



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**MESTRADO EM GENÉTICA**

---

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *GSTM1* EM  
PACIENTES COM ATEROSCLEROSE**

---

**DÉBORA ACYOLE RODRIGUES**

**Goiânia – GO**

**2016**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**MESTRADO EM GENÉTICA**

---

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *GSTM1* EM  
PACIENTES COM ATEROSCLEROSE**

---

**DÉBORA ACYOLE RODRIGUES**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Genética MGENE da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. KÁTIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA**

**Goiânia – GO**

**2016**

R696a Rodrigues, Débora Acyole  
Análise do Polimorfismo do gene GSTM1 em pacientes  
com Aterosclerose [manuscrito] / Débora Acyole Rodrigues.--  
2016.

66 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.  
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO  
SENSU em Genética, Goiânia, 2016  
Inclui referências, f. 47-57

1. Aterosclerose. 2. Polimorfismo (Genética). I.Moura,  
Katia Karina Verolli de Oliveira. II.Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 616.13-004.6(043)

ATA COMPLEMENTAR Nº 114/2016

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: DÉBORA ACYOLE RODRIGUES

DEFENDIDA EM 11 DE MARÇO DE 2016 E APROVADA COM CONCEITO 4

O título foi alterado ( não ( sim) \_\_\_\_\_

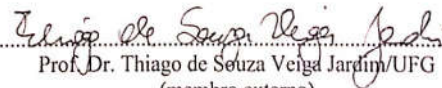
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dra. Kátia Karina Verolli de O Moura  
(presidente-orientador)



Prof.ª Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás  
(Membro interno)



Prof. Dr. Thiago de Souza Veiga Jardim/UFG  
(membro externo)

## **Dedico este trabalho...**

*Ao meu Deus que por sua infinita misericórdia e graça tem me sustentado até aqui. A minha família Luis Antonio, Janilda Acyole e Lucas Acyole pelo amor incondicional, apoio e dedicação constante e ininterrupta durante toda minha vida pessoal, acadêmica e profissional. “Busquem, pois, em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça, e todas essas coisas serão acrescentadas a vocês” (Mateus 6:33).*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Karina Verolli O. Moura, orientadora, amiga e fonte de inspiração profissionalmente e humanamente. Por ter acolhido a mim como orientada nos programas de Pós graduação *latu e strictu senso*, com tamanha cumplicidade, correções e sugestões, contribuindo assim, para a construção do meu conhecimento.

## AGRADECIMENTO

*“Rendam graças ao Senhor, pois ele é bom;  
o seu amor dura para sempre” (1 Crônicas 16:34)*

A Deus primeiramente, por ter cuidado da minha vida e me concedido força e ânimo em meio as adversidades.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me proporcionar o melhor, educando e apoiando na vida estudantil, pessoal e profissional. E também ao meu irmão por seu carinho e incentivo. Sem esse amor verdadeiro não seria possível essa conquista.

Aos meus familiares e amigos que permanecem sempre na torcida, meus agradecimentos pela compreensão quando estive ausente.

A todos os meus colegas e funcionários do Replicon: José Vitor, Magda, Ellen, Thairine, Andréia, Lilian, Fábio, Ana Júlia, Alessandra, Eduardo, Aldaires, Samuel, Aparecido (Peixoto) e as pessoas da iniciação científica. Obrigada pelos momentos únicos vivenciados, pelo ombro amigo, as conversas, pelo companheirismo e em especial pelo convívio dentro e fora do Replicon.

À Profª MSc. Iasmim Ribeiro da Costa, pela paciência, atenção, disponibilidade, carinho e sugestões durante toda graduação e mestrado.

Aos membros da banca examinadora pela disposição para avaliar e discutir o presente trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon o qual viabilizou o desenvolvimento das pesquisas.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE APÊNDICES .....	viii
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Doenças cardíacas .....	13
1.2 – Aterosclerose .....	13
1.2.1 Históricos da Doença .....	13
1.3 Definição/Causa .....	14
1.4 Tratamento .....	19
1.5 Prevalência.....	20
1.6 Genética da doença .....	21
1.7 Gene Glutathione S-Transferase (GST).....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Casuística.....	28
3.2 Extração de DNA genômico.....	29
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR .....	29
3.4 Análise de Dados .....	29
4. RESULTADOS .....	32
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONCLUSÃO .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
APÊNDICE I.....	58
APÊNDICE II.....	60
APÊNDICE III.....	63



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fagócitos mononucleares em aterogênese. Penetração na íntima por diapedese, captação de lipídeos modificados LDL-oxidado e a transformação em células espumosas. (Fonte: modificado de Roche e Sánchez, 2013).....	16
<b>Figura 2:</b> Fatores primários na formação da lesão aterosclerótica. (Fonte: Gottlieb et al., 2005).....	17
<b>Figura 3:</b> Gene <i>ApoE</i> mapeado no cromossomo humano 19 (19q13,2). (Fonte: Ojopi et al., 2004).....	23
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático ilustrando a deleção de <i>GSTM1</i> . São mostradas as posições relativas dos genes da classe Mu de GST, no cromossomo 1p, e a representação do alelo selvagem e nulo do gene <i>GSTM1</i> . Fonte: Pinheiro,2013 .....	25
<b>Figura 5.</b> Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, indicando o resultado da genotipagem do gene <i>GSTM1</i> (215pb). PM: peso molecular de 100pb; C+: controle positivo; Poço 1 e 5: <i>GSTM1</i> nulo; Poço 2, 3 e 4: <i>GSTM1</i> presente.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Seqüência nucleotídica dos primer <i>GSTM1</i> .....	30
<b>Tabela II:</b> Protocolo para a amplificação do polimorfismo do <i>GSTM1</i> para PCR.....	31
<b>Tabela III:</b> Protocolo de termociclagem para amplificação dos <i>primers GSTM1</i> para técnica de PCR.....	31
<b>Tabela IV:</b> Distribuição do Polimorfismo do gene <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle.....	32
<b>Tabela V:</b> Distribuição do polimorfismo <i>GSTM1</i> em relação ao sexo nos grupos caso e controle..	33
<b>Tabela VI:</b> Associação da bebida alcoólica com o polimorfismo <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle.....	34
<b>Tabela VII:</b> Associação do tabagismo com polimorfismo <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle.....	35
<b>Tabela VIII:</b> Associação do tabagismo com o genótipo presente do gene <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle relacionado com a quantidade de tabaco.....	36
<b>Tabela IX:</b> Associação do tabagismo com o genótipo nulo do gene <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle relacionado com a quantidade de tabaco.....	37
<b>Tabela X:</b> Associação do tabagismo com o genótipo presente do gene <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle relacionado com os anos de tabagismo. ....	38
<b>Tabela XI:</b> Associação do tabagismo com o genótipo nulo do gene <i>GSTM1</i> nos grupos caso e controle relacionado com os anos de tabagismo. ....	38

## **LISTA DE APÊNDICE**

<b>APÊNDICE I:</b> Questionário: Projeto de pesquisa polimorfismos de genes envolvidos no processo de aterogênese primária. ....	58
<b>APÊNDICE II:</b> Termo de consentimento livre e esclarecimento.....	60
<b>APÊNDICE III:</b> Termo de consentimento livre e esclarecido-grupo controle....	63

## SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ASMR	Academia Americana de Medicina Reprodutiva
APOE	Apolipoproteína
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DCNT	Doença crônica não transmissível
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etileno tetra-acético
GST	Glutathione
GSTM1	Glutathione S-transferase M1
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia familiar
H <sub>2</sub> O	Água
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mM	Milimolar
μl	Microlitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
n	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
Pb	Pares de bases
PAAS	Proteína A amiloide sérica
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
QM	Quilomicron
RNA	Ácido ribonucléico
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-borato de EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
V/cm	Volts por centímetro
VDS	Sistema de Vídeo Documentação
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
$\chi^2$	Teste qui – quadrado
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
$\beta$	Beta
$\infty$	Infinito
[ ]	Concentração
1p13.3	Braço curto do cromossomo 1, região 1 banda 3, sub-banda 3

## RESUMO

A expressão *aterosclerose* deriva do grego *atero*, que quer dizer caldo ou pasta, e *esclerose*, refere-se ao endurecimento, sendo caracterizada por lesões na túnica íntima dos vasos, denominadas ateroma ou placas ateromatosas obstruindo o lúmen vascular e enfraquecendo a túnica média subjacente. Já foram descritos outras série de fatores de risco para a gênese da aterosclerose, podendo ser divididos em modificáveis, como por exemplo, hipertensão arterial, tabagismo, obesidade, níveis elevados de colesterol LDL, níveis diminuídos de HDL, sedentarismo, estresse, e não modificáveis como: diabetes mellitus, hipertensão familiar, trombofilias, sexo, idade, fatores genéticos e história familiar prematura para doenças cardíacas. A associação de polimorfismos do gene glutationa-S-transferase (GST) com a doença arterial coronariana tem sido objeto de estudos. Já que o polimorfismo pode afetar a atividade enzimática contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose. Este estudo teve como objetivo analisar o polimorfismo do gene *GSTM1* nos grupos de indivíduos com diagnóstico de aterosclerose e no grupo controle. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 200 pacientes, com diagnóstico prévio de doença aterosclerótica baseado em exame clínico e confirmada através de método de imagem, e 100 amostras para o grupo controle. Os genótipos para o polimorfismo *GSTM1* foram determinados por PCR. Foi verificada uma diferença significativa nos grupos (aterosclerose x controle) em relação polimorfismo do gene *GSTM1*. A frequência do gene *GSTM1* presente no grupo aterosclerose foi 1,2 vezes maior quando comparado ao grupo controle. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa quando analisados os genótipos presente e nulo associado a variável gênero sexual, bebida alcoólica e tabagismo. Contudo quando analisamos os genótipos presente e nulo associado a variável hábito de fumar relacionada com a quantidade de tabaco consumido detectou-se que o genótipo *GSTM1*/presente foi mais freqüente, 52,6%, no grupo caso para os indivíduos que relataram fumar 20 ou mais cigarros e de 60,0% no controle para os indivíduos que fumam entre 10 a 20 cigarros ( $p= 0,0035$ ). Quando analisamos a variável hábito de fumar relacionada com os anos de tabagismo, o genótipo presente foi mais freqüente nos indivíduos que relataram ser ex-fumantes. Sendo no grupo caso de 45,5%, no período maior que 20 anos e no grupo controle de 50,0% para menores que 10 anos e 50,0% entre 10 a 20 anos ( $p= 0,0240$ ).

**Palavras-Chave:** Aterosclerose, Polimorfismo, *GSTM1*, PCR.

## ABSTRACT

The word Atherosclerosis comes from the Greek words *athero* that means gruel or paste and *sclerosis* that means hardness. The disease is characterized by lesions in the inner layer of the blood vessels called atheroma or atheromatous plaques. Those plaques block the vascular lumen and weaken the underlying tunica media. Several risk factors for the development of atherosclerosis have been described in the scientific literature. They are divided into modifiable and non-modifiable. The former includes hypertension, smoking, obesity, elevated levels of LDL cholesterol, decreased HDL levels, sedentary lifestyle and stress and the latter includes diabetes mellitus, family hypertension, thrombophilia, sex, age, genetic factors and premature family history of heart disease. The association of polymorphisms in the *GST* gene with coronary artery disease has been target of studies since polymorphisms may affect the enzyme activity and contribute to the onset of atherosclerosis. This present research aimed to analyze the polymorphism of *GSTM1* in individuals diagnosed with atherosclerosis and in healthy individuals composing the control group. We collected peripheral blood samples from 200 patients with a previous diagnosis of atherosclerotic disease based on clinical examination and confirmed by imaging methods. The control group was composed by 100 samples. The *GSTM1* polymorphism genotypes were determined by PCR. A significant difference was observed between the groups (atherosclerosis x control) regarding the *GSTM1* polymorphism. The frequency of the *GSTM1* present genotype in atherosclerosis group was 1.2 times higher compared to the control group. We found no significant difference between the present and null genotypes associated with variables such as gender, alcohol and smoking. However when we compared the present and null genotypes associated with smoking habits we found that the *GSTM1* present was more frequent, a frequency of 52.6% in the case group for individuals who reported smoking 20 or more cigarettes per day and 60.0% in the control for individuals who smoke 10 to 20 cigarettes per day ( $p = 0.0035$ ). When we analyze the variable smoking regarding years of smoking, the *GSTM1* present genotype was more frequent in individuals who reported being former smokers. The frequency of the *GSTM1* present genotype in the case group was 45.5% in individuals who have smoked for more than 20 years and 50.0% in the control group for those who have smoked less than 10 years and 50.0% between 10 to 20 years ( $p = 0.0240$ ).

KEYWORDS: Atherosclerosis, Polymorphism, *GSTM1*, PCR.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Doenças cardíacas**

As cardiopatias estão entre as principais causas de mortalidade. Dentre elas podemos destacar: a angina de peito, o infarto do miocárdio e aterosclerose (ALVES et al., 2010; PARPINELLI E CAMPIOLO, 2010; MOREIRA et al., 2010).

A angina de peito se deve a uma isquemia miocárdica que leva a dor ou desconforto no peito, uns dos fatores são devido ao esforço físico ou anemias hemolíticas que proporcionam uma redução no número de hemácias, responsáveis pelo transporte de oxigênio para os tecidos (ALVES et al., 2010).

Quando o fluxo sanguíneo coronariano rapidamente reduz após oclusão trombótica de alguma artéria coronária localizada externamente ao coração, desenvolve o que conhecemos como infarto do miocárdio, sendo considerado a segunda mais frequente causa de morte (DATASUS 2010; MOREIRA et al., 2010).

Com grande relevância em todo mundo a aterosclerose é uma doença crônica não transmissível (DCNT), que pode causar a obstrução das artérias, sendo este processo patológico cardiovascular relacionado à idade avançada uma vez que desenvolve em crianças e adolescentes (PARPINELLI E CAMPIOLO 2010; MOTTA, 2013).

## **1.2 – Aterosclerose**

### **1.2.1 Históricos da Doença**

Existe relatos com mais de 3.500 anos e estudos que buscam compreender o histórico natural e as causas envolvidas na patogênese da aterosclerose. Sua existência foi descrita em múmias egípcias sendo o primeiro sintoma clínico de angina pectoris, relatado por Hipócrates (460 370 a.C.) (MARTELLI, 2014; KUMAR et al., 2005; FAVARATO et al., 2003).



Em 1904, o patologista Felix Marchand, proferiu o termo aterosclerose para narrar as grandes e médias lesões das artérias com depósitos na túnica íntima de placas amarelas que continham colesterol e matéria lipóide, Herrick, em 1912 fez a primeira correlação da síndrome dolorosa com estudo anatomopatológico (KUMAR et al., 2005; GOTTIEB et al., 2005).

Por meio de fatores como a erradicação das doenças infecciosas e modificações nos estilos de vida a doença aterosclerótica passou a ser um problema significativo de saúde, o que proporcionou maior conhecimento das doenças ateroscleróticas e dos distúrbios cardiovasculares (KUMAR et al., 2005; MARTELLI, 2014).

Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose de 2013, as doenças cardiovasculares integram uma importante causa de morte nos países desenvolvidos e também nos que estão em desenvolvimento. Estudos demonstram que o processo aterosclerótico está presente desde a fase intra-uterina até a morte, podendo ser causa ou meramente coadjuvante (HIGUCHI et al., 2002; PELLANDA, 2014).

### **1.3 Definição/Causa**

Aterosclerose pode ser entendida como uma doença inflamatória crônica, degenerativa, de base multifatorial que em sua maioria é formada por um núcleo acelular de lipídeos e substâncias necróticas, circundado pelas chamadas células espumosas (células que englobaram grandes quantidades de lipídios, correspondendo a macrófagos) e, também, por uma capa fibrosa composta de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo fibroso (XAVIER et al., 2013 ; CASELLA et al., 2003).

A expressão *aterosclerose* deriva do grego *atero*, que quer dizer caldo ou pasta, e *esclerose*, refere-se ao endurecimento, sendo caracterizada por lesões na túnica íntima dos vasos, denominadas ateroma ou placas ateromatosas obstruindo o lúmen vascular e enfraquecendo a túnica média subjacente (MARTELLI, 2014; GOTTLIEB et al., 2005).

O depósito dessas placas na parede arterial são fatores fundamentais para a aterogênese. Ainda que qualquer artéria possa ser afetada, o depósito dessas placas pode ter outros alvos como a aorta e as artérias coronárias e

cerebrais, tendo como principais consequências o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico (MARTELLI, 2014; KUMAR et al., 2005; GOTTLIEB et al., 2005).

As dislipidemias, também conhecidas como alterações no metabolismo lipídico, elevam os riscos de doença arterial coronariana, os quais estão intimamente ligados a concentração das lipoproteínas na corrente sanguínea (CYMBRON, 2011; CORREIA et al., 2010).

O colesterol substancia do tipo lipídio-esteróide é fundamental para o organismo, desempenhando papel importante nas estruturas das membranas celulares, atuando como precursor de compostos como os ácidos biliares e os hormônios esteróides, é sintetizado endogenamente em particular pelas células do fígado e do intestino sendo também provenientes da alimentação (ROCHA et al, 2012; SCHERR et al., 2009; CAULA et al., 2008).

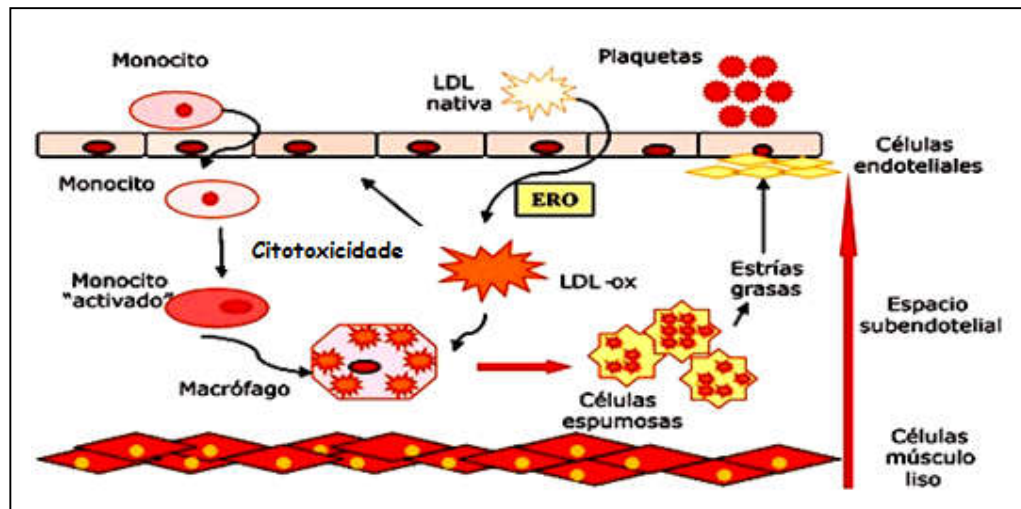
Existem vários tipos de lipoproteínas que transportam o colesterol no plasma sanguíneo, são elas: Quilomícron (QM), Lipoproteínas de densidade muito baixa (Very Low-Density Lipoproteins, VLDL), lipoproteína de baixa densidade ("Low Density Lipoproteins"- LDL) e de alta densidade ("High Density Lipoproteins"-HDL) atuando diretamente na evolução da aterosclerose (CYMBRON, 2011; CORREIA et al., 2010; LUDKE et al., 1999).

A LDL é um apo lipoproteína (apo B100), composta principalmente por colesterol. São capturadas pelas células hepáticas ou periféricas por meio dos receptores de LDL (LDL-R). Enquanto a HDL é composta pelos apos AI e AII sendo formadas no fígado, no intestino e na circulação (XAVIER et al, 2013; CYMBRON, 2011).

Qualquer alteração no metabolismo do colesterol pode acarretar o aumento da sua concentração no sangue e, como consequência, doenças coronarianas como aterosclerose, além de causar hipertensão arterial, problemas de diabetes mellitus e formação de cálculos biliares (ROCHA et al., 2012; SCHERR et al., 2009).

A constituição da placa aterosclerótica é devida a elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons). Com o depósito das lipoproteínas na parede arterial, inicia-se o processo de agressão ao endotélio vascular (revestimento interno dos vasos), na qual ocorre de maneira

proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma sanguíneo (figura 1) (MARTELLI, 2014; XAVIER et al., 2013).



**Figura 1.** Fagócitos mononucleares em aterogênese. Penetração na íntima por diapedese, captação de lipídeos modificados LDL-oxidado e a transformação em células espumosas. Fonte: modificado de Roche e Sánchez, 2013.

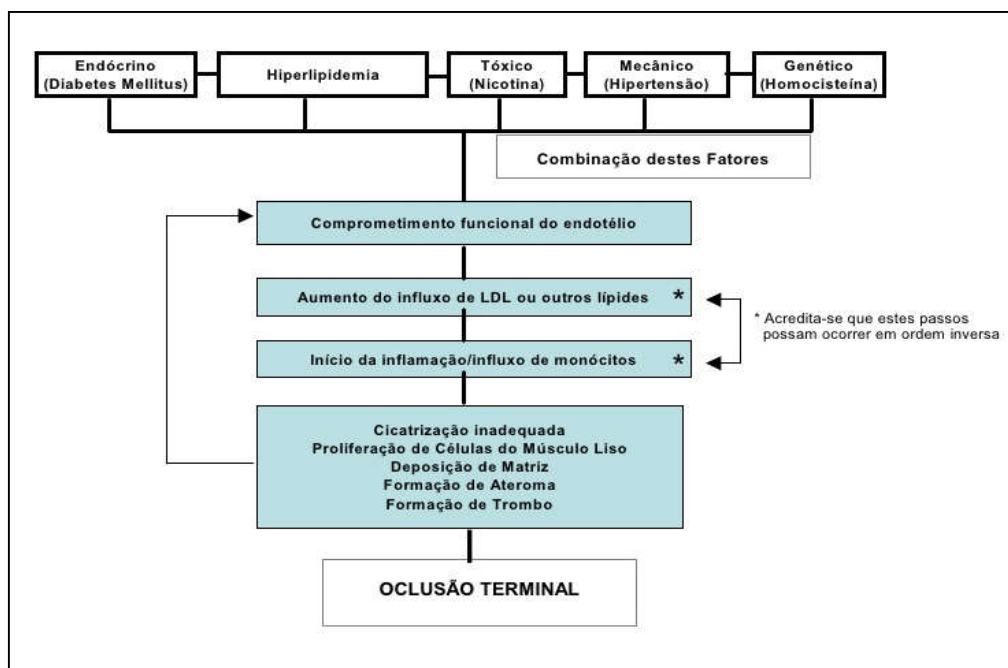
Uma vez desenvolvida, a placa aterosclerótica possui elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico e necrótico, formado principalmente por debris de células mortas. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico e necrótico de proporções menores (XAVIER et al., 2013).

Dentre os agravos causados pela presença dessas placas, destacam-se: a calcificação da lesão que mais tarde origina esclerose local; fissura ou ulceração da placa com formação de trombos, com consequente oclusão vascular; hemorragia intravascular, aumentando o tamanho da placa e a obstrução da luz do vaso com a perda da elasticidade vascular (ZAT et al., 2005).

Dentre os marcadores moleculares envolvidos nesses processos, destacam-se: LDL-oxidado (LDL-ox); citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa); moléculas de adesão intercelular (ICAM-1); proteínas da estimulação hepática, como proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) e proteína A amiloide sérica (PAAS) e contagem de leucócitos (MARANHÃO et al., 2014).

Diversos estudos realizados nos últimos anos mostram que no início do processo aterogênico ocorre a expressão de várias moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, as quais são responsáveis por modular as interações do endotélio vascular com os leucócitos. A presença desses leucócitos mononucleares para a camada íntima dos vasos é um fenômeno celular precoce que ocorre na gênese do ateroma desencadeando reações celulares específicas (MARTELLI, 2014; RABELLO, 2001).

Por outro lado, já foram descritos outras série de fatores de risco para a gênese da aterosclerose, podendo ser divididos em modificáveis, como por exemplo, hipertensão arterial, tabagismo, obesidade, níveis elevados de colesterol LDL, níveis diminuídos de HDL, sedentarismo, estresse, e não modificáveis como: diabetes mellitus, hipertensão familiar, trombofilias, sexo, idade, fatores genéticos e história familiar prematura para doenças cardíacas (figura 2) (MARTELLI, 2014; SANTOS et al., 2008).



**Figura 2.** Fatores primários na formação da lesão aterosclerótica. Fonte: Gottlieb et al., 2005.

Em relação ao sexo, os homens apresentam maior risco de uma ocorrência cardiovascular; porém, as mulheres estão com grande tendência a se igualar

devido à perda do efeito protetor estrogênico, na menopausa (SANTOS et al., 2011).

O sedentarismo e a inclusão da mulher no mercado de trabalho, devido à urbanização no século XX no Brasil, e também as mudanças nos hábitos alimentares viabilizaram um aumento no consumo de gorduras, ácidos graxos, açúcares e redução da ingestão de alimentos ricos em fibras, levando alterações do comportamento das famílias por muitas das vezes ter o hábito de fazer refeições fora de suas casas, indicando uma diminuição da alimentação saudável (MACHADO et al., 2014; FILHO et al., 2013).

Com isso, aumenta-se o risco de haver complicações cardiovasculares tendo muita das vezes relação com a hipertensão arterial sistêmica juntamente com a obesidade (PELLANDA, 2014; RABELO, 2011).

Portanto o incentivo a prática de exercícios físicos ativos deve ser precoce, já que a realização de atividade física ajuda no controle do peso, reduzindo a gordura e aumentando a massa muscular e também aumentando a sensibilidade à insulina com conseqüente redução da insulinemia, o que pode desempenhar papel importante sobre as lipoproteínas; previne ou retarda o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica e ajuda a reduzir os níveis de pressão arterial em adolescentes hipertensos, além de reduzir os sentimentos de depressão e ansiedade, reduzindo, no futuro, a morbidade e mortalidade (MACHADO et al., 2014)

De acordo com Rozanski e colaboradores 1999, existem alguns fatores psicológicos que favorecem a patogênese da doença arterial coronariana, como: depressão, ansiedade, características da personalidade, isolamento social e o stress crônico (SANTOS et al., 2011; LIPP et al., 2006).

Classificado como um dos possíveis fatores contribuintes para o desenvolvimento da aterosclerose, o estresse intenso induz ativação plaquetária favorecendo maior risco de suceder não só as doenças cardiovasculares, mas também a depressão e obesidade. O que, segundo o autor Steptoe e colaboradores (2003), esclarece a alta prevalência encontrada em indivíduos com classe econômica menos favorável. (SANTOS et al., 2011; SCHMIDT et al., 1999)

Considerado como um distúrbio endócrino por apresentar um defeito de secreção e/ou ação da insulina produzida pelo pâncreas, o que leva a

utilização inadequada de glicose pelos tecidos resultando na hiperglicemia, o Diabetes Mellitus (DM) está associada ao risco relativo de morte por eventos cardiovasculares, ajustado para a idade, em diabéticos é três vezes maior do que o da população em geral (SANTOS et al., 2008; MACHADO et al., 2014; VIANA et al., 2011).

Estudos demonstram que os prováveis mecanismos tóxicos da glicose direta sobre a vasculatura, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco contribuem para o desenvolvimento da doença aterosclerótica (SANTOS et al., 2008; RABELLO, 2011; VIANA et al., 2011)

Evidencia-se o tabagismo entre os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da aterosclerose. Além de ser determinante para o baixo peso ao nascer, para o descolamento prematuro da placenta e para doenças pulmonares, o cigarro diminui as concentrações sanguíneas de HDL o que está associado a uma disfunção endotelial significativa, sendo fortemente associado à prevalência de lesões ateroscleróticas avançadas, principalmente na aorta abdominal de jovens necropsiados (RABELO, 2001; SANTOS et al., 2008).

Um estudo iniciado em Framingham, em 1948, de extrema relevância populacional acerca das doenças cardiovasculares observou-se que das 1.423 mulheres analisadas as quais apresentavam aterosclerose subclínica ao padrão de dieta e tabagismo, tiveram redução significativa da aterosclerose (OR 0.17;  $p = .00011$ ) quando mantinham dieta saudável e não fumavam (SANTOS et al, 2011).

#### **1.4 Tratamento**

O tratamento adequado para essa patologia deve ser individualizado para cada paciente, visto que é necessária uma abordagem mais complexa para o tratamento da aterosclerose. Presume-se que 70 a 80% dos pacientes cardiopatas, que se submeteram a terapia apresentam o risco residual de um segundo evento cardiovascular adverso principal, isso porque muitas vezes não incluem o componente inflamatório da doença nas terapias atuais. Pacientes que utilizam drogas como as estatinas, cuja ação é antiinflamatória, apresentam redução da síntese de colesterol. Uma vez que o uso dessas drogas em indivíduos que apresentam alto risco para o desenvolvimento da

aterosclerose tem demonstrado uma redução dos índices de mortalidade e morbidade (MOTTA et al., 2013; RIOS, 2009).

### **1.5 Prevalência**

No Brasil, a aterosclerose acomete com maior freqüência a população adulta sendo nos dias atuais, como a mais freqüente causa de óbito. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes no mundo todo. (MARTELLI, 2014; OMS, 2011)

Avalia-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por essas doenças em 2012, o que representa 30% de todas as mortes do mundo, destes, 7,4 milhões morreram de doença isquêmica do coração e 6,7 milhões de acidente vascular cerebral (OMS, 2011; TAVARES, 2000).

Para o ano de 2015 presumi-se que 20 milhões de pessoas morrerão a cada ano por doença cardiovascular. Em torno de 80% dessas mortes estão ocorrendo em países de renda média e baixa, e as principais causas são o tabagismo, a inatividade física e a dieta inadequada (OMS, 2011; MARANHÃO et al., 2000).

Apesar de não poder ser considerada a única causa para o desenvolvimento de eventos agudos, em 50% dos casos a aterosclerose é considerada a causa. Em países ocidentais, essa doença progressiva, pode afetar 50% da população mais velha acima de 55 anos (ASCENSÃO, 2012; ANJANA et al., 2010).

Verificou-se em vários estudos a prevalência de placas ateroscleróticas aproximadamente superiores a 40% das autopsias nos adultos jovens, demonstrando que o processo aterosclerótico desenvolve precocemente, tanto na infância ou adolescência (PELLANDA, 2014; ANJANA et al., 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde, em uma pesquisa realizada sobre a freqüência de diagnóstico médico de hipertensão arterial, sendo maior em mulheres, 25,5%, do que em homens 20,7%, dentre as 27 cidades brasileiras analisadas. Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão – SBH, a hipertensão é responsável por 40% dos infartos, 80% dos derrames e 25% dos

casos de insuficiência renal terminal (SANTOS et al., 2011; PARPINELLI E CAMPIOLO, 2010)

As causas cardiovasculares atribuíveis à aterosclerose foram responsáveis por 193.309 mortes, às neoplasias por 166.036 mortes, as causas respiratórias responderam por 106.927 mortes, as causas externas por 77.503, as doenças do aparelho digestivo por 53.754 mortes e as do aparelho geniturinário por 21.527 mortes. Devido ao grande impacto social, a comunidade científica tem dedicado suas pesquisas visando compreender melhor os fatores, a fisiopatologia e o desenvolvimento de métodos preventivos para a doença aterosclerótica (ANJANA et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

Dados do IBGE afirmam que 24,6 milhões de brasileiros de 15 anos ou mais de idade fumavam derivados de tabaco em 2008 (17,2% da população nessa faixa etária). O tabagismo é outro fator importante que favorece o aparecimento das DCV, pois além da ação da nicotina sobre o calibre dos vasos, ele atua na formação de carboxihemoglobina (união do monóxido de carbono com a hemoglobina), impossibilitando que a hemoglobina transporte oxigênio (ASCENSÃO, 2012; PARPINELLI E CAMPIOLO, 2010).

## **1.6 Genética da doença**

Dentre os fatores já citados, existe também a possibilidade do fator genético estar envolvido no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Recentemente estudos avaliaram a relação dos componentes genéticos e a doença aterosclerótica, contribuindo para melhorar os modelos de predição estabelecidos (BOURBON, 2008; GONÇALVEZ, 2011).

A análise genética vem sendo investigada desde tempos passados e algumas descobertas referentes a essas características foram associadas à patogênese dessa doença, bem como a metodologia e interpretação dos resultados destes estudos (MANSUR, 2000).

Segundo o Programa Nacional de educação sobre o Colesterol, a HF é o principal causa das DCV, porque as partículas de LDL contêm 70% de colesterol no sangue, sendo o principal alvo de intervenção médica. As ferramentas para o rastreamento genético nas famílias com HF estão



disponíveis e vem sendo usadas em clínicas especializadas. (XAVIER et al., 2013; FORTI et al., 2003).

Segundo a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia familiar (HF) (2012), a HF é uma doença genética grave de herança autossômica codominante sendo responsável por 5-10% dos casos de eventos cardiovasculares em pessoas com menos de 50 anos, caracterizada por defeitos genéticos que afetam o receptor da LDL resultando na diminuição da endocitose da lipoproteína (FORTI et al., 2003; SANTOS 2008).

Os fatores genéticos como os polimorfismos também podem contribuir para a patogênese da doença, para isso é necessário analisar a interação de múltiplos polimorfismos em múltiplos genes responsáveis por codificarem várias proteínas envolvidas na etiopatogenese molecular das DCV. Contudo esse é um processo considerado complexo, que conta com a ajuda de novas tecnologias que proporcionam o desenvolvimento de chips de DNA capazes de responder a um teste de susceptibilidade para as DCV (BOURBON, 2008).

Os polimorfismos genéticos interagem de modo a maximizar ou minimizar o efeito patogênico total e ao mesmo tempo a expressão fenotípica final estará sendo modulada por outros fatores não genéticos (ambientais ou comportamentais). Porém, a heterogeneidade originada das diferentes suscetibilidades genéticas de cada indivíduo implica em fazer uma análise determinante incluindo todos os polimorfismos (BOURBON, 2008; MANSUR, 2000).

A análise das relações entre genes e o ambiente poderá levar a uma melhor percepção da patologia em questão. Como no caso de exposição a poluentes como dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), sendo produzidos em função da queima de combustíveis fósseis (MARINKOVIC et al., 2013).

Os polimorfismos de genes que codificam enzimas de HAP podem alterar a resposta celular específica final e produzir metabolitos que se encontram envolvidos em processos ateroscleróticos, como por exemplo, o *CYP1A1*, *GSTT1* e *GSTM1*. Denotando relação entre esses genes o tabagismo e o desenvolvimento de doenças malignas e a ateroscleróticas (MARINKOVIC et al, 2013).

A associação de polimorfismos do gene glutationa-S-transferase (GST) com a doença arterial coronariana tem sido objeto de estudos. Já que o polimorfismo

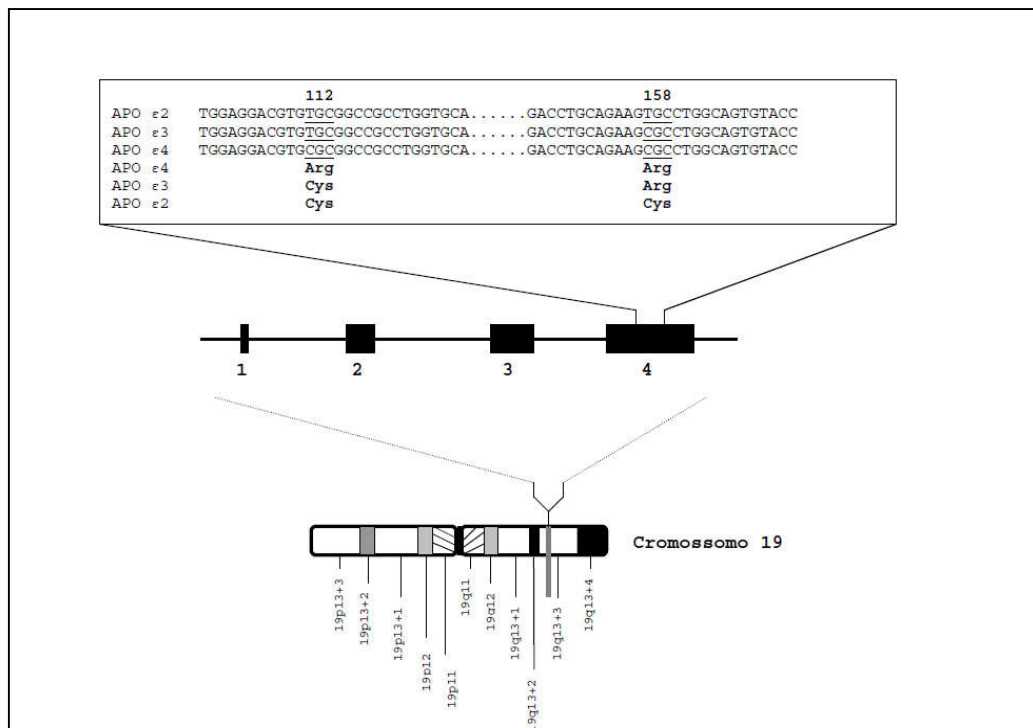
pode afetar a atividade enzimática contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose (GIRISHA et al.,2004).

São vários genes que demonstram participação e influenciam no processo aterosclerótico, tais como, o da enzima conversora de angiotensina, o angiotensinogênio, receptor AT1 da angiotensina e das apolipoproteínas AI, B e E (MANSUR, 2000; DALLANORA, 2013).

Observou-se o polimorfismo da enzima de conversão da angiotensina relacionado com o infarto agudo do miocárdio, isso porque os diferentes genótipos expressavam diferentes atividades da enzima de conversão da angiotensina o que influenciava o tônus vascular e a pressão arterial (MARANHÃO et al., 2014; MANSUR, 2000).

O primeiro polimorfismo estudado que apresentava relação com a doença coronariana foi o da apolipoproteína E, responsável por modificações essenciais no perfil lipídico (MANSUR, 2000; FORTI et al., 2003; DALLANORA, 2013).

A apolipoproteína E (APOE) localizada no cromossomo 19 é um gene que desempenha papel significativo no catabolismo das lipoproteínas ricas em TG e no transporte reverso do colesterol, atuando como mediador do receptor de LDL. A afinidade pelo receptor depende do polimorfismo HhaI (exon 4) no gene APOE. Para a formação de 6 genótipos, existem 3 alelos (e2, e3 e e4): E2E2, E2E3, E2E4, E3E3, E3E4 e E4E4. Além disso, vários estudos mostraram que o alelo e4 está associado à maior risco de DAC, pelo fato da elevação das taxas de LDL-c (MANSUR, 2000; FORTI et al., 2003).



**Figura 3.** Gene ApoE mapeado no cromossomo humano 19 (19q13,2).Fonte: Ojopi et al., 2004

### 1.7 Gene Glutathione S-Transferase (GST)

A detoxificação e metabolização de xenobióticos referente às heranças dos polimorfismos de genes, seja com a vida ou morte celular, exercem relevante atribuição na susceptibilidade às doenças (Koch et al., 2010; Pinheiro, 2012).

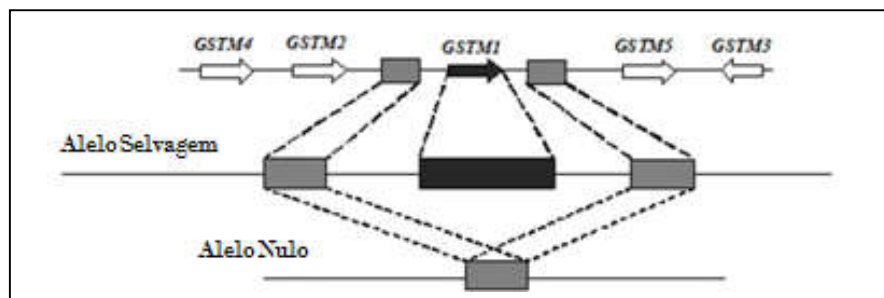
Por conseguinte, os radicais livres são formados continuamente no organismo, sendo mantidos por ação de defesa pelos antioxidantes, contudo, diversas condições podem desfavorecer esse equilíbrio ocasionando danos a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Estas situações acarretam disfunções celulares que estão descritas em varias fisiopatologias de doenças como aterosclerose, neoplasias e diabetes (WEST, 2000; RAHAMN, 2007; PINHEIRO, 2013).

