



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**POLIMORFISMO DO GENE *eNOS* G894T (Glu298Asp) EM
PACIENTES SINTOMÁTICOS PARA ATEROSCLEROSE**

FÁBIO LEMOS CAMPEDELLI

Goiânia – GO

2016



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**POLIMORFISMO DO GENE *eNOS* G894T (Glu298Asp) EM
PACIENTES SINTOMÁTICOS PARA ATEROSCLEROSE**

FÁBIO LEMOS CAMPEDELLI

Dissertação apresentada à Pontifícia
Universidade Católica - Goiás, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Genética, para a obtenção parcial do título de
Mestre.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. KÁTIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA

Goiânia – GO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

©reprodução autorizada pelo autor

C193p Campedelli, Fábio Lemos
Polimorfismo do gene eNOS G894T (Glu298Asp) em
Pacientes sintomáticos para aterosclerose[manuscrito]/ Fábio
Lemos Campedelli.-- 2016.
61 f.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Programa de Pós-Gaduação Stricto
Sensu em Genética, Goiânia, 2016
Inclui referências f.44-53

1. Genética. 2. Aterosclerose. 3. Polimorfismo (Genética).
I.Moura, Katia Karina Verolli de Oliveira. II.Pontifícia
Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 616.13-004.6(043)

Dedico este trabalho à minha esposa Ana Flávia, pelo seu amor, apoio incondicional, cumplicidade e paciência; aos meus pais Humberto e Sttellita, meus maiores exemplos; e aos meus sogros Flávio e Marise, grandes incentivadores na conquista dos meus sonhos.

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

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

A DEUS, nosso criador, e razão pela busca de um presente e futura melhor para todos.

À minha orientadora, Professora Dra. Kátia Karina Verolli De O. Moura por sua paciência, compreensão, competência e atenção nas revisões. Seu apoio e dedicação foram fatores fundamentais para conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas, amigos, que ao longo destes dois anos compartilhamos angustias, apreensões, ensinamentos, vitórias, e claro, boas risadas. Em especial à Debora, José Vitor, Iasmin, Magda, Andréia e Monize.

Aos professores do mestrado, em especial ao Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz (Prof. Peixoto), por compartilhar sua sabedoria, seu entusiasmo, sua amizade. E hoje concordo com suas palavras no início desta caminhada, quando me disse que iria mudar minha “visão” sobre a medicina.

Aos meus irmãos, Rafael e Felipe, que apesar da distância, sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio nos momentos tristes e felizes da vida.

Aos meus grandes amigos (irmãos), Carlos Eduardo, Fábio Augusto e Phillipe, que sempre me apoiaram na vida acadêmica e pessoal. E compreenderam minha ausência no trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon, por ter viabilizado o projeto e desenvolvimento da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Histórico.....	14
1.2. Formação do Ateroma.....	14
1.3. Processo de Formação da Placa Ateromatosa.....	15
1.4. Diagnóstico.....	18
1.5. Prevalência, Morbidez e Mortalidade.....	19
1.6. Fatores de Risco.....	19
1.7. Genética e Aterosclerose.....	22
1.7.1. Polimorfismo Genético (PG).....	23
1.8. Óxido nítrico (NO), origem e função.....	24
1.8.1. Polimorfismo do Gene <i>eNOS</i>	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivos Gerais.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Casuística.....	29
3.2. Análises Moleculares.....	30
3.3. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÊNDICES.....	54
APÊNDICE I.....	54
APÊNDICE II.....	56
APÊNDICE III.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Após disfunção endotelial, mecanismos que irão contribuir para recrutamento de monócitos à parede arterial e evolução inflamatória-proliferativa. (Fonte: adaptado, Li, et al., 2002).	16
Figura 2. Complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e idade (Fonte: adaptado de DAI, et al., 2016)	23
Figura 3. Comportamento do Oxido nítrico (NO) vascular na artéria sadia e doente (Fonte: adaptado de Lundberg, et al., 2015).....	26
Figura 4. Polimorfismo em humanos do gene <i>eNOS</i> em regiões de introns e exons (Fonte: adaptado de Hingorani A, et al., 1997)	27
Figura 5. Produto da PCR em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo para amplificação do polimorfismo do <i>eNOS</i> para PCR.....	31
Tabela 2 - Protocolo de termociclagem para amplificação dos primers <i>eNOS</i> para técnica de PCR.....	32
Tabela 3 - Seqüência nucleotídica dos primer <i>eNOS</i>	32
Tabela 4 - Distribuição do Polimorfismo do gene <i>eNOS</i> nos grupos caso- controle.....	33
Tabela 5 - Distribuição do polimorfismo <i>eNOS</i> em relação ao sexo nos grupos caso e controle.	33
Tabela 6 - Associação do tabagismo com os genótipos do gene <i>eNOS</i> nos grupos caso e controle relacionado com o tempo de exposição ao tabaco.....	34
Tabela 7 - Associação do tabagismo com os genótipos do gene <i>eNOS</i> nos grupos caso e controle relacionado com tempo de exposição ≥ 15 anos e que nunca fumaram.....	35
Tabela 8 - Associação do tabagismo com os genótipos do gene <i>eNOS</i> nos indivíduos fumantes dos grupos caso e controle relacionado com a carga tabágica.	35
Tabela 9 - Distribuição do polimorfismo <i>eNOS</i> em relação ao consumo de Bebida alcoólica nos grupos caso e controle.....	36

APÊNDICES

APÊNDICE I: Questionário.....	54
APÊNDICE II: Termo de consentimento livre e esclarecido –grupo caso.....	56
APÊNDICE III: Termo de consentimento livre e esclarecido -grupo controle.....	59

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

7q35→36	Braço longo do cromossomo 7, da região 35 até 36
Apo – B	Apolipoproteína B
Apo – E	Apolipoproteína E
DA	Doença aterosclerótica
DAC	Doença aterosclerótica coronariana
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribunucleico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
eNOS	Gene da síntese de óxido nítrico endotelial
G894T	Substituição de Timina por Guanina na posição 894
GMP-C	Guanilato monofosfato cíclico
GST's	Gene das Glutathione S-transferases
HAS	Hipertensão arterial
HDL-C	Colesterol carregado pela Lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL – 1	Interleucina 1
IL – 6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzido
LDL-C	Colesterol carregado pela Lipoproteína de baixa densidade

LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MCP – 1	Proteína de quimioatração de monócitos
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O₂⁻	Ânion superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PG	Polimorfismo Genético
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TNF	Fator de Necrose tumoral
TNF - α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VNTR	Variação do número de repetições <i>in Tandem</i>

RESUMO

Campedelli FL. *Polimorfismo do gene eNOS G894T (Glu298Asp) em pacientes sintomáticos para aterosclerose* [dissertação]. Goiânia: Pontifícia Universidade Católica, PUC-GO; 2016.

INTRODUÇÃO: A doença aterosclerótica (DA) com suas complicações cardiovasculares é responsável por 17,5 milhões de mortes por ano segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). É consenso que a aterosclerose envolve múltiplos processos patogênicos que se iniciam pela disfunção endotelial, com inflamação e proliferação vascular determinando alterações da matriz com consequente formação da placa ateromatosa e suas repercussões clínicas. Fatores de risco como a hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemias e tabagismo são amplamente conhecidos. Atualmente a genotipagem, não relacionada diretamente a estes fatores, não é aceita para estimativa de risco das doenças cardiovasculares, porém fortes evidências relacionam diversos genes polimórficos, como fator de risco e evolução para complicações da doença. Dentre os genes envolvidos o *eNOS* (gene da síntese de óxido nítrico endotelial), responsável pela produção de Óxido nítrico (NO), endotelial (importante vasodilatador arterial), quando se apresenta em variação polimórfica pode determinar mal funcionamento da produção e predispor a DA. **OBJETIVOS:** Analisar o polimorfismo G894T do gene *eNOS* nos grupos de indivíduos com diagnóstico de aterosclerose e no grupo controle. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram coletados amostras de sangue periférico de 200 pacientes com DA previamente diagnosticados e 100 amostras de grupo controle. A análise de genotipagem para o polimorfismo do gene *eNOS* foi determinada por PCR. **RESULTADOS:** Após análise do polimorfismo entre os grupos com DA e grupo controle, e associação com as variáveis gênero, relação com hábito de fumar, carga tabágica e consumo de bebida alcóolica, foram encontrados diferença estatísticas na distribuição dos grupos caso e controle ($p=0,0378$) e nos pacientes não tabagistas ($p=0,0263$). Nas demais associações não houve diferença estatisticamente significativa. **CONCLUSÃO:** Na população estudada evidenciou a frequência do genótipo heterozigoto (GT) muito superior aos demais (GG e TT) em ambos os grupos (caso e controle). O genótipo GG demonstrou maior suscetibilidade à DA. A associação do genótipo GG em não tabagista também apresentou maior suscetibilidade. O gênero, o etilismo, o hábito de fumar e carga tabágica não influenciaram na DA.

Palavras-Chave: aterosclerose, polimorfismo, *eNOS*, G894T, Glu298Asp, PCR.

ABSTRACT

Campedelli FL. *Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients to atherosclerosis* [dissertation]. Goiânia: “Pontificia Universidade Católica, PUC-GO”; 2016.

INTRODUCTION: Atherosclerotic disease (AD) with its cardiovascular complications is responsible for 17.5 million deaths a year, according to the World Health Organization (WHO). There is consensus that atherosclerosis involves multiple pathogenic processes initiated by endothelial dysfunction, with inflammation and vascular proliferation determining alterations in the matrix, with consequent formation of the atheromatous plaque and its clinical implications. Risk factors such as hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia and smoking are widely known. Currently genotyping, which is not directly related to these factors, is not accepted to estimate the risk of cardiovascular diseases, but strong evidence indicates several polymorphic genes as factors of risk and progression leading to complications of the disease. Among the genes involved, *eNOS* (endothelial nitric oxide synthase gene), which is responsible for the production of endothelial nitric oxide (NO, an important arterial vasodilator), when presented in polymorphic variation can determine production malfunction and predisposition to AD. **OBJECTIVES:** To analyze the G894T polymorphism of *eNOS* gene in groups of individuals diagnosed with atherosclerosis and in the control group. **MATERIALS AND METHODS:** 200 blood samples were collected from patients previously diagnosed with DA and 100 from the control group. The genotyping analysis for polymorphism of *eNOS* gene was determined by PCR. **RESULTS:** After analysis of polymorphism between the DA and control groups and association with variables such as gender, relation with smoking, smoking history and alcohol consumption, statistical difference were found in the distribution of the case and control groups ($p = 0.0378$) and in non-smoking patients ($p = 0.0263$). In the other associations no statistically significant difference was found. **CONCLUSION:** In the population studied, the frequency of the heterozygous genotype (GT) was much higher than in the other populations (GG and TT) in both groups (case and control). The GG genotype showed greater susceptibility to AD. The association of GG genotype in nonsmokers also showed greater susceptibility. Gender, alcohol consumption, smoking and smoking history did not influence AD.

Keywords: atherosclerosis, polymorphism, *eNOS*, G894T, Glu298Asp, PCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A palavra ateroma foi primeiramente citada, em estudos de Von Haller (1755), quando evidenciou conteúdo pultáceo amarelado, advindo do interior de uma placa comum. Inicialmente a doença foi descrita como arteriosclerose, ou mesmo arteriosclerose senil, apresentada em 1829 por Jean Lobstein (MAYERL, et al.,2006).

Em 1958 Organização Mundial de Saúde, decidiu reeditar o termo Ateroma, em conformidade ao descrito por Von Haller, e conseqüentemente formação de placas de ateroma, como processo patológico único. Já o termo aterosclerose, de origem grega, apresenta como significado o espessamento da camada mais interna, a camada íntima, das artérias onde apresenta propensão ao depósito de lipídios (RAFIEIAN-KOPAEI, et al., 2014).

Já Marchand (1924), conseguiu criar uma relação direta entre estado de hipercolesterolemia e o depósito de colesterol no interior da parede arterial, determinando a formação de placas em locais mais propensos (BRITO, 2014).

Desde 5000 anos atrás, em papiros egípcios, já haviam relatos sobre os sinais encontrados no processo inflamatório, como vermelhidão e calor. Mas a definição dos sinais que compõem a inflamação, que inclui, além de calor e vermelhidão, dor e edema foi descrito no primeiro século, por Aulus Cornelius Celsus (BRITO, 2014).

No século 19, foi descrito, por pesquisadores, a migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o interior dos tecidos (LIBBY, 2012). O conhecimento da natureza inflamatória na placa aterosclerótica foi reconhecido pelo patologista, Rudolf Virchow (BRITO, 2014).

1.2. Formação do Ateroma

O processo imuno-inflamatório é o principal fator de iniciação de desenvolvimento no processo de aterogênese (GALKINA, et al., 2009; LIBBY, et al., 2011; MAIURE, et al., 2013).

Diversos componentes como alterações vasculares, metabólicas e do sistema imunológico, estão envolvidos neste processo (GALKIN, et al., 2009). Essas alterações ocorrem de forma lenta e os mecanismos inflamatórios relacionados ao desenvolvimento da doença se iniciam ainda na infância, quando ocorre a formação de estrias gordurosas (LOPPNOW, et al., 2011).

Neste período inicial o processo inflamatório é o único fator responsável pela desregulação dos mecanismos protetores da homeostasia do endotélio (LOPPNOW, et al., 2011).

Ao longo dos anos, essa agressão à parede vascular pode se intensificar até se tornar clinicamente evidente (HAN, et al., 1999).

O processo de desequilíbrio plasmático, associado a injúrias promovida por outros fatores de agressão ao endotélio, seja exógeno (ex: agentes infecciosos), e/ou endógenos (ex: citocinas, interleucinas), irá promover desnudação, vasoconstrição e alterações na função endotelial, permitindo aumento da permeabilidade, com exposição a fatores procoagulantes, aumento da adesividade leucocitária e aumento da produção de glicoproteínas extracelulares (ZHANG, et al., 1993; LOPPNOW, et al., 2011)

Portanto, no processo de aterogênese a disfunção endotelial é o processo chave que caracteriza a doença, em todas as suas fases (PINHO, et al., 2010).

1.3. Processo de Formação da Placa Ateromatosa

Após iniciado o processo de injúria endotelial, ocorre infiltração e deposição de cristais de colesterol carregados pela lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), na íntima e camada muscular lisa (camada média), com aderência à matriz extracelular composta de glicoproteínas. Esse é o processo-chave para desencadear a processo oxidativo, com consequente produção de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) (MAIURI, et al., 2013).

O LDL-ox associado a produção de citocinas, interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), induzem a produção de moléculas na superfície do endotélio, que atuam como fator quimiotático para adesão e migração (diapedese), de leucócitos mononucleares (monócitos) e linfócitos (células T), para a camada subintimal (GALKINA, et al., 2009; LOPPNOW, et al., 2011).

Os monócitos após ultrapassagem para a camada subintimal se diferenciam em macrófagos, que através de fagocitose, acumulam LDL-ox formando as células espumosas (LOPPNOW, et al., 2011; XAVIER, et al., 2013).

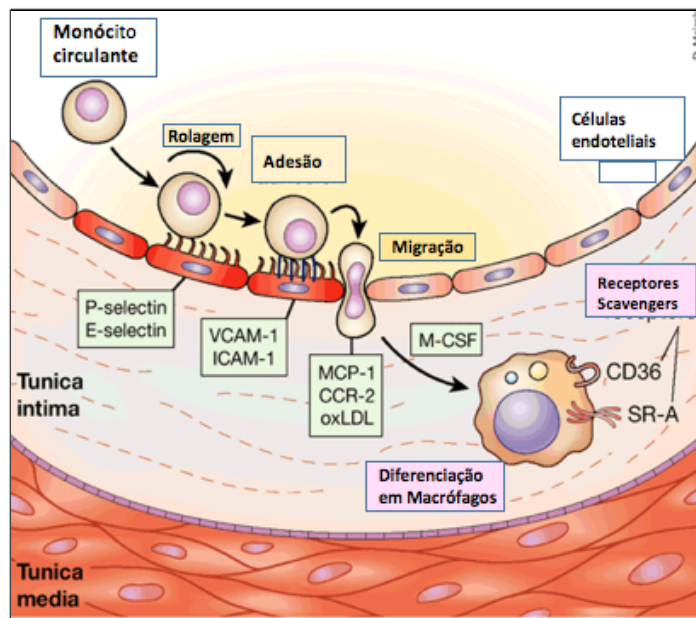


Figura 1. Após disfunção endotelial, mecanismos que irão contribuir para recrutamento de monócitos à parede arterial e evolução inflamatória-proliferativa. (Fonte: adaptado, Li, et al., 2002).

As LDL-C podem atravessar a parede arterial tanto num sentido como no outro. Tudo irá depender da concentração plasmática, que se encontrada em excesso, promoverá, tardiamente, o surgimento da placa de ateroma (BRITO, 2014).

Em contrapartida a elevação da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) circulante, auxilia na remoção de LDL-ox da parede vascular, inibe a fixação de moléculas de adesão, diminuindo a passagem de monócitos para a camada subintimal, além de estimular a liberação de óxido nítrico (NO). Ou seja, níveis altos de HDL-C são considerados como importante biomarcador de prevenção ao desenvolvimento e evolução da doença aterosclerótica (BUCKLEY, et al., 2015).

O LDL-ox acumulado no interior do macrófago, determina a liberação de citocinas, como a IL-1 e IL-6, o TNF e proteína de quimioatração de monócitos 1 (MCP-1), que são elementos responsáveis pela perpetuação da inflamação local, com adesão leucocitária, proliferação e migração de células musculares lisas através da membrana elástica interna,

produção de matriz extracelular por fibroblastos, depósito de cálcio, com formação de capa fibrosa e conseqüentemente do ateroma (LONG, et al, 1998; LIBBY, et al., 2005).

Os macrófagos secretam metaloproteinases, que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Já os Linfócitos T produzem TNF- α , que impedem a produção de colágeno pelas células musculares lisas. Ambos são encontrados nas bordas da placa ateromatosa. (BRITO, 2014)

A formação da placa aterosclerótica é um processo irreversível, na qual é observado a destruição da arquitetura da parede vascular, e se constitui de células espumosas, debris celulares (provenientes de apoptose e conseqüente necrose), ésteres de colesterol, cálcio, musculatura lisa e matriz extracelular (responsável pela capa fibrosa). (CASELLA, et al., 2003; XAVIER, et al., 2013).

Dependendo da atividade inflamatória apresentada podemos classificar as placas ateromatosas como: estável, onde apresenta maior conteúdo de colágeno, escassas células inflamatórias, com núcleo lipídico e necrótico menor, associado a capa fibrótica espessada; instável, quando apresenta intensa atividade inflamatória, grande atividade proteolítica (degradação e interrupção de produção da matriz extracelular), proeminente núcleo lipídico e necrótico, e fina capa fibrótica (LIBBY, et al., 2005).

Este segundo tipo de placa apresenta maior facilidade de ruptura da capa fibrótica, ocorrendo exposição de seus elementos constitutivos, altamente trombogênicos, promovendo aderência plaquetária com formação de trombo e conseqüente interrupção do fluxo sanguíneo local (XAVIER, et al., 2013; RAFIEIAN-KOPAEI, et al., 2014).

A trombose arterial é a principal complicação da aterosclerose e se constitui como um dos principais fatores determinantes das manifestações clínicas (XAVIER, et al., 2013).

Essas complicações, normalmente ocorrem após os 50 anos e estão relacionadas a obstrução parcial ou total do vaso, e dependendo da localização de ocorrência pode levar ao acidente vascular encefálico, agudização da doença crônica, como oclusão arterial periférica, principalmente em membros inferiores, infarto agudo do miocárdio e morte súbita (HERRINGTON, et al., 2016).

1.4. Diagnóstico

Para avaliação diagnóstica da doença aterosclerótica, é de extrema importância a realização de uma anamnese completa (BRITO, 2014).

Dados de identificação já apresentam elementos que podem identificar fatores que influenciam no desenvolvimento e evolução da doença, como idade, sexo, etnia, religião (interferência com hábitos saudáveis de vida) e profissão. (CRONENWETT, et al., 2014).

Na presença de queixas ou mesmo na ausência (realização de *check up*), é possível identificar elementos que indicam a presença da doença. Histórico de doenças pregressas e história familiar de doença precoce justificam muitas das vezes avaliação de menor e/ou maior invasividade para pesquisa da doença (DAI, et al., 2016).

Ao exame físico é realizado, avaliações antropométricas (peso, altura, circunferência abdominal), medidas da pressão arterial, pressão arterial comparativa entre membros tanto superiores (índice braço/braço), como inferiores/superiores (índice tornozelo/braço), palpação de pulsos (a ausência de pulso em algum setor é fator patognomônico da doença) (MAFFEI, 2014; BRITO, 2014).

Presença de hiperpulsatilidade ou mesmo massa abdominal pulsátil pode denotar a presença de aneurismas, que se relacionam à doença, uma vez que a aterosclerose pode levar tanto à obstrução como dilatação da parede arterial (aneurismas) (Cronenwett, et al., 2014; FATINI, et al., 2005).

A complementação diagnóstica através de exames é feita com a realização de exames laboratoriais, para pesquisa de fatores de risco, como o perfil lipídico (avaliação de colesterol total e frações, triglicérides), dosagem de apolipoproteínas, dosagem de Homocisteinemia, níveis glicêmicos (pesquisa de diabetes mellitus) (XAVIER, et al., 2013)

Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2013), o uso de genotipagem para avaliação de risco cardiovascular para doenças ateroscleróticas não é recomendada, mesmo com o reconhecimento da associação de diversos genes envolvidos na doença.

Para confirmação diagnóstica da doença pode ser realizado exames de imagem não invasivos como os estudos de eco color Doppler de carótidas e artérias periféricas, e exames

invasivos como angiotomografias, angiorressonâncias, cineangiocoronariografia e/ou arteriografias periféricas (MAFFEI, 2014; BRITO, 2014).

1.5. Prevalência, Morbidez e Mortalidade

A DA, em suas diversas apresentações, que inclui doença coronariana, acidente vascular encefálico isquêmico, doença obstrutiva crônica periférica, aneurismas, e demais complicações, são responsáveis pela principal causa de incapacidade e mortalidade no Brasil e no mundo (LOTUFO, 1998; GUS, et al., 2002; PINHO, et al 2010; YANG, et al., 2014).

Segundo estudos, para essa “epidemia” da modernidade são esperados índices de mortalidade de 34% para todos os homens e 32% para todas as mulheres na Índia, em 2015 (SAINI, et al., 2011).

Segundo a organização mundial de saúde (2014), as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17,5 milhões de mortes por ano (31%).

Já no Brasil, nos últimos dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), através da Síntese de indicadores de saúde, em 2010, com coleta de dados em 2008, confirmam que as doenças circulatórias apresentam maior percentual de óbito no adulto, 29,5%, enquanto a segunda maior, as neoplasias, respondem por pouco mais da metade, 15,6%.

De acordo com distribuição demográfica por região, a que apresentou maior índice de doenças circulatórias foi a região sul (30,2%), em particular o estado do Paraná, seguida pelas regiões sudeste (30%), centro-oeste (28,8%), nordeste (29,7%) e norte (22,6%). Em relação a distribuição por gênero os homens apresentaram 26,9% e as mulheres 33% (IBGE, 2010), porém não houve distinção entre as diversas doenças que acometem este sistema.

1.6. Fatores de Risco

A DA esta associada a muitos co-fatores que interferem e precipitam sua formação e evolução (BUCKLEY, et al., 2015; DAI, et al., 2016). Didaticamente pode-se classificar em fatores de risco não modificáveis e modificáveis (BUCKLEY, et al., 2015).

Os fatores de risco não modificáveis, tidos como fatores primários, são relacionados às alterações genéticas que pré-dispõem a doença como as dislipidemias, hipertensão arterial

sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), hiperhomocisteinemia (HH), e fatores inerentes a senilidade como idade avançada (acima de 50 anos) e ao sexo (masculino) (BUCKLEY, et al., 2015; HERRINGTON, 2016).

Os fatores de risco modificáveis, também considerado por alguns autores como fatores secundários, são aqueles relacionados aos hábitos de vida, como obesidade, sedentarismo, e principalmente tabagismo (BUCKLEY, et al., 2015; HERRINGTON W, 2016).

A diferença entre os sexos com incidência, prevalência, morbidez e mortalidade aumentada para o gênero masculino são bem comprovadas. E seu resultado esta relacionado à uma complexa interação entre fatores genéticos, hormonais e exposição a fatores ambientais que determinam risco, e forma de apresentação fenotípica individualizada da doença (STACEY, et al., 2015).

Mas ambos cromossomos X e Y são contribuintes para o desenvolvimento da doença. Como há diferenças fisiológicas entre os gêneros que influenciam também nos fatores de risco da doença tanto na precocidade de início de doenças relacionadas (ex: HAS), como no metabolismo lipídico, a influência do cromossomo Y como gene envolvido na ativação dos macrófagos, acaba por influenciar no gênero masculino como fator de risco para a doença (WINHAM, et al., 2015).

As dislipidemias são alterações relacionadas ao metabolismo dos lipídios. E podem ser classificadas como primárias, relacionada a alterações mono ou poligenéticas, ou secundárias, que se apresentam como consequência à presença de outra doença ou uso de medicamentos. Ambas situações determinam estado de hipercolesterolemia, sendo esta uma condição fundamental para o desenvolvimento da doença aterosclerótica. (BRITO, 2014)

O estado hiperlipidêmico não costuma apresentar sintomas e como forma de avaliação são realizadas dosagens no sangue periférico, com análise laboratorial do perfil lipídico. As alterações relevantes envolvem os elevados níveis de colesterol total, e principalmente de LDL-C, IDL e apolipoproteínas (apo B), com baixos níveis de HDL-C (SEMENKOVICH, et al., 2011; XAVIER, et al., 2013).

Estudos recentes apontam que a presença de níveis elevados de triglicerídeos (TG), isoladamente ou associado a baixos níveis de HDL-C, representam importante fator preditivo independente de risco cardiovascular (WAN, et al., 2015).

O DM, doença metabólica que altera os níveis glicêmicos, está associado a presença da aterosclerose, porém não se sabe ao certo se seu efeito é direto na formação da placa aterosclerótica ou ao fato de ocorrer normalmente associado a dislipidemia, HAS, inflamação vascular e alterações protrombóticas (BECKMAN, et al., 2002; HERRINGTON, et al., 2016).

Estudos demonstram que a presença de DM acelera a evolução da doença em duas a seis vezes mais do que em indivíduos não diabéticos (BRITO, 2014).

O DM altera principalmente o arcabouço extracelular da placa aterosclerótica, com necrose mais intensa e depósito de cálcio. Outro fato relevante é o tempo de doença, que se mostra como importante fator preditivo de complicações da doença (BECKMAN, et al., 2002).

Os vasos mais afetados pelo diabetes são da microcirculação e artérias de menor calibre, como coronárias e artérias distais de membros inferiores. Há evidências que a hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina se apresentam também como fatores isolados de agressão ao endotélio arterial (KANNEL, et al., 1985; BECKMAN, et al., 2002; HERRINGTON, et al., 2016).

Outro cofator é o tabagismo que também é um importante agressor da parede arterial. Além dos seus efeitos deletérios diretos, provocado pela nicotina e seus derivados, interferem na homeostasia do endotélio vascular agindo também no metabolismo lipídico causando diminuição nos níveis de HDL (DZIDA, et al., 2012).

A presença de HAS incrementa o risco de doença aterosclerótica coronariana de forma contínua, e a manutenção de níveis pressóricos elevados determinam estado progressivo da doença. Porém ainda não foi comprovado seu efeito na circulação periférica. Estudos de população sugerem relação com obstrução de artérias de médio e grande calibres (JUERGENS, et al., 1980).

A elevação do nível pressórico sistólico parece ser mais relevante que os níveis diastólicos e a atuação em artérias proximais sobrepõem aos segmentos distais na progressão da doença (SMITH, et al., 1990).

A presença de elevados níveis de angiotensina, encontrada na HAS descontrolada, é importante vasoconstrictor e também atua como elemento responsável pela disfunção endotelial (MOKRETA et al., 2016).

A homocisteína é um homólogo natural da cisteína e alternativamente derivada da demetilação da metionina. No plasma encontra-se ligada principalmente à albumina na forma oxidada. Diversas pesquisas demonstram que a presença de níveis elevados no plasma atua na disfunção endotelial, com lesão das células endoteliais, crescimento de células musculares lisas, aumento da adesividade plaquetária e depósito de LDL-OX com efeito direto protrombótico (NEVES, et al., 2004).

Uma das formas pela qual a HH parece também atuar é na inativação do NO, a partir da produção de peróxidos lipídicos produzidos pela oxidação da homocisteína. Na redução do NO o endotélio se torna vulnerável aos efeitos deletérios pró-inflamatórios (WELCH, et al., 1997).

1.7. Genética e Aterosclerose

A DA, e suas diversas formas de apresentação, seja assintomática ou sintomática, tem como fator genético associado uma relação de aproximadamente 20-60% (YANG, et al., 2014; DAI, et al., 2016).

Para comprovação da influência genética na doença, foram realizados estudos em gêmeos que estimaram uma taxa média de herdabilidade para doença aterosclerótica coronariana (DAC) de 57% para o gênero masculino e 38% para feminino, com evidente influência genética numa grande variação de idade, de 36 a 86 anos (ZDRAVKOVIC, et al 2002; DAI, et al., 2016).

Diversos estudos confirmam a presença do fator genético, com transmissão hereditária, com forte associação independente aos fatores de risco tradicionais, (descritos anteriormente), para o desenvolvimento de DAC e infarto do miocárdio (SHOLTZ, et al., 1975; COLDITZ, et al 1986; HOPKINS, et al., 1988; PHILLIPS, et al., 1988; COLDITZ, et al., 1991; ASSMANN, et al., 2002; LLOYD-JONES, et al., 2004; YUSUF, et al., 2004).

Uma complexa relação entre os fatores genéticos, fatores ambientais e idade também merecem destaque no processo fisiopatológico da doença (DAI, et al., 2016).

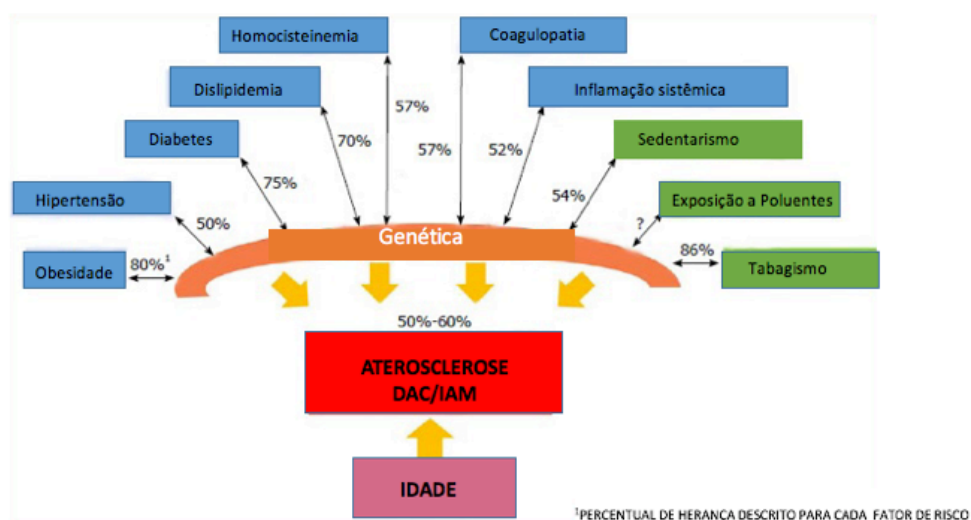


Figura 2. Complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e idade (Fonte: adaptado de DAI, et al., 2016)

Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2013), atualmente algumas hiperlipidemias graves, altamente relacionadas ao desenvolvimento de doença aterosclerótica, podem ser diagnosticadas através de genotipagem. Um importante exemplo é a Apolipoproteína E (Apo E), que se apresenta em três isoformas (Apo E2, E3 e E4), e na presença de homozigose para ApoE2, é diagnóstico de disbetalipoproteinemia familiar, importante hiperlipidemia combinada grave.

Vários fatores genéticos se relacionam à doença, e mais de 400 genes foram descritos na associação com a aterosclerose, seja por estar ligado à regulação da função endotelial, à inflamação, ao metabolismo dos aminoácidos, dos lipídios ou dos hidratos de carbono. Alguns se destacam como o *CYP1A*, *GSTs*, *ApoE*, e o *NOS* (MARQUES E SÁ, 2011; MARINKOVIĆ, et al., 2013).

Grande parte destes genes relacionados à doença aterosclerótica são polimórficos, e por codificarem proteínas envolvidas na fisiologia normal do endotélio, suas variações em determinadas situações poderão contribuir para etiopatogênese molecular na doença cardiovascular (GAIO, et al., 2014)

1.7.1. Polimorfismo Genético (PG)

Os cromossomos homólogos, numa determinada espécie, apresentam similaridade entre si. Porém em qualquer posição do cromossomo, poderá ocorrer uma variação na sequência do DNA (ROCHA, et al., 2007; REIS, 2010;).

A ocorrência de variação superior a 1% na população, numa determinada sequência, com um mínimo de dois fenótipos, é denominada polimorfismo (ROCHA, et al., 2007; REIS, 2010;).

Um dos fatores responsáveis pela diversidade humana, determinando diferenças fenotípicas é o polimorfismo. Essa variabilidade pode influenciar diretamente sobre fatores de risco que se associam a doenças multifatoriais. E explicar as diferenças apresentadas entre os indivíduos de uma mesma espécie na evolução clínica e resposta terapêutica para uma mesma patologia e medicação utilizada (TARDIN, et al., 2009).

Dentre os PG, encontra-se o polimorfismo Inserção/Deleção, podendo ou não estar associada a variação do número de repetições em sequência (do latim, *in Tandem*) (VNTRs); Outro exemplo de polimorfismo muito comum são os polimorfismos de nucleotídeo único-SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*) (TARDIN, et al., 2009).

1.8. Óxido nítrico (NO), origem e função

O NO é uma pequena molécula com peso de 30 Daltons, e sua produção é resultado da conversão de L-arginina em L-citrulina através da atividade enzimática exercida pela família das óxido nítrico sintetases (NOS), nas células endoteliais (NISHEVITHA, 2009).

Para síntese necessita da presença dos cofatores mononucleotídeo flavina, do dinucleotídeo adenine flavina, cálcio/calmodulina e tetra-hidrobiopterina. Esse gás possui meia-vida curta, de 4 a 8 segundos. Sua produção ocorre na parede vascular após estímulo de agonistas como a acetilcolina e bradicinina, liberados durante estresse vascular, pela isoforma óxido nítrico endotelial sintetase (*eNOS*).

Há pelo menos três isoenzimas de NOS codificadas por diferentes genes nos mamíferos: óxido nítrico sintetase endotelial (*eNOS* ou NOS III); óxido nítrico sintetase neuronal (*nNOS* ou NOS I; 12q24.2) e óxido nítrico sintetase induzida (*iNOS* ou NOS II;17cen-q12) (SHANKARISHAN, et al., 2011; DIAS, 2012; YANG, et al, 2014).

Trabalhos foram publicados demonstrando relação entre níveis de NO e doenças cardiovasculares. E sua importância se dá ao fato de atuar como agente pró-relaxante da musculatura lisa vascular, e responsável também pela manutenção da homeostasia vascular (SAINI, et al, 2011).

A disfunção endotelial, provocado pelos fatores de risco citados acima como a hiperlipidemia, diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo, hiper-homocisteinemia, determinam um mal funcionamento da *eNOS*, com produção de peroxinitrito ao invés de NO. (PONNUSWAMY, et al., 2012; LUO, et al., 2014)

O NO é tido como importante agente protetor arterial e anti-aterogênico. Atua diminuindo adesividade leucocitária, agregação plaquetária, migração das células musculares lisas para o endotélio e inibição da vasoconstrição. Inibe a oxidação de moléculas de LDL-C por ação antioxidante (PINHO, et al., 2010).

A ação antiagregante ocorre pela ligação do NO à molécula de guanilatociclase, que induz formação de guanilato monofosfato cíclico (GMPc), promovendo baixa concentração de íons cálcio no interior das plaquetas e consequente inativação e antiagregação (PINHO, et al., 2010). Ou seja, atua em todos os fatores envolvidos no processo de aterogênese impedindo seu desenvolvimento e evolução. E isso irá ocorrer na dependência da biodisponibilidade, determinada pelo balanço entre a síntese e degradação (PONNUSWAMY, et al., 2012).

No momento em que ocorre *stress* oxidativo, seja físico ou humoral, há desequilíbrio na homeostasia da parede vascular, com baixa biodisponibilidade de NO, resultante do aumento da produção de NAD(P)H oxidase e consequente aumento de ânion superóxido (O_2^-), que se liga ao NO elevando a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (ZAGO, et al., 2010; PONNUSWAMY, et al., 2012).

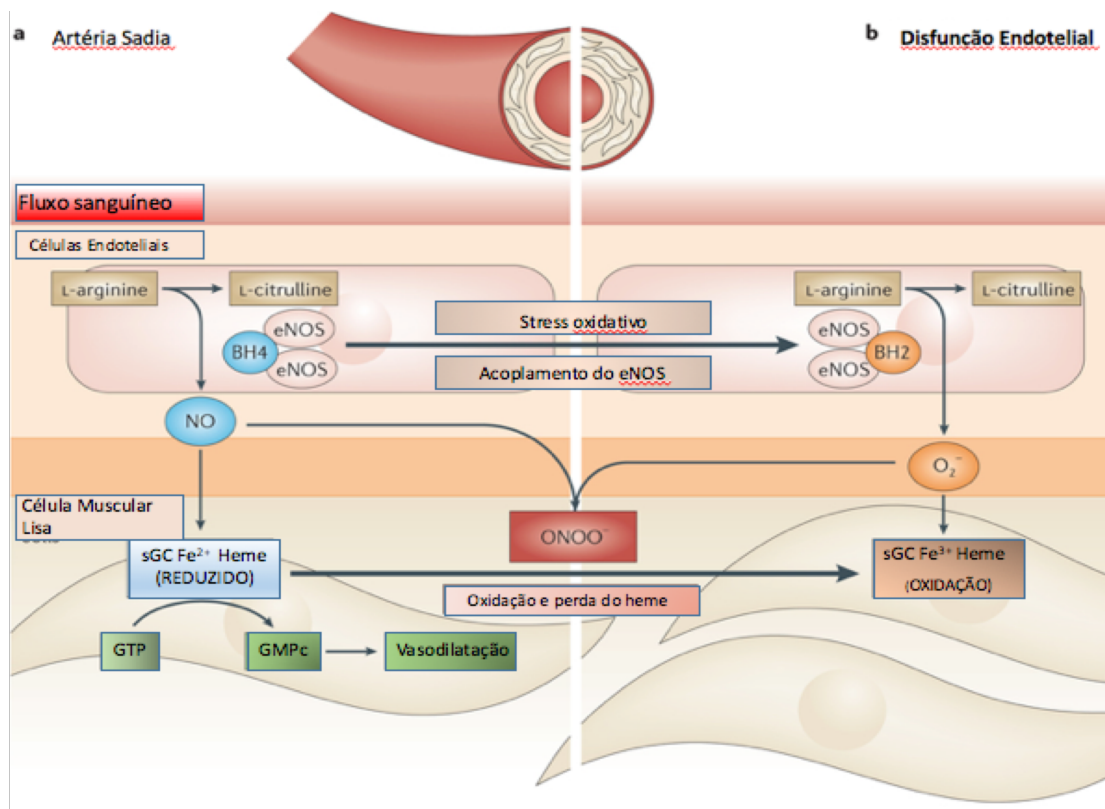


Figura 3. Comportamento do Oxido nítrico (NO) vascular na artéria sadia e doente (Fonte: adaptado de Lundberg, et al., 2015)

1.8.1. Polimorfismo do Gene *eNOS*

Dentre os fatores genéticos associados, diversos estudos clínicos-genéticos identificaram o polimorfismo no gene que codifica *eNOS* como responsável pelo desenvolvimento da DA, com repercussão clínica variada (ZIGRA, et al., 2013; IDRISSEI, et al., 2016).

O gene responsável pela codificação *eNOS* se localiza no braço longo do cromossomo 7, da região 35 até 36 (7q35→36). Apresentam 26 exons e 25 introns, com total de 21 kilobases (Gen Bank D26607), codificado por 4052 nucleotídeos no mRNA, e é expresso pelas células endoteliais tanto de vasos centrais como periféricos. (SALIMI, et al., 2010; LIU, et al., 2005).

Foram identificados alguns sítios, principalmente em regiões intrônicas, que apresentam polimorfismo e irão atuar de forma diferenciada na produção e/ou expressão do NO no endotélio arterial (figura 4) (LIU, et al., 2005).

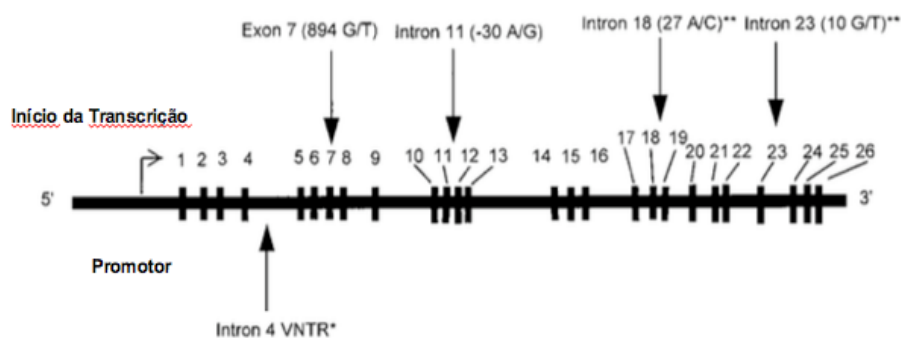


Figura 4. Polimorfismo em humanos do gene *eNOS* em regiões de introns e exons (Fonte: adaptado de HINGORANI, et al., 1999).

1) A variação do número de repetições in Tandem (sigla em inglês, VNTRs): ocorre no Intron 4, com 4 VNTR (*4b/a*) possui dois alelos recessivos, correspondendo à uma inserção-deleção onde em *4a* possui quatro repetições sequenciais de 27 pares de bases e em *4b* cinco (NIU, 2011), e implica em redução dos níveis plasmáticos de NO (YANG, et al., 2014; SHEWEITA, et al., 2011). No intron 13, quando ocorre a repetição mínima de 38 cópias, geralmente entre 17 e 44 cópias de CA há um grande aumento do risco de eventos cardiovasculares.

2) Polimorfismo de nucleotídeo único (sigla em inglês, SNP): estudos descrevem em japoneses, a presença de vasoespasm coronariano relacionado a substituição de pares de bases em 786T/C (rs2070744), 922A/G e 1468T/A na região promotora do gene *eNOS* (SHEWEITA, et al., 2011). Porém apenas na primeira situação, onde ocorre a substituição de uma Timina (T) por uma Citosina (C) no códon 786, em região promotora lateral de 5' do gene *eNOS*, foi possível determinar redução significativa da atividade enzimática na região e consequente baixo nível sérico de NO (DENGEL, et al., 2007; YANG, et al., 2015; SHEWEITA, et al., 2011).

3) Substituição de aminoácido: esta alteração também se apresenta como um SNP, porém com particularidade de ocorrência em região de exon 7, na posição 894, nucleotídeo (códon) 298, onde a simples substituição de uma Guanina por uma Timina (G/T), irá promover alteração dos aminoácidos não essenciais, Glutamato por Aspartato (Glu298Asp: rs:1799983; rs:7830; rs:3918188), influenciando na estabilidade da enzima (YANG, et al., 2015).

Desta forma, encontramos descrito na literatura o mesmo polimorfismo como: G894T (substituição de Guanina por Timina na posição 894), ou Glu298Asp (substituição do aminoácido não essencial Glutamato por Aspartato no códon 298).

SNP:

rs1799983: CCCCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA[G/T]CCCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCC

Essa alteração determina uma degradação acelerada, reduzindo de forma significativa a produção de NO (SHEWEITA, et al., 2011). Esse polimorfismo é também descrito como G894T e em diversos estudos apresentaram forte relação com DA e suas complicações como o infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico isquêmico (ELLUL, et al., 2011; SHANKARISSHAN, et al., 2011).

Diversos estudos e meta-análises foram realizados na tentativa de estabelecer ligação entre a presença de doença aterosclerótica, com suas variadas apresentações e complicações, com polimorfismo do gene *eNOS* nas três principais situações G894T, 4b/a VNTR e 786T/C, porém apresentam resultados controversos.

No processo de aterogênese, a interferência nos fatores de risco, parece ser o caminho para prevenção e/ou mesmo retardo na evolução da doença aterosclerótica.

O conhecimento do perfil genético pode beneficiar indivíduos mais suscetíveis com instituição precoce de medidas preventivas e/ou medicamentosa com melhor determinação prognóstica e maior sobrevida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar o polimorfismo do gene *eNOS* G894T nos grupos de indivíduos com doença aterosclerótica sintomática e no grupo controle.

2.2. Objetivos Específicos

Detectar o polimorfismo do gene *eNOS* G894T em pacientes de Goiânia para o SNP G894T.

Verificar a associação entre os possíveis genótipos para polimorfismo do gene *eNOS* e a doença aterosclerótica.

Avaliar distribuição entre os possíveis genótipos para polimorfismo do gene *eNOS* e o fator de risco relacionado ao gênero nos indivíduos do grupo caso e controle.

Verificar a associação entre os possíveis genótipos para polimorfismo do gene *eNOS* e o fator de risco tabagismo, assim como a carga tabágica nos indivíduos do grupo caso e controle.

Verificar possível associação entre os possíveis genótipos para polimorfismo do gene *eNOS* e o consumo de álcool nos indivíduos do grupo caso e controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram coletadas amostras de sangue periférico com heparina de 300 pacientes no período de outubro de 2014 a fevereiro de 2015, do Serviço de angiologia/cirurgia vascular e cardiologia da clínica Angiogyn, situada no município de Goiânia, para estudo caso-controle. Destes pacientes 200 apresentavam previamente, diagnóstico de doença aterosclerótica, seja em território periférico e/ou central, avaliados através de historia clínica, exame físico e confirmados através de angiografia, e 100 amostras para o grupo controle baseado nas manifestações clínicas e método de imagem não invasivo.

Os critérios de inclusão para os pacientes portadores de doença aterosclerótica foram idade superior a 38 anos, presença de sintomas para doença aterosclerótica (dor precordial, claudicação intermitente, dor em repouso em membros inferiores e/ou AVC isquêmico com doença carotídea comprovada), comprovação da doença através de exame de imagem (angiografia coronária, carotídea e/ou periférica), que assinaram ao termo de consentimento

livre e esclarecido – TCLE- (apêndice II), e concordaram em responder ao questionário da pesquisa (apêndice I). Os critérios de exclusão foram pacientes com idade inferior a 38 anos, que não concordaram em assinar o TCLE e/ou não quiseram responder ao questionário.

Para o grupo controle foi adotado como critérios de inclusão idade superior a 38 anos e que não apresentaram diagnóstico de doença aterosclerose, avaliadas por história clínica, exame físico e) e/ou exames de imagem não invasivos - Eco color Doppler de carótidas sem evidência de placa ateromatosa e sem espessamento mio-intimal (Complexo mio-intimal < 1 mm) e que concordaram em assinar termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE- (apêndice III), e responderam ao questionário da pesquisa. Os critério de exclusão foram os mesmo do grupo caso. O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Sistema Nacional de Informações Sobre Éticas em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC GOIAS. (Número: 35321614.3.0000.0037).

Na avaliação dos pacientes quanto ao tabagismo, em consonância ao Projeto e Diretrizes da Associação Médica Brasileira (2013), foram classificados, tanto o grupo caso quanto o controle em dois distintos grupos: Fumantes, usuário regular de tabaco fumado e/ou derivados (tabagista), e que interromperam o hábito a menos de 15 anos; Não Fumantes, que nunca fez uso de produtos do tabaco fumado e que interrompeu seu uso em período igual ou superior à 15 anos.

3.2. Análises Moleculares

Para realização da extração do DNA genômico do sangue coletado foi utilizado o kit Kaswi®(Genomic DNA Purification Kit),no Laboratório do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontificia Universidade Católica de Goiás, conforme recomendações do fabricante. Após extração, foi feita a quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus, e só foram utilizadas as amostras cujo o resultado da quantificação, em relação a concentração de DNA, foi superior a 5ng/μl. O DNA foi armazenado à temperatura de -20°C até sua amplificação pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Após extração e quantificação, as amostras de DNA foram amplificadas por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*), para análise e pesquisa do polimorfismo do gene *eNOS*. (Tabela III e IV). Para evitar contaminação das amostras a análise foi realizada em capela apropriada, com fluxo laminar, de acordo com o protocolo proposto por Frare (2011).

Para o estudo do polimorfismo do gene *eNOS* na G894T utilizou-se três pares de primers: primer forward, reverse normal e reverse mutante. A presença da amplificação da banda significa presença de polimorfismo TT/GT/GG, sendo a PCR sempre realizada em duplicata (MEHRTASHFAR et al, 2014).

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% em um campo elétrico de 10 V/cm e corado com brometo de etídio (5mg/mL) sendo visualizado em seguida no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA)

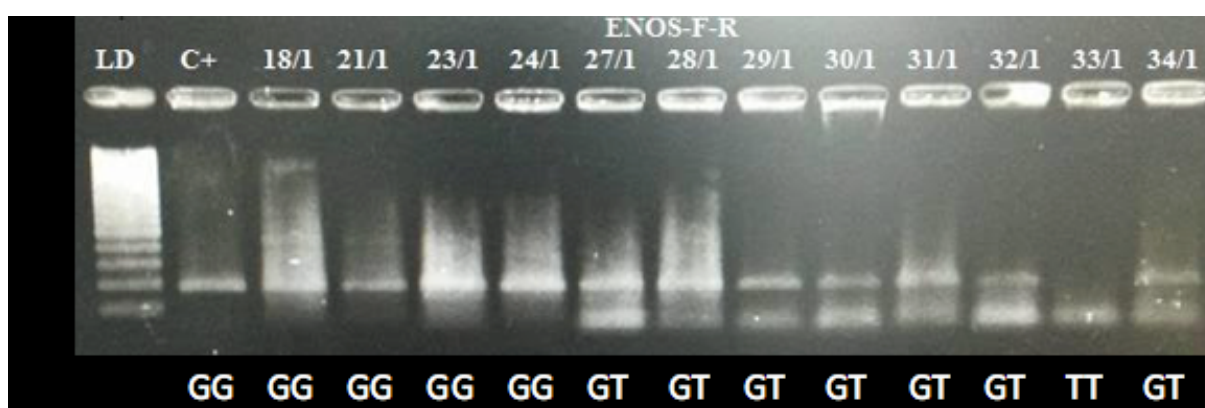


Figura 5 - Produto da PCR em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

Tabela 1 - Protocolo para amplificação do polimorfismo do *eNOS* para PCR.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,0 µL
dNTPs	3,0 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 ₂ O Mili Q	12,3	17,2 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	1,0 µL
Volume final		25,0 µL

Tabela 2 - Protocolo de termociclagem para amplificação dos primers *eNOS* 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	∞	

Na tabela 3 temos as seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) utilizados para a amplificação da região.

Tabela 3 - Seqüência nucleotídica dos primer *eNOS*

<i>eNOS</i>	F _c : 5' AAGGCAGGAGACAGTGGATG 3' R _N : 5' TGAAGGAAGAGTTCTGGTGGC 3' R _M : 5' GAAGGAAGAGTTCTGGTGGGA 3'	196pb
-------------	---	-------

Tajehmiri et al, 2013

3.3. Análise estatística

Para análise estatística do polimorfismo do gene *eNOS*, foram utilizados os testes qui-quadrado e o Teste G, com escolha de um ou de outro de acordo com a variável analisada e de acordo com o que melhor se adequava, utilizando o *software* Biostat 5.0. Para diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

No grupo caso, foram analisados 200 pacientes, com média de idade de 61,1 anos enquanto no grupo controle, constituído de 100 pacientes, a média de idade foi de 50,2 anos.

A distribuição do polimorfismo G894T do gene *eNOS* encontrada no grupo caso foi de 10% (20/200) GG, 76% (152/200) GT e 14% (28/200) TT. E no grupo controle foi de 2%

(2/100) GG, 85% (85/100) GT e 13% (13/100) TT, houve diferença estatística entre os grupos caso e controle em relação à distribuição genotípica ($p= 0,0378$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição do Polimorfismo do gene eNOS nos grupos caso- controle

	GG		GT		TT		TOTAL		p^*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Caso	20	10	152	76	28	14	200	100	0.0378
Controle	02	2	85	85	13	13	100	100	

* Teste Qui-quadrado

A diferença entre os grupos para o genótipo GG foi 5 vezes maior para o grupo caso.

Em relação à distribuição genotípica nos gêneros, o sexo masculino apresentou no grupo caso 7,6% (7/ 92) GG, 79,3% (73/ 92) GT e 13,1% (12/ 92). O grupo controle apresentou 1,9% (1/ 53) GG, 88,7% (47/ 53) GT e 9,4% (5/ 53).

O gênero feminino apresentou frequência genotípica no grupo caso de 12,1% (13/ 108) GG, 73,1% (79/ 108) GT e 14,8% (16/ 108). E o grupo controle 2% (1/47) GG, 81% (38/47) GT e 17% (8/47) TT.

Não houve significância entre genótipos do polimorfismo G894T do gene *eNOS* e o sexo masculino ($p= 0,2133$) ou feminino ($p= 0,0850$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição do polimorfismo *eNOS* em relação ao sexo nos grupos caso e controle.

Sexo	GG		GT		TT		Total	p^{**}	
	n	%	n	%	n	%			
Masculino									
Caso	07	7,6	73	79,3	12	13,1	92	100	0,2133
Controle	01	1,9	47	88,7	05	9,4	53	100	
Feminino									
Caso	13	12,1	79	73,1	16	14,8	108	100	0,0850
Controle	01	2,0	38	81,0	08	17,0	47	100	

** Teste G

Quando analisamos a distribuição de indivíduos em relação ao hábito de fumar foi encontrado 35% (70/199) de pacientes no grupo caso e 25,3% (25/99) no grupo controle que se declararam fumantes, enquanto 65% (129/199) de indivíduos do grupo caso e 74,7% (74/99) do grupo controle declararam não fumar ou interromperam o hábito há 15 anos ou mais.

Ao avaliarmos a associação dos pacientes declarados tabagistas no grupo caso com a frequência dos genótipos, observou-se 10% (7/70) GG, 80% (56/70) GT e 10% (7/70) TT. No grupo controle, esta associação, apresentou frequência de 4% (1/25) GG, 88% (22/25) GT e 8% (2/25) TT, e não foi observado diferença significativamente estatística entre os grupos ($p=0,5658$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação do tabagismo com os genótipos do gene *eNOS* nos grupos caso e controle relacionado com o tempo de exposição ao tabaco.

Grupos	Fumantes (<15 anos)								
	Genótipos								
	GG		GT		TT		Total	p^{**}	
	n	%	n	%	n	%			
Caso	07	10	56	80	07	10	70	100	
Controle	01	4,0	22	88	02	8,0	25	100	0,5658

**** Teste G**

Na avaliação dos pacientes que se declararam não fumantes e pacientes com relato de interrupção do tabagismo superior à 15 anos, a frequência encontrada no grupo caso foi de 10% (13/129) GG, 73,7% (95/129) GT e 16,3% (21/129) TT. No grupo controle a frequência de não tabagista e ex-tabagista foi de 1,3% (1/74) GG, 83,8% (62/74) e 14,9% (11/74). Nesta associação dos genótipos com não tabagista e ex-tabagista superior há 15 anos foi encontrado diferença significativamente estatística ($p=0,0263$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação do tabagismo com os genótipos do gene *eNOS* nos grupos caso e controle relacionado com tempo de exposição ≥ 15 anos e que nunca fumaram.

Não Fumantes (ou ≥ 15 anos)								
Grupos	Genótipos						Total	<i>p</i> **
	GG		GT		TT			
	n	%	n	%	n	%		
Caso	13	10	95	73,7	21	16,3	129	100
Controle	01	1,3	62	83,8	11	14,9	74	100

** Teste G

O grupo caso o genótipo GG foi 9 vezes maior que no controle, indicando uma não associação do cigarro e o polimorfismo G894T.

Quando foi analisado a associação do tabagismo e correlação com a carga tabágica no grupo caso, os pacientes que declararam fumar 05 à 10 maços-ano apresentaram frequência genotípica de 0% (0/3) GG, 14% (6/43) GT e 14,2% (1/7) TT. Para os pacientes com carga tabágica de 10 à 20 maços-ano a frequência foi de 66,7% (2/3) GG, 32,5% (3/7) GT e 42,9% (3/7) TT. E para indivíduos que declaram fumar 20 ou mais maços-ano foi observado um maior número de GT 53,5% (23/43), do que GG e TT, tanto do grupo caso, quanto no controle que obteve 23% (03/13) GT. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos caso e controle quanto a carga tabágica (Grupo caso $p=0,7302$; Grupo controle $p=0,0765$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Associação do tabagismo com os genótipos do gene *eNOS* nos indivíduos fumantes dos grupos caso e controle relacionado com a carga tabágica.

FUMANTES							
Grupos	Grupo Caso						<i>p</i> **
	GG		GT		TT		
	n	%	n	%	n	%	
05 – 10	00	0,0	06	14,0	01	14,2	0,7302
10 – 20	02	66,7	14	32,5	03	42,9	
20 ou mais	01	33,3	23	53,5	03	42,9	
Total	03	100,0	43	100,0	07	100,0	

Grupos	Grupo controle						<i>p</i> **
	GG		GT		TT		
	n	%	n	%	n	%	
05 - 10	01	100,0	00	0,0	00	0,0	0.0765
10 – 20	00	0,0	10	77,0	02	100,0	
20 ou mais	00	0,0	03	23,0	00	0,0	
Total	01	100,0	13	100,0	02	100,0	

** Teste G

Na análise do polimorfismo em relação ao consumo de bebida alcoólica foi observado um maior número de indivíduos que se declararam não consumidores, tanto no grupo caso (182/200) quanto no grupo controle (80/100). E o genótipo que apresentou maior frequência foi GT, tanto para os grupos que se declararam consumidores, com 93,7% (15/16) grupo caso e 85% (17/20) para grupo controle, quanto para os grupos que declararam não consumir bebida alcoólica, com grupo caso 74,1% (135/182) e grupo controle 85% (68/80). Não foi observado diferença estatística entre os grupos que consomem ($p= 0,0734$), nem entre os grupos que não consomem bebida alcoólica ($p= 0,063$)(Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição do polimorfismo *eNOS* em relação ao consumo de Bebida alcoólica nos grupos caso e controle.

Genótipos	Grupos				p**
	Bebe		Controle		
	Caso			Controle	
	n	%	n	%	
GG	1	6,3	0	0	0,0734
GT	15	93,7	17	85	
TT	0	0	3	15	
Total	16	100,0	20	100,0	

Genótipos	Grupos				p*
	Não Bebe		Controle		
	Caso			Controle	
	n	%	n	%	
GG	19	10,5	2	2,5	0,063
GT	135	74,1	68	85	
TT	28	15,4	10	12,5	
Total	182	100,0	80	100,0	

* Teste Qui-quadrado **Teste G

5. DISCUSSÃO

A DA atualmente é responsável pela maior morbimortalidade no mundo e no Brasil (WHO, 2014; SAINI, et al., 2011; IBGE, 2010). Com a falta de justificativa para o risco excessivo da doença em situações de precocidade dos sintomas e suas complicações, assim como na ausência dos fatores tradicionais de risco, o estudo da suscetibilidade genética para doença passou a ser evidenciada (VISWANATHAN, et al., 1998).

Desde que foi descoberto a importância do NO no processo regulatório da homeostasia vascular, e que seus níveis eram regulados pelo gene *eNOS*, diversos polimorfismos foram estudados na tentativa de correlacionar suscetibilidade genética às doenças cardiovasculares (SAINI, et al., 2011).

A presença do polimorfismo G894T do gene *eNOS* em relação ao processo de produção do NO é controverso. Não está claro, nos estudos de associação se o polimorfismo G894T é uma variante genética funcional ou um marcador para outra variante funcional deste gene ou de outro gene adjacente (LEESON, et al., 2002).

Quando se realiza estudo da DA, tipo caso-controle, é necessário, para melhor interpretação dos resultados uma definição mais adequada dos grupos. Embora o reconhecimento da doença aterosclerótica em estágio subclínico seja difícil, uma vez que necessitaria de exames mais invasivos, e como descrito anteriormente, as lesões podem ocorrer em idade precoce sem determinar sinais e/ou sintomas, nosso estudo procurou selecionar pacientes com sintomas para DA e suas consequências para grupo caso e completa ausência de sinais clínicos e fatores de risco conhecidos para doença, aliado a exame não invasivo (Eco Doppler de carótidas), para seleção do grupo controle, na tentativa de diminuir este viés.

O alto grau de miscigenação na população brasileira, formado por europeus, índios e africanos, determinou importante fator de heterogeneidade genética entre os brasileiros. Pena (2005) destaca em seus estudos que a presença de características físicas são pobres indicadores de origem ancestral para determinar origem geográfica de um indivíduo brasileiro. Desta forma, também não conseguimos identificar a ancestralidade dos pacientes estudados tanto no grupo caso quanto no controle, apenas nacionalidade e região (centro-oeste brasileiro).

Quando se estuda variações genéticas, como o polimorfismo de genes, esta realidade se extrapola para nossos dados. Em nosso estudo foi evidente a presença de um maior número de indivíduos heterozigóticos (GT) tanto para o grupo caso (78%) quanto para o grupo controle (85%). Corroborando com nossos resultados Tardin e colaboradores (2013) estudou a população do Rio de Janeiro com objetivo de associar o polimorfismo G894T do gene *eNOS* e insuficiência cardíaca, encontrando maior frequência genotípica GT (48,3%), do que GG (40%) e TT (11,7%).

Rezende (2009), ao avaliar mulheres hipertensas no período do climatério no interior do estado de São Paulo, cidade de Rio Claro, identificou também a presença de maior número de pacientes heterozigóticas (GT=56,25%) em relação à homozigose (GG=40,625%; TT=3,125%). Castro (2006), em estudo abrangendo maior amostragem, na população de

Gravataí-RS ($n=437$), foram avaliados para esse mesmo polimorfismo em idosos com idade média de 66, 76 \pm 6,78 anos, apresentando frequência genotípica de GG=38,8% ($n=169$), GT=53,3% ($n=234$) e TT=7,8% ($n=34$).

Na América do norte, Garcia-González e colaboradores (2015) observou maior frequência do genótipo GT em pacientes com história familiar de doença coronariana em Yucatan, México.

Quando se avalia estudos em diferentes lugares do mundo a frequência de heterozigose (GT) se reduz em relação à homozigose, principalmente GG, inclusive ocorrendo inversão destas frequências. Fatine e colaboradores (2004), em estudo de população caucasiana da região central da Itália, quando avaliou doença aterosclerótica em território carotídeo não observou diferença de distribuição genotípica entre indivíduos heterozigotos GT (43%), para indivíduos homozigotos GG (42%) no grupo caso e no grupo controle com 46% GT e 44% GG ($p=0,16$). Diversos outros estudos em populações europeias apresentaram distribuição genotípica análoga com leve predominância para o genótipo GG: Inglaterra ($n=331$; GG 47,8%, GT 42% e TT 10,2%) (HINGORANI, et al., 1999), Alemanha ($n=190$; GG 50,5%, GT 40%, e TT 9,5%) (KREX, et al., 2006), Turquia ($n=150$; GG 49,3%, GT 41,3% e TT9,3%) (AFRASYAP, et al., 2004).

Estudos em populações africanas houve uma notável predominância do genótipo GG. Hillermann e colaboradores (2005), na África do Sul, publicou pequena amostra ($n=42$), com 78,6% GG, 19% GT e 2,4% TT. Li e colaboradores (2004), em população de afro-americanos apresentou ($n=60$) frequência genotípica de 70,4% GG, 23,9% GT e 5,6% TT.

Gad e colaboradores (2012), em pesquisa com uma amostra da população egípcia de 104 casos de pacientes com IAM e 101 controles apresentou uma predominância do genótipo GG (58,4%) em relação aos genótipos GT (33,7%) e TT (7,9%).

Em asiáticos o que chama a atenção, nos estudos publicados, além do genótipo GG predominante, foi a quase ausência e em alguns trabalhos total ausência do genótipo TT. Coréia ($n=411$; GG 97,6%, GT 19,5%e TT 0,9%)(MOON, et al., 2002), Japão ($n=513$; GG 84,4%, GT 17,4% e TT 0%) (KATO, et al., 1999), Índia ($n=105$; GG 74,3%, 25,7% e TT 0%) (NISHEVITHA, et al., 2009).

De acordo com a literatura, diversos estudos apresentam resultados conflitantes em relação à variação genotípica para o polimorfismo G894T do gene *eNOS* e relação à maior predisposição para DA (LUO et al., 2014). Na população que nós estudamos foi observado que a presença do genótipo GG mostrou maior predisposição para DA uma vez que ocorreu diferença estatística significativa entre os grupos caso e controle e o genótipo GG apareceu 5 vezes mais em indivíduos no grupo caso do que no grupo controle. Não foi encontrado outros estudos na população brasileira que fizesse a correlação deste polimorfismo com DA.

Luo e colaboradores (2014), realizando meta-análise para este polimorfismo e sua relação com IAM relata associação significativa em subgrupo de Asiáticos ($p < 0,05$), porém não encontrou significância estatística em grupos não-asiáticos ($p > 0,05$) e conclui que a etnia apresenta forte relação para definição desta associação (polimorfismo G894T X risco de IAM).

Kaur e colaboradores (2015), em seus estudos com 120 pacientes portadores de AVC e 101 controles, encontrou forte impacto do polimorfismo *eNOS* G894T, como fator predisponente em doença isquêmica cerebral na população do norte da Índia. Porém, esta relação ocorreu para o genótipo TT ($p = 0,05$) e o alelo T ($p = 0,014$)

Mokretar e colaboradores (2016) em estudo cohort de pacientes búlgaros apresentou alto percentual de alelos T894 em pacientes com isquemia coronariana ($n = 171$) em comparação ao grupo controle ($n = 123$) ($p = 0,006$).

Antoniades e colaboradores (2005) em seus estudos com 229 pacientes que apresentaram IAM em período precoce (idade inferior há 55 anos), evidenciou polimorfismo homocigótico (TT), para G894T com importante diferença significativa, assim como Isordia – Salas e colaboradores (2009) que descreveram Glu298ASP como fator de risco independente para IAM precoce.

Spence e colaboradores (2004) descreveu em seus estudos que indivíduos homocigóticos para mutação genotípica TT não apresentaram associação ao risco de IAM.

Quando Fatini e colaboradores (2004) avaliaram pacientes caucásianos não encontraram diferença estatística para o polimorfismo G894T ($p = 0,16$), assim como Andrikopoulos e colaboradores (2008) que também não encontram significância estatística do polimorfismo G894T em pacientes com IAM.

A relação do gênero como fator de risco para DA, já foi amplamente estudada, e apresenta forte tendência ao sexo masculino por razões genéticas, hormonais, e até mesmo culturais (WINHAM, et al., 2015). Porém, quando foi avaliado em nosso estudo a relação do polimorfismo G894T para gene *eNOS* entre os grupos caso e controle com os gêneros masculino e feminino, não foi encontrado diferença estatística.

Sinici e colaboradores (2009) pesquisando este polimorfismo na população turca e a correlação com doença vascular também não encontrou correlação significativa entre os sexos. Gad e colaboradores (2012) também não encontrou diferença estatística entre os sexos que contribuisse para uma maior influência no polimorfismo estudado em população egípcia.

Nasr e colaboradores (2015), em pesquisa do polimorfismo *eNOS* G894T como marcador de suscetibilidade para obesidade em população da Tunísia, revelou alta frequência de indivíduos masculinos com genótipo TT em comparação ao grupo controle, porém sem associação significativa para alteração da função vascular.

Estudos estatísticos publicados por Roger e colaboradores (2012) concluem uma prevalência consideravelmente menor, de doenças cardiovasculares, em mulheres no período de pré-menopausa comparado com período de pós menopausa e começo precoce de doença cardiovascular em homens.

Ao analisarmos a variável hábito de fumar, foi realizada divisão tanto nos grupos caso quanto controle em dois subgrupos: Fumantes, aqueles que declararam uso regular do tabaco ou que pararam em menos de 15 anos e o subgrupo de ex-fumantes, que cessaram o tabagismo por período igual ou superior a 15 anos e os que nunca fumaram. Essa opção de classificação foi realizada pois dados da Associação médica Brasileira (2013), descrevem que o risco de evento cardíaco agudo se reduz pela metade após um ano de interrupção do tabagismo e se iguala à população de não fumantes quanto é igual ou superior à 15 anos.

O tabaco fumado apresenta mais de 4,000 componentes, como monóxido de carbono, dióxido de carbono, amônia, óxido de nitrogênio, cianeto de hidrogênio, e nicotina. É considerado um importante vasoconstrictor, com ação deletéria direta sobre a parede arterial pelo estresse oxidativo, levando a disfunção endotelial (DZIDA, et al., 2012). Além disso associa ao efeito indesejado de elevação da pressão arterial e frequência cardíaca (SILVA A, 2005). O papel do hábito de fumar já foi comprovado em estudos experimentais, clínicos e anatomopatológicos como importante fator de risco para DA. Diversos estudos comprovam

que o risco é proporcional à idade de início do consumo, ao número de cigarros consumidos e duração do hábito (WENGER, 1977; JAJICH, et al., 1984; VOGT, et al., 1996; ALENCAR, et al., 2000).

Porém, em nosso estudo, ao analisar a relação do polimorfismo G894T do gene *eNOS*, em indivíduos que se declararam tabagista, assim como a carga tabágica em ambos os grupos (caso e controle), não foi evidente a influência deste fator de risco em nossa população. Corroborando com nossos resultados Castro (2016) em Porto Alegre-RS, avaliando a associação de atividade física, polimorfismo G894T, prevalência de fatores de risco e morbidade cardiovascular em idosos, também não encontrou relevância estatística ($p=0,960$)

Contradizendo nossos resultados Hassani e colaboradores (2016), ao estudar este mesmo polimorfismo apresentou em seus resultados diferença estatística em relação ao tabagismo ($p=0,04$), porém não menciona a carga tabágica dos grupos.

Quando passamos ao subgrupo de pacientes que interromperam o tabagismo por 15 anos ou mais e que nunca fumaram, observamos neste presente estudo relevância estatística para o genótipo GG se sobrepondo no grupo de pacientes com sintomas para DA.

Dzida e colaboradores (2012) ao analisar 166 indivíduos poloneses que sofreram IAM evidenciou um maior percentual de indivíduos não fumantes portadores do genótipo GG (86%) em relação ao genótipo TT+GT (14%). Porém refere a ocorrência de maior frequência do alelo T para o polimorfismo *eNOS* G894T entre os indivíduos fumantes do que os não fumantes ($p=0,039$) e conclui que o hábito de fumar teve impacto na associação com o polimorfismo G894T.

A relação entre o consumo de álcool, como fator de risco, e a DA é controverso. Em estudo populacional italiano realizado por Kiechl e colaboradores (1998), concluiu que há efeitos adversos e benéficos do álcool em relação à doença ou mesmo na sua prevenção. Como fator protetor, estariam o consumo esporádico de bebidas leves (consumo de álcool <50g/dl), por seus efeitos antitrombótico e inibidor da ação aterogênica dos altos níveis de LDL-C. Já os efeitos adversos estariam relacionados ao elevado consumo de bebidas ditas pesadas (consumo de álcool ≥ 100 g/dl).

Toda e AyajiKi (2010), em estudo de revisão, ao avaliar a associação da ação vascular do NO e o consumo de bebida alcoólica, observaram que a concentração de NO foi

inversa ao consumo de álcool. Ou seja, baixas concentrações de álcool determinaram aumentado NO endotelial por maior ativação e expressão do NOS. Em contrapartida a presença de alta concentração de álcool ou ingestão crônica determinou prejuízo da função endotelial com redução significativa da produção do NO.

Em nosso estudo avaliamos a relação entre os grupos caso e controle que declararam consumo de bebida alcóolica e o polimorfismo G894T, e os grupos que declararam não consumir bebida alcóolica e o mesmo polimorfismo. Não foi realizada subdivisão em relação à quantidade e tipo de bebida alcóolica consumida. Porém observamos que nos grupos estudados os indivíduos que declararam não consumir bebida alcóolica foi 11,3 vezes maior no grupo caso e 4 vezes maior no grupo controle em relação aos grupos caso e controle que declararam o consumo.

Quando foi pesquisado estudos que relacionam o consumo de bebida alcóolica e o polimorfismo G894T do gene *eNOS* só foi encontrado associação com doenças hepáticas e renais. Não foi encontrado nas plataformas PUBMED, SCIELO, LILACS e MEDLINE, estudos que realizaram esta associação com DA.

6. CONCLUSÃO

- A população estudada evidenciou um maior número de heterozigotos (GT), tanto para o grupo com aterosclerose, 7,2 vezes, quanto no grupo controle, 5,6 vezes, corroborando com a heterogeneidade da população brasileira.
- A presença do genótipo GG comparando aos grupos caso e controle mostrou maior suscetibilidade à doença aterosclerótica sintomática.
- Para os grupos não tabagistas e que interromperam o hábito do tabagismo igual ou superior a 15 anos houve influencia no polimorfismo estudado para o genótipo GG.
- Para os indivíduos que se declararam tabagista não foi encontrado diferença estatística entre os grupos estudados.
- Como não houve influência no polimorfismo o hábito do tabagismo, a quantidade de tabaco também não influenciou na presença do polimorfismo entre os grupos.
- Os gêneros masculino e feminino não influenciaram na presença do polimorfismo tanto no grupo caso quanto no grupo controle.
- Quando analisado a variável etilismo, tanto nos indivíduos que declararam consumir bebida alcoólica quanto os que negaram, em ambos grupos, não houve influência estatística significativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afrasyap L, Ozturk G. NO level and Endothelial NO Synthase Gene Polymorphism with Coronary Artery Disease from the Turkish Population. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004; 36: (10) 661- 666.

Alencar Y, Carvalho E, Paschoal S, Curiati J, Fing W, Litvoc J. Fatores de risco para aterosclerose em uma população idosa ambulatorial na cidade de São Paulo. *Arq Bras Cardiol*. 2000; vol 74 (n3), 181-188.

Andrikopoulos G, Grammatopoulos D, Tzeis S, Zervou S, Richter D, Zairis M, Gialafos E, Sakellariou D, Foussas S, Manolis A, Stefanadis C, Toutouzas P, Hillhouse E, GEMIG study investigators. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction, *BMC Med Genet*. 2008; 9: 43-49.

Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, Tentolouris C, Marinou K, Koumallos N, Stefanadis C. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol* 2005; 46, 1101-9.

Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002; 105:310–315.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002; 287:2570–2581.

Borrayo-Sanchezd, Gabriela, Association of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene 4G/5G Polymorphism with ST Elevation Acute Myocardial Infarction in Young Patients. 2009

Brito C, Murilo R, Duque A, Loureiro E, Merlo I, Fonseca Filho V. “Cirurgia vascular: cirurgia endovascular, angiologia”. Revinter,2014.

Buckley M, and Ramji D,. “The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1852 (7):1498-1510, july 2015

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

Castro L. Associação da atividade física e do polimorfismo G894T da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) na prevalência de fatores de risco e morbidades cardiovasculares em idosos. (Tese de Doutorado). PUC-RS. 2006.

Colditz GA, Rimm EB, Giovannucci E, Stampfer MJ, Rosner B, Willett WC. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary artery disease in men. *Am J Cardiol*. 1991; 67:933–938.

Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *Am J Epidemiol*. 1986; 123:48–58.

Cronenwett J, Johnston K. Rutherford’s Vascular Surgery. 8thed. Elsevier. 2014

Dzida G, Sobstyl J, Puźniak A, Prystupa A, Mosiewicz J. Impact of smoking status on particular genetic polymorphisms associations with cardiovascular diseases. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2012, Vol 6, n 1, 31-34.

E.Galkina and K.Ley, “Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis,” *Annual Review of Immunology*. 2009; vol. 27, pp. 165–197.

Fatini C, Sofi F, Gensini F, et al. Influence of *eNOS* Gene Polymorphisms on Carotid Atherosclerosis. 2004; 27:540-544.

Fatini C1, Sofi F, Sticchi E, Bolli P, Sestini I, Falciani M, Azas L, Pratesi G. *eNOS* G894T polymorphism as a mild predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2005 Sep;42(3):415-9.

Gad M, Rahman M, Hashad I, Abdel-Maksoud S, Farag N, Abou-Aisha K. Endothelial Nitric Oxide Synthase (G894T) Gene Polymorphism in a Random Sample of the Egyptian Population: Comparison with Myocardial Infarction Patients. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2012; 16: 695-700

García-González I, Solís-Cárdenas A, Flores-Ocampo J, Alejos-Mex R, Herrera-Sánchez L, González-Herrera L. G894T (*NOS3*) and G1958A (*MTHFD1*) gene polymorphisms and risk of ischemic heart disease in Yucatan, Mexico. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2015; vol. 27 (2): 64–73.

Gu L Okada, Y Clinton S, Gerard C, Sukhova G, Libby P, Rollins B “Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice”, *Molecular Cell*. 1998; vol: 2 pp: 275-281

Han, K. H., K. O. Han, S. R. Green, and O. Quehenberger. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J. Lipid Res*. 1999; 40: 1053–1063.

Hassani Idrissi H, Hmimech W, Diakite B, Korchi F, Baghdadi D, Habbal R, Nadifi S. Association of G894T *eNOS*, 4G/5G PAI and T1131C APOA5 polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction in Morocco. *Meta Gene*. 2016; vol: 9 pp: 56-61.

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016; 118:535-546.

Hillermann R, Carelse K, Gebhardt GS. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet*. 2005; 50:415–419.

Hingorani A, Liang C, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper R, Stephens N, O’Shaughnessy K, Brown M *Circulation*. 1999; 100:1515-1520.

Hopkins PN, Williams RR, Kuida H, Stults BM, Hunt SC, Barlow GK, Ash KO. Family history as an independent risk factor for incident coronary artery disease in a high-risk cohort in Utah. *Am J Cardiol.* 1988; 62:703–707.

IBGE, 2010. Síntese dos indicadores de saúde. Internet. [Http: www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)

Idrissi H, Hmimech W, Diakite B, Korchi F, Baghdadi D, Habbal R, Nadifi S. Association of G894T *eNOS*, 4G/5G PAI and T1131C APOA5 polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction in Morocco. *Meta Gene.* 2016; 9: 56-61.

Isordia-Salas I, Leanos-Miranda A, Sainz I, Reyes-Maldonado E. Association of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene 4G/5G Polymorphism with ST Elevation Acute Myocardial Infarction in Young Patients. *Rev Esp Cardiol.* 2009; Apr; 62(4):365-72.

Jajich CL, Ostfeld AM, Freeman Jr DH. Smoking and coronary heart disease mortality in the elderly. *JAMA* 1984; 252: 2831-4.

Juergens J, Bernartz P., “Atherosclerosis of the extremities”. In: *Peripheral vascular diseases.* (ed.) Philadelphia, W.B. Saunders. 1980; 5.^a ed,:253

Kannel WB, McGee DL., “Update on some epidemiological features of intermitente claudication: The Framingham Study. *J Am. Geriatr. Soc.* 1985; no:33, 13-18.

Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension.* 1999; 33(4):933-6.

Kaur K, Uppal A, Kaur A. An exonic G894T variant of endothelial nitric oxide synthase gene as a risk factor for ischemic stroke in North Indians. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2015; 75(4):339-50.

Kiechl S, Willeit J, Rungger G, Egger G, Oberhollenzer F, Bonora E. Alcohol Consumption and Atherosclerosis: What Is the Relation?: Prospective Results From the Bruneck Study. *Stroke.* 1998 May;29(5):900-7.

Krex D, Fortun S, Kuhlisch E, et al. The role of endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) genetic variants in European patients with intracranial aneurysms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26:1250–1255.

Leeson C, Hingorani A, Mullen M, Jeerooburkhan N, Kattenhorn M, Cole T, Muller D, Lucas A, Humphries S, Deanfield J. Glu298Asp Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism Interacts With Environmental and Dietary Factors to Influence Endothelial Function. *Circ Res.* 2002; 90:1153-1158.

Li A, Glass C. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8(11):1235-42.

Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens.* 2004; 17:560–567.

Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005; 111 (25):3481-8

Libby P. History of Discovery: inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(9):2045-51.

Libby P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011; 473 (7347): 317–325.

Lloyd-Jones DM, Nam BH, D’Agostino RB, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PW, O’Donnell CJ. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA.* 2004; 291: 2204–2211.

Loppnow H, Buerke M, Werdan K, and Rose-John S. “Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis”, *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 115 (3): 484-500.

Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14:623–41

Luo J, Wen J, Zhou H, Chen X, Zhang W. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene G894T Polymorphism and Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of 34 Studies Involving 21068 Subjects. Miao X, ed. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e87196.

Maffei H, Yoshida W, Rollo H, Moura R, Sobreiro M, Giannini M, Lastória S. *Doenças Vasculares Periféricas*. 5^a ed. Guanabara. 2015; 2 vol.

Maiure M, Grassia G, Platt A, Carnuccio R, Ialente A, and Maffia P. “Macrophage Autophagy in Atherosