



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**MESTRADO EM GENÉTICA**

---

**ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO *GSTT1* EM  
PACIENTES COM ATEROSCLEROSE DE GOIÂNIA, GOIÁS.**

---

**JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS**

**Goiânia – GO**

**2016**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**MESTRADO EM GENÉTICA**

---

**ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO *GSTT1* EM  
PACIENTES COM ATEROSCLEROSE DE GOIÂNIA, GOIÁS.**

---

**JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Genética MGENE da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 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**

M386a Martins, José Vitor Magalhães  
Análise molecular do polimorfismo GSTT1 em pacientes  
com aterosclerose de Goiânia, Goiás [manuscrito] /  
José Vitor Magalhães Martins.-- 2016.  
60 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

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 112/2016

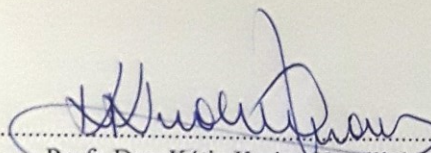
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS

DEFENDIDA EM 09 DE MARÇO DE 2016 E APROVADO COM CONCEITO..... A

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

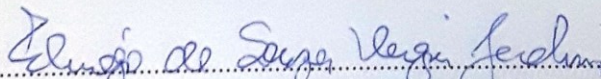
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel / PUC Goiás  
(Membro interno)



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

**Dedico este trabalho...**

*Aos meus pais, José e Ângela e á minha irmã  
Tamara, pelo exemplo de amor e dedicação.*

*“Palavras são incapazes de expressar todo  
sentimento que tenho por vocês”.*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter me propiciado a vida, saúde e perseverança necessárias, para que pudesse me levantar diante de cada queda, e lutar pelos meus objetivos.

Aos meus pais José Raimundo Martins e Ângela Maria Magalhães Martins por me tornarem uma pessoa de caráter, exemplos de dedicação, amizade, companheirismo, afeto, ensinamentos, coragem, a não desanimar, e nunca desistir dos meus sonhos. Enfim por tudo, Amo vocês!

A minha irmã, Tamara Magalhães Martins pelo eterno sentimento de amor e carinho, primos Julia, Kadeu, Tia Clarice, padrinho Júlio, Vovó Lídia e Rosa e Vô Manoel, pela compreensão, carinho e apoio de sempre.

Á minha orientadora *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura* pela confiança, orientação, paciência, apoio e incentivo a pesquisa e pela busca incessante do aprendizado.

Á Débora Acyole Rodrigues e Magda Helena Lagares, Ellen Mayanne, pela amizade, companheirismo, profissionalismo e por estar sempre presente em minha vida.

Á Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de Mestrado, que possibilitou a realização desse estudo. Ao Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por propiciar o ambiente e os materiais necessários para desenvolver esse estudo.

Aos colegas de mestrado, alunos de iniciação científica, pela ajuda e esforço e companheirismo.

De modo geral a todos aqueles que de alguma forma direta ou indiretamente estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Muito obrigado!

# SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| Lista de Figuras                       | v    |
| Lista de Tabelas                       | vi   |
| Lista de Anexos                        | vii  |
| Siglas, Símbolos e Abreviaturas        | viii |
| Resumo                                 | ix   |
| Abstract                               | x    |
| 1. Introdução                          | 11   |
| 1.1 Definição/Patogênese               | 11   |
| 1.2 Epidemiologia                      | 14   |
| 1.3 Componente Genético                | 15   |
| 2. Objetivos                           | 21   |
| 2.1 Objetivos gerais                   | 21   |
| 2.2 Objetivos específicos              | 21   |
| 3. Materiais e métodos                 | 22   |
| 3.1 Casuística                         | 22   |
| 3.2 Extração de DNA Genômico           | 24   |
| 3.3 Reação em Cadeia da Polimerase-PCR | 24   |
| 3.4 Análise Estatística                | 26   |
| 4. Resultados                          | 26   |
| 5. Discussão                           | 35   |
| 6. Conclusão                           | 41   |
| 7. Referências                         | 42   |
| 8. Anexos                              | 53   |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1:</b> Localização do gene <i>GSTT1</i>                   | 17 |
| <b>FIGURA 2:</b> Gel de agarose da genotipagem do gene <i>GSTT1</i> | 27 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela I:</b> Característica molecular do primer <i>GSTT1</i> -NPR.   | 24 |
| <b>Tabela II</b> - Protocolo para a amplificação do polimorfismo do <i>GSTT1</i> para PCR.   | 24 |
| <b>Tabela III</b> - Protocolo de termociclagem para amplificação dos <i>primers GSTT1</i> para técnica de PCR.   | 25 |
| <b>Tabela IV</b> -Distribuição do polimorfismo presente ou nulo do gene <i>GSTT1</i> nos grupos caso e controle.   | 27 |
| <b>Tabela V</b> - Distribuição do polimorfismo <i>GSTT1</i> em relação ao sexo nos grupos caso e controle.   | 28 |
| <b>Tabela VI</b> - Comparação da variável tabagismo com polimorfismo <i>GSTT1</i> no grupo caso e controle.  | 28 |
| <b>Tabela VII</b> - Comparação da variável tabagismo com polimorfismo do gene <i>GSTT1</i> nos grupos caso e controle com relação á quantidade diária de tabaco. | 29 |
| <b>Tabela VIII</b> - Comparação da variável tabagismo com polimorfismo <i>GSTT1</i> nos grupos caso e controle relacionado com o tempo (anos) de tabagismo.      | 31 |
| <b>Tabela IX</b> - Comparação da declaração do consumo de bebida alcoólica no polimorfismo <i>GSTT1</i> nos grupos caso e controle.                              | 33 |

## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO I:** Questionário – Projeto de pesquisa polimorfismos de genes envolvidos no processo de Aterogênese primária

**ANEXO II:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## **SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.**

Segue abaixo a lista na ordem em que as siglas apareceram.

|          |                                       |
|----------|---------------------------------------|
| AI       | Angina Instável                       |
| AMB      | Associação Médica Brasileira          |
| apoE     | Apolipoproteína E                     |
| AVC      | Acidente Vascular Cerebral            |
| DAC      | Doença Arterial Coronariana           |
| DAOP     | Doença Arterial Obstrutiva Periférica |
| Enos     | Síntese do Óxido Nítrico Endotelial   |
| GSTM1    | Glutathione S-transferase mu 1        |
| GSTs     | Glutathione S-Transferase             |
| GSTT1    | Glutathione S-transferase theta 1     |
| HF       | Hipercolesterolemia familiar          |
| IAM      | Infarto Agudo do Miocárdio            |
| IL       | Interleucina                          |
| LDL      | Lipoproteína de baixa densidade       |
| LDL-ox   | Lipoproteína Oxidada                  |
| NPR      | Núcleo de pesquisa REPLICON           |
| OMS      | Organização Mundial de Saúde          |
| SBC      | Sociedade Brasileira de Cardiologia   |
| SUS      | Sistema Único de Saúde                |
| TBE      | Tris-borato de EDTA                   |
| TNF      | Fator de necrose tumoral              |
| UV       | Ultravioleta                          |
| PCR      | Reação em Cadeia da Polimerase        |
| $\chi^2$ | Teste Qui-quadrado                    |

## RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que ocorre pelo acúmulo de lipídios na camada mais interna das artérias (túnica íntima) de médio e grande calibre, esse depósito juntamente com fatores plaquetários estimulam a proliferação das células musculares desta região. Mais de 400 genes podem estar envolvidos com essa patologia, por estarem relacionados com a regulação da função endotelial, coagulação, inflamação, metabolismo dos aminoácidos, lipídios e hidratos de carbono. As Glutathionas S-Transferase (GSTs) são enzimas polimórficas que catalisam a detoxificação de metabólitos produzidos pelo estresse oxidativo dentro da célula, sendo induzidas por espécies reativas de oxigênio. Consideradas como um dos mecanismos de defesa contra os danos do estresse oxidativo. Em virtude de fatores genéticos, culturais e ambientais a doença aterosclerótica se torna acelerada, contudo o diagnóstico precoce é importante para a prevenção e tratamento das diversas complicações que envolvem o processo aterosclerótico. Esse estudo teve por objetivo a análise da frequência dos genótipos do gene *GSTT1* da presença ou ausência do polimorfismo em relação à aterosclerose. Foram coletadas 200 amostras de sangue periférico de pacientes com diagnóstico prévio de aterosclerose baseado em exame clínico e de imagem, e 100 amostras de sangue periférico para grupo controle de pacientes não portadores da doença. O polimorfismo foi avaliado por PCR e analisados em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo. As frequências do polimorfismo do gene *GSTT1* foram comparadas com o teste  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ) e teste G. No grupo caso foram detectados em 85,5% dos pacientes com aterosclerose a presença do gene *GSTT1* e 14,5% dos pacientes o genótipo nulo. Foi verificada uma diferença significativa em ambos os grupos estudados (caso x controle) em relação a presença do polimorfismo do gene *GSTT1*. A frequência do gene *GSTT1* em pacientes com aterosclerose foi de 1,3 vezes maior quando comparado ao grupo controle. Na análise da variável consumo de bebida alcoólica verificou-se que no grupo aterosclerose a presença do gene *GSTT1* foi mais elevada nos indivíduos que relataram não consumir bebida alcoólica. Neste estudo a presença do polimorfismo do gene *GSTT1* em pacientes do sexo masculino com aterosclerose foi de 1,5 vezes maior quando comparado aos pacientes do sexo feminino. Com relação aos anos de tabagismo verificou-se que o genótipo presente foi mais frequente nos indivíduos fumantes em ambos os grupos estudados

**Palavras-Chave:** GSTT1, Polimorfismo, Aterosclerose, PCR.

## ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that occurs by the accumulation of lipids in the innermost layer of the artery (intima) of medium and large caliber, this deposit with platelet factors stimulate the proliferation of muscle cells in this region. More than 400 genes may be involved in this pathology, being related to the regulation of endothelial function, coagulation, inflammation, metabolism of amino acids, lipids and carbohydrates. Glutathione S-Transferase (GST) are enzymes that catalyze the polymorphic detoxification of metabolites produced by oxidative stress within the cells, is induced by reactive oxygen species. Deemed one of the defense mechanisms against oxidative stress damage. Because of genetic, cultural and environmental factors atherosclerotic disease becomes accelerated, however, early diagnosis is important for the prevention and treatment of various complications involving the atherosclerotic process. This study aimed to analyze the frequency of genotypes of GSTT1 gene presence or absence of polymorphism in relation to atherosclerosis. We collected 200 samples of peripheral blood of patients with previous diagnosis of atherosclerosis based on clinical examination and imaging, and 100 peripheral blood samples for the control group of patients without the disease. The polymorphism was assessed by PCR and analyzed on agarose gel and stained with 2% ethidium bromide. The frequency of the GSTT1 gene polymorphisms were compared with  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ) and G. In the case group were detected in 85.5 % of patients with atherosclerosis the presence of the GSTT1 gene and 14.5 % of patients the null genotype . A significant difference was observed in both groups (if x control ) in relation to the presence of the polymorphism of GSTT1 gene. The frequency of the GSTT1 gene in patients with atherosclerosis was 1.3 times higher compared to the control group . In the analysis of the variable consumption of alcohol it was found that in atherosclerosis group the presence of the GSTT1 gene was higher in individuals who reported not drinking alcohol . In this study the presence of the polymorphism of the GSTT1 gene in male patients with atherosclerosis was 1.5 times higher compared to female patients. With respect to years of smoking it was found that this genotype was more frequent in smokers in both groups

**Keywords:** GSTT1, polymorphism, atherosclerosis

# 1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é a principal causa de morte em todo mundo, sua presença inclusive sob formas severas, foi constatada em múmias egípcias há mais de 3.500 anos, sendo assim, não deve ser considerada uma doença nova ou com características de tempos modernos (Ruffter, 2005).