A família Glutathione S-Transferases (GSTs) apresenta uma formação multigênica contendo produtos de *loci* gênicos diferentes, baseado no ponto isoelétrico, na similaridade da sequência de aminoácidos e na especificidade por substrato. São conhecidas 8 classes de GSTs citosólicas humanas:  $\alpha$  (*GSTA*),  $\mu$  (*GSTM*),  $\theta$  (*GSTT*),  $\pi$  (*GSTP*),  $\sigma$  (*GSTS*),  $\kappa$  (*GSTK*),  $\omega$  (*GSTO*) e  $\zeta$  (*GSTZ*) (MCILWAIN et al., 2006; PINHEIRO, 2013).

Estudos publicados relacionando à identificação da suscetibilidade genética à aterosclerose e o polimorfismo do gene glutationa S-transferase (GST) *GSTM1*, demonstram ser relevante na desintoxicação dos produtos do estresse oxidativo (GIRISHA et al., 2004; ZI et al., 2014; SILVA, 2011).

Os dados obtidos em um estudo realizado no Brasil sugerem que a presença de uma dupla deleção dos genótipos do gene *GSTM1* está associada com níveis de hipertrigliceridemia e baixo HDL-colesterol nos seres humanos. Podendo ser mais um campo para o estudo entre o metabolismo lipídico e a homeostase da GST (MACIEL et al., 2009).

A superfamília  $\mu$  (M) apresenta no mínimo 5 genes distintos, são eles: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5* sendo esses mapeados no braço curto do cromossomo 1. Localizado no cromossoma 1p13.3, o gene de estudo *GSTM1* altamente polimórfico possui dois alelos funcionais (*GSTM1*\*A e *GSTM1*\*B) provando ser eficiente na atividade metabólica (REIS, 2010; KOCH et al., 2010; DIAS, 2011).



**Figura 4.** Desenho esquemático ilustrando a deleção de *GSTM1*. São mostradas as posições relativas dos genes da classe Mu de GST, no cromossomo 1p, e a representação do alelo selvagem e nulo do gene *GSTM1*. Fonte: Pinheiro, 2013.

O gene *GSTM1*, consiste em 8 exões, os quais têm entre 36 a 112 pb, enquanto que os intrões variam entre 87 a 2641 pb. O *GSTM1* está “encaixado” numa região com extensas homologies sendo flanqueado por 2 regiões idênticas com 4,2 Kb (caixas cinzentas) (MANFREDI et al., 2009)

O genótipo nulo do *GSTM1* resultado da deleção de 16 Kb deste gene em ambos os alelos, acarretando na completa ausência e função do gene, e consequentemente da sua atividade enzimática (DIAS, 2011; COSTA, 2010).

Relatos sugerem que a enzima *GSTM1* ativa é responsável pela detoxificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presente no cigarro, em solventes como o benzeno, uma vez que a ausência destas enzimas pode potencializar a susceptibilidade ao câncer devido à diminuição da eficiência em desintoxicar cancerígenos (ZI et al., 2014; MARINKOVIC et al., 2013).

Embora o desenvolvimento da aterosclerose tenha um cunho genético, o uso de técnicas genotípicas ainda não é utilizado como método diagnóstico. Vários estudos sugerem que, futuramente, essas técnicas poderão ser utilizadas para a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver a aterosclerose (XAVIER et al, 2013; CORRÊA-CAMACHO et al, 2007).

Atualmente o seu diagnóstico é feito através da avaliação clínica e estudo das artérias do paciente, utilizando métodos não invasivos, como o Eco Doppler, para artérias periféricas, e invasivos como a angiotomografia e cateterismo, tanto para artérias periféricas como artérias centrais (coronárias e cerebrais), porém sem possibilidade de avaliação prognóstica.

Alguns trabalhos apresentaram resultados conflitantes quanto a correlação da aterosclerose e os polimorfismos genéticos, esse fato pode ser devido a estudos com metodologias inadequadas, número reduzido de pacientes e a ausência de um painel de polimorfismos, sendo estudados de forma isolada (MANSUR, 2000).

Dentre as técnicas moleculares destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). Por ser um método muito sensível, rápido, eficiente e por necessitar de pequenas quantidades de DNA, essa técnica ganhou rapidamente extensivo uso para a detecção de várias patologias (FERNANDES et al., 2004).

Neste estudo avaliamos o polimorfismo do gene *GSTM1* em pacientes com aterosclerose em Goiânia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Analisar o polimorfismo do gene *GSTM1* nos grupos de indivíduos com diagnóstico de aterosclerose e no grupo controle.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Detectar o polimorfismo dos genes *GSTM1* nos grupos caso e controle.
- Verificar a distribuição do polimorfismo do *GSTM1* em relação aos grupos caso e controle, além dos fatores gênero, tabagismo e o consumo de álcool.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Foram coletadas amostras de sangue periférico (15 mL) de 200 pacientes com diagnóstico prévio de doença aterosclerótica baseado em exame clínico e confirmado através de método de imagem, e 100 amostras para o grupo controle baseado nas manifestações clínicas e método de imagem não invasivo. As amostras foram de pacientes do serviço de cardiologia e cirurgia vascular periférica, da Clínica Angiogyn no município de Goiânia, no período de outubro de 2014 a fevereiro de 2015. As amostras de sangue periférico foram coletadas e submetidas a testes moleculares a fim de detectar o polimorfismo do gene *GSTM1*. Como controle positivo para reação de PCRs foi utilizado DNA de indivíduo com a presença confirmada dos polimorfismos para o gene *GSTM1*.

Os critérios de inclusão para o grupo caso foram pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares intervencionistas, que aceitaram responder ao questionário e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo II e III). Os exames de imagem usados como métodos de diagnóstico baseados na clínica foram: Eco color Doppler, angiotomografia e/ou angiografia digital, angiotomografia e/ou cine-angiocoronariografia. Os de exclusão foram os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitaram a participar da pesquisa.

Os critérios de inclusão para o grupo controle foram idade superior a 38 anos, e que não apresentaram diagnóstico de doença aterosclerótica baseados em critérios clínicos (anamnese, exame clínico, ausência de sintomas, sem alterações vasculares periféricas e diagnóstico clínico laboratorial) e/ou exames de imagem não invasivos - Eco color Doppler de carótidas sem evidência de placa ateromatosa e sem espessamento mio-intimal (Complexo mio-intimal < 1 mm) e que aceitaram responder ao questionário e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo I e III). Os de exclusão são pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitaram participar da pesquisa.

O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Sistema Nacional de Informações Sobre Éticas em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC GOIAS. (Número: 35321614.3.0000.0037)

Em relação ao hábito de fumar, os pacientes do grupo caso responderam um questionário (anexos I) sendo que tanto o grupo caso e controle foram dispostos em três grupos: fumantes atuais, nunca fumaram, e Ex- fumantes. Entende-se como fumante (tabagista) toda pessoa que faz uso regular de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado, independentemente do tempo em que fuma, e ex-fumante (ex-tabagista), o indivíduo que, no passado, fez uso de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado e, no momento, não fuma. Sendo que o indivíduo que compõem o grupo dos ex-fumantes foram aqueles que cessaram de fumar no período maior ou igual 15 anos, baseado no Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira de 2013.

### **3.2 Extração de DNA genômico**

A extração do DNA genômico de sangue periférico foi obtido por meio do kit Kaswi® (Genomic DNA Purification Kit), no Laboratório do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, conforme recomendações do fabricante. Por conseguinte, foram submetidas a quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus, tendo relevância apenas as amostras cujo o resultado da quantificação em relação a concentração de DNA foi superior a 5ng/μl. O DNA foi mantido à temperatura de -20°C até a amplificação pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR).

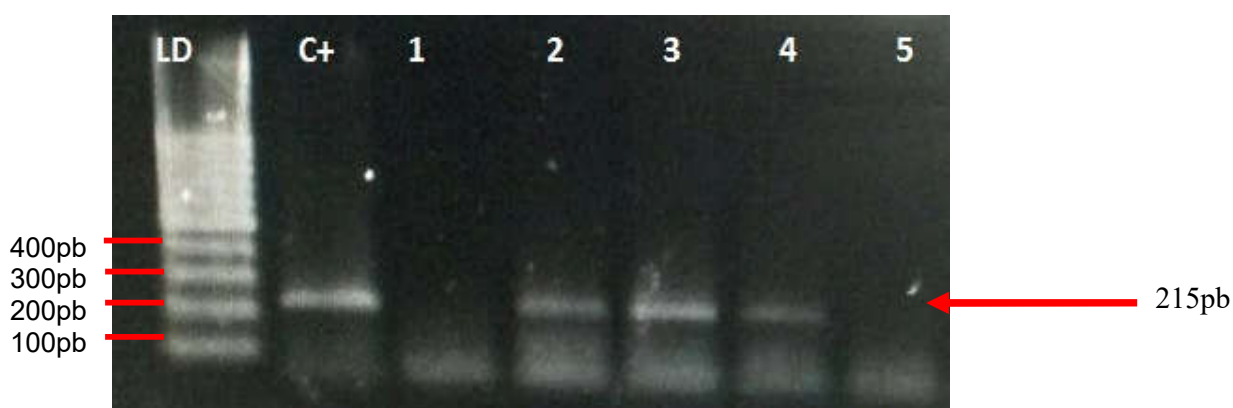
### **3.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR**

Posteriormente a quantificação das amostras, essas foram analisadas por meio da amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction – PCR) para detectar o polimorfismo dos genes *GSTM1*, em capela de fluxo laminar buscando a minimização da contaminação, sendo o volume final foi de 25μL, de acordo com o protocolo proposto por Frare (2011).



Para o estudo do polimorfismo dos genes *GSTM1* a ausência de amplificação indica genótipo nulo e a presença da amplificação confirma que o indivíduo possui pelo menos um dos genes alelos presente, sempre em duplicata, e só foi considerado genótipo nulo após 3 vezes de repetição com o mesmo resultado.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% em solução Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. Os géis foram corados com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizados no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA).(Figura 5).



**Figura 5.** Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, indicando o resultado da genotipagem do gene *GSTM1*(215pb). PM: peso molecular de 100pb; C+: controle positivo; Poço 1 e 5: *GSTM1* nulo; Poço 2, 3 e 4: *GSTM1* presente.

Na tabela I temos as seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) utilizados para a amplificação da região.

**Tabela I:** Seqüência nucleotídica dos primer *GSTM1*

<i>GSTM1</i>	F: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3' R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215pb
--------------	---	-------

Abdel-Rahma et al, 1996; Simoni et al, 2004

A PCR para o gene *GSTM1* foi realizada contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio, 1,25 U/µL de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 2,5U/µL de Taq

polimerase, 20 pmol de *primer* e aproximadamente 200ng/ $\mu$ L de DNA genômico. (Tabela II). Para o protocolo de termociclagem do gene *GSTM1* utilizou-se 94°C por 5 minutos na primeira etapa de desnaturação, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos (Tabela II).

O protocolo utilizado para amplificação do polimorfismo do *GSTM1* foi especificado na tabela III e o protocolo de termociclagem especificado na tabela III.

**Tabela II** - Protocolo para a amplificação do polimorfismo do *GSTM1* para PCR.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM	1,0 $\mu$ L
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 $\mu$ L de cada = 2,0 $\mu$ L
Taq polimerase 5 U/ $\mu$ L	2,5 U/ $\mu$ L	0,3 $\mu$ L
Primer sense	20 pM	0,5 $\mu$ L
Primer antisense	20 pM	0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O Mili Q	---	17,2 $\mu$ L
DNA amostra	200 ng/ $\mu$ L	1,0 MI
<b>Volume final</b>		<b>25,0 MI</b>

**Tabela III** - Protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers GSTM1* para técnica de PCR.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	56°C	90 seg	35
Polimerização	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	$\infty$	

### 3.4 Análise de dados

Os resultados do polimorfismo do gene *GSTM1* foram tabulados em planilhas Excel, constituindo um banco de dados. Foi utilizada a análise estatística de *odds ratio*, Teste G e qui-quadrado para analisar a relação do polimorfismo e a doença aterosclerótica. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Estes testes estatísticos foram feitos com o auxílio do *software* Bioestat versão 5.3.

## 4. RESULTADOS

O grupo caso foi constituído por 200 indivíduos, sendo que a média de idade dos pacientes foi de 61,1 anos e o grupo controle composto por 100 indivíduos apresentando uma média de 50,2 anos.

A frequência encontrada para a presença do gene *GSTM1*, foi de 72,5% (145/200) sendo que 27,5% (55/200) dos pacientes apresentaram o genótipo nulo. No grupo controle, detectou-se 60% (60/100) para a presença do gene *GSTM1* e 40% (40/100) dos pacientes apresentaram o genótipo *GSTM1* do tipo nulo. (Tabela IV)

No que se refere à relação do polimorfismo do gene *GSTM1* com a doença aterosclerótica, nos 300 pacientes analisados, observou-se que o genótipo presente foi 1,2 vezes maior no grupo caso (n=200) em relação ao grupo controle (n=100) ( $p= 0,0282$ ).

**Tabela IV-** Distribuição do Polimorfismo do gene *GSTM1* nos grupos caso e controle.

	Presente		Nulo		Total		$p^*$
	n	%	n	%	n	%	
Caso	145	72,5	55	27,5	200	100,0	0,0282
Controle	60	60,0	40	40,0	100	100,0	

\* Teste Qui-Quadrado

Nos pacientes do sexo masculino do grupo caso, foi constatado que 75,8% (69/91) foi presente para o gene enquanto que 24,2% (22/91) apresentou o genótipo nulo. Já nos pacientes controles, verificamos que 60,4% (32/53) do gene *GSTM1* é do tipo presente, é 39,6% (21/53) nulo. A diferença entre o genótipo presente ou nulo do gene *GSTM1* nos pacientes do sexo masculino de ambos os grupos não foi estatisticamente significativa ( $p= 0, 7816$ ) ( $p= 0,0508$ ). (Tabela V)

Ao analisarmos o grupo caso das pacientes do sexo feminino, a frequência de *GSTM1*-presente e *GSTM1*-nulo foram de 70,6% (77/109) e 29,4% (32/109), respectivamente. Entre as pacientes do grupo controle, foi observado que, 59,6% (28/47) era genótipo presente e 40,4% (19/47) dos pacientes gene *GSTM1* nulo, sendo que esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,1763$ ). (Tabela V)

Quanto à distribuição do polimorfismo do gene *GSTM1* em relação ao gênero dos pacientes dos grupos caso e controle, observamos que no grupo caso de ambos os sexos a frequência do genótipo presente foi maior, sendo 75,8% e 70,6% no sexo masculino e feminino, respectivamente.

**Tabela V-** Distribuição do polimorfismo *GSTM1* em relação ao sexo nos grupos caso e controle.

Sexo	Presente		Nulo		Total		$p^*$
	n	%	n	%	n	%	
<b>Masculino</b>							
Caso	69	75,8	22	24,2	91	100,0	0,0508
Controle	32	60,4	21	39,6	53	100,0	
<b>Feminino</b>							
Caso	77	70,6	32	29,4	109	100,0	0,1763
Controle	28	59,6	19	40,4	47	100,0	

\* Teste Qui-Quadrado

Quanto ao hábito de ingerir bebida alcoólica, 19 (9,5%) pacientes do grupo caso relataram ingerir e 181(90,5%) a não ingestão. Sendo que dos pacientes consumidores de bebida alcoólica, detectou-se 68,4% (13/19) presente para o

gene *GSTM1*. Nos pacientes que relataram não consumir do grupo caso observou-se que 72,9% (132/181) apresentaram o genótipo presente e 27,1% (49/181) nulo para o *GSTM1*, não sendo estatisticamente significativa ( $p=0,8819$  e  $OR = 0,8043$  (0,2896 a 2,2336)). (Tabela VI)

Dos pacientes controles, 20 (20%) relataram ingerir bebidas alcoólicas e 80 (80%) relataram a não ingestão. No presente estudo dentre os pacientes que disseram que consomem, foram encontrados 65% (13/20) e 35% (07/20), para o tipo *GSTM1* presente e nulo, respectivamente. Encontramos uma maior frequência em relação ao genótipo presente do gene *GSTM1* no grupo controle dos pacientes que não consomem bebida alcoólicas de 58,75% (47/80) e 41,25% (33/80) para o gene nulo, não sendo estatisticamente significativa ( $p=0,7986$   $OR = 1,3040$  (0,4697 a 3,6198)). (Tabela VI)

Verificou-se que no grupo caso o gene *GSTM1* presente foi mais elevado 72,9% nos indivíduos que não fazem o uso de bebida alcoólica, contudo no grupo controle o genótipo presente foi mais alto 65% nos indivíduos que consumiam bebida alcoólica.

**Tabela VI – Associação da bebida alcoólica com o polimorfismo *GSTM1* nos grupos caso e controle.**

Variáveis / Grupos	Bebida alcoólica						
	Sim		Não		$p\alpha^*$	OR*	Mini *máx.
	n	%	n	%			
<b>Caso</b>							
Presente	13	68,4	132	72,9	0,8819	0,8043	0,2896 – 2,2336
Nulo	06	31,6	49	27,1			
Total	19	100,0	181	100,0			
<b>Controle</b>							
Presente	13	65,0	47	58,8	0,7986	1,3040	0,4697 – 3,6198
Nulo	07	35,0	33	41,2			
Total	20	100,0	80	100,0			

\*Teste de OddsRatio

Ao analisarmos o polimorfismo *GSTM1* do grupo caso nos indivíduos com o hábito de fumar, foi encontrado 71,4% (50/70) de presença para o gene *GSTM1* enquanto 28,6% (20/70) para o genótipo *GSTM1*/nulo. Dos 85 pacientes com aterosclerose que relataram nunca ter fumado 71,8% (61/85) apresentaram o gene *GSTM1* presente e 28,2% (24/85) *GSTM1* nulo. No grupo caso, dos pacientes que foram considerados ex-fumantes, ou seja, aqueles que cessaram de fumar no período igual ou superior 15 anos, detectou-se que a frequência de *GSTM1*-presente e *GSTM1*-nulo são de 74,4% (32/43) e 25,6% (11/43), respectivamente. Não sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,9351$ ). Contudo, dois pacientes do grupo caso não informaram há quanto tempo cessaram de fumar é também um paciente relatou ser fumante passivo durante toda sua vida. (Tabela VII)

Quanto ao grupo controle, dos pacientes com hábito de fumar constatou-se que 56,0% (14/25) foram presente para o gene e 44,0% (11/25) apresentaram o gene *GSTM1* do tipo nulo. A frequência encontrada nos 62 indivíduos que nunca fumaram, do grupo controle, em relação à presença do gene *GSTM1* foi de 63,0% (39/62) sendo que 27,0% (23/62) dos pacientes apresentaram o genótipo nulo. Para o grupo dos ex-fumantes ( $\geq$  de 15 anos), o genótipo presente foi encontrado em 54,5% (06/11) dos indivíduos e o genótipo *GSTM1*/nulo em 45,5% (05/11), sendo que esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,7720$ ). Dos pacientes do grupo controle, dois não informaram o período em que cessaram de fumar. (Tabela VII)

**Tabela VII-** Associação do tabagismo com polimorfismo *GSTM1* nos grupos caso e controle. ( $\geq$  de 15 anos)

Variáveis/ Grupos	Tabagismo						<i>p</i>
	Fuma		Nunca Fumou		Ex Fumante		
	n	%	n	%	n	%	
Caso							
Presente	50	71,4	61	71,8	32	74,4	0,9351*
Nulo	20	28,6	24	28,2	11	25,6	
Total	70	100,0	85	100,0	43	100,0	
Controle							
Presente	14	56,0	39	63,0	06	54,5	0,7720**
Nulo	11	44,0	23	27,0	05	45,5	
Total	25	100,0	62	100,0	11	100,0	

\*Qui-quadrado; \*\* Teste G

Foram analisadas as freqüências genóticas do gene *GSTM1* em indivíduos fumantes e ex-fumantes ( $\geq 15$  anos) relacionado com a carga tabágica, tanto no grupo de indivíduos com aterosclerose como no grupo controle. (Tabela VIII)

Dos indivíduos fumantes do grupo caso, que apresentaram o genótipo *GSTM1*/presente 13,2% (05/38) informaram que consomem de 5 a 10 tabacos, 34,2% (13/38) de 10 a 20 tabacos e 52,6% (20/38) 20 ou mais. Enquanto que no grupo controle, observou-se que nenhum indivíduo fumante relatou o uso de 5 a 10 tabacos, enquanto que 90,0% (09/10) relataram o uso de 10 a 20 e 10,0% (01/10) 20 ou mais tabacos, sendo esses *GSTM1*/presente ( $p= 0,0035$ ). (Tabela VIII)

Em relação a análise sobre a quantidade de tabaco e o genótipo presente no grupo de indivíduos que são ex-fumantes, não houve diferença significativa em ambos os grupos caso e controle ( $p=0,3915$ ). (Tabela VIII)

**Tabela VIII-** Associação do tabagismo com o genótipo presente do gene *GSTM1* nos grupos caso e controle relacionado com a quantidade de tabaco.

GSTM1 PRESENTE					
Grupos	FUMANTES				$p^*$
	CASO		CONTROLE		
	n	%	n	%	
05 - 10	05	13,2	00	0,0	0.0035
10 – 20	13	34,2	09	90,0	
20 ou mais	20	52,6	01	10,0	
Total	38	100,0	10	100,0	
EX-FUMANTES					
Grupos	CASO		CONTROLE		$p^*$
	n	%	n	%	
	n	%	n	%	
05 - 10	11	34,4	01	20,0	0.3915
10 – 20	09	28,1	03	60,0	
20 ou mais	12	37,5	01	20,0	
Total	32	100,0	05	100,0	

\*\*Qui-quadrado; \*\* Teste G

Para o genótipo do tipo nulo em pacientes do grupo caso e controle associado com a carga tabágica, não houve diferença significativa no grupo de indivíduos fumantes ( $p= 0, 8537$ ) e ex-fumantes ( $p=0, 2130$ ). (Tabela IX)

Dentre os pacientes analisados do grupo caso, das tabelas VIII e IX, quinze indivíduos que se declararam fumantes não relataram o número de

cigarros fumados por dia e outros dois pacientes declararam usar 2 cigarros de palha por dia. Dos indivíduos estudados que compõe o grupo controle, onze pacientes não informaram o número de cigarros fumados por dia e um paciente relatou que faz uso de cachimbo.

**Tabela IX-** Associação do tabagismo com o genótipo nulo do gene *GSTM1* nos grupos caso e controle relacionado com a quantidade de tabaco.

<i>GSTM1</i> NULO					
Grupos	FUMANTES				<i>p</i> *
	CASO		CONTROLE		
	N	%	n	%	
05 - 10	02	13,3	01	16,7	0.8537
10 – 20	06	40,0	03	50,0	
20 ou mais	07	46,7	02	33,3	
Total	15	100,0	06	100,0	
EX-FUMANTES					
Grupos	CASO		CONTROLE		<i>p</i> *
	N	%	n	%	
	05 - 10	03	30,0	00	
10 – 20	02	20,0	02	66,7	
20 ou mais	05	50,0	01	33,3	
Total	10	100,0	03	100,0	

\*Qui-quadrado; \*\* Teste G

Na tabela X temos a associação da variável hábito de fumar e o tempo em que o indivíduo fuma ou deixou de fumar (ex-fumantes) com os genótipos do gene *GSMT1* no grupo com aterosclerose e controle.

Em relação aos pacientes do grupo caso e controle com o genótipo *GSTM1*/presente e com o hábito de fumar, não foi encontrado diferença significativa ( $p= 0,4869$ ). (Tabela X)

Entre os pacientes que são ex-fumantes ( $\geq 15$  anos) do grupo caso e que apresentam o genótipo presente, 15,1% (05/33) fumam a  $< 10$  anos 39,4% (13/33) de 10 a 20 anos e 45,5% (15/33)  $> 20$  anos. Enquanto que a frequência encontrada nos indivíduos ex-fumantes com o mesmo genótipo *GSTM1* do tipo presente foram 50,0% (03/06) para os que fumavam  $< 10$  anos, 50,0% (03/06) de 10 a 20 anos e nenhum paciente relatou ter fumado por  $> 20$  anos, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p= 0, 0240$ ). (Tabela X)



**Tabela X-** Associação do tabagismo com o genótipo presente do gene *GSTM1* nos grupos caso e controle relacionado com os anos de tabagismo.

GSTM1 PRESENTE					
Grupos	FUMANTES				<i>p</i> *
	CASO		CONTROLE		
	n	%	n	%	
<10 anos	02	4,0	01	7,7	0.4869
10 a 20 anos	03	6,0	02	15,4	
> 20 anos	45	90,0	10	76,9	
Total	50	100,0	13	100,0	
EX-FUMANTES					
Grupos	CASO		CONTROLE		<i>p</i> *
	n	%	n	%	
< 10 anos	05	15,1	03	50,0	0.0240
10 a 20 anos	13	39,4	03	50,0	
> 20 anos	15	45,5	00	00,0	
Total	33	100,0	06	100,0	

\*Qui-quadrado; \*\* Teste G

Quanto à distribuição do polimorfismo do gene *GSTM1* do tipo nulo nos grupos caso e controle relacionado com os anos de tabagismo, não houve diferença significativa nos indivíduos classificados como fumantes ( $p= 0, 0762$ ) e ex-fumantes ( $p= 0, 0471$ ). Dos pacientes do grupo controle, três não informaram o período em que fumaram. (Tabela XI)

**Tabela XI-** Associação do tabagismo com o genótipo nulo do gene *GSTM1* nos grupos caso e controle relacionado com os anos de tabagismo.

GSTM1 NULO					
Grupos	FUMANTES				<i>p</i> *
	CASO		CONTROLE		
	n	%	n	%	
<10 anos	00	0,0	02	22,2	0.0762
10 a 20 anos	03	16,7	02	22,2	
> 20 anos	15	83,3	05	55,6	
Total	18	100,0	09	100,0	
EX-FUMANTES					
Grupos	CASO		CONTROLE		<i>p</i> *
	n	%	n	%	
< 10 anos	01	15,1	02	40,0	0.0471
10 a 20 anos	03	39,4	03	60,0	
> 20 anos	05	45,5	00	00,0	
Total	09	100,0	05	100,0	

\*Qui-quadrado; \*\* Teste G

## 5. DISCUSSÃO

Segundo Marques e Sá (2011) nos últimos 20 anos, publicações sobre a patogênese da doença cardiovascular relacionada com a genética aumentaram em cinco vezes. Visando compreender melhor os polimorfismos dos genes e marcadores de inflamação, a fim de elucidar os aspectos intrínsecos envolvidos na aterosclerose e na doença coronária.

Os polimorfismos genéticos são caracterizados por variações na seqüência do DNA, proteína ou cromossomo originando proteínas com atividades alteradas e com diferentes capacidades metabólicas, quando ocorre numa frequência igual ou superior a 1% na população geral. Esses polimorfismos ajudam a explicar as diferenças nas evoluções clínicas e nas respostas terapêuticas entre os pacientes com a mesma patologia e mesmo tratamento farmacológico (Willard, 2000; Marques e Sá, 2011).

Sendo aterosclerose uma doença de base multifatorial, os fatores genéticos atuam como determinantes de risco para o desenvolvimento da mesma. Considera-se que mais de 400 genes possam estar envolvidos nos processos de regulação da função endotelial, hidratos de carbono, inflamação, coagulação e o metabolismo dos aminoácidos e lípidos. (Doevendans et al, 2001; Marques e Sá, 2011).

A associação do polimorfismo das GSTs (enzimas de detoxificação) aumenta ou diminuem a sensibilidade de um organismo a processos inflamatórios envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose, sendo esse assunto abordado por diferentes estudos (Hayes, 2005; Marinković, 2013; Wilson et al, 2000; Izzoti et al., 2001)

Em um estudo feito na população no Norte da Índia sobre o polimorfismo de presente/nulo da glutathione S-transferase *GSTM1* relacionado com a doença arterial coronariana, demonstrou-se que em ambos os grupos caso e controle o genótipo presente foi maior, sendo 76,65% e 79,29% respectivamente (Girisha et al., 2004).

Bem como no presente estudo, o qual encontrou uma maior frequência do *GSTM1* presente tanto no grupo caso (72,5%) como no grupo controle (60,0%), ( $p= 0,0282$ ). Além disso, constatou-se que no grupo caso o genótipo presente

foi 1,2 vezes maior quando comparado com o grupo controle. Assim como, Taspinar e colaboradores (2012) mostram em seus estudos na população Turca, uma maior prevalência do genótipo presente, sendo essa 58,2% para o grupo caso e 53,5% no grupo controle.

Estudos realizados por Wilson e colaboradores (2000) no Reino Unido, demonstraram maior frequência do genótipo *GSTM1* presente nos pacientes do grupo caso, 52,0%. Em contra partida, uma menor prevalência desse genótipo foi relatada no grupo controle, de 42,8%.

Grignoli e colaboradores (2009), ao analisarem o polimorfismo do gene *GSTM1* e sua relação com outras patologias dentre elas a aterosclerose, na população da região de Araras, relataram que o *GSTM1*/presente foi mais prevalente (57,0%) em relação ao genótipo *GSTM1*/nulo (43,0%), assim como no presente estudo.

Diferentemente dos nossos resultados os quais foram avaliados indivíduos diagnosticados de aterosclerose, Turkanoglu e colaboradores (2010) descreveram em seu trabalho realizado na população caucasiana, sendo o grupo caso composto por indivíduos que sofreram de acidente vascular cerebral isquêmico, uma menor prevalência para o genótipo presente do *GSTM1* sendo ela 49,4% (n=172) e 43,8% (n=105), para o grupo caso e controle respectivamente.

Também uma revisão de meta-análise realizada por Zhang e Zhan (2014), com a finalidade de investigar a associação entre o genótipo nulo do gene *GSTM1* e a doença arterial coronariana (DAC), sugerindo que esse genótipo é um fator de risco para DAC, sendo estatisticamente significativa.

Manfredi e colaboradores em 2007 ao analisar a população Italiana, encontraram que apenas 41,4% dos pacientes casos apresentaram o gene *GSTM1* do tipo presente ao contrario do grupo controle, onde 54,7% também eram *GSTM1*/presente.

No presente estudo quando analisado o gênero foi encontrada uma maior frequência do genótipo *GSTM1* presente em ambos os grupos controle e caso e para ambos os gêneros (masculino e feminino).

Também Maciel e colaboradores em 2009, analisou 1577 indivíduos da população geral, destes, 50,5% dos homens eram *GSTM1*/presente e 49,4%

das mulheres, também para o mesmo genótipo. Corroborando com os nossos resultados.

Assim como Schreiber e colaboradores (2013) em um estudo na população brasileira, observaram uma frequência semelhante, sendo 50,0% dos pacientes do sexo masculino e 47,9% dos indivíduos do sexo feminino genótipo *GSTM1* presente.

Entretanto, Olshan e colaboradores (2003) detectaram em seus estudos na Carolina do Norte, que o genótipo presente do gene *GSTM1* foi mais freqüente nos pacientes do sexo masculino (55,5%) comparado com o sexo feminino (44,5%).

Do mesmo modo, Wang e colaboradores (2012) em seus estudos realizados em um grupo de chineses, sobre a relação do polimorfismo *GSTM1* e a aterosclerose, encontraram também uma menor frequência de *GSTM1*/presente entre indivíduos masculino do grupo caso (48,5%) e do controle (48,3%). Assim como no gênero feminino, onde a frequência do genótipo *GSTM1* presente foi de 45,0% e 45,6%, para o grupo caso e controle respectivamente.

A frequência do genótipo *GSTM1* presente no nosso estudo foi mais elevada 72,9% nos indivíduos do grupo caso que não fazem o uso de bebida alcoólica, ao contrário do grupo controle onde a maior frequência foi encontrada em pacientes que relataram consumir bebida alcoólica (65,0%), não sendo esta diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos estudados.

Também estudos conduzidos na população brasileira por Pinheiro (2013), estão de acordo com nossos resultados. Eles estudaram associação entre os genótipo nulo e presente do gene *GSTM1* em pacientes brasileiros com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), contudo não foram encontraram diferença significativa com relação ao hábito de consumir bebida Alcoólica no grupo caso e controle.

Assim como, Girisha e colaboradores (2004) estudando a população indiana observaram que não foi significativa ( $p= 0.0826$ ) para polimorfismo do gene *GSTM1* associado ao risco de desenvolvimento da doença coronariana.

Entretanto, outra pesquisa realizada com indivíduos da Índia por Syed e colaboradores (2010), encontrou diferença significativa ( $p< 0.001$ ) para o gene

*GSTM1* relacionado com a doença arterial coronariana e o hábito de ingerir bebida alcoólica.

Pan e colaboradores (2011) ao analisarem a população Chinesa associada ao histórico do consumo de bebida alcoólica em pacientes declarados detectaram maior frequência do genótipo nulo (70,5%) quando comparado aos indivíduos que não fazem o uso de bebida alcoólica (59,8%). Ao contrario do nosso estudo o qual encontrou maior frequência para o genótipo presente do gene *GSTM1* tanto no grupo caso como no grupo controle.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o tabagismo é considerado como o fator de risco mais importante associado à morbidade e mortalidade cardiovasculares. Sendo que todas as formas de consumo do tabaco, sejam ou não produtoras de fumaça, favorecem a instalação de dependência à nicotina. Com relação ao fumante passivo, caracterizado por ser um individuo que não fuma, ao conviver com o fumante inala a fumaça resultante da queima de derivados do tabaco, o que também é considerada nociva à saúde.

Dentro do nosso estudo, foi observada uma alta frequência do genótipo *GSM11*/presente entre pacientes com a doença arterial e pacientes controles, independente da classificação quanto ao hábito de fumar. Também, estudos realizados na população brasileira sobre alterações bioquímicas clínicas e variáveis dentre elas o tabagismo, comparando com genótipos presente e nulo do gene *GSTM1*, observou-se que não ocorreu diferença significativa para a variável analisada (Pinheiro, 2013).

Em 2011 Sultana e colaboradores também relataram em seus estudos que, indivíduos indianos do grupo controle com o genótipo presente para o gene *GSTM1* apresentaram um papel protetor nos pacientes com o hábito de fumar. Além disso, nos grupos caso (91,2%) e controle (83,3%) dos indivíduos que informaram ser ex-fumantes foram detectadas uma maior frequência para o genótipo presente.

Wang e colaboradores (2015) avaliaram os polimorfismos do gene glutationa S-transferase (*GSTM1*) associado ao acidente vascular cerebral isquêmico na população chinesa, os resultados encontrados nos pacientes que afirmaram fumar do grupo caso demonstraram uma frequência semelhante para o genótipo *GSTM1*/presente e *GSTM1*/nulo, sendo 50,0% e 50%,

respectivamente. Dentre os indivíduos que relataram não fumar do grupo caso observou-se que 45,7% apresentaram presente e 54,3% genótipo nulo. Em relação ao grupo controle nos indivíduos fumantes foram detectados que 47,5% são para a presença do gene e 52,5 para o tipo nulo, sendo essas frequências bastante próximas das encontradas nos indivíduos não fumantes tanto para o genótipo presente, 47,0%, como para o nulo, 53,0%.

Evidências adicionais sobre o processo da inflamação e a exposição à fumaça do tabaco como uma importante condição para o desenvolvimento de várias doenças crônicas relacionada com os genótipos do gene *GSTM1* é tema para diversos estudos (Hayes et al., 1995; Schmidt et al., 1999; He et al., 2004; Hakim et al., 2004).

Dentre eles, Kim e colaboradores (2006), analisando indivíduos saudáveis da Coreia, observaram que 41,1% dos indivíduos que relataram não ser fumantes apresentaram o genótipo presente para o gene *GSTM1* e 55,9% para o genótipo nulo. E para os indivíduos fumantes, considerando o hábito de fumar por pelo menos 5 anos, encontraram frequências de 50,0% e 50,0% para o genótipo presente e nulo, respectivamente.

Diferente dos nossos resultados, estudos realizados na Arábia Saudita verificaram que o genótipo nulo do gene *GSTM1* é considerado fator de risco para a doença arterial coronariana independente do hábito de fumar. (Amero et al, 2006). Pesquisas demonstram que a associação de *GSTM1*/nulo com a aterogênese depende de diferentes fatores e incluem outros polimorfismos (interações gene-gene), hábitos de vida, assim como a influência do ambiente (Basic et al., 2012; Manfredi et al., 2007; Marinkovic et al., 2013).

Contudo, em um estudo conduzido por Wilson e colaboradores (2000) quando os indivíduos submetidos à angiografia foram classificados quanto ao hábito de fumar, observaram que a associação entre genótipo *GSTM1* e o infarto agudo do miocárdio (AMI) foi observada apenas em fumantes, sugerindo que o polimorfismo é mais significativo nos indivíduos que fumam.

Foi encontrado em nosso estudo associação significativa entre o hábito de fumar relacionada com a quantidade de tabaco consumido e o genótipo *GSTM1*/presente, sendo que no grupo caso foi observado uma maior frequência nos indivíduos que relataram fumar mais que 20 cigarros por dia

enquanto que no controle foi nos indivíduos que fumam entre 10 a 20 cigarros ( $p= 0,0035$ ).

Diferentemente de Pan et al., (2011) que ao investigarem as associações de polimorfismos genéticos do gene *GSTM1* na população Hakka do sul da China com história familiar de certas doenças crônicas dentre elas a doença arterial coronariana, não encontraram diferenças significativas com relação aos genótipos presente/nulo do gene *GSTM1* e a quantidade de tabaco consumida (<10 cigarros; 10-20 cigarros; >20 cigarros por dia), sendo considerado como tabagista o indivíduo com hábito de fumar um cigarro por dia por pelo menos seis meses.

De acordo com Associação Médica Brasileira (2013), a ocorrência e gravidade de muitas doenças causadas pela fumaça do tabaco são diretamente relacionadas com idade de início do tabagismo, duração e número de cigarros fumados diariamente. Os derivados do tabaco são nocivos à saúde, tanto na forma industrializada de cigarros, charutos, cachimbos e rapé, como na forma artesanal de narguilé, tabaco mascado ou fumo de corda com palha.

O fumo causa o estreitamento das artérias periféricas, dificultando o fluxo sanguíneo, aumentando o risco dos fumantes desenvolverem doenças vasculares periféricas. Mesmo em baixos níveis de exposição à fumaça do tabaco, ocasiona um rápido e intenso aumento da inflamação e disfunção na parede que reveste os vasos sanguíneos (endotélio), que são determinantes para desencadear o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (Olin, 2000).

Também tem sido demonstrado que variantes genéticas podem interagir com o fumo aumentando a peroxidação de lipídios, proporcionando assim um grande efeito aterogênico. O tabagismo ocasiona alterações do DNA no coração e vasos sanguíneos, o que leva ao desenvolvimento de CAD. (Taylor et al., 2007)

A variabilidade individual de desenvolvimento de CAD em fumantes de cigarro resulta dos polimorfismos genéticos das enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos (Hayek et al., 2006).

Observou-se que em relação à variável hábito de fumar relacionada com os anos de tabagismo e o genótipo *GSTM1*/presente, encontrou-se uma maior frequência no grupo caso para os indivíduos que relataram fumar em um

período maior que 20 anos e no grupo controle detectou-se que as maiores freqüências foram tanto para os indivíduos que relataram fumar no período menor que 10 anos e entre 10 a 20 anos, sendo essa diferença significativa para aqueles indivíduos que se declararam ex- fumantes ( $p= 0, 0240$ ).

Entretanto, *Olshan* et al, não encontrou nenhuma interação entre o tabagismo ( $\geq 20$  anos) e os genótipos do *GSTM1* na população americana.

Em outro estudo realizado por Grignoli et al, (2008) no Brasil, verificou-se que o gene *GSTM1* do tipo nulo foi mais freqüente (58,0%) em indivíduos que fumam há mais de dez anos , o que leva a deficiência na atividade de detoxificação do organismo, provocando o acúmulo de substâncias reativas que ocasionam mutações no DNA e, conseqüentemente, modulando a susceptibilidade para o desenvolvimento de cânceres e outras doenças como a aterosclerose relacionados ao tabagismo.

O genótipo nulo pode estar mais associado ao aumento de diversas patologias devido à maior suscetibilidade a substâncias cancerígenas, podendo também relacionar a menor resposta ao tratamento medicamentoso, por afetar a eficácia de certas drogas (Turkanoglu et al., 2010; Marinković et al., 2013; Zhang e Zhan, 2014).

Dentre as substancias presentes no tabaco, os xenobióticos são metabolizados por um complexo enzimático composto por enzimas ativadoras da fase I e detoxificadoras da fase II. A fase I consiste na metabolização de compostos estranhos ao organismo. Já na fase II da biotransformação, as enzimas conjugam compostos hidrofílicos, como o acetil ou a glutationa, tornando mais hidrossolúveis a fim de facilitar a eliminação pelo organismo (Melo, 2014).

O gene *GSTM1* codificam enzimas de fase II, sendo polimórfico na população humana. A enzima *GSTM1* é codificada pelo gene *GST*. O principal papel da *GSTM1* reside na desintoxicação de xenobióticos como o benzo(a)pireno diol epóxido (BPED), compostos eletrofílicos, hidrocarbonetos, compostos aromáticos policíclicos e outros mutagênicos que são altamente reativos com capacidade de formar ligações covalentes com o DNA desencadeando mutações. (Bourbon, 2008; Melo, 2014; Marinkovic et al., 2013).



## 6. CONCLUSÃO

- Foi verificada uma diferença significativa nos grupos (aterosclerose x controle) em relação polimorfismo do gene *GSTM1*;
- A frequência do gene *GSTM1* presente no grupo aterosclerose foi 1,2 vezes maior quando comparado ao grupo controle;
- Não foi encontrada nenhuma diferença significativa quando analisados os genótipos presente e nulo associado a variável gênero sexual, bebida alcoólica e tabagismo sendo classificado entre indivíduos que relataram fumar, que nunca fumaram e para os ex-fumantes, sendo considerado como ex-fumantes os pacientes que consumiram cigarro durante um período maior ou igual a 15 anos.
- Quando analisamos os genótipos presente e nulo associado a variável hábito de fumar relacionada com a quantidade de tabaco consumido detectou-se que o genótipo *GSTM1*/presente foi mais freqüente nos grupo caso para os indivíduos que relataram ser fumantes, e fumam 20 ou mais cigarros por dia enquanto que no controle foi nos indivíduos que fumam entre 10 a 20 cigarros.
- Quando analisamos a variável hábito de fumar relacionada com os anos de tabagismo, o genótipo presente foi mais freqüente nos indivíduos que relataram ser ex-fumantes. Sendo no grupo caso mais freqüente no período maior que 20 anos e no grupo controle nos períodos menores que 10 anos e entre 10 a 20 anos, sendo essa diferença significativa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES L, CESAR JA, HORTA BL. Prevalência de angina pectoris em Pelotas, RS. **Arq. Bras. Cardiol.** 2010, vol.95, n.2, pp. 179-185.

AMERO KKA, AL-BOUDARI OM, MOHAMED GH, DZIMIRI N. T<sup>null</sup> and M<sup>null</sup> genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. **BMC Medical Genetics.** 2006; 7-38.

ANJANA R, SURESH R. Periodontal Infection – A risk for coronary artery disease. Sri Ramachandra Journal of Medicine. 2010; 3 (2). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** - Volume 100, Nº 4, Abril 2013.

ASCENSÃO JCO. Associação entre Doença Periodontal e Aterosclerose Universidade Fernando Pessoa Faculdade de **Ciências da Saúde Porto**, 2012.

BASIC M, BUTORAC A, LANDEKA JURČEVIĆ I, BAČUN-DRUŽINA V. Obesity: genome and environment interactions. **Arh Hig Rada Toksikol** 2012;63:395-405.

Bourbon M. Factores Genéticos e a Doença Cardiovascular. **Rev Port Cardiol.** 2008; 27: 1559-63.

CASELLA FA, ARAÚJO RG, GALVÃO TG, CHAGAS ACP. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Rev Bras Cardiol Invas** 2003; 11(3): 14-19.

CAULA FCB, OLIVEIRA MP, MAIA EV. Teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará Ciênc. **Tecnol. Aliment**, Campinas. 2008; 28(4): 959-963.

CORRÊA-CAMACHO CR, DIAS-MELICIO LA, SOARES AMVC. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde** 2007 jan-mar;14(1):41-48.

CORREIA FO, LEAL RS. Efeito do exercício aeróbio e resistido nas alterações de colesterol total e lipoproteínas hdl-c, ldl-c e triglicerídeos. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**. 2010 SP; 4 (22): 337-341.

COSTA, IR. **Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose** [Dissertação de Mestrado em Genética]. Goiânia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, 2010.

CYMBRON T. Aterosclerose e doença Cardiovascular O problema do colesterol elevado. **Dep de biologia da universidade dos açores**. 2011.

DALLANORA AH. **Associação entre variações alélicas clássicas do gene da ApoE com fatores de risco cardiovascular em indivíduos muito idosos**. [Monografia da Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Curso de Farmácia, 2013.

DIAS AFRS. **Estudo da Associação dos Polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 null em Nadadores de Elite Portugueses**. [Dissertação da Universidade da beira interior, Faculdade de Ciências da Saúde]. Outubro, 2011.

DOEVENDANS PA, JUKEMA W, et al. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. **Int J Cardiol**. 2001; 80:161-72.

FAVARATO D, LUZ PL. Hipertenso e aterosclerose: Aspectos fisiopatológicos Hipertensão. **Revista da sociedade brasileira de hipertensão revista da sociedade brasileira de hipertensão**. 2003; 6(4).

FILHO AC, ARAÚJO RG, GALVÃO TG, CHAGAS ACP. Inflamação e aterosclerose: integração de novas teorias e valorização dos novos marcadores. **Rev Bras Cardiol Invas**. 2003; 11(3): 14-9.

FORTI N, LUIS A. SALAZAR, JAYME DIAMENT, SERGIO D. GIANNINI, MARIO H. HIRATA, ROSARIO DC. Alterações genéticas e colesterolemia **Arq Bras Cardiol**. 2003; 80 (5), 565-71.

GIRISHA KM, GILMOUR A, MASTANA S, SINGH VP, SINHA N, TEWAR S, RAMES V, SANKAR VH, AGRAWAL S. T1 and m1 polymorphism in glutathione S transferase gene and coronary artery disease in north indian population Indian. **J Med Sci.** 2004; 58 (12).

GONCALVES LM. A procura dos preditores genéticos da doença coronária: A saga continua. *Rev Port Cardiol.* 2011; 30 (06): 593-598.

GOTTLIEB MG, BONARDI G, MORIGUCHI EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica.** 2005; 15(3).

GRIGNOLI CRE, RE AL, BERTONCIN AC. Polimorfismos dos genes das enzimas glutatona S-Transferase MU1 e TETA1. *Pensamento Plural: Revista Científica do São João da Boa Vista.* 2009; 3 (1).

HAKIM IA, HARRIS RB, CHOW HH, DEAN M, BROWN S, ALI IU. Effect of a 4-month tea intervention on oxidative DNA damage among heavy smokers: role of glutathione S-transferase genotypes. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2004; 13: 242-9.

HAYEK T, STEPHENS JW, HUBBART CS, ACHARYA J, CASLAKE MJ, HAWE E, et al. A common variant in the glutathione S transferase gene is associated with elevated markers of inflammation and lipid peroxidation in subjects with diabetes mellitus. **Atherosclerosis.** 2006; 184: 404-12.

HAYES JD, FLANAGAN JU, JOWSEY IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:51–88.

HAYES JD, STRANGE RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. **Free Radic Res.** 1995; 22: 193-207.

HE JQ, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARE PD, SANDFORD AJ. Glutathione S-transferase variants and their interaction with smoking on lung function. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 388-94.

HIGUCHI ML, et al. Comparison between Adventitial and Intimal Inflammation of Ruptured and Nonruptured Atherosclerotic Plaques in Human Coronary Arteries. **Arq. Bras. Cardiol.** 2002 SP; 79 (1), 20-24.

I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF) Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2012; 99 (2), Supl.2.

IZZOTTI A, CARTIGLIA C, LEWTAS J, FLORA S. Increased dna alterations in atherosclerotic lesions of individuals lacking the GSTM1 genotype. **The FASEB Journal.** 2001; 15 (3), 752-757.

KIM, JIN-HEE, et al. "GSTM1 and GSTP1 polymorphisms as potential factors for modifying the effect of smoking on inflammatory response." **Journal of Korean medical science.** 2006; 1021-1027.

KOCH FP, KÄMMERER PW, KÄMMERER P, AL-NAWAS B, BRIEGER J. Influence of class M1 glutathione s-transferase (GST M1) polymorphism on GSTM1 gene expression level and tumor size in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology.** 2010; 46 128-33.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, ROBBINS CP. Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: **Elsevier**; 2005.

LIPP MEN, SARAIVA JFK, NETO AA, DIAMENT J, RIVEIRA IR, SILVA MAM. Aspectos psicológicos na prevenção na aterosclerose na infância e na adolescência. **Rev. Cienc. Med.** 2006; 15(6) 515-524.

LUDKE MCM, LÓPEZ J. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suínas. **Ciência Rural.** 1999; 29 (1).

MACHADO LE, CAMPOS R. O impacto da diabetes melito e da hipertensão arterial para a saúde pública. **Saúde Meio Ambient.** 2014; 3 (2), 53-61.

MACIEL SS, PEREIRA AC, SILVA GJ, RODRIGUES MV, MILL JG, KRIEGER JE. Association between glutathione S-transferase polymorphisms and triglycerides and HDL- cholesterol. **J.atherosclerosis.** 2009; 206 (1):204-8.

MANFREDI S, FEDERICI C, PICANO E, BOTTO N, RIZZA A, ANDREASSI MG. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: a case-only study. **Mutat Res.** 2007;621:106-12.

MANFREDI S, CALVI D, DEL FIANDRA M, BOTTO N, BIAGINII A, ANDREASSI MG. Glutathione s-transferase T1- and M1-null genotypes and coronary artery disease risk in patients with type 2 diabetes mellitus. **Pharmacogenomics.** 2009; 10, 29-34.

MANSUR AP. Componente genético da doença coronariana. **Arq Bras Cardiol.** 2000; 74 (6).

MARANHÃO RC, CARVALHO PO, STRUNZ CC, PILEGGI F. Lipoproteína (a): Estrutura, Metabolismo, Fisiopatologia e Implicações Clínicas **Arq Bras Cardiol.** 2014; 103(1): 76-84.

MARINKOVIĆ N, PAŠALIĆ D, POTOČKI S. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. **Biochemia Medica.** 2013; 23 (3):255–65.

MARQUES E SÁ, AC. **O Papel dos Polimorfismos Genéticos na Doença Cardíaca Isquêmica.** [Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina]. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar Universidade do Porto; 2011.

MARTELLI A. Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle. **Revista Saúde e Desenvolvimento Humano.** 2014 Maio 30; 2(1): 41-52.

MCILWAIN CC, TOWNSEND DM, TEW KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene,** 2006; 25, 1639–1648.

MELO LGP. **Análise dos polimorfismos genéticos GSTM1 e GSTT1 em fumantes e nunca fumantes.** Universidade Estadual de Londrina 2014. [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde]. Universidade Estadual de Londrina ; 2014.

Ministério da Saúde. Datasus. **Informações de saúde: internações hospitalares do SUS-por local de internação- Brasil**, segundo região/especialidade cirúrgica, 2007.

MOREIRA CGD, FERNANDES JAA. **Recidivas de infarto agudo do miocárdio atendidos na santa casa de misericórdia de ourinhos/sp no período de janeiro a junho de 2010**. [Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas]. Faculdades Integradas de Ourinhos; 2010.

MOTTA NAV, FUMIAN MM, CASTRO JP, BRITO FCF. Inflamação e Aterosclerose: Novos Biomarcadores e Perspectivas Terapêuticas **Rev Bras Cardiol**. 2013; 26(5): 390-99.

OJOPI EPB, BERTONCINI AB, DIAS NETO, E. Apolipoproteína E e a doença de alzheimer. **Rev Psiquiatr Clín**. 2004; 1: 26-33.

OLIN JW. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). **N Engl J Med**. 2000; 343 (12):864-9.

OLSHAN, ANDREW F., et al. "Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione S-transferase genes." **Epidemiology**. 2003; 14 (3): 321-327.

OMS. **The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2011**. [Acesso 19 de março 2015].

PAN S, YANG X, YANG L, WEI Q, YANG Y, XU G, LIN Z, HUANG J. Human GSTs polymorphisms in the Hakka population of south China and their associations with family history of several chronic diseases. **Biomed Environ Sci**. 2011 Oct;24(5):491-8.

PARPINELLI EP, CAMPIOLO GMG. Prevalence of risk factors for chronic diseases no transmissível (dcnt) among teachers of the state public net of teaching of the west area of londrina, **paraná -terra e cultura** . 2010; 51.

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, ROCHA J, ET AL. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100: 177-82.

PELLANDA LC. Trajetórias da Saúde Cardiovascular: Epidemiologia do Curso da Vida no Brasil. **Arq Bras Cardiol.** 2014; 102(5): 418-419.

Pena, SDJ. Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos.** 2005; 12 (1), 321-46.

PINHEIRO DS, COSTA CDD, ROCHA FILHO CR, MUNDIM CA, REIS AAS, GHEDINI PC. Avaliação do nível de controle glicêmico dos pacientes diabéticos tipo 2 atendidos em um Hospital Universitário. *Rev. Univ. Vale do Rio Verde (Três Corações).* 2012; 10 (2), 03-11.

PINHEIRO DS. **Avaliação do polimorfismo de deleção de GSTT1 e GSTM1 na susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 2. 2013. 87 f.** Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PROJETO DIRETRIZES: evidências científicas sobre tabagismo para subsídio ao Poder Judiciário Associação Médica Brasileira; Associação Médica Brasileira; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Aliança de Controle do Tabagismo. Fonte: Rio de Janeiro; **Associação Médica Brasileira;** 2013.

RABELO LM. Fatores de risco para doença aterosclerótica na adolescência. **Jornal de Pediatria.** 2001; 77(2): 153-64.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin. Interv. in Aging.** 2007; 2(2), 219–236.

RAHMAN SZA, EL-ZEIN RA, ANWAR NA, et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Letters.** 1996; 107(2): 229-233.

REIS AAS. **Associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide.** [Tese Doutorado] Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, 2010.

RIOS FJO. **Sinalização intracelular e expressão de receptores mediados por LDL modificada e peptídeos da ApoB-100 em monócitos/ macrófagos**



**humanos** [tese].São Paulo: Instituto de ciências biomédicas da universidade de são Paulo ;2009.

ROCHA CP, OLIVEIRA LC. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba. 2012; 6: 170-184.

ROCHE LD, SÁNCHEZ GM. El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos, **Universidad de La Habana**. 2013.

ROZANSKI A, BLUMENTHAL JA, KAPLAN J. Impacto f psychologival factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Curculation**. 1999; 99 (16): 2192-21.

SANTOS MCB, VIEIRA JAM, CÉSAR BN, NOVAES MRCG. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil - Com. **Ciências Saúde**. 2011; 22(3): 247-256.

SANTOS MG, PEGORARO M, SANDRINI F, MACUCO EC. Risk Factors for the Development of Atherosclerosis in Childhood and Adolescence.**Arq Bras Cardiol**. 2008; 90(4): 301-308.

SCHERR C, RIBEIRO JP. Cholesterol and Fats in Brazilian Foods: Implications for Prevention of Atherosclerosis **Arq Bras Cardiol**. 2009; 92(3): 190-195.

SCHMIDT MI, DUNCAN BB, SHARRETT AR, LINDBERG G, SAVAGE PJ, OFFENBACHER S, AZAMBUJA MI, TRACY RP, HEISS G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. **Lancet** 1999; 353: 1649- 52.

SCHREIBER R1, MILL JG, KRIEGER JE, PEREIRA AC. Association between glutathione S-transferase M1 polymorphism and urinary sodium excretion in a Brazilian population. **Am J Hypertens**. 2013 Aug; 26(8):1024-9.

SILVA, DGH. Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em relação aos haplótipos da beta globina, polimorfismos da glutathione S-Transferase e enzimas de detoxificação .São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

SIMONI M, BAKKER E AND KRAUSZ C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. **international journal of andrology**. 2004; 27:240–249.

STEPTOE A, MARMOT M. Burden of Psychosocial adversity and vulnerability in middle age: association with biobehavioral risk factors and quality of life. **Psychosom med**. 2003; 65(6): 1029-37.

SULTANA, SHEHNAZ, et al. "Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms in south Indian stroke patients." **J Med Genet Genomics** 3 (2011): 65-70.

SYED, RABBANI, FARHA DEEBA, AND KAISER JAMIL. "Role of GSTM1 gene polymorphism and its association with coronary artery disease." **Journal of Clin. Med. Res**. 2010: 22-25.

TASPINAR M, AYDOS S, SAKIRAGAOGLU O, DUZEN IV, ET AL. of Genetic Variations of the CYP1A1, GSTT1, and GSTM1. Genes on the Risk of Coronary Artery Disease. **DNA AND CELL BIOLOGY**. 2012; 31 (2), 211–218.

TAVARES A. Polimorfismos dos genes do sistema renina angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares - **Rev Bras Hipertens**. 2000; 3: 237-42.

TAYLOR R, NAJAFI F, DOBSON A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. **Int J Epidemiol**. 2007; 36 (5): 1048-59.

TÜRKANOĞLU A, CAN DB, DEMIRKAYA S, BEK S, ET AL. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphism and serum total GST activity with ischemic stroke risk. **Neuro ISci**. 2010 Dec; 31 (6): 727-34.

VIANA MR, RODRIGUEZ TT. Complicações cardiovasculares e renais no diabetes mellitus.R. **Ci. med. biol.** 2011 Salvador; 10 (3), 290-296.

WANG R, WANG Y, WANG J, YANG K. Association of glutathione S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms with ischemic stroke risk in the Chinese Han population. **Neural Regeneration Research.** 2012;7(18):1420-1427.

WEST JC. Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabet. Med.** 2000; 17, 171-80.

WILLARD H. Genética e câncer. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FN. Genética médica Thompson & Thompson. 2000 Rio de Janeiro: 274- 293.

Wilson MH, Peter G J, Laura J H, et al. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. **FASEB J.** 2000 April; 4:791-796.

XAVIER HT, IZAR MC, FARIA NETO JR, ASSAD MH, ROCHA VZ, SPOSITO AC, FONSECA FA, DOS SANTOS JE, SANTOS RD, BERTOLAMI MC, FALUDI AA, MARTINEZ TLR, DIAMENT J, GUIMARÃES A, FORTI NA, MORIGUCHI E, CHAGAS ACP. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivo Bras Cardiol.** 2013; 101(4.1): 1-22.

ZAT C, HADAS TCS. Prevalência das dislipidemias e a sua relação com a obesidade e sedentarismo em crianças de 3 a 12 anos atendidas no laboratório da fundação municipal de saúde de santa rosa. **Revista Contexto & Saúde.** 2005; 5 (8).

ZHANG ZX, ZHANG Y (2014). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null genotype and coronary artery disease risk: a meta-analysis. **J Clin Exp Med.** 2014; 7 (10):3378-3384.

ZI YM, WU S, MA D, YANG C, YANG M, HUANG Y, YANG SJ. Association of GSTT1 and GSTM1 variants with acute myeloid leukemia risk. **Genetics and Molecular Research**. 2014 13 (2):3681-3685.

## APÊNDICE I

### QUESTIONÁRIO – PROJETO DE PESQUISA POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA

Nº PRONTUÁRIO: \_\_\_\_\_ INICIAIS- \_\_\_\_\_ Nº  
TUBO \_\_\_\_\_  
NOME: \_\_\_\_\_  
DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ IDADE: (\_\_\_)  
SEXO: ( ) **M** ; ( ) **F** COR DA PELE: \_\_\_\_\_ ( Branco, negro ou pardo)  
FILHOS: ( ) **SIM** ( ) **NÃO**.  
QUANTOS: HOMENS (\_\_\_\_\_) MULHERES  
(\_\_\_\_\_) ABORTO: \_\_\_\_\_ QTOS \_\_\_\_\_ NATURALIDADE: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
RESIDE EM: \_\_\_\_\_  
TELEFONE: \_\_\_\_\_ TEL. CONTATO: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
PROFISSÃO \_\_\_\_\_

1. ATUALMENTE FUMA: ( ) **SIM** ( ) **NÃO**  
QUANTO TEMPO: ( ) MAIS 10 ANOS ( ) MENOS 10 ANOS INICIOU  
COM \_\_\_\_\_ ANOS  
2. EX-FUMANTE ( ) INICIOU COM QUANTOS ANOS (\_\_\_\_\_) PAROU COM  
QUANTOS ANOS (\_\_\_\_\_)  
QUANTOS CIGARROS: 5-10/DIA ( ) 10-20/DIA ( ) 20 OU MAIS ( ), CARGA  
TABÁGICA: \_\_\_\_\_ MAÇOS/ANOS  
2. BEBE ( ) **SIM** ( ) **NÃO** FREQUÊNCIA \_\_\_\_\_  
VINHO ( ) CERVEJA ( ) CACHAÇA ( ) OUTROS \_\_\_\_\_  
1 COPO ( ) 2-3 COPOS ( ) 3 OU + COPOS ( )  
DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_  
INÍCIO DOS SINTOMAS AOS: \_\_\_\_\_ ANOS  
SINTOMAS: \_\_\_\_\_  
DATA DO DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_ INÍCIO DO TRATAMENTO \_\_\_\_\_  
CO-MORBIDADES: HAS ( ) DM ( ) DISLIPIDEMIA ( )  
HIPERHOMOCISTEINEMIA ( ) IRC ( ) DIALÍTICO (\_\_\_\_\_)  
D. ISQ. CORONARIANA ( ) IAM ( ) \_\_\_/\_\_\_ AVE ( ) \_\_\_/\_\_\_  
OUTRAS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
MEDICAMENTOS EM  
USO: \_\_\_\_\_

EXAMES REALIZADOS: ECO DOPPLER ARTERIAL PERIFÉRICO ( )  
ARTERIOGRAFIA ( ) ANGIOTOMOGRAFIA ( ) ECO CARDIOGRAMA ( )  
CATETERISMO CARDÍACO ( )

REALIZOU INTERVENÇÃO CIRÚRGICA? SIM ( ) / NÃO ( ) QUAL E  
QUANDO? \_\_\_\_\_

COMPLICAÇÕES? \_\_\_\_\_

---

REINTERVENÇÃO? SIM ( ) NÃO ( ). QUANTAS VEZES E  
QUANDO? \_\_\_\_\_ -

FAZ USO DE CLOPIDOGREL? SIM ( ) DOSE: \_\_\_\_\_ MG NÃO ( ). POR  
QUANTO TEMPO? \_\_\_\_\_ PAROU? ( ) QUANTO TEMPO? \_\_\_\_\_ INICÍO

ANTES DE INTERVENÇÃO ( ) APÓS INTERVENÇÃO ( ) TRATAMENTO  
CLÍNICO: SIM ( ) NÃO ( )

OBSERVAÇÕES:

## APÊNDICE II

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA**.

Meu nome é \_\_\_\_\_, sou pesquisador (a) responsável pelo projeto. As informações e esclarecimentos a respeito da pesquisa serão repassados e caso aceite participar do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias. A primeira será de guarda e confidencialidade do pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

Qualquer dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a coordenadora responsável **Dra. Katia Karina Verolla de Oliveira Moura** no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail [kkverolli@pucgoias.edu.br](mailto:kkverolli@pucgoias.edu.br). Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que estará sob consulta e com o diagnóstico de aterosclerose (acúmulo de placas de gordura nos vasos sanguíneos) será contatado e informado da pesquisa. Caso aceite deverá assinar o TCLE e caso se recuse ou desista em qualquer momento da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para detecção da variação das doenças genéticas de cada paciente que possam estar relacionadas á alterações vasculares.

III. O objetivo da pesquisa é a detecção da variação das doenças genéticas de cada individuo bem como a detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue coletadas serão analisadas para verificar a presença das variações de cada paciente. Os critérios de inclusão são: pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares, que aceitem responder ao questionário e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os de exclusão são: pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos aos participantes, estando relacionados á acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Caso ocorra qualquer tipo de dano à saúde e à integridade física e/ou psicológica do paciente em decorrência dos procedimentos da pesquisa, este terá atendimento integral e irrestrito garantido pelo pesquisador responsável.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo, você será informado pelo médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento dos pacientes com aterosclerose. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

VII. O material será utilizado somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente estudo, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa. O material após realização dos exames será descartado.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202- setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

IX. Está garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a sua pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a você ou responsável.

X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.

XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente



em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_, de 201\_\_.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante Data

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo Data

## APÊNDICE III

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-GRUPO CONTROLE

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA**.

Meu nome é \_\_\_\_\_, sou o pesquisador (a) responsável pelo projeto. As informações e esclarecimentos a respeito da pesquisa serão repassados e caso aceite participar do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias. A primeira será de guarda e confidencialidade do pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins.

Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

Qualquer dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a coordenadora responsável **Dra. Katia Karina Verolla de Oliveira Moura** no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail [kkverolli@pucgoias.edu.br](mailto:kkverolli@pucgoias.edu.br). Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que esta sob consulta sem diagnostico de aterosclerose baseado em resultados de exames que procuraram o consultório médico para outros tipos de consulta, como varizes, onde foi informado da pesquisa e caso aceite assinará o TCLE-grupo controle. Caso não aceite, ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para detecção da variação das doenças genéticas de cada paciente que possam estar relacionadas á alterações vasculares.

III. O objetivo da pesquisa é a detecção da variação das doenças genéticas de cada individuo bem como a detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue do grupo controle coletadas serão analisadas para verificar a ausência das variações de cada paciente. Os critérios de inclusão são: pacientes maiores de 38 anos, e que não apresentem diagnostico de aterosclerose baseado em resultados de exames de imagem. Os de exclusão são: pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos aos participantes, estando relacionados á acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Caso ocorra qualquer intercorrência o paciente receberá auxílio/assistência no momento da coleta.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo, você será informado pelo médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento dos pacientes com aterosclerose. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

VII. O material será utilizado somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente estudo, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa. O material após realização dos exames será descartado.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202- setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

IX. Está garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem, e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.

XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e

poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_, de 201\_\_.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante Data

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo Data