	G/A (0.86)	2.88×10^{-9}	1.06
rs2954029	<i>TRIB1</i>	8	A/T (0.55)	4.75×10^{-9}	1.05
rs1333049	<i>CDKN2BAS1</i>	9	C/G (0.47)	1.39×10^{-52}	1.23
rs3217992		9	A/G (0.38)	7.75×10^{-57}	1.16
rs579459	<i>ABO</i>	9	C/T (0.21)	2.66×10^{-8}	1.07
rs12413409	<i>CYP17A1-CNNM2-NT5C2</i>	10	G/A (0.89)	6.26×10^{-8}	1.10
rs2505083	<i>KIAA1462</i>	10	C/T (0.42)	1.35×10^{-11}	1.06
rs501120	<i>CXCL12</i>	10	A/G (0.83)	1.79×10^{-9}	1.07
rs2047009		10	C/A (0.48)	1.59×10^{-9}	1.05
rs974819	<i>PDGFD</i>	11	A/G (0.29)	3.55×10^{-11}	1.07
rs3184504	<i>SH2B3</i>	12	T/C (0.40)	5.44×10^{-11}	1.07
rs4773144	<i>COL4A1-COL4A2</i>	13	G/A (0.42)	1.43×10^{-11}	1.07
rs9515203		13	T/C (0.74)	5.85×10^{-12}	1.08
rs9319428	<i>FLT1</i>	13	A/G (0.32)	7.32×10^{-11}	1.10
rs2895811	<i>HHIPL1</i>	14	C/T (0.43)	4.08×10^{-10}	1.06
rs7173743	<i>ADAMTS7</i>	15	T/C (0.58)	6.74×10^{-13}	1.07
rs17514846	<i>FURIN-FES</i>	15	A/C (0.44)	9.33×10^{-11}	1.04
rs12936587	<i>RAI1-PEMT-RASD1</i>	17	G/A (0.59)	1.24×10^{-9}	1.06
rs2281727	<i>SMG6</i>	17	C/T (0.36)	7.83×10^{-9}	1.05
rs1122608	<i>LDLR</i>	19	G/T (0.76)	6.33×10^{-14}	1.10
rs9982601	Gene desert (<i>KCNE2</i>)	21	T/C (0.13)	7.67×10^{-17}	1.13

Fonte: adaptado pela autora com base em SAYOLS-BAIXERAS et al, 2014:

2.2 Óxido Nítrico, Enzima Óxido Nítrico Sintase e Doenças Cardiovasculares

Até meados da década de 1980, o ON foi considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos. O interesse pelas funções biológicas do ON foi conseqüente ao desfecho simultâneo de três linhas de pesquisa, absolutamente independentes. Furchgott e Zawadzki, em 1980, investigaram o papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Uma segunda linha de pesquisa tratava da questão da produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos. Em 1994, os pesquisadores Schmidt e Walter relataram que os mamíferos produzem óxidos de nitrogênio, quando se demonstrou que a quantidade eliminada destes compostos excedia a quantidade ingerida. Já a terceira linha estava associada à investigação do mecanismo de ação de neurotransmissores. Assim, foi confirmada a produção de ON pelo sistema nervoso (BREDT; SNYDER, 1989) e demonstrou-se que o glutamato é o mediador da liberação de ON por receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) estimulados (GARTHWAITE, 1989). No entanto, foram os resultados dos estudos de Furchgott e Zawadzki que abriram caminho para a compreensão da função endotelial, revolucionando a fisiologia cardiovascular.

O ON é sintetizado a partir da L-arginina, por pelo menos três isoformas de ON sintase (NOS): induzível (iNOS), neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) (FATINI et al, 2004). Estruturalmente, a eNOS consiste em domínios oxigenase (arginina e tetrahydrobiopterina) e redutase (flavina mononucleotídeo, flavina adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), interpostos por um domínio de ligação cálcio/calmodulina. A produção de ON pela eNOS ocorre por dois tipos de mecanismos, dependentes ou independentes de cálcio. Em condições basais, a eNOS encontra-se ligada a caveolinas em cavéolas de células endoteliais e, enquanto está ligada à elas, está inativa (MOUNT et al, 2007). Um grande número de evidências revelou que as cavéolas são capazes de recrutar numerosas moléculas de sinalização e regular suas atividades, em vez de servirem como simples suporte para a troca e o transporte celulares. Assim, foi descrito que a eNOS localiza-se dentro da cavéola, e é mantida em um estado menos ativo via sua interação

com a caveolina (BUCCI, et al, 2000). Estímulos mecânicos, neurais e humorais podem aumentar a concentração intracelular de cálcio, que se liga à calmodulina, ativando a eNOS. Além disso, a fosforilação de sítios serina e treonina na eNOS, assim como a interação entre a proteína de choque térmico 90 (HSP90), também podem ativar a produção de ON (BUCCI, et al, 2000).

O endotélio vascular é um sistema complexo, integrado por diversos mediadores químicos, entre eles o ON, que se destaca por ser um potente vasodilatador (HIGASHI et al, 2009). É um órgão ativo e sua integridade favorece efeitos benéficos, como ação antioxidante, anti-inflamatória, anticoagulante, pro-fibrinolítica, inibitória da adesão e migração de leucócitos, inibitória da proliferação e migração das células musculares lisas, inibitória da agregação e adesão plaquetária. Assim, cria-se um cenário ateroprotetor, caracterizado por uma harmonia entre substâncias liberadas pelo endotélio, no qual o ON é citado como um dos compostos vasoativos de maior relevância (FORSTERMANN, 2006). Muitos fatores de risco para a DAC estão relacionados à disfunção endotelial, como dislipidemias, aterosclerose, causando mudanças prejudiciais à biologia vascular, incluindo a diminuição da biodisponibilidade do ON, podendo levar a uma capacidade vasodilatadora prejudicada (ANTONIADES et al, 2003; HERMAN, LERMAN, 2001).