O primeiro relato de *angina pectoris*, ou dor torácica, definição clínica de origem coronariana conhecida nos tempos atuais foi descrita por Heberden em 1786 (Macruz, 1976).

A expressão aterosclerose foi referida por Felix Marchand, patologista alemão, que caracterizou como lesões das grandes e médias artérias com depósitos de placas e matéria lipóide que contêm colesterol (Dorland, 1966).

Monckeberg em 1915 relatou após exames relacionados às artérias coronarianas em 140 soldados da 1ª guerra mundial com idade média de 27 anos, lesões típicas em artérias coronarianas em 50% deles, ficando evidente a possibilidade de ocorrência em indivíduos jovens (Giannini, 2000).

Já na década de 50 e 60 diversos pesquisadores estabeleceram a história natural da aterosclerose baseado em dados de necropsias que demonstravam relação entre distúrbios cardiovasculares e doenças ateroscleróticas (Giannini, 2000).

Introncasso, (2001) destaca a doença arterial coronariana (DAC) e o acidente vascular cerebral (AVC), como principais sequelas da aterosclerose, contudo esta só passou a ser reconhecida como problemas de saúde no início do século.

Diversos fatores como a eliminação de doenças infecciosas, mudanças no estilo de vida, provocou um aumento da expectativa de vida e um maior conhecimento destas patologias por parte da classe médica (Introncasso, 2001).

## 1.1 Definição/patogênese

A palavra aterosclerose deriva do grego *atero*, que significa caldo ou pasta, e *esclerose*, que corresponde a endurecimento (Gottlieb et al., 2005). A

aterosclerose é uma doença lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas (Hackam, 2003).

Caracterizada como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial ocorre em resposta à agressão endotelial e acomete principalmente, a camada íntima de artérias de médio e grande calibre decorrentes de uma inflamação progressiva na parede dos vasos sanguíneos resultando no acúmulo de lipoproteínas e turbulências hemodinâmicas (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

A agressão do endotélio vascular leva à formação da placa aterosclerótica que pode ser desencadeada por fatores como a dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013). Este problema se tornou a principal causa de morte na civilização moderna envolvendo diversos aspectos decorrentes do estilo de vida entre eles a alimentação irregular, ingestão de bebidas alcoólicas em excesso, estresse cotidiano, hereditariedade e o sedentarismo (Cotran,1987; Ross et al., 1992; Morais,2009).

Dentre os principais sítios da doença que pode afetar qualquer artéria destacam-se: a aorta e as artérias coronarianas e cerebrais, tendo como principais consequências o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico (Gottlieba et al.,2005).

A disfunção endotelial por sua vez aumenta a permeabilidade da camada íntima de artérias de médio e grande calibre às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. As partículas das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) retidas sofrem então oxidação, causando a exposição de diversos neoepitopos e tornando-as imunogênicas (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

O início da aterogênese ocorre então de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas depositadas na parede arterial presentes no plasma. Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, ocorre o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial que são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a intimidade da parede arterial (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013). Os monócitos são induzidos por proteínas quimiotáticas que migram para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos e captam as LDL-ox, estes que contem os

lípidos que são os principais componentes das estrias gordurosas, que se caracterizam por lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Baigent et al., 2011).

Uma vez ativados, os macrófagos são, em grande parte, responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica mediante a secreção de citocinas, que amplificam a inflamação, e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

Outras células inflamatórias participam do processo aterosclerótico os linfócitos T, que desempenham uma importante função na aterogênese estas que podem se diferenciar e produzir citocinas que modulam o processo inflamatório local (Hansson, 2005).

Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (Horton et al., 2009; Steinberg et al., 2009).

Diversas interações entre plaquetas, macrófagos, linfócitos T, moléculas de adesão, células do músculo liso e componente genético têm sido documentadas e provavelmente promovem o ambiente de inflamação e crescimento necessário para provocar a injúria endotelial (Gottlieb, et al. 2005).

As placas instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico e necrótico proeminente e capa fibrótica tênue (Libby, 2005). A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo conhecido por aterotrombose, sendo um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose. Estas placas caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico e necrótico de proporções menores (Horton, et al., 2009; Catapano et al., 2011).

Geralmente manifestações agudas como a angina instável (AI) e o Infarto agudo do miocárdio (IAM), são desencadeadas através de uma desestabilização da placa aterosclerótica, com redução significativa da luz do



vaso devida á formação local do trombo contribuindo assim para o desenvolvimento da doença (Gottlieb et al., 2005).

As lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL) apresentam um importante papel na etiologia da doença aterosclerótica, apesar de que, muitos indivíduos desenvolvem doenças cardiovasculares na ausência de anormalidades no perfil das lipoproteínas (Libby, 2002).

## **1.2 Epidemiologia**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no início do século XX, a doença cardiovascular foi responsável por menos de 10% das mortes em todo o mundo e ao final deste século, corresponde a 50% de todas as mortes em países desenvolvidos e 25% em países em desenvolvimento (Almeida et al.,2003) O crescimento acelerado da doença em países em desenvolvimento representa uma das questões de saúde pública mais relevantes no momento (Libby et al.,2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde em 2002 ocorreram 16 milhões de óbitos, desses 7,2 milhões foram relacionados a doenças cardiovasculares. Estima-se para 2020 um aumento entre 35 e 40 milhões de óbitos (Guimarães, 2006). As doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 15 milhões de óbitos a cada ano em todo o mundo, apesar das modernas estratégias preventivas e terapêuticas, representando os mais altos custos em assistência médica (Lopes, 1993; Murray et al.,1996; Hajjar et al.,2006; Libby et al.,2010).

A ocorrência de um evento coronariano agudo em pelo menos metade dos indivíduos é a primeira manifestação clínica da doença aterosclerótica. Contudo é fundamental a identificação dos indivíduos assintomáticos a fim de, uma prevenção efetiva com a correta definição das metas terapêuticas individuais (Wilson et al.,1998)

No Brasil entre 2000 á 2009 as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 65% dos óbitos na população adulta em plena fase laboral, entre 30 a 69 anos, e por 40% das aposentadorias precoces (Nogueira et al.,2010).

A doença obstrutiva periférica, (DAOP), está cada vez mais prevalente na sociedade moderna devido ao aumento da expectativa de vida da população. Em 2010 cerca de 200 milhões de pessoas no mundo foram acometidos por esta patologia (Fowkers et al.,2013).

Um conjunto de fatores de risco clássicos e emergentes tem sido correlacionado á patogenia da doença (Gottlieba, et al.2005). Entretanto quanto maior a existência destes fatores, maior será a probabilidade do individuo apresentar um evento cardiovascular. Quanto menor o controle dos hábitos de vida com a redução do numero de fatores modificadores associados, maior será a redução do risco (Braunwald et al.,2003 e Lanas et al.,2007)

Os fatores de risco podem ser divididos em modificáveis (ambientais e comportamentais) como o tabagismo, colesterol sérico elevado, hipertensão arterial sistêmica, inatividade física, diabetes, obesidade, estresse mental, uso de anticoncepcional e obesidade abdominal: e fatores de risco não modificáveis (genéticos e biológicos) tais como a hereditariedade, sexo e idade avançada (Polanczyk, 2005 e Herrmann et al.,2006)

Dentre os fatores de risco citados a hipertensão e o diabetes estão relacionados a acidentes cerebrovasculares (AVC) devido à interrupção do fluxo sanguíneo ou redução nas artérias cerebrais sendo que atualmente, é a terceira maior causa de morte no mundo (Turkanoglu et al, 2010).

### **1.3 Componente Genético**

A Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013, destaca que vários genes têm sido associados a doenças cardiovasculares nos últimos anos. O uso de genotipagem para estimativa de risco não é recomendado, no entanto, estudos sugerem que no futuro ela poderá ser utilizada para a identificação de indivíduos de alto risco. No diagnóstico de algumas hiperlipidemias geneticamente determinadas, a genotipagem da apolipoproteína E (apo-E) e/ou de genes associados à Hipercolesterolemia familiar (HF) pode ser considerada (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013). De tal forma, as doenças de cunho genético podem ser investigadas através do uso de marcadores moleculares

visto que o procedimento é realizado de forma não invasiva (Lekawa-Ilczuk et al., 2011).

Mais de 400 genes podem estar envolvidos á esta patologia, podendo assim estar relacionados á regulação da função endotelial, lipídios, hidratos de carbono, inflamação, metabolismo dos aminoácidos e a coagulação. Com relação aos genes envolvidos destacam-se: *CYP1A*, *GSTs*, *Apo-E* e o *ENOS* (Marinković et al., 2013; Marques e Sá, 2011).

Alguns genes e proteínas estão relacionados com metabolização e ou detoxificação de xenobióticos, que são usualmente utilizados em estudos de marcadores potenciais de suscetibilidade para desenvolvimento de várias doenças, inclusive câncer, nestas onde a etiologia está relacionada á exposição ambiental (Young et al., 2010).

Genes que codificam as enzimas de ativação (reação de fase I) ou detoxificação (reação de fase II) de xenobióticos são alvos potenciais para estudos de suscetibilidade genética. Muitos estudos mostram que a detoxificação celular feita por enzimas está relacionada com a proteção celular. (Young et al., 2010).

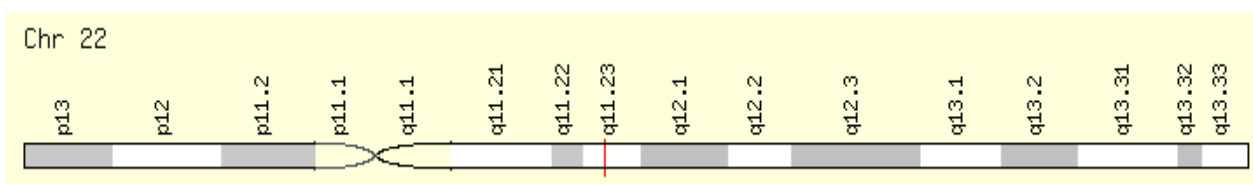
As *GSTs*, Glutathione S-transferase, compreendem uma família de enzimas multifatoriais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (*GSH*) a compostos que apresentam um hidrogênio, um carbono, ou um átomo de enxofre eletrofílico. Em mamíferos são encontradas três famílias de *GST*: mitocondrial, microssomal e citossólica (Bolth e Their, 2006).

Foram identificadas sete classes distintas nas *GSTs*, diferenciadas pelas sequências de aminoácidos: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta, sendo a última classe ligada à membrana. Dentre as proteínas citosólicas as *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, são as que possuem maior correlação com a suscetibilidade ao câncer (Tsai et al., 2005).