2.3 Gene da enzima óxido nítrico sintase (eNOS)

A produção enzimática do ON é mediada por uma família de três NOS, codificadas por genes distintos. O gene da sintase endotelial (eNOS) está localizado no cromossomo 7 (Gen Bank D26607), mais especificamente no longo braço do cromossomo, na região 7q35-36, apresentando este um comprimento genômico de 4.4kb, compreendendo 25 íntrons e 26 éxons, sintetizando um RNAm de 4052 nucleotídeos (GOVERS, 2001).

A atividade da eNOS é bem conhecida no ambiente vascular e é regulada por mecanismos após sua tradução: inclusão de lipídios, mecanismo cálcio-calmodulina dependente, interações diretas proteína-proteína, diferentes fosforilações sítio dirigidas, glicosilação e disponibilidade de substratos e

cofatores, podendo interagir com várias proteínas em seus estados “menos ativos” ou “mais “ativos” (BOO et al, 2006).

A presença de polimorfismos no gene *eNOS* pode explicar os diferentes níveis de atividade enzimática, que podem ser associados com o aumento do risco cardiovascular. O polimorfismo T786C (rs2070744), localizado na região promotora do gene, é o mais extensivamente estudado, no qual a presença do alelo C estaria associada com a diminuição em cerca de 50% a atividade transcricional, provavelmente devido à ligação da proteína repressora RPA1 à região promotora quando esse alelo está presente (FATINI et al, 2004). Outro polimorfismo, G894T (rs1799983), presente no éxon 7 do gene, resulta na substituição de um aminoácido glutamato por um aspartato, no códon 298 (Glu298Asp), o que parece provocar uma alteração da estrutura da enzima e, conseqüentemente, da localização da *eNOS* nas cavéolas das células endoteliais, reduzindo assim sua resposta. (ZAGO et al, 2013). Alguns estudos têm sugerido uma associação desse polimorfismo com a DAC, com o espasmo coronariano induzido por acetilcolina e com a hipertensão arterial (ZAGO et al, 2013). As pesquisas que demonstraram associação da variante G894T com fenótipos cardiovasculares apontam para uma possível redução da biodisponibilidade do ON, sugerindo que a *eNOS* transcrita do alelo mutante apresenta atividade enzimática alterada.

A correlação entre genótipo e fenótipo clínico varia quantitativa e qualitativamente, e a inconsistente associação entre os polimorfismos do *eNOS* e vários fenótipos clínicos é um fenômeno frequentemente observado em outros genes associados a fenótipos. Essa inconsistência tem sido atribuída a fatores ambientais, alelos independentes, interação entre genes e variabilidades em fenótipos clínicos. A importância dos fatores ambientais na gênese de doenças reflete-se nas diferenças de morbidade e mortalidade entre grupos geneticamente homogêneos, porém com estilos de vida diferentes. Uma variação genética pode não ser relevante a uma determinada população, refletindo diferenças na frequência da distribuição dos alelos. Um exemplo disso é a frequência do alelo 894T, que é significativamente maior em populações brancas, quando comparado à população japonesa. A inconsistente associação entre o polimorfismo do gene *eNOS* e as alterações vasculares ainda tem sido atribuída à variação na distribuição da *eNOS* em

diferentes órgãos. Artérias de órgãos específicos são sujeitas a diferentes pressões hemodinâmicas, determinando a resposta da parede do vaso e o consequente grau de disfunção endotelial (SOUZA et al, 2012).

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Amostra

A amostra foi composta por 645 pacientes atendidos no Serviço de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born de Lajeado (HBB), RS. Os critérios de inclusão nesse estudo foram: a) brasileiros euro-derivados; b) maiores de 18 anos; c) submetidos ao exame de cateterismo cardíaco. Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) e preencheram um questionário semiestruturado (Anexo B), 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. Foram excluídos pacientes que estavam inconscientes, ou que não estavam em condições adequadas para responderem ao questionário ou assinarem o TCLE. Durante a realização do exame de cateterismo, foram coletadas amostras de sangue periférico, para posteriores análises laboratoriais, e aferidos os níveis de pressão arterial sanguínea.

Todos os pacientes foram classificados no ERG de DAC, proposto pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013). O ERG leva em consideração as variáveis: sexo, idade, níveis de colesterol total, colesterol HDL, níveis de pressão arterial sistêmica, quando tratada e não tratada, e a presença de tabagismo e diabetes mellitus. De acordo com a pontuação obtida no ERG, os pacientes foram classificados em baixo risco, risco intermediário ou alto risco para a DAC.

3.2 Análises laboratoriais

Os níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, glicose, CK (creatinoquinase), CK-MB (creatinoquinase fração MB), TGO (transaminase glutâmico oxalacética), TGP (transaminase glutâmico pirúvica), ureia, creatinina e PCR ultrasensível (proteína C-Reativa) 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 extração de DNA foi realizada através de uma adaptação do método de Lahiri e Nurnberger (1991) e os polimorfismos rs2070744 e rs1799983 foram genotipados através do sistema de discriminação alélica taqman® (Applied Biosystems, StepOne Real Time PCR System), no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES.

3.3 Análises estatísticas

As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado com base nessas frequências pelo teste do qui-quadrado. A influência dos polimorfismos em variáveis clínicas contínuas, com distribuição normal, foi avaliada através de modelos lineares univariados e, em variáveis sem distribuição normal, pelo método não paramétrico correspondente (Kruskal-Wallis). A associação dos genótipos com as variáveis categóricas foi investigada pelo teste do qui-quadrado ou por regressão logística binária.

4. RESULTADOS

A amostra foi composta por 645 pacientes submetidos ao exame de cateterismo cardíaco, com idade média de 62,8 anos, sendo composta por 57,8% de homens. A classificação no ERG, proposto pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, foi realizada para 640 pacientes. Destes, 435 (68%) foram classificados em alto risco, 166 em risco intermediário (26%) e 39 (6%) em baixo risco para a DAC.

As frequências alélicas dos polimorfismos investigados no gene *eNOS* foram 0,69 (G) e 0,31 (T) para a variante rs1799983 e 0,59 (T) e 0,41 (C) para o rs2070744. As frequências genotípicas, em ambos os polimorfismos, não mostraram um desvio significativo dos valores esperados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas e genotípicas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados

Genótipo		n (%)	Valor-P*
<i>eNOS</i> rs1799983	GG	314 (48,7)	0,301
	GT	264 (40,9)	
	TT	67 (10,4)	
	Alelo G	892 (69,1)	
	Alelo T	398 (30,9)	
<i>eNOS</i> rs2070744	TT	223 (34,6)	0,597
	TC	318 (49,3)	
	CC	104 (16,1)	
	Alelo T	764 (59,2)	
	Alelo C	526 (40,8)	

*Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As características clínicas e sócio demográficas da amostra, categorizadas de acordo com os genótipos *eNOS*, são mostradas na Tabela 7. Não foram detectados efeitos genéticos significativos dos polimorfismos investigados (rs1799983 e rs2070744) nas variáveis clínicas (Tabela 7).

Tabela 7 – Características clínicas e sócio demográficos da amostra de acordo com os genótipos

	eNOS rs179983				Valor-P	eNOS rs2070744			Valor-P
	Todos (n = 645)	GG (n = 314)	GT (n = 264)	TT (n = 67)		TT (n = 223)	TC (n = 318)	CC (n = 104)	
Idade (anos)	62,8 (11,0)	63,1 (11,7)	62,2 (10,2)	63,6 (10,0)	0,505	61,7 (12,4)	63,3 (10,2)	63,5 (9,7)	0,162
Escolaridade (anos)*	5,0 (4,0)	5,0 (4,0)	5,0 (4,0)	5,0 (4,0)	0,658	5,0 (4,0)	5,0 (4,0)	5,0 (4,0)	0,851
Gênero (homens)	373 (57,8)	183 (58,3)	152 (57,6)	38 (56,7)	0,965	130 (58,3)	185 (58,2)	58 (55,8)	0,901
Tabagismo									
Tabagista atual	87 (13,5)	47 (15,0)	37 (14,0)	3 (4,5)	0,068	32 (14,3)	44 (13,8)	11 (10,5)	0,635
Ex-tabagista	255 (39,5)	119 (37,9)	106 (40,2)	30 (44,8)	0,560	83 (37,2)	133 (41,8)	39 (37,5)	0,502
Uso de álcool	198 (30,7)	92 (29,3)	81 (30,7)	25 (37,3)	0,437	59 (26,5)	106 (33,3)	33 (31,7)	0,221
Exercício físico	250 (38,8)	132 (42,0)	100 (37,9)	18 (26,9)	0,065	85 (38,1)	125 (39,3)	40 (38,5)	0,957
Parâmetros antropométricos									
Peso (kg)	77,9 (15,8)	77,4 (15,2)	77,8 (16,0)	80,4 (18,0)	0,364	76,8 (15,5)	78,9 (15,9)	77,2 (16,3)	0,285
IMC (kg/m ²)	27,8 (4,9)	27,6 (4,7)	27,8 (4,7)	28,3 (6,4)	0,632	27,4 (4,5)	28,1 (4,9)	27,8 (5,7)	0,263
Cintura (mm)	102,1 (13,7)	102,8 (15,5)	101,5 (12,0)	101,7 (12,7)	0,760	102,1 (16,7)	102,7 (12,5)	100,3 (10,7)	0,557
Pressão arterial									
Sistólica (mmHg)	142,4 (24,3)	142,9 (25,6)	141,4 (22,8)	143,9(24,2)	0,521	140,2 (24,8)	144,3 (24,7)	141,1 (21,7)	0,097
Diastólica (mmHg)	77,4 (10,3)	77,3 (10,9)	77,5 (9,6)	77,1 (10,3)	0,979	76,7 (11,0)	78,1 (10,1)	76,7 (9,1)	0,404
História clínica									
História de DAC	470 (72,9)	222 (70,7)	204 (77,3)	44 (65,7)	0,085	157 (70,4)	235 (73,9)	78 (75,0)	0,547
Medicação para DAC	77 (11,9)	30 (9,6)	39 (14,8)	8 (11,9)	0,162	25 (11,2)	38 (11,9)	14 (13,5)	0,844
Diabetes	145 (22,5)	71 (22,6)	59 (22,3)	15 (22,4)	1,000	47 (21,1)	78 (24,5)	20 (19,2)	0,422
Medicação para diabetes	94 (14,6)	48 (15,3)	37 (14,0)	9 (13,4)	0,884	34 (15,2)	49 (15,4)	11 (10,6)	0,462
Dislipidemia	70 (10,9)	39 (12,4)	27 (10,2)	4 (5,9)	0,285	32 (14,3)	30 (9,4)	8 (7,7)	0,107
Medicação para dislipidemia	282 (43,7)	140 (44,6)	113 (42,8)	29 (43,3)	0,913	93 (41,7)	151 (47,5)	38 (36,5)	0,111
Hipertensão	401 (62,2)	198 (63,1)	159 (60,2)	44 (65,7)	0,651	128 (57,4)	208 (65,4)	65 (62,5)	0,169
Medicação para hipertensão	467 (72,4)	226 (72,0)	189 (71,6)	52 (77,6)	0,614	157 (70,4)	228 (71,7)	82 (78,8)	0,260

Os dados estão expressos como média e (desvio padrão) ou n e (%). *Mediana e (amplitude interquartil). Abreviações: IMC, índice de massa corporal; DAC, doença arterial coronariana.

Em relação às características laboratoriais, marcadores de função, lesão e inflamação (ureia, creatinina, AST, ALT, CK total, CKMB, proteína C reativa), descritas na Tabela 8, não evidenciamos diferenças significativas entre os genótipos, em ambos os polimorfismos (*eNOS* rs1799983 e rs2070744). Da mesma forma, não foram detectadas associações significativas com os parâmetros bioquímicos de glicemia, colesterol total e triglicerídeos (Tabela 8).

Foram detectados efeitos genéticos do rs2070744 nos valores de colesterol HDL ($p=0,002$) e na pontuação do ERG ($p=0,032$) (Tabela 8). As análises *post-hoc* revelaram que os valores de HDL foram significativamente mais elevados em indivíduos homozigotos TT, quando comparados aos indivíduos heterozigotos TC ($P=0,003$) e aos indivíduos homozigotos CC ($P=0,022$) (Figura 2A). Em relação ao efeito do rs2070744 na pontuação no ERG, nossos resultados evidenciaram que homozigotos TT possuem uma pontuação menor do que os heterozigotos TC ($P=0,027$) (Figura 2B). Quando considerados em um modelo dominante (TT *versus* TC+ CC), os mesmos efeitos foram observados para o colesterol HDL (Figura 3A) e para o ERG (Figura3B).

Tabela 8 – Características laboratoriais e pontuação no Escore de Risco Global de acordo com os genótipos

	Todos (n = 645)	eNOS rs1799983			Valor- P	eNOS rs2070744			Valor- P
		GG (n = 314)	GT (n = 264)	TT (n = 67)		TT (n = 223)	TC (n = 318)	CC (n = 104)	
Parâmetros bioquímicos									
Glicemia (mg/dl)	99,0 (24,8)	98,0 (23,0)	100,0 (27,0)	100,0 (24,0)	0,308	98,0 (23,0)	100,0 (25,0)	96,0 (23,0)	0,056
Colesterol total (mg/dl)	162,4 (47,2)	161,4 (50,1)	164,6 (44,3)	158,6 (44,3)	0,569	165,9 (51,5)	161,8 (44,6)	156,7 (45,0)	0,247
Colesterol HDL (mg/dl)	40 (17,1)	40,9 (19,0)	40,0 (17,0)	42,0 (16,3)	0,699	43,5 (19,0)	39,0 (18,0)	39,0 (14,0)	0,001
Triglicérides (mg/dl)	100,5 (75,0)	98,0 (68,0)	103,0 (77,0)	103,0 (84,0)	0,230	100,0 (79,3)	103,0 (72,0)	98,0 (78,0)	0,590
Marcadores de função, lesão e inflamação									
Ureia (mg/dl)	41,8 (19,2)	41,6 (19,4)	41,7 (18,4)	43,4 (19,3)	0,969	40,7 (17,6)	43,0 (18,7)	41,8 (20,1)	0,114
Creatinina (mg/dl)	0,9 (0,25)	0,9 (0,24)	0,9 (0,25)	0,9 (0,30)	0,577	0,9 (0,25)	0,9 (0,24)	0,9 (0,26)	0,113
AST (U/L)	16,0 (11,0)	16,0 (11,0)	16,0 (11,0)	18,0 (15,0)	0,594	17,0 (10,0)	16,0 (13,0)	17,0 (13,0)	0,890
ALT (U/L)	9,0 (7,0)	9,0 (8,0)	8,0 (6,8)	9,0 (10,0)	0,368	9,0 (8,0)	9,0 (6,0)	8,0 (8,0)	0,637
CK total (U/L)	79,7 (71,5)	82,2 (74,2)	75,4 (63,9)	85,3 (93,8)	0,315	80,4 (71,9)	78,6 (70,8)	81,3 (72,6)	0,890
CKMB (U/L)*	15,6 (11,6)	15,9 (11,8)	15,2 (10,2)	19,3 (20,0)	0,186	17,9 (11,5)	14,8 (9,8)	18,9 (17,0)	0,071
Proteína C reativa (mg/dl)*	0,8 (2,9)	0,9 (3,3)	1,0 (2,3)	0,5 (2,3)	0,351	0,9 (3,3)	1,0 (2,8)	0,6 (1,9)	0,605
Escore de Risco Global**	16,0 (6,0)	16,0 (7,0)	16,0 (6,0)	16,0 (4,0)	0,886	16,0 (7,3)	17,0 (6,0)	16,0 (6,0)	0,031

*Tamanho amostral menor (n = 240). ** Tamanho amostral (n=640).

Os dados estão expressos como mediana e (amplitude interquartil), exceto para colesterol total que está expresso como média e (desvio padrão).
Abreviações: ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, CK: creatinoquinase, CKMB: creatinoquinase fração MB

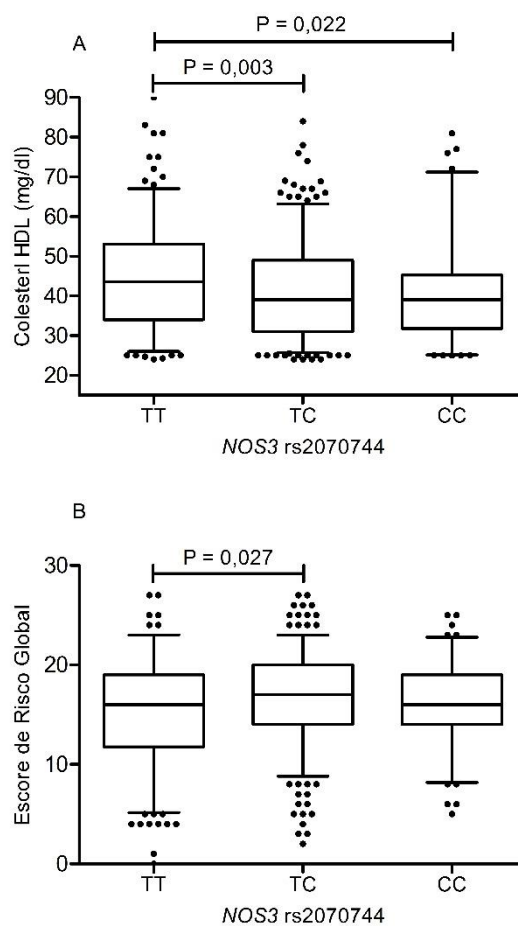


Figura 2 – Comparações *post-hoc* (valor-P corrigido por Bonferroni) dos efeitos do rs2070744 no gene *eNOS* sobre o HDL e o Escore de Risco Global.

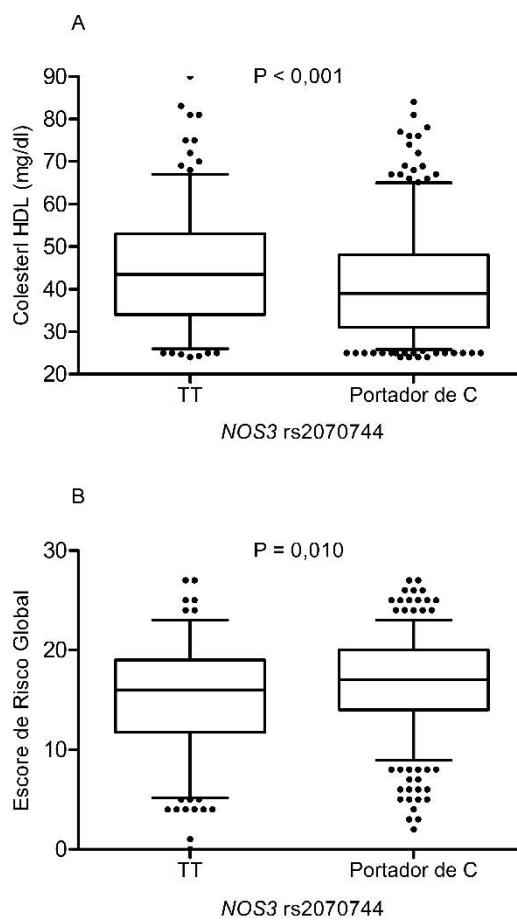


Figura 3 – Efeitos do rs2070744 no gene *eNOS* sobre o HDL e o Escore de Risco Global a partir de um modelo dominante.

A análise da influência dos polimorfismos no gene *eNOS* sobre o risco cardiovascular (baixo + intermediário *versus* alto) está descrita na Tabela 9. Com relação ao polimorfismo rs1799983, não foi observado efeito significativo. Para a variante rs2070744, foi detectado um aumento do risco no ERG em indivíduos heterozigotos TC, quando comparados aos indivíduos TT ($p=0,028$) (Tabela 9). Da mesma forma, no modelo dominante, os indivíduos portadores do alelo C apresentaram um aumento do risco no ERG ($P=0,014$) (Tabela 10).

Tabela 9 – Influência dos polimorfismos no gene *eNOS* sobre o risco cardiovascular (baixo + intermediário *versus* alto)

	B	EP	Wald	Df	OR (CI 95%)	Valor-P
<i>eNOS</i> rs1799983			0,163	2		0,921
GG (referência)					1	
GT	-0,002	0,179	0,0001	1	0,998 (0,702-1,419)	0,992
TT	0,113	0,293	0,149	1	1,120 (0,630-1,988)	0,699
<i>eNOS</i> rs2070744			6,219	2		0,044
TT (referência)					1	
TC	0,408	0,186	4,838	1	1,504 (1,045-2,163)	0,027
CC	0,508	0,261	3,788	1	1,662 (0,996-2,772)	0,051

Baixo + intermediário (n = 205); Alto (n = 435).

EP = erro padrão.

df = graus de liberdade.

Tabela 10 – Influência do rs2070744 no gene *eNOS* sobre o risco cardiovascular (baixo + intermediário *versus* alto – modelo dominante)

	B	EP	Wald	Df	OR (CI 95%)	Valor-P
<i>eNOS</i> rs2070744						
TT (referência)					1	
Portador de C	0,432	0,175	6,076	1	1,541 (1,093-2,173)	0,013

Baixo + intermediário (n = 205); Alto (n = 435).

EP = erro padrão

df = graus de liberdade.

5. DISCUSSÃO

Na tentativa de contribuir para o conhecimento de alguns mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, este trabalho teve como objetivo verificar a associação dos polimorfismos do gene *eNOS* (rs2070744 e rs1799983) com a DAC, bem como a influência destes nos níveis de colesterol, triglicerídeos, glicose e pressão arterial, em uma amostra de 645 pacientes submetidos a um exame de cateterismo cardíaco. O grupo foi composto, em sua maioria, por homens, com idade média de 62,8. Na descrição geral da amostra pode-se observar, ao menos em parte dos pacientes, a presença de alguns fatores de risco clássicos para o desenvolvimento da DAC, como a idade mais avançada, a presença de hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo e obesidade. De fato, ao classificar a amostra em um escore de risco para a doença, proposto pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, 68% dos pacientes foram classificados em alto risco para a DAC, enquanto que apenas 6% encontram-se na categoria de baixo risco. Ao incluir as variáveis genéticas, objetivo principal deste estudo, detectou-se um aumento do risco de DAC em portadores do alelo C do polimorfismo rs2070744, evidenciado pelo efeito nos valores de colesterol HDL e na pontuação do ERG. Para a variante rs1799983 não foi detectado nenhum efeito significativo. O alelo C da variante rs2070744 é caracterizado funcionalmente por um efeito na redução da atividade promotora do gene *eNOS*, possivelmente com consequente influência sobre a produção de ON (NAKAYMA et al 1999), e diversas evidências sugerem que alterações na via do ON podem estar envolvidas na disfunção endotelial e na aterosclerose (COOKE, 1996; OEMAR et al, 1998). O óxido nítrico relaxa o músculo liso vascular, inibe a ativação das plaquetas e modula a migração e o crescimento de células musculares lisas (LOCALZO et al, 1995).

Nossos resultados demonstraram que pacientes portadores do alelo C (rs2070744) apresentaram níveis diminuídos de colesterol HDL, quando comparados aos homozigotos TT. Sabe-se da existência de uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de colesterol HDL e o risco de doença coronariana e, nesse contexto, o HDL modula a atividade da enzima *eNOS*, como já foi demonstrado em estudos *in vitro* com células humanas endoteliais (BESLER et al, 2011) e também em estudos

in vivo, utilizando modelos animais, e em seres humanos, após aplicação intravenosa de HDL (BESLER et al, 2011). Os mecanismos responsáveis pela preservação da função endotelial mediados pelo HDL estão relacionados com a capacidades deste último em inativar os efeitos nocivos do colesterol LDL oxidado, preservando a localização e atividade da eNOS nas cavéolas (localização subcelular funcional) e, assim, regulando a produção do óxido nítrico (GUTIÉRREZ et al, 2013). O colesterol LDL oxidado induz o deslocamento da eNOS das cavéolas e inibe a produção de ON. O HDL, por sua vez, promove a produção do ON através de sua atuação na regulação e distribuição subcelular da eNOS e do ambiente lipídico dentro das cavéolas, prevenindo que o LDL desaloque a eNOS através da Apo A-1 (GUTIÉRREZ et al, 2013; TERASAKA et al, 2010).

Embora não estejam elucidados os mecanismos biológicos pelos quais a disfunção endotelial na produção de ON possa influenciar os níveis de colesterol, outros autores também já relataram associações de polimorfismos no gene *eNOS* com alterações do perfil lipídico (IMAMURA et al, 2008) e sabe-se que o colesterol plasmático está sob intensa regulação genética. Estudos têm documentado que 80% do colesterol é sintetizado endogenamente e os níveis plasmáticos de LDL-C, HDL-C, triglicerídeos e colesterol total apresentam medidas de herdabilidade estimadas entre 60% a 80% (COHEN et al, 2004; ROBERTS, 2008). Estudos de GWAS já identificaram mais de 50 variantes associadas com os níveis de colesterol (TESLOVICH et al, 2010; WILLER et al, 2013), sendo, portanto, possível que algumas destas variantes possam estar interagindo com polimorfismos no gene da *eNOS* e, desta forma, influenciando os níveis séricos de colesterol. Estudos futuros, avaliando essas possibilidades, podem ajudar a esclarecer nossos achados.

Inúmeros estudos, em todo o mundo, relacionam a doença arterial coronariana com polimorfismos do gene da *eNOS*. Em nosso estudo, demonstramos que homozigotos TT (rs2070744) possuem uma pontuação menor do que os heterozigotos TC no ERG. Além disso, também demonstramos que portadores do alelo C apresentaram um aumento do risco de DAC, ao considerar a classificação categórica (baixo risco + intermediário *versus* alto risco). Esses resultados estão de acordo com o observado em outros estudos. Fatini e colaboradores (2008), em um estudo com 477 pacientes e 537 controles, demonstraram que indivíduos homozigotos para o alelo C apresentaram um aumento do risco para a doença. Rossi e colaboradores (2003), em um estudo realizado com 1106 pacientes, também

demonstraram que indivíduos portadores do alelo C tiveram um risco aumentado (62,9%) de desenvolver DAC, sendo este significativamente associado como fator de risco independente. Um estudo de meta-análise recente, realizado por Liu e colaboradores em 2014, confirmaram os achados de associação entre o alelo C do polimorfismo rs2070744 e o risco de DAC, para populações caucasoides e asiáticas.

Polimorfismos no gene *eNOS* também têm sido relacionados com outras doenças e fatores de risco associados com as doenças cardiovasculares, sugerindo um papel importante desse sistema no desenvolvimento da DAC. Alkharfy e colaboradores (2012) avaliaram 886 indivíduos da Arábia Saudita (477 com síndrome metabólica e 409 indivíduos saudáveis) e evidenciaram uma associação entre a síndrome metabólica e o polimorfismo rs2070744, sugerindo um efeito do alelo C. Na avaliação dos parâmetros metabólicos, portadores do alelo C (TC + CC) apresentaram níveis mais elevados de glicose ($p= 0,014$) e menor concentração de HDL ($p= 0,038$). A síndrome metabólica (dislipidemia, hiperglicemia, hipertensão e obesidade) aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Além disso, a disfunção endotelial é um componente que pode resultar em redução da biodisponibilidade do óxido nítrico vascular (DEANFIELD et al, 2007; WIDLANSKY et al, 2003) e outros estudos também relacionam o polimorfismo rs2070744 com a síndrome e a redução dos níveis de HDL (KANG et al, 2014; ALKHARFY et al, 2014).

Na população brasileira, um estudo realizado no Rio Grande do Sul, por Piccoli e colaboradores (2012) com 135 pacientes com Síndrome coronariana aguda e 115 controles mostrou que polimorfismos no gene *eNOS* não foram fatores de risco independentes para a Síndrome Coronariana Aguda. Em outro estudo, Sampaio e colaboradores (2006), com 128 pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio e 121 controles, demonstraram que o alelo T, da variante rs2070744, esteve associado com a doença e a hipertensão. Rios e colaboradores (2005) investigaram a variante rs2070744 em 358 pacientes com DAC e 129 controles e concluíram que portadores de um haplótipo, que incluía o alelo C do rs2070744, têm um risco maior para DAC. Em 2007, Rios e colaboradores estudaram a relação desta variante e sua interação com o tabagismo e a DAC, em 715 brasileiros (447 caucasianos e 268 afro-brasileiros), evidenciando que pacientes portadores do alelo C apresentam um risco aumentado de DAC, independentemente do tabagismo.

Em nosso estudo, a variante rs1799983 não foi associada à Doença Arterial Coronariana, em desacordo com dados de um estudo com população brasileira em que indivíduos sem diabetes, mas com genótipo 894TT, demonstraram maior risco para síndrome Coronariana Aguda, porém não considerados como fator de risco independente (PICCOLI et al, 2007). Em outros estudos, o rs1799983 (GT+TT) foi associado com a hipertensão (ALKHARFY et al, 2012) e com colesterol total, triglicérides e LDL numa população chinesa (GT+TT) (HSIEH et al, 2008); e à dislipidemia em brasileiros com síndrome metabólica (PICCOLI et al, 2008).

Por fim, algumas limitações deste estudo devem ser consideradas. Primeiramente, a ausência da avaliação dos níveis de óxido nítrico, os quais poderiam ser incluídos nas análises clínicas e genéticas. Outra questão refere-se à composição da amostra, que se limitou a análise de indivíduos doentes, sem ser possível um estudo caso-controle com indivíduos saudáveis. O número amostral, embora não seja tão pequeno, ainda é um fator limitante relevante. Diante do exposto, fica clara a necessidade de mais estudos, especialmente com abordagens de interação gene-gene e gene-ambiente, para um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DAC e os possíveis efeitos das variantes do gene *eNOS* na doença.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o polimorfismo rs2070744 no gene *eNOS* está associado com um risco aumentado de DAC e com os níveis de colesterol- HDL na nossa amostra. Esses dados confirmaram estudos prévios que sugerem o envolvimento de polimorfismos no gene *eNOS* nas doenças cardiovasculares e fenótipos associados.

REFERÊNCIAS

ALKHARFY K; AL-DAGHRI NM; AL-ATTAS O; ALOKAIL MS; MOHAMMED AK; VINODSON B et al. Variants of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with components of metabolic syndrome in an Arab population. **Endocrine Journal** 2012, 59 (3), 253-263.

ANTONIADES C, TOUSOULIS D, TENTOLOURIS C, TOUTOUZAS P, STEFANADIS C. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. **Herz**. 2003; 28: 628-38.

APOSTOLAKIS S, VOGIATZI K, AMANATIDOU V, PANDIDOD D A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 84: 353-360, 2009

BESLER Christian; HEINRICH, Kathrin; ROHRER, Lucia; DOERRIES, Carola; RIWANTO, Meliana; SHIH, Diana M. et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating path ways in patients with coronary artery disease. **The Journal of Clinical Investigation**, Volume 121 Number 7, 2693–708.

BOO YC, KIM HJ, SONG H, FULTON D, SESSA W. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. **Free Radic Biol Med**. 2006; 41 (1): 144-53.

BRETT D. S; SNYDER S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 9030-9033, 1989

BUCCI M, GRATTON JP, RUDIC RD, ACEVEDO L, ROVIEZZO F, CIRINO G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. **Nat Med**. 2000; 6: 1362-7.

COHEN JC, KISS RS, PERTSEMLIDIS A, MARCEL YL, MCPHERSON R, HOBBS HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. **Science** 2004;305:869

COOKE JP. Role of nitric oxide in progression and regression of atherosclerosis. **West J Med** 1996;164:419–24

DANDONA S, STEWART AF, ROBERTS R. Genomics in coronary artery disease: past, present and future. **Can J Cardiol** 2010;26(Suppl. A):56A–59AA

DEANFIELD JE, HALCOX JP, RABELINK TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, 2007, 115: 1285-1295.

DELOUKAS P, KANONI S, WILLENBORG C, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. **Nat Genet**. 2013;45:25–33.

FATINI C; SOFI F; STICCHI E; GENSINI F; GORI AM, FEDI S et al. Genetics Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. **American Heart Journal**, 2004, 147, 3.

FORSTERMANN U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. **Biol Chem**. 2006; 387 (12): 1521-33.

FURCHGOTT RF; ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 1980, 288: 373-376.

GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 172, p. 413-416, 1989

GLEISSNER CA; LEITINGER N; LEY K. Effects of Native and Modified Low-Density Lipoproteins on Monocyte Recruitment in Atherosclerosis. **Hypertension**. 2007; 50: 276-283.

GOVERS R, RABELINK TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2001; 280: F193-206.

GUTIÉRREZ YP; GUTIÉRREZ AP; LEÓN AR; ÁLVAREZ CL. Las lipoproteínas de alta densidade: protectoras vasculares contra la aterosclerosis. **Cor Salud** 2013, 5(4):366-378.

HANSSON, Goran; LIBBY, Peter; SCHÖNBECK , Uwe; YAN, Zhong-Qun. Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circulation**, American Heart Association, 2002, 91:281-291

HELGADOTTIR A, THORLEIFSSON G, MANOLESCU A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. **Science**. 2007;316:1491–1493.45.

HERMANN J, LERMAN A. The endothelium: dysfunction and beyond. **J Nucl Cardiol**. 2001; 8: 197-206.

HIGASHI Y; NOMA K; YOSHIZUMI M; KIHARA Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circ J**. 2009; 73(3):411-8.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional em Saúde - Percepção do Estado de Saúde, Estilos de Vida e Doenças Crônicas – Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, RJ, 2014.

IMAMURA A; TAKAHASHI R; MURAKAMI R; KATAOKA H; CHENG XW, NUMAGUCHI Y et al. The effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on endothelial function and metabolic risk factors in healthy subjects: the significance of plasma adiponectin levels. **European Journal of endocrinology**, 2008, 158, 189-195.

KANG, Min Kyu; KIM, Ok Joon; JEON, Young Joo; KIM, Hyun Sook; OH, Seung Hun; KIM, Jin Kwon; KIM, Eo Jin ; HWANG, Tae Sun; KIM, Nam Keun. Interplay between polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and metabolic syndrome in determining the risk of ischemic stroke in Koreans. **Journal of the Neurological Sciences**, 2014, 344, 55–59.

KASLIWAL, Ravi; BANSAL, Manish; SHARMA, Maya. Carotid intima–media thickness: Current evidence, practices, and Indian experience. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, 2014, Jan-Feb 18(1):13-22.

LIMA, Francisca Angela Teixeira. ARAÚJO, Thelma Leite de. LOPES, Marcos Vinicius de Oliveira. SILVA, Lucia de Fátima da. MONTEIROS, Ana Ruth Macedo. OLIVEIRA, Sherida Karanini Paz de. Fatores de risco da doença coronariana em pacientes que realizaram revascularização miocárdica. **Revista Rene**, 2012; 13(4): 853-60.

LIU D; JIANG Z; DAI L; ZHANG X; YAN C; HAN Y. Association between the -786T>C 1polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. **Gene**, 2014, 15;545(1):175-83.

LOCALZO J, WELCH G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Prog Cardiovascular**, 1995 ;38:87–104.

LUCERO, Adam; LAMBRICK, Danielle; FAULKNER, James A.; FRYER, Simon; TARRANT, Michael A.; POUDEVIGNE, Melanie; WILLIAMS, Michelle A.; STONER, Lee. Modifiable Cardiovascular Disease Risk Factors among Indigenous Populations. **Advances in Preventive Medicine**. 2014. Volume 20.

LUDVIG J, Miner B, Eisenberg MJ. Smoking cessation in patients with coronary artery disease. **Am Heart J**. 2005;149(4):565-72.

MCPHERSON R, PERTSEMLIDIS A, KAVASLAR N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. **Science**. 2007;316:1488–1491.

MOUNT PF, KEMP BE, POWER DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multisite eNOS phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol**. 2007; 42:271-9.

NAKAMAIA M; YASUE H; YOSHIMURA M; SHIMASAKI Y; KUGIYAMA K; OGAWA H et al. T-786-C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gen is associated with coronary spasm. **Circulation**, 1999; 99:2864-2870.

OEMAR BS, TSCHUDI MR, GODOY N, BROVKOVICH F, MALINSKI T, LÜSCHER TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. **Circulation**, 1998;97:2494–8.

PEDEN, John F.; FARRAL, Martin. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. **Human Molecular Genetics**, 2011, Vol. 20, Review Issue 2.

PICCOLI, Jacqueline C. Escobar et al . Associação entre o polimorfismo 894g>T do gene óxido nítrico sintetase endotelial e síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v. 52, n. 8, nov. 2008 .

PICCOLI, J. C.E. et al. Interaction Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (-786T>C, 894G>T and Intron 4 a/b) and Cardiovascular Risk Factors in Acute Coronary Syndromes. 2012. **Archives of Medical Research**, 43, 205-211.

RAJMAN I; EACHO P; CHOWIENCZYK PJ; RITTER JM. LDL particle size: an important drug target? **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2001. Volume 48, Issue 2, pages 125–133.

RIOS DLS; ONÓFRIO L; SOUZA J; QUEIRÓZ A; MARON L; NETO N et al. Smoking-dependent and haplotype-specific effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on angiographically assessed coronary artery disease in Caucasian- and African-Brazilians. **Atherosclerosis**. 2007, Volume 193, 1,135–141.

RIOS DLS, CALLEGARI-JACQUES SM, HUTZ MH. Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta** 2005;362:138-46.

ROBERTS, R., Stewart, A. F.R. Genetics of Coronary Artery Disease in the 21st Century. 2012.

ROBERTS R. Genetics of coronary artery disease. **Circ Res**. 2014;114:1890–903

ROBERTS R. Genetics of premature myocardial infarction. **Curr Atheroscler Rep** 2008;10:186–93

RODGMAN A, Perfetti TA. The chemical components of tobacco and tobacco smoke. Florida: **CRC Press**; 2009.

ROSSI GP, CESARI M, ZANCHETTA M, COLONNA S, MAIOLINO G, PEDON L, CAVALLIN M, MAIOLINO P, PESSINA AC: The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. **JAm Coll Cardiol** 2003, 41:930-937.

RUDOLF, Joseph; LEWANDROWSKI, Kent. Cholesterol, Lipoproteins, High-sensitivity C-reactive Protein, and Other Risk Factors for Atherosclerosis. **Clin Lab Med**, 2014, 34, 113–127.

SAMPAIO MF; HIRATA MH; HIRATA RDC; SANTOS FCP; PICCIOTTI R; LUCHESSI AD et al. AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults. **Clinica Chimica Acta**. 2007. 377 154–162.

SAYOLS-BAIXERAS, Sergi; GANELLA, Carla Lluís; LUCAS, Gavin; ELOSUA, Roberto. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. **The Application of Clinical Genetics** 2014;7:15-32.

SHIN WS, SZUBA A, ROCKSON S G. The role of cytokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 160: 91-102, 2002

SCHMIDT, H. H. H. W; WALTER, U. No at work. **Cell**, Cambridge, v. 78, p. 919-925, 1994

SCOTT J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Curr Opin Genet Dev**. 2004 Jun;14(3):271-9.

SIMAO, AF et al. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Volume 101, Nº 6, Suplemento 2, Dezembro 2013.

STEINBERG D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J Biol Chem** 1997;272(34):20963-6.

SWERDLOW, Daniel I.; HOLMES, Michael V. ; HARRISON, Seamus; HUMPHRIES, Steve E. The genetics of coronary heart disease. **British Medical Bulletin**, 2012; 102.

TERASAKA N, WESTERTEP M, KOETSVELD J, FERNÁNDEZ-HERNANDO C, YVAN-CHARVET L, WANG N, et al. ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2010, Nov; 30(11):2219-25.

TESLOVICH TM, MUSUNURU K, SMITH AV, EDMONDSON AC, STYLIANOU IM, KOSEKI M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. **Nature** 2010;466:707–13

TONSTAD S, FARSANG C, KLAENE G, LEWIS K, MANOLIS A, PERRUCHOUD AP, et al. Bupropion SR for smoking cessation in smokers with cardiovascular disease: a multicentre, randomised study. **Eurp Heart J**. 2003;24(10):946-55.

WIDLANSKY, ME, GOKCE N, KEANEY JF, JR., VITA JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. **JAm Coll Cardiol**, 2003, 42: 1149-1160.

WILLER C.J., SCHMIDT E.M., SENGUPTA S., PELOSO G.M., GUSTAFSSON S., KANONI S., et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. **Nat Genet**. 2013; 45):1274-83.

WILSON PW, D'Agostino RB, LEVY D, BELANGER AM, SILBERSHATZ H, KANNEL WB. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. **Circulation** 1998; 97: 1837-1847.

WILSON PWF; D'AGOSTINO RB; SULLIVAN L; PARISE H; KANNEL WB. Overweight and Obesity as Determinants of Cardiovascular Risk. **Arch intern med.** 2002; 162, 1867-1872.

XAVIER H. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** Volume 101, Nº 4, Suplemento 1, outubro 2013.

ZAGO, Vanessa Helena de Souza. Efeitos da Atorvastatina e do Polimorfismo T-786C do Gene eNOS sobre Parâmetros do Metabolismo Lipídico Plasmático. **Arq Bras Cardiol.** 2013;100(1):14-20.

ZDRAVKOVIC S, WIENKE A, PEDERSEN NL, MARENBERG ME, YASHIN AI, DE FAIRE U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 966 Swedish twins. **J Intern Med.** 2002; 252 (3): 247-54).

ANEXOS

ANEXO A – 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

Assinatura do pesquisador Entrevistador

Nome da Testemunha

Assinatura da testemunha

ANEXO B – 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: ____/____/____

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 semana
- 2.() 3 a 4 vezes por semana
- 3.() 5 a 7 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.() 1X/sem
- 2.() 2X/sem
- 3.() 3 a 4/Xsem
- 4.() 5 a 7/Xsem

INFORMAÇÕES MÉDICAS

AA. Diagnóstico/sintomas anteriores ao cateterismo: _____

AB. Indicação do cateterismo: _____

AC. Resultado do cateterismo: _____

AD. Medicamentos utilizados: _____

AE. Altura: _____ m AF. Peso: _____ Kg AG. IMC: _____ AH. circ. cintura: _____ cm