Em humanos são classificadas em quatro grupos *GST-α* (A), *GST-μ* (M), *GST-π* (P), *GST-θ* (T), de acordo com a especificidade do substrato, afinidade química, estrutura, sequência de aminoácidos e comportamento cinético da enzima. Os genes que codificam a isoenzima *GSTT1* podem apresentar alelos nulos resultante da deleção do gene, resultando assim na diminuição de sua atividade enzimática. Em caucasianos a frequência dos genótipos nulos do *GSTM1* varia de 42 a 60% e do *GSTT1* de 13 a 26% (Turkanoglu et al., 2010).

A subfamília da GST da classe Theta, consiste em 2 genes, GSTT1 e GSTT2, localizados no cromossomo 22q11.2 (Figura 1) e separados por aproximadamente 50kb. Com cinco divisões idênticas de intron/éxon, ambos os genes possuem 5 éxons mas possuem apenas 55% da identidade de aa. A falta de proteínas ativas no gene GSTT1 faz com que ele apresente um polimorfismo nulo (Young et al., 2010).

Além disso, o gene GSTT1 pode ser excluído do genoma gerando alelo ou genótipo nulo este que pode provocar mudanças na capacidade metabólica dos indivíduos contribuindo para sua diferenciação na população (Hayes e Strange, 2000). Os indivíduos que possuem o genótipo nulo não tem atividade enzimática nula sendo que este genótipo aumenta o risco de acúmulo de toxinas nas células podendo provocar dano ao DNA, levando o aparecimento de alguma doenças (Kvitko et al., 2012).



**Figura 1:** Localização do gene GSTT1 (representado em vermelho)

Fonte: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTT1>.

As enzimas GSTs são de fase II, desempenhando assim funções como a metabolização de drogas que protege a célula contra metabólitos endógenos e exógenos através da conjugação da Glutathiona endógena com compostos eletrofílicos, desativando assim sua citotoxicidade. As GSTs estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos incluindo carcinógenos ambientais, espécies reativas de oxigênio e agentes terapêuticos. A enzima GSTT1 detoxifica pequenos hidrocarbonetos reativos, como o óxido de etileno (Kvitko et al., 2008;Norskov et al., 2011).

Esses hidrocarbonetos causam mutações no DNA, promovendo transformações celulares e clones proliferativos, presentes na fumaça do cigarro estando assim envolvidos na carcinogênese e aterogênese (Marinkovic et al.,2013).

As espécies eucarióticas apresentam múltiplas isoenzimas da Glutathione S-Transferase, entretanto, existem diferenças relativas quanto aos níveis de expressão e distribuição nos tecidos, influenciando na formação de heterodímeros. A GSTM1 encontra-se expressa no fígado onde ocorre a formação de heterodímeros entre a classe GSTM1, e outra classe como, por exemplo, a GSTT1 (Pettigrew et al., 2001).

As GSTs são enzimas polimórficas que catalisam a detoxificação de metabólitos produzidos pelo estresse oxidativo dentro da célula, sendo induzidas por espécies reativas de oxigênio. Estas enzimas desempenham funções relacionadas á mecanismos de defesa contra os danos do estresse oxidativo (Turkanoglu et al., 2010).

O estresse oxidativo apresenta um importante papel na aterosclerose, uma vez que ele promove a liberação excessiva de radicais livres induzindo a disfunção endotelial, oxidação do LDL aumenta a fosforilação da tirosina quinase, afeta a produção do fator nuclear kappa B e fatores ativadores da transcrição da proteína-1. Estando todos estes processos e moléculas envolvidos no processo da aterogênese. (Zivkovic et al, 2014; Turkanoglu et al, 2010).

Contudo o estresse oxidativo pode induzir a expressão de genes relacionados à inflamação que é um mecanismo bastante comum aos fatores de risco tradicionais que pode levar ao desenvolvimento da aterosclerose (Alexander, 1995). Sendo assim sob a ação de inúmeros fatores, as células liberam uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio resultando no estresse oxidativo este que promove a formação da placa de aterosclerose e sua ruptura pode ocasionar o acidente vascular cerebral isquêmico (Dazhong et al., 2012).

Reis, 2010 destaca que devido à heterogeneidade genética do conjunto de genes humanos, o nível de expressão de muitas das enzimas responsáveis pelas reações de detoxificação pode variar muito em diferentes indivíduos (Reis, 2010). Contudo como os genes que expressam as enzimas de GST são polimórficos tornando assim possível que as variações individuais na atividade metabólica de cada enzima promovam intermediários tóxicos ao DNA, e estes podem ser parcialmente responsáveis pelo risco individual de dano ao stress oxidativo nas células  $\beta$  (Wang et al., 2006).

Alguns polimorfismos de genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos estão relacionados com o desenvolvimento de câncer, aterosclerose e Diabetes mellitus tipo 2. (Reis, 2010; Koch et al., 2010; Farbstein et al., 2010; Wang et al., 2006). Considerada como a principal enzima detoxificante da fase II, a Glutathione S-Transferase, desempenha um papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares (Wang et al., 2006).

Estudos demonstram que a ausência de uma ou mais formas de GST ou variantes alélicas que expressam diferentes combinações destas enzimas são mais susceptíveis ao estresse químico, o qual contribui na disfunção celular (Wang et al., 2006). Além disso, diversos autores associam os polimorfismos GSTM1 e GSTT1 responsáveis pelo desenvolvimento de vários tumores uma vez que se encontram expressos em locais como o pulmão, pescoço, cabeça, mama, bexiga, fígado, rins, estômago, ovário, músculo esquelético, coração, veias, artérias e próstata (Hussey et al.,1991; Ramalhinho, 2001; Pettigrew et al.,2001; Rosario,2007; Talat et al.,2009; Kwon,2011).

Em um estudo de associação entre os níveis de estresse oxidativo e a inflamação na aterosclerose realizada na população chinesa observou-se a presença dos genótipos GSTM1 e GSTT1, modificando o risco de desenvolver a aterosclerose. Visto que, as GSTs desempenham funções como a defesa do organismo contra agentes oxidativo, tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Sendo assim as duas classes da GST podem evitar a formação das placas ateroscleróticas de tal forma que a proteína das GSTs catalisará a conjugação dos eletrólitos modulando a lesão oxidativa ou inflamação (Oliveira, 2008).

A interação de componentes genéticos, ambientais e a resposta inflamatória baseados em evidencias científicas têm demonstrado que mecanismos envolvidos na gênese da doença aterosclerótica são extremamente complexos (Ross,1976, Stein et al.,2002; Hulthe,2002; Libby,2002; Hackam,2003).

Em virtude de fatores genéticos, culturais e ambientais a doença aterosclerótica se torna acelerada, contudo o diagnostico precoce é importante para a prevenção e tratamento das diversas complicações que envolvem o processo aterosclerótico (Kauffman, 2007).

A viabilidade de efetivar terapias para a prevenção de doenças cardiovasculares e seus desfechos negativos, traduz-se em uma necessidade de identificar indivíduos de baixo, médio e alto risco, dentro de uma determinada população para a aplicação de intervenções eficazes, antes dos problemas manifestarem-se visto que muitos indivíduos desenvolvem doença cardiovascular na ausência de outros fatores de risco (Gottlieba, et al.,2005).

Sendo assim faz-se necessário o entendimento da biologia básica da inflamação da aterosclerose a fim de proporcionar um melhor suporte clínico que poderá alterar o caminho da prática da medicina preventiva e propiciar benefícios para a saúde pública (Gottlieba, et al.2005).

Esse estudo teve por objetivo a análise da frequência dos genótipos do gene *GSTT1* da presença ou ausência do polimorfismo em relação à aterosclerose.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar o polimorfismo do gene *GSTT1* em um grupo de pacientes com aterosclerose e um grupo controle sem a doença na cidade de Goiânia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar o polimorfismo do gene *GSTT1* no grupo caso e no grupo controle;
- Verificar qual é o genótipo mais frequente relacionado á aterosclerose na população estudada;
- Verificar possíveis associações entre o genótipo *GSTT1* e os fatores de risco para a doença: gênero, hábito de ingerir bebida alcoólica e hábito de fumar.



## **3.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Casuística**

O estudo foi do tipo caso-controle. Foram coletadas 200 amostras de sangue periférico de pacientes com diagnóstico prévio de aterosclerose baseado em exame clínico e de imagem, e 100 amostras de sangue periférico para grupo controle de pacientes não portadores da doença.

As amostras de sangue foram coletadas no período de outubro de 2014 a fevereiro de 2015 de pacientes referenciados ao serviço de cardiologia e cirurgia vascular periférica da Clínica Angiogyn no município de Goiânia, esta que atende pacientes tanto da rede privada como do Sistema Único de Saúde (SUS).

As amostras de sangue periférico coletadas foram submetidas a testes moleculares a fim de verificar presença dos polimorfismos do gene GSTT1. A análise genética molecular foi realizada no núcleo de Pesquisas Replicon-PUC-Goiás. Como controle positivo para o gene foi utilizado DNA de indivíduo com a presença confirmada dos polimorfismos para o gene GSTT1.

Os critérios de inclusão na pesquisa foram pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares intervencionistas (angiografia) que aceitaram responder ao questionário (anexo I) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O diagnóstico prévio da doença aterosclerótica foram baseados em exame clínico e confirmados através dos exames de imagem (Eco color Doppler, angiotomografia e/ou angiografia digital, angiotomografia e/ou cine-angiocoronariografia) indicados de acordo com a clínica de cada paciente. Os critérios de exclusão são os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

Para o grupo controle os critérios de inclusão foram indivíduos com idade superior à 38 anos, e que não apresentaram diagnóstico da 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 Doppler). Os

de exclusão foram os indivíduos 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 Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC GOIAS. (Número: 35321614.3.0000.0037). Todos os pacientes responderam a um questionário (anexo I) com dados relativos a nome, hábito de fumar, hábito de ingerir bebida alcoólica, etnia, medicamentos em uso, exames realizados e intervenção cirúrgica, bem como assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (anexo II).

Publicações baseadas em consensos ou opiniões de especialistas definem como fumante (tabagista) toda pessoa que faz uso regular de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado, independentemente do tempo em que fuma. Além disso, é definido como ex-fumantes (ex-tabagista) o indivíduo que, no passado, fez uso de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado e, que atualmente, não fuma (AMB, 2013).

Estudos experimentais e observacionais destacam que o risco de um evento cardíaco agudo é reduzido pela metade após um ano de cessação do tabagismo e se iguala ao da população não fumante após 15 anos sem fumar (Critchley et al.,2003). Sendo assim foi definido em nosso estudo realizado na população de Goiânia como paciente ex-fumante todo aquele cujo período de cessação do tabagismo foi igual ou superior a 15 anos.

No grupo caso dois pacientes não relataram há quanto tempo pararam de fumar e apenas um paciente relatou ser fumante passivo durante toda a vida, e que nunca fumou. Dois pacientes do grupo caso relataram fazer uso de 02 cigarros de palha/dia, além disso, 15 pacientes deste mesmo grupo que relataram fumar não informaram durante a pesquisa a quantidade diária de cigarros, os resultados não foram incluídos na tabela VII, 02 pacientes do grupo caso que relataram fumar e um paciente considerado ex-fumante não informaram durante a pesquisa o tempo de uso. Os resultados não foram incluídos na tabela VIII.

No grupo controle dois pacientes não relataram há quanto tempo pararam de fumar. Nove pacientes pertencentes a este grupo relataram fumar e 02 pacientes considerados ex-fumantes, não responderam ao questionário

com relação à quantidade diária de cigarros. Apenas um paciente relatou fazer uso de cachimbo, os resultados não foram incluídos na tabela VII. Três pacientes não relataram há quanto tempo fumam os resultados não foram incluídos na tabela VIII.

### **3.2 Extração de DNA genômico**

A extração de DNA das amostras coletadas de sangue periférico foram realizadas de acordo com as instruções do kit Kaswi® (Genomic DNA Purification Kit), no Laboratório do Núcleo de pesquisas Replicon – PUC-Goiás. Por conseguinte, foram submetidas á quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus de acordo com as instruções do fabricante, 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**

Após a extração do DNA as amostras foram submetidas à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) para detectar o polimorfismo do gene *GSTT1*, em capela de fluxo laminar buscando a minimização da contaminação, sendo o volume final foi de 25uL, de acordo com o protocolo proposto por Frare (2011).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por Frare (2011). Como controle positivo para reação de PCR foi utilizado DNA de individuo com a presença confirmada do polimorfismo *GSTT1*.

Para o estudo do polimorfismo dos genes *GSTT1* a ausência de amplificação indica genótipo nulo e a presença da amplificação confirma que o indivíduo possui pelo menos um dos genes presente, sempre em duplicata, sendo considerado genótipo nulo após três vezes de repetição com o mesmo resultado.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em solução Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x, em um campo elétrico de 10 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio (5mg/mL) sendo visualizada em seguida no sistema de vídeo-documentação gel doc Gel Doc™ XR+ System.

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

**Tabela I:** Característica molecular do primer *GSTT1*-NPR

|              |  |       |
|--------------|--|-------|
| <i>GSTT1</i> | F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'<br>R: 5' TCACCGGATGGCCAGCA 3' | 480pb |
|--------------|--|-------|

Legenda: NPR; Núcleo de Pesquisas Replicon.

O protocolo utilizado para amplificação do polimorfismo do *GSTT1* foi especificado na tabela II e o protocolo de termociclagem especificado na tabela III.

**Tabela III** - Protocolo para a amplificação do polimorfismo do *GSTT1* para PCR.

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

Para a realização da PCR para o gene *GSTT1* foi utilizado 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/µL de DNA genômico. (Tabela II). Para o protocolo de termociclagem do gene *GSTT1* 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 III).

**Tabela III** - Protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers GSTT1* para técnica de PCR.

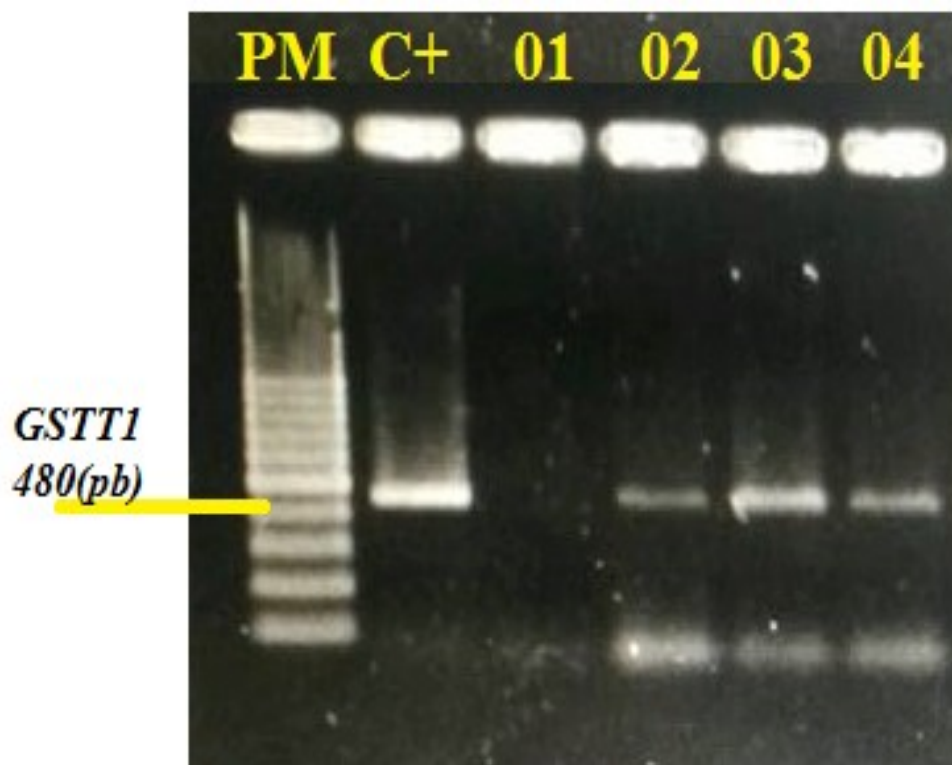
|                      | Temperatura (°C) | Tempo (minutos) | Ciclos |
|----------------------|------------------|-----------------|--------|
| Desnaturação inicial | 94°C             | 5               | 1      |
| Desnaturação         | 94°C             | 1               |        |
| Anelamento    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

### 3.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos com a análise do polimorfismo do gene *GSTT1*, dos grupos em estudo foram tabulados em planilhas do software Excel® (2010). Posteriormente foi aplicado o Teste qui-quadrado e Teste G quando necessário para verificação de possíveis associações entre a análise molecular do polimorfismo e a aterosclerose. Para a realização estatística dos testes foi utilizado o programa BioEstat® 5.3 (Sociedade Civil Mimirauá / MCT-CNPq).

## 4.0 RESULTADOS

A distribuição do polimorfismo do gene *GSTT1* foi analisada no grupo caso (paciente com aterosclerose) e no grupo controle (pacientes sem a doença) (Figura 2) conforme descrito na tabela IV. Sendo que a idade média encontrada nos pacientes do grupo caso estudada (n=200) foi de  $\pm 61$  anos; já no grupo controle (n=100) a idade média dos pacientes foi de  $\pm 50$  anos.



**FIGURA 2:** Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, indicando o resultado da genotipagem do gene *GSTT1* (480pb). C+: controle positivo; Poço 01 ausência de banda indicando *GSTT1* nullo; Poço 02,03,04 *GSTT1* positivo.

No grupo caso (n=200) foram detectados em 85,5% (171/200) dos pacientes com aterosclerose a presença do gene *GSTT1* e 14,5% (29/200) dos pacientes, apresentaram o genótipo nulo. No grupo controle (n=100) foi detectada em 65% (65/100) dos pacientes a presença do gene *GSTT1* e em 35% (35/100) o genótipo nulo. A frequência do gene *GSTT1* presente em pacientes com aterosclerose foi de 1,3 vezes maior quando comparado ao grupo controle, sendo esta diferença estatística, significativa,  $p < 0,0001$ .

**Tabela IV**-Distribuição do polimorfismo presente ou nulo do gene *GSTT1* nos grupos caso e controle.

| Polimorfismo | Presente |      | Nulo |      | Total |     | <i>p</i> * |
|--------------|----------|------|------|------|-------|-----|------------|
|              | N        | %    | n    | %    | N     | %   |            |
| Caso         | 171      | 85,5 | 29   | 14,5 | 200   | 100 | <0,0001    |
| Controle     | 65       | 65,0 | 35   | 35,0 | 100   | 100 |            |

*p*\*= Teste qui-quadrado

A distribuição do polimorfismo do gene *GSTT1*, nos indivíduos do sexo masculino e feminino nos grupos estudados pode ser observada na tabela V.

O polimorfismo presente do gene *GSTT1* nos indivíduos do sexo masculino no grupo caso corresponde a 89% (81/91) e 11% (10/91) o genótipo nulo. No grupo controle o gene está presente em 56,6% (30/53) dos pacientes e 43,4% (23/53) apresentaram o genótipo nulo. Este resultado é considerado significativo,  $p = 0,005$ . A frequência da presença do polimorfismo do gene *GSTT1* em pacientes do sexo masculino com aterosclerose foi de 1,5 vezes maior quando comparado aos pacientes do sexo feminino.

No sexo feminino a presença do polimorfismo do gene *GSTT1* encontrada foi de 82,6% (90/109) no grupo caso e em 17,4% (19/109) o genótipo nulo; No grupo controle em 74,5% (35/47) dos pacientes o gene está presente e 25,5% (n=12/47) apresentou o genótipo nulo. Esse resultado não é considerado estatisticamente significativo ( $p=0,224$ ).

**Tabela V-** Distribuição do polimorfismo *GSTT1* em relação ao sexo nos grupos caso e controle

| Sexo             | Presente |      | Nulo |      | Total |       | <i>p</i> * |
|------------------|----------|------|------|------|-------|-------|------------|
|                  | N        | %    | n    | %    | N     | %     |            |
| <b>Masculino</b> |          |      |      |      |       |       |            |
| Caso             | 81       | 89,0 | 10   | 11,0 | 91    | 100,0 | 0,005      |
| Controle         | 30       | 56,6 | 23   | 43,4 | 53    | 100,0 |            |
| <b>Feminino</b>  |          |      |      |      |       |       |            |
| Caso             | 90       | 82,6 | 19   | 17,4 | 109   | 100,0 | 0,224      |
| Controle         | 35       | 74,5 | 12   | 25,5 | 47    | 100,0 |            |

*p*\* Teste Qui-quadrado

Foi comparado o habito de fumar dos pacientes do grupo aterosclerose e grupo controle e sua relação com o polimorfismo do gene *GSTT1* (Tabela VI).

**Tabela VI-** Comparação da variável tabagismo com polimorfismo *GSTT1* no grupo caso e controle.

| Variáveis/<br>Grupos | Tabagismo |      |             |      |            |      | <i>p</i> |
|----------------------|-----------|------|-------------|------|------------|------|----------|
|                      | Fumante   |      | Nunca Fumou |      | Ex Fumante |      |          |
|                      | N         | %    | n           | %    | n          | %    |          |
| <b>Caso</b>          |           |      |             |      |            |      |          |
| Presente             | 59        | 84,3 | 75          | 88,2 | 35         | 81,4 | 0,5578*  |
| Nulo                 | 11        | 15,7 | 10          | 11,8 | 08         | 18,6 |          |
| Total                | 70        | 100  | 85          | 100  | 43         | 100  |          |
| <b>Controle</b>      |           |      |             |      |            |      |          |
| Presente             | 17        | 68   | 37          | 60   | 09         | 82   | 0,3068** |
| Nulo                 | 08        | 32   | 25          | 40   | 02         | 18   |          |
| Total                | 25        | 100  | 62          | 100  | 11         | 100  |          |

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

Na análise dos 70 pacientes do grupo aterosclerose que declararam fumar, foram detectados em 84,3% (59/70) a presença do gene *GSTT1* e 15,7% (11/70) apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo. No grupo aterosclerose em 85 pacientes que relataram nunca fumar foram detectados em 88,2% (75/85) a presença do genótipo *GSTT1* nulo. Dos 43 pacientes considerados ex-fumantes, foram detectados em 81,4% (35/43) a presença do gene *GSTT1*,



e em 18,6% (08/43) a presença do genótipo *GSTT1* nulo, não sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,5578$ ), (Tabela VI).

Na análise dos 25 pacientes do grupo controle com o hábito de fumar, foram detectados em 68% (17/25) a presença do gene *GSTT1* e 32% (08/25) dos pacientes apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo. No grupo controle em 62 pacientes que relataram nunca fumar, foram detectados em 60% destes (37/62) a presença do gene *GSTT1* e em 40% (25/62) o genótipo *GSTT1* nulo. Já nos 11 pacientes considerados ex-fumantes ( $\geq 15$  anos) foram detectados em 82% (08/11) a presença do gene *GSTT1* e em 18% (2/11) o genótipo *GSTT1* nulo, não sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,3068$ ).

**Tabela VII-** Comparação da variável tabagismo com polimorfismo do gene *GSTT1* nos grupos caso e controle com relação à quantidade diária de tabaco.

| Variáveis/<br>Grupos | Tabagismo             |     |            |      |                   |     |            |     |
|----------------------|-----------------------|-----|------------|------|-------------------|-----|------------|-----|
|                      | <i>GSTT1</i> PRESENTE |     |            |      | <i>GSTT1</i> NULO |     |            |     |
|                      | Fumante               |     | Ex-Fumante |      | Fumante           |     | Ex-Fumante |     |
|                      | N                     | %   | n          | %    | n                 | %   | n          | %   |
| <b>Caso</b>          |                       |     |            |      |                   |     |            |     |
| 05 - 10              | 05                    | 12  | 11         | 35   | 02                | 20  | 03         | 30  |
| 10 - 20              | 14                    | 32  | 09         | 28   | 05                | 50  | 02         | 20  |
| 20 ou mais           | 24                    | 56  | 12         | 37   | 03                | 30  | 05         | 50  |
| Total                | 43                    | 100 | 32         | 100  | 10                | 100 | 10         | 100 |
| $p^*$                | 0,0537*               |     |            |      | 0,3615**          |     |            |     |
| <b>Controle</b>      |                       |     |            |      |                   |     |            |     |
| 05 - 10              | 0                     | 0   | 01         | 12,5 | 01                | 14  | 0          | 0   |
| 10 - 20              | 08                    | 90  | 05         | 62,5 | 04                | 57  | 0          | 0   |
| 20 ou mais           | 01                    | 11  | 02         | 25   | 02                | 29  | 0          | 0   |
| Total                | 09                    | 100 | 08         | 100  | 07                | 100 | 0          | 100 |
| $p^*$                | 0,3064**              |     |            |      | 1,000**           |     |            |     |

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

A tabela VII analisa a distribuição do polimorfismo do gene *GSTT1* entre pacientes fumantes e ex-fumantes ( $>15$  anos) no grupo aterosclerose e controle com relação à quantidade diária de tabaco.

No grupo caso em 43 pacientes o gene *GSTT1* está presente nos indivíduos que fazem o uso do tabaco. Destes, 12% (05/43) relataram fumar entre 5 a 10 cigarros, 32% (14/43) entre 10 a 20 cigarros e 56% (24/43) 20 ou mais cigarros diariamente. Enquanto que em 32 pacientes pertencentes ao mesmo grupo (caso) o gene *GSTT1* também está presente em indivíduos

considerados ex-fumantes ( $\geq 15$  anos). Destes, 35% (11/32) fumaram entre 5 a 10 cigarros, 28% (09/32) entre 10 a 20 cigarros e 37% (12/32) 20 ou mais cigarros diariamente, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0537$ ).

Em indivíduos que fazem uso do tabaco, 10 pacientes pertencentes ao grupo aterosclerose (caso) apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo. Destes, 20% (02/10) relataram fumar entre 5 a 10 cigarros, 50% (05/10) entre 10 a 20 cigarros e 30% (03/10) 20 ou mais cigarros diariamente. Enquanto que em 10 pacientes pertencentes ao mesmo grupo (caso) o genótipo *GSTT1* nulo também está presente em indivíduos considerados ex-fumantes ( $\geq 15$  anos). Destes, 30% (03/10) relataram fumar entre 5 a 10 cigarros, 20% (02/10) entre 10 a 20 cigarros e 50% (05/10) 20 ou mais cigarros diariamente, sendo esta diferença estatisticamente não significativa ( $p=0,3615$ ).

Dos 09 pacientes que fazem o uso do tabaco pertencente ao grupo controle o gene *GSTT1* está presente. Destes, nenhum relatou fumar entre 5 a 10 cigarros, 90% (08/09) entre 10a 20 cigarros e apenas 11% (01/09) 20 ou mais cigarros diariamente. Enquanto que em 08 pacientes pertencentes ao mesmo grupo (controle) o gene *GSTT1* também está presente em indivíduos considerados ex-fumantes ( $\geq 15$  anos). Destes 12,5% (01/08) relataram fumar entre 5 a 10 cigarros, 62,5% (05/08) entre 10 a 20 cigarros e 25% (02/08) 20 ou mais cigarros diariamente, sendo esta diferença estatisticamente não significativa ( $p=0,3064$ ).

Em indivíduos que fazem uso do tabaco, 07 pacientes pertencentes ao grupo controle apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo. Destes, 14% (01/07) relataram fumar entre 5 a 10 cigarros, 57% (04/07) entre 10 a 20 cigarros e 29% (02/07) 20 ou mais cigarros diariamente. Enquanto que nenhum paciente do grupo controle considerado ex-fumante ( $\geq 15$  anos) apresentou o genótipo *GSTT1* nulo, sendo esta diferença estatisticamente não significante ( $p=1,000$ ).

**Tabela VIII-** Comparação da variável tabagismo com polimorfismo *GSTT1* nos grupos caso e controle relacionado com o tempo (anos) de tabagismo.

| Variáveis/<br>Grupos | Tabagismo             |     |            |     |                   |     |            |     |
|----------------------|-----------------------|-----|------------|-----|-------------------|-----|------------|-----|
|                      | <i>GSTT1</i> PRESENTE |     |            |     | <i>GSTT1</i> NULO |     |            |     |
|                      | Fumante               |     | Ex-Fumante |     | Fumante           |     | Ex-Fumante |     |
|                      | N                     | %   | n          | %   | n                 | %   | n          | %   |
| <b>Caso</b>          |                       |     |            |     |                   |     |            |     |
| <10 anos             | 02                    | 4,0 | 06         | 17  | 0                 | 0   | 0          | 0   |
| 10 a 20 anos         | 03                    | 6,0 | 13         | 37  | 03                | 20  | 03         | 43  |
| >20 anos             | 48                    | 90  | 16         | 46  | 12                | 80  | 04         | 57  |
| Total                | 53                    | 100 | 35         | 100 | 15                | 100 | 07         | 100 |
| <i>p</i> *           | <0,001*               |     |            |     | 0,5468*           |     |            |     |
| <b>Controle</b>      |                       |     |            |     |                   |     |            |     |
| <10 anos             | 02                    | 15  | 05         | 50  | 01                | 11  | 0          | 0   |
| 10 a 20 anos         | 02                    | 15  | 05         | 50  | 02                | 22  | 01         | 100 |
| >20 anos             | 09                    | 70  | 0          | 0   | 06                | 67  | 0          | 0   |
| Total                | 13                    | 100 | 10         | 100 | 09                | 100 | 01         | 100 |
| <i>p</i> *           | 0,006*                |     |            |     | 0,2615*           |     |            |     |

\*Teste G

A tabela VIII mostra a distribuição do polimorfismo do gene *GSTT1* entre pacientes fumantes ex-fumantes (>15 anos) no grupo aterosclerose e controle com relação ao tempo de tabagismo em anos.

Dos 53 pacientes pertencentes ao grupo aterosclerose (caso) o gene *GSTT1* está presente em indivíduos que fazem uso do tabaco. Destes apenas 4% (02/53) relataram fumar em um período menor que 10 anos, 6% (06/53) entre 10 e 20 anos e 90% (48/53) há mais de 20 anos. Enquanto que em 35 pacientes pertencentes ao mesmo grupo (caso), o gene *GSTT1* está presente em indivíduos considerados ex-fumantes (>=15 anos). Destes, 17% (06/35) fumaram no período menor que 10 anos, 37% (13/35) entre 10 e 20 anos e 46% (16/35) há mais de 20, sendo esta diferença estatística significativa ( $p=0,001$ ).

Em indivíduos que fazem uso do tabaco, 15 pacientes pertencentes ao grupo aterosclerose (caso) apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo. Destes, nenhum (0/0) relatou fumar no período menor que 10 anos, 20% (03/15) entre 10 e 20 anos e 80% (12/15) há mais de 20 anos. Enquanto que em 07 pacientes pertencentes ao mesmo grupo (caso) o genótipo *GSTT1* nulo está presente em indivíduos considerados ex-fumantes (>=15 anos). Destes,

nenhum (0/0) relatou fumar no período menor que 10 anos, 43 % (03/07) entre 10 e 20 anos e 57% (04/07) há mais de 20 anos, sendo esta diferença estatisticamente não significativa ( $p=0,5468$ ).

Em 13 pacientes pertencentes ao grupo controle o gene *GSTT1* está presente em indivíduos que fazem uso do tabaco. Destes, 15 % (02/13) relataram fumar no período menor que 10 anos, 15% (02/13) entre 10 e 20 anos e 70% (09/13) há mais de 20 anos. Enquanto que em 10 pacientes pertencentes ao mesmo grupo (controle) o gene *GSTT1* também está presente em indivíduos considerados ex-fumantes ( $\geq 15$  anos). Destes 50% (05/10) relataram fumar no período menor que 10 anos, 50% (05/10) entre 10 e 20 anos e nenhum (0/0) há mais de 20 anos, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,006$ ).

Em indivíduos que fazem uso do tabaco, 09 pacientes pertencentes ao grupo controle apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo. Destes, 11% (01/09) relataram fumar no período menor que 10 anos, 22% (02/09) entre 10 e 20 anos e 67% (06/09) há mais de 20 anos. Enquanto que apenas 01 paciente considerado ex-fumante ( $\geq 15$  anos) do grupo controle apresentou o genótipo *GSTT1* nulo. Deste, nenhum (0/0) relatou fumar no período menor que 10 anos, 100% (01/01) entre 10 e 20 anos e nenhum (0/0) há mais de 20 anos, sendo esta diferença estatística não significativa ( $p=0,2615$ ).

Na tabela IX, foi comparado o hábito de consumir bebida alcoólica nos pacientes do grupo caso e do grupo controle e sua relação com o polimorfismo do gene *GSTT1*. Na análise dos 19 (9,5 %) pacientes do grupo caso que declaram consumir bebida alcoólica, foram detectados em 100% (19/19) a presença do gene *GSTT1* presente e em nenhum dos pacientes deste grupo (0/0) foi encontrado o genótipo *GSTT1* nulo. Dos 181 (95,5%) pacientes que declaram não consumir nenhum tipo de bebida alcoólica 84% (152/181) destes o gene *GSTT1* estava presente e em 29 (29/181) pacientes, 16% apresentaram o genótipo *GSTT1*-nulo. O resultado encontrado é considerado significativo ( $p=0,0122$ ).

**Tabela IX** - Comparação da declaração do consumo de bebida alcoólica no polimorfismo *GSTT1* nos grupos caso e controle.

| Variáveis / Grupos | Bebida alcoólica |       |     |       |             |      |                   |  |
|--------------------|------------------|-------|-----|-------|-------------|------|-------------------|--|
|                    | Sim              |       | Não |       | $p\alpha^*$ | OR*  | Mini –<br>*máx.   |  |
|                    | n                | %     | n   | %     |             |      |                   |  |
| <b>Caso</b>        |                  |       |     |       |             |      |                   |  |
| Presente           | 19               | 100   | 152 | 84    | 0,0122**    | -    | -                 |  |
| Nulo               | 0                | 0     | 29  | 16    |             |      |                   |  |
| Total              | 19               | 100,0 | 181 | 100,0 |             |      |                   |  |
| <b>Controle</b>    |                  |       |     |       |             |      |                   |  |
| Presente           | 14               | 70    | 52  | 65    | 0,5904      | 1,25 | 0,6707-<br>2,3536 |  |
| Nulo               | 6                | 30    | 28  | 35    |             |      |                   |  |
| Total              | 20               | 100,0 | 80  | 100,0 |             |      |                   |  |

\*\* Teste G

Na análise dos 20 (20%) pacientes do grupo controle que declaram consumir bebida alcoólica foram detectados em 70% (14/20) a presença do gene *GSTT1* e em 6 (6/20) pacientes, 30% apresentaram o genótipo *GSTT1*nulo. Dos 80 (80%) pacientes do grupo controle que declaram não consumir bebida alcoólica 65% (52/80) apresentaram o gene *GSTT1* presente e 28 (28/80) pacientes, 35% o genótipo *GSTT1* nulo. Sendo esta diferença estatisticamente não significativa ( $p=0,5904$ ; OR= 1,2564).

Nota-se que nos pacientes do presente estudo com relação ao consumo de bebida alcoólica o genótipo presente foi mais elevado tanto no grupo dos pacientes que tem a doença como no grupo dos pacientes que não tem a doença aterosclerótica (Tabela IX)

## 5.0 Discussão

O conhecimento dos polimorfismos genéticos que predisõem ou agravam a doença arterial coronariana é um importante instrumento para a prevenção primária, abordagem diagnóstica, tratamento e aconselhamento genético em cardiologia (Sabino, 2004).

A biologia molecular apresenta uma grande importância na compreensão de doenças complexas e multifatoriais como a doença arterial coronariana. Esta abordagem gera uma nova forma de avaliação da doença coronariana e propicia à criação de novas técnicas, métodos diagnósticos e abordagens terapêuticas, interferindo, no desfecho clínico final do paciente (Izar et al., 2004).

Estudos sugerem que essas técnicas poderão vir a ser utilizadas para a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver a aterosclerose (Xavier et al., 2013; Corrêa-Camacho et al., 2007). Marinkovic et al. (2013), em seu artigo de revisão, destaca os polimorfismos genéticos envolvidos na biotransformação e aterosclerose a fim de estudar melhor a expressão do gene e elucidar a sua interação e o ambiente (Marinkovic et al., 2013).

Inúmeros trabalhos têm sido relacionados ao polimorfismo do genótipo *GSTT1* em pacientes com aterosclerose. (Miller et al., 2003; Hayek et al., 2006; Moon et al., 2007; Manfredi et al., 2007; Maciel et al., 2009; Bazo et al., 2011; Norskow et al., 2011; Taspinar et al., 2012).

Neste estudo a presença do polimorfismo *GSTT1* foi significativa em ambos os grupos, sendo que nos pacientes com aterosclerose ela foi 1,3 vezes maior.

Um estudo realizado em São Paulo por Bazo et al., (2011) também detectou uma maior presença do genótipo *GSTT1* em pacientes submetidos à angiografia com diagnóstico de doença arterial coronariana (DAC).

Assim como na população indiana foi detectado uma maior presença do genótipo do *GSTT1* nos indivíduos com a doença arterial coronariana comprovada pela angiografia (Girisha et al., 2004). Zivkovic et al., (2014) também verificaram a presença do *GSTT1* prevalente em 346 pacientes da Servia diagnosticados com aterosclerose avançada.

Manfredi et al., (2009), da mesma forma identificaram em pacientes fumantes da Itália com obstrução dos grandes, a prevalência do genótipo GSTT1 nulo associado a um risco 3x maior para o desenvolvimento da doença arterial coronariana em pacientes com diabetes tipo II.

Em nosso estudo observamos que a presença do polimorfismo do gene GSTT1 foi estatisticamente significativa para o gênero masculino em ambos os grupos estudados. Verificou-se que a frequência da presença do gene GSTT1 em pacientes do sexo masculino com aterosclerose foi de 1,5 vezes maior quando comparado aos pacientes do sexo feminino.

Turkanoglu et al.,(2010), da mesma forma identificaram em pacientes isquêmicos caucasianos da Turquia o genótipo presente do *GSTT1* em maior porcentagem. Entretanto, Taspinar et al.,(2012) relataram a prevalência do genótipo nulo do gene *GSTT1* em pacientes com doença arterial coronariana, sendo 8,9 vezes, maior quando comparado ao controle. Também um estudo no Brasil, com a população da cidade de Vitoria (ES) submetida à angiografia coronariana, a prevalência do genótipo nulo do gene *GSTT1* foi maior (Maciel et al., 2009).

Um grupo de 871 pacientes brasileiros (Maciel et al., 2009) analisados mostrou que a presença do gene GSTT1 é maior na população masculina, que corrobora com o detectado em nossos resultados. Da mesma forma, Schreiber e colaboradores (2013) também verificou em 76% dos pacientes na população brasileira presença do gene GSTT1 maior no sexo masculino estudado. No estudo conduzido com a população americana (Olshan et al.,2003) mostrou que a presença do genótipo *GSTT1* nulo é maior na população masculina daquele país.

Entretanto em um estudo realizado com pacientes chineses (Rui et al., 2012) não encontrou diferenças significativas entre os sexo masculino e feminino em ambos os grupos estudados com relação ao risco de desenvolvimento de acidente vascular cerebral. A diferença no resultado pode ser explicada pela população utilizada em cada estudo considerado. Enquanto a população brasileira é marcada pela miscigenação (Suarez-Kurtz, et al., 2014), a população chinesa tem origem Asiática (Ma et al., 2007).

A análise da variável consumo de bebida alcoólica em pacientes declarados verificou-se que no grupo aterosclerose (caso) o gene GSTT1

presente foi mais elevado nos indivíduos que relataram não consumir bebida alcoólica ( $p=0,0122$ ).

No estudo conduzido com a população de Hakka no Sul da China por Pan et al.,(2011) associado a história familiar de várias doenças crônicas dentre elas a hipertensão, mostrou que presença do gene *GSTT1* também foi maior nos pacientes que relataram não consumir bebida alcoólica.

Entretanto Girisha et al., (2004) em pesquisa realizada com a população indiana não encontrou diferenças significativas ( $p=0,0826$ ) associado ao consumo de bebida alcoólica no polimorfismo do gene *GSTT1* para ocorrência de doença arterial coronariana.

Pinheiro (2012) também não encontrou diferenças significativas com relação a possíveis alterações bioquímicas e clínicas no grupo de pacientes estudados no Brasil quanto ao consumo de álcool entre os indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 associado a presença do gene e genótipo *GSTT1* nulo.

A análise da associação do tabagismo com o polimorfismo do gene *GSTT1* não apresentou-se significativa neste estudo em nenhum dos dois grupos estudados ( $p= 0,5578$ ,  $p= 0,3068$ ) em indivíduos que relataram fumar, nunca fumaram e ex-fumantes.

Assim como o estudo realizado com a população brasileira por Pinheiro (2012) também não encontrou diferenças significativas com relação a possíveis alterações bioquímicas e clínicas se considerando o hábito de fumar por pelo menos um ano durante a vida associado ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 ao genótipo *GSTT1* presente e nulo. Maciel et al., (2009), também não encontraram significância estatística nos indivíduos fumantes de Vitória (ES) submetidos a angiografia coronariana associado a presença do genótipo *GSTT1*.

Zivkovic et al.,(2014) estudando pacientes da Servia diagnosticados com aterosclerose avançada também não encontraram diferenças na frequência genotípica do polimorfismo do gene *GSTT1* em pacientes fumantes com doença arterial coronariana. Pan et al.,(2011) estudando a população Chinesa também não encontraram diferenças significativas associadas á presença do gene *GSTT1* e genótipo nulo em indivíduos fumantes e não fumantes associado á fatores de risco e estilo de vida ligados a aterosclerose .



Entretanto, a pesquisa conduzida na Índia (Girisha et al.,2004) encontrou diferenças significativas associadas ao desenvolvimento da doença arterial coronariana ( $P= 0.018$ ), com relação a presença do genótipo *GSTT1* em pacientes fumantes. Cornelis et al., (2007) em um estudo caso controle envolvendo 2042 pacientes com infarto agudo do miocárdio da Costa Rica verificaram que a presença do Genótipo *GSTT1* pode modificar o risco de desenvolver infarto agudo do miocárdio associado ao consumo de vegetais crucíferos em pacientes fumantes e não fumantes. Eles constataram que o efeito protetor dos vegetais crucíferos foi maior entre os pacientes que atualmente fumam.

Quando analisamos o genótipo presente associado a variável hábito de fumar relacionado à quantidade diária de tabaco consumida, não houve diferença estatisticamente significativa no grupo caso estudada com relação aos indivíduos fumantes e ex-fumantes ( $p=0,0537$ ). Nossa pesquisa mostrou que a presença do polimorfismo do gene *GSTT1* foi maior no grupo caso para os indivíduos fumantes e ex-fumantes que relataram consumir mais de 20 tabacos por dia.

Alguns estudos tem relacionado o uso do tabaco na indução a danos do DNA e a relação de polimorfismos de enzimas envolvidos no metabolismo de genotoxinas com o desenvolvimento da doença arterial coronariana (Wilson et al., 2000; Tamer et al.,2004)

Wilson et al.,(2000) relataram uma associação significativa com o tabagismo destacando a hipótese de que o consumo de tabaco pode induzir dano ao DNA desencadeando o mecanismo da doença arterial coronariana em adultos. Assim como Tamer et al (2004) encontrou uma associação do genótipo *GSTT1* nulo significativa com o tabagismo associado ao desenvolvimento de doença cardíaca em População turca . Eles descobriram que o genótipo *GSTT1* nulo estava associado ao risco aumentado de desenvolver doenças coronárias, mas este aumento não foi significativo. No entanto os pacientes fumantes encontrados com genótipo *GSTT1* nulo apresentaram um risco significamente maior de desenvolver doença arterial coronariana. Estes resultados demonstram que o polimorfismo do gene GSTs pode agir de forma diferente em diferentes populações estudadas.

Manfredi et al.,2007 destaca que a variabilidade individual de desenvolvimento da doença arterial coronariana em fumantes de cigarro é resultado do polimorfismo genético de enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos. Além disso, várias variações genéticas podem interagir com o tabagismo aumentando a peroxidação de lipídios proporcionando assim um efeito aterogênico ainda mais elevado (Hayek et al.,2006).

Pan et al.,(2011) não encontraram diferenças significativas na população chinesa associada à presença do gene *GSTT1* e genótipo nulo relacionado a quantidade diária de tabaco em indivíduos fumantes e não fumantes a fatores de risco e estilo de vida ligados a aterosclerose nos grupos estudados. Em nosso estudo também não foram encontradas diferenças significativas com relação à quantidade diária de tabaco no grupo caso em associação ao genótipo *GSTT1* nulo e grupo controle.

Nossos estudos detectaram que o genótipo *GSTT1* presente foi mais frequente nos indivíduos fumantes nos grupos caso ( $p < 0,001$ ) e controle ( $p = 0,006$ ) estudados em que o período de tabagismo foi igual ou maior que 20 anos. Sendo, esta diferença estatisticamente significativa.

Olshan et al.,(2003), avaliaram os efeitos da interação do tabagismo no polimorfismo do gene *GSTT1* sobre o risco de desenvolvimento da aterosclerose provenientes do Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC), selecionados aleatoriamente de quatro comunidades americanas entre 1987 e 1989 com base na espessura da camada íntima da artéria. Os autores concluíram que a presença do genótipo *GSTT1* pode estar relacionada a uma possível interação com o desenvolvimento da doença em indivíduos que fumaram em um período igual ou maior que 20 anos baseado no aumento da espessura da íntima.

Grignoli et al.,(2009) também estudando a população da região de Araras no Brasil, encontraram em 61,3% dos pacientes que fumam há mais de 10 anos uma maior frequência da presença do gene *GSTT1* com relação ao genótipo nulo.

Mais de 60 substâncias encontradas no tabaco é classificadas como carcinogênicas, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC,2002; IARC, 2004). De acordo com a Associação Médica Brasileira (2013), o risco de câncer aumenta de acordo com a idade mais precoce de

início do tabagismo, quantidade de cigarros e número de anos que a pessoa fuma. O tabaco, além de ser fator de risco para o câncer, também é um importante fator que dificulta o tratamento e o controle das neoplasias em geral (AMB, 2013).

Alguns autores têm relacionado diversos polimorfismos genéticos envolvidos no mecanismo de biotransformação e carcinogênese aos hidrocarbonetos policíclicos, entretanto os dados ainda são escassos (Marinkovic et al.,2013).

Acredita-se que dois grupos de enzimas estão envolvidos no processo de biometabolização dos compostos químicos do cigarro e do álcool: as enzimas do metabolismo oxidativo (Fase I) e as enzimas conjugadoras (Fase II). As enzimas oxidativas da Fase I, principalmente as enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYPs), convertem muitos compostos a metabólitos altamente reativos. Contudo, as enzimas da Fase II atuam de modo a inativar os produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção como resultado da conjugação desses com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio da ação das glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs) (GEISLER et al.,2001; TAIOLI,2008).

Marinkovic et al.,(2013) destacaram que os dados de associação da aterosclerose e os polimorfismos genéticos ainda são controversos em ocorrência a diversos aspectos que abrangem o delineamento do estudo e número de indivíduos pesquisados. Além disso, Hayes et al.,(2005) ressalta que o polimorfismo do gene GSTT1 pode aumentar ou diminuir a sensibilidade de um organismo causando um processo inflamatório e carcinogênico envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose.

## 6.0 CONCLUSÃO

- Foi verificada uma diferença significativa nos 2 grupos estudados (caso x controle) em relação ao polimorfismo do gene *GSTT1*.
- A presença do gene *GSTT1* em pacientes com aterosclerose foi de 1,3 vezes maior quando comparado ao grupo controle.
- A presença do polimorfismo do gene *GSTT1* em pacientes do sexo masculino com aterosclerose foi de 1,5 vezes maior quando comparado aos pacientes do sexo feminino.
- A associação do tabagismo com o polimorfismo do gene *GSTT1* entre os indivíduos que relataram fumar, que nunca fumaram e ex-fumantes não apresentou-se significativa em nenhum dos 2 grupos estudados.
- Quando analisamos o genótipo presente associado a variável hábito de fumar relacionado à quantidade diária de tabaco consumida, não houve diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos estudados.
- A frequência do genótipo *GSTT1* presente foi maior no grupo caso para os indivíduos fumantes e ex-fumantes que relataram consumir mais de 20 tabacos por dia.
- Com relação aos anos de tabagismo verificou-se que a presença do genótipo *GSTT1* foi frequente nos indivíduos fumantes em ambos os grupos estudados. Sendo, esta diferença estatisticamente significativa.
- Na análise da variável consumo de bebida alcoólica verificou-se que no grupo aterosclerose a presença do gene *GSTT1* foi elevada nos indivíduos que relataram não consumir bebida alcoólica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*. 1995;25(2):155–161.
2. Almeida FF, Barreto SM, Couto BRGM, Starling CEF. Fatores Preditores da Mortalidade Hospitalar e de Complicações Per-Operatórias Graves em Cirurgia de Revascularização do Miocárdio. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* 2003; 80(1): 41- 50.
3. Associação Médica Brasileira. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer. Evidências Científicas sobre Tabagismo para Subsídio ao Poder Judiciário. 2013.
4. Báez A. Genetic and environmental factors in head and neck cancer genesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2008;26:174-200.
5. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. SHARP Revista Ciências em Saúde v4, n 3, jul-set 2014 Investigators. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9784):2181-92.
6. Bazo AP, Salvadori D Jr, Salvadori RA, Sodr e LP, da Silva GN, de Camargo EA, Ribeiro LR, Salvadori DM. DNA repair gene polymorphism is associated with the genetic basis of atherosclerotic coronary artery disease. *Cardiovascular Pathology* 20 (2011) 9–15.
7. BOLTH, H.; THEIR, R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology *Current Drug Metabolism*, v. 7, n. 6, p. 613-628, 2006.
8. BRAUWNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. Tratado de Medicina Cardiovascular. 6 Ed. São Paulo: Roca, 2003.
9. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. European Society of Cardiology (ESC); European Atherosclerosis Society (EAS). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European

- Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. 2011;217(1):3-46
10. Cornelis MC, Sohemy AE, e Campos H. GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr* 2007;86:752– 8.
  11. Corrêa-Camacho CR, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc Saúde* 2007. jan-mar;14(1):41-48
  12. Cotran R.S, Munro J.M. Pathogenesis of Atherosclerosis: Recent Concepts. In: Grundy S.M, Bearn A.G. *The Role of Cholesterol in Atherosclerosis*. Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc. 1987; p.5-15.
  13. Critchley J, Capewell S Smoking cessation for the secondary prevention of coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003.
  14. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.
  15. Dazhong Liu, Fei Wang, Qiushi Wang, Xiaotong Guo, Hao Xu, Wei Wang, Linyou Zhang. Association of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and lung cancer risk in a Chinese population. *Clinica Chimica Acta*, Volume 414, 24, December 2012. pg188-190.
  16. Dorland. *Diccionario de Ciencias Médicas*. Buenos Aires, El Ateneo 1966, 157: 847.
  17. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
  18. Farbstein, D; Levy, A. The genetics of vascular complications in Diabetes mellitus. *Cardiology Clinics*, v.28, p. 477-496, 2010.
  19. Fowkers F, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 2013;382(9901):1329-40.
  20. Fox CS, Pencina MJ, Wilson PW, Paynter NP, Vasan RS, D'Agostino RB Sr. Lifetime risk of cardiovascular disease among individuals with and without

- diabetes stratified by obesity status in the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2008;31(8):1582-4.
21. Frare AB. Investigação dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em mulheres com endometriose (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-Goiás, Goiânia-Brasil, 2011.
  22. Garofolo L et al.,Biomarcadores e arteriopatia obstrutiva periférica. *J Vasc Bras*. 2014 Jul.-Set.; 13(3):182-191
  23. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-huge review. *Am J Epidemiol*. 2001;154:95-105.
  24. Giannini SD. História natural da aterosclerose. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000;10(6):677-85.
  25. Girisha K. M, A. Gilmour, S. Mastana, V. P. Singh, N. Sinha, S. Tewari, V. Ramesh V. H sankar, S. Agrawal Glutathione S-transferase T1 M1 Polymorphism and coronary artery disease. *Indian J Med Sci* Vol. 58 No. 12, December 2004
  26. Gottlieb MG, Bonardi G, Moriguchi EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatorios da aterosclerose. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, jul./set. 2005.
  27. Grignoli, C. R. E. R , A. L. e Bertoncin, A. C..Polimorfismos dos genes das enzimas glutaniona S-Transferase MU1 e TETA1. *Pensamento Plural: Revista Científica do* , São João da Boa Vista, v.3, n.1, 2009
  28. Guimaraes, H.P.: Avezum. A.; Piegas, L.S. Epidemiologia do Infarto Agudo do Miocárdio. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, y. 1, p 1-7, 2006.
  29. Hackam GD, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003;290:932-40.
  30. Hajjar, I., Kotchen. J.M.. Kotchen. T.A. Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control. *Annual Review of Public Health*, y. 27, p. 465—490, 2006.
  31. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
  32. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.05.017>.
33. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51–88
  34. Hayes, J. D.; strange, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, v. 61, n. 3, p. 154-166, 2000.
  35. Herrmann. J.L.V.; Souza.A, J.A.M. “Check-up” Cardiológico: avaliação clínica e fatores de risco. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. V. 16, p. 127-137, 2006.
  36. Higuchi M.L, Gutierrez P.S. Avanços na patologia da placa aterosclerótica. *Rev SOCESP*.2002;12:694-704.
  37. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res*. 2009;50(Suppl):S172-7.
  38. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1162-7.
  39. Hussey, A.J.; Kerr, L.A.; Cronshaw, A.D.; Harrison, D.J.; et al. (1991). “Variation in the expression of Mu- class glutathione S- transferase isoenzymes from human skeletal muscle.” *Biochem* 273: 323-332.
  40. International Agency for Research on Cancer. IARC- Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Tobacco smoking. Vol. 38. Lyon: IARC; 2002.
  41. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: tobacco smoke and involuntary smoking. Vol. 83. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2004.
  42. Introncasso L. HISTÓRIA NATURAL DA ATEROSCLEROSE .*Atheros* 2001; 12 (1): 27-322.
  43. Izar, MC; Relvas, WGM; Helfenstein, T; Fonseca, Francisco AH. A doença arterial coronariana sob o prisma da genética molecular / A genetic view of the coronary artery disease. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*;14(3):521-529, Maio-Jun. 2004.
  44. KAUFFMAN, P. Doença Aterosclerótica Periférica. 2 edição. São Paulo: BBS Editora, 2007.



45. KOCH, F.P.; KAMMERER, P.W.; KAMMERE, P.; et al. 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* v.46, p. 128-133, 2010.
46. Kvitko K, Rohr P, Zucchetti G, Silla LMR. Aspectos Ambientais e Genéticos no Desenvolvimento de Leucemias. *RBB*. 2008;6(4):369-73.
47. Kvitko, K.; Bandinelli, E.; Henriques, J. A. P.; Heuser, V. D. et al. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Genetics and molecular biology*, v.35, n. 4, p. 1060-1068, 2012.
48. Kwon, D.D.; Lee, J.W.; Han, D.Y.; et al. (2011). "Relationship between the Glutathione S Transferase P1, M1, and T1 Genotypes and Prostate Cancer Risk in Korean Subjects." *Korean J Urol*. 52(4): 247-252.
49. Lanas, F. et al. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. *Circulation*, y. 115, p. 1067-1074, 2007.
50. Lekawa-Ilczuk, A.; Antosz, H.; Rymgayłło-Jankowska, B. Zarnowski, T. Expression of double strand DNA breaks repair genes in pterygium, *Ophthalmic Genet*. 32(2011) 39–47.
51. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481-8.
52. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
53. LIBBY, P. Braunwald — Tratado de doenças cardiovasculares. Rio de Janeiro, Elsevier 2010. p.1 003-1026.
54. Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PW, et al. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation*. 2006;113(6):791-8.
55. LOPEZ, A.D. Assessing the burden of mortality from cardiovascular diseases. *World Health Stat Q*, y. 46, p. 91-96, 1993.
56. Luo XL. Research on the Origin of Hakka. Beijing: Overseas Chinese Press, 1989.
57. Maciel SS, Pereira Ada C, Silva GJ, Rodrigues MV, Mill JG, Krieger JE. Association between glutathione S-transferase polymorphisms and triglycerides and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis* .2009;206:204-8.

58. Macruz R. Dor cardíaca. São Paulo, Sarvier, 1976; 1.
59. Manfredi S, Calvi D, del Fiandra M, Botto N, Biagini 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. <http://dx.doi.org/10.2217/14622416.10.1.29>.
60. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.02.014>.
61. Manuel A F. Doenças cardiovasculares constituem primeira causa de morte em Campinas. Universidade Estadual de Campinas. J. UNICAMP. 2006;55-62
62. Marinković N, Pašalić D, Potočki S. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons biotransformation and atherosclerosis. *Biochemia Medica* 2013;23(3):255–65
63. Marques e Sá, AC. O papel dos polimorfismos genéticos na doença cardíaca isquêmica. Dissertação de mestrado em medicina. Universidade do Porto, Portugal, 2011.
64. Miller EA, Pankow JS, Millikan RC, Bray MS, Ballantyne CM, Bell DA, et al. Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2003;171:265-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2003.07.007>.
65. Moon KS, Lee HJ, Hong SH, Kim HM, Um JY. CYP1A1 and GSTM1/T1 genetic variation in predicting risk for cerebral infarction. *J Mol Neurosci* 2007;32:155-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-007-0028-1>.
66. Morais SA. Marcadores inflamatórios em pacientes coronariopatas submetidos a um programa regular de exercícios físicos. (Mestrado). Universidade Federal Fluminense Programa de Pós-graduação em Ciências Cardiovasculares. Rio de Janeiro 2009
67. Morimoto LM, White E, Newcomb PA. Selection bias in the assessment of gene-environment interaction in case-control studies. *Am J Epidemiol* 2003;158:259-263.
68. MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, Injuries

- and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge: Harvard University Press; 1996.
69. Nogueira, D et al. Reconhecimento tratamento e controle da hipertensão arterial: estudo Pró Saúde, Brasil. Pan american journal of public health v.27(2),p.103-109,2010.
70. Norkov MS, Frikke-Schmidt R, Loft S, Sillesen H, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Copy Number Variation in Glutathione S-Transferases M1 and T1 and Ischemic Vascular Disease Four Studies and Meta-Analyses. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4:418-428.
71. Oliveira, E. A. S. (2008). "Biodisponibilidade – Biotransformação." Apostila nº 3.
72. Olshan AF, Rongling Li, James S. Pankow, Molly Bray, Herman A. Tyroler, Lloyd E. Chambless, Eric Boerwinkle, Gary S. Pittman, and Douglas A. Bell. Risk of Atherosclerosis: Interaction of Smoking and Glutathione S Transferase Genes. May 2003, Vol. 14 No. 3
73. PAN ShangXia , YANG XingFen , YANG LinQing , WEI Qing , YANG Ying XU GuangNing, LIN ZhongNing, HUANG JunMing. Human GSTs Polymorphisms in the Hakka Population of South China and Their Associations with Family History of Several Chronic Diseases. *Biomed Environ Sci*, 2011; 24(5): 491-498
74. Pettigrew, N.E.; Colman, R.F. (2001). "Heterodimers of Glutathione S-Transferase Can Form between Isoenzyme Classes pi and mu." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol 396, nº 2: 225-230.
75. Pinheiro DDS, Filho CRR, Mundim CA, Ulhoa CJ, Ghendini PC, Reis AAS. Avaliação do polimorfismo de deleção de gstm1 na susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 2\*. *Estudos, goiânia*, .v . 39, n. 3, p. 331-336, jul./set. 2012.
76. Pinhel MA, Sado CL, Longo Gdos S, Gregório ML, Amorim GS, Florim GM, Mazeti CM, Martins DP, Oliveira Fde N, Nakazone MA, Tognola WA, Souza DR. Nullity of GSTT1/GSTM1 related to pesticides is associated with Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013 Aug;71(8):527-32.
77. Polanczyk, C.A. Cardiovascular risk factors in Brazil. The next 50 years' *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, y. 84, p. 199-201, 2005.

78. Ramalhinho, A. C.; Moutinho, J.A.F.; Breitenfeld, L. (2001). "Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population." *Mol Cell Biochem*.
79. Reis, A. A. S. Associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide. [Tese Doutorado] Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, 2010.
80. Reis, A. F., VELHO, G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 46, p. 426-32, 2002. ROBERTSON, R. P. et al. Glucose toxicity in [beta]-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, v. 52, p. 581–587, 2003.
81. Reis, A.A.S.; Silva, D.M.; Curado, M.P.; Dacruz, A.D. Involvement of CYP1A1, GST, 72TP53 polymorphisms in the pathogenesis of thyroid nodules. *Genetic and Molecular Research*, v.9, n.4, p. 2222-2229, 2010
82. Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA*. 2007;297(6):611-9.
83. Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation*. 2008;118(22):2243-51.
84. Rosario, F. (2007) "Análise da variabilidade de frequência cardíaca em nadadores de elevado rendimento competitivo numa época desportiva" Universidade de Coimbra – Faculdade de ciências do Desporto e Educação Física.
85. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*. 1976;193:1094-100.
86. Ross R. The Pathogenesis of Atherosclerosis. In: Braunwald E. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1992, 36: p. 1106-1124.
87. Ruffter MA. On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 BC . 525 AD). *J Path Bact* 1911; 15: 453-62. 2005
88. Rui Wang, Yan Wang, M.D., Junhong Wang, and Kun Yang. Association of glutathione S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms with ischemic stroke risk in the Chinese Han population. *Neural Regen Res*. 2012 Jun 25; 7(18): 1420–1427.

89. Sabino, A. P. Eventos trombóticos venosos e arteriais: Importância de fatores genéticos predisponentes e hiperhomocisteinemia. 2004. Defesa de monografia: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2004.
90. Schreiber R, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC, Nadruz W Jr. Association between glutathione S-transferase M1 polymorphism and urinary sodium excretion in a Brazilian population. *Am J Hypertens*. 2013 Aug;26(8):1024-9. doi: 10.1093/ajh/hpt066. Epub 2013 May 20.
91. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.88, suppl.1, São Paulo, 2007.
92. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013; 101(4Supl.1): 1-22
93. Stein O, Thiery J, Stein Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2002; 160:1-10.
94. Steinberg D, Witztum JL. Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9546-7.
95. Taioli E. Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. Review. *Carcinogenesis*. 2008;29:1467-74.
96. Talat Islam, M.B.B.S.; Berhane, K.; Rob McConnell, M.D.; et al.(2009). "Glutathione-S-Transferase (GST)P1, GSTM1, Exercise, Ozone and Asthma Incidence in school children." *Thorax*, 64(3):197-202.
97. Tamer L, Ercan B, Camsari A, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2004;99:223–9.
98. Taspınar M, Aydos S, Sakiragaoglu O, Duzen IV, Yalcinkaya A, Oztuna D, Bardakci H, Tutar E, Sunguroglu A. Impact of genetic variations of the CYP1A1, GSTT1, and GSTM1 genes on the risk of coronary artery disease. *DNA Cell Biol*. 2012 Feb;31(2):211-8
99. Tsai YY, Lee H, Tseng SH. Evaluation of TNF-alpha and IL- 1beta polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterygium. *Eye* 2005;19:571-4.

100. Tsai, Y. Y.; Cheng, Y. W.; Lee, H.; Tsai, F. J et al. P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein expression in pterygium. *Molecular Vision*, Atlanta, v.11, p. 50-55, 2005.
101. Turkanoğlu A, Demirdoğan BC, Demirkaya S, Bek S, Adalı O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *Neurol Sci* (2010) 31:727–734.
102. Wahner AD, Glatt CE, Bronstein JM, Ritz B. Glutathione S-transferase mu, omega, pi, and theta class variants and smoking in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2007;413:274-278.
103. Wang J, Zou L, Huang S, Lu F, Lang X, et al. (2010) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of coronary heart disease. *Mutagenesis* 25: 365–369.
104. Wang, G. et al. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 341, p. 310-313, 2006.
105. Whalen, R.; Boyer, T.D. Human Glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis.* v.18, n.4, p.345-58, 1998
106. Wilson MH, Grant PJ, Hardie LJ, Wild CP. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *FASEB J* 2000;14:791– 6
107. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97(18):1837-47.
108. Xavier H. T., Izar M. C., Faria Neto J. R., Assad M. H., Rocha V. Z., Sposito A. C., Fonseca F. A., dos Santos J. E., Santos R. D., Bertolami M. C., Faludi A. A., Martinez T. L. R., Diament J., Guimarães A., Forti N. A., Moriguchi E., Chagas A. C. P., Coelho O. R., Ramires J. A. F.; Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2013.
109. Yang, Y.; Kao, M.T.; Chang, C.C.; et al. Glutathione S-transferase T1 deletion is a risk factor for developing end stage renal disease in diabetic patients. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 14, p.855-859, 2004

110. Young, C. H.; LO, Y. L.; Tsai, Y. Y.; Shih, T. S et al. CYP1A1 gene polymorphisms as a risk factor for pterygium. *Molecular Vision*, Atlanta, v. 16, p. 1054-1058, 2010.
111. Zivković M, Stanković A, Djurić T, Končar I, Kolaković A, Djurdjević V, Davidović L, Alavantic D. Effects of glutathione S-transferase T1 and M1 deletions on advanced carotid atherosclerosis, oxidative, lipid and inflammatory parameters. *Mol Biol Rep* (2014) 41:1157–1164.

## ANEXO 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: \_\_\_\_\_

INICIO DOS SINTOMAS AOS: \_\_\_\_\_ ANOS

SINTOMAS: \_\_\_\_\_

DATA DO DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_. INÍCIO DO TRATAMENTO \_\_\_\_\_

TRATAMENTO CLÍNICO: SIM ( ) NÃO ( )



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 ( )

OBSERVAÇÕES:

## ANEXO 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 JOSE VITOR MAGAHAES MARTINS, 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 O. 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 no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para diferentes variações genéticas que podem estar relacionados á alterações vasculares.

III. O objetivo da pesquisa é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico coletadas serão analisadas para verificar a presença das variações genéticas. Os critérios de inclusão são: pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares como a angioplastia e o cateterismo, 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 mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para alguma variação genética, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses 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 apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressalvando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames serão descartados.

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 periférico, 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 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

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

### **GRUPO CONTROLE**

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

Meu nome é JOSE VITOR MAGALHAES MARTINS, sou o pesquisador (a) responsável, mestrando em genética. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o (a) pesquisador (a) responsável **Dra. Katia Karina Verolla de O. 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 medico 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 analise de diferentes variações genéticas que podem estar relacionados com alterações vasculares.

III. O objetivo do estudo é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico do grupo controle coletadas serão submetidas a testes de sangue, para verificar a ausência das variações genéticas. Para o grupo controle os critérios de inclusão serão idade superior a

38 anos, e que não apresentem diagnóstico de doença aterosclerótica baseados em resultados de exames de imagem. Os de exclusão são os 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 mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para algum polimorfismo, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses 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 apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressalvando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames serão descartados.

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 periférico, 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. Fica 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

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data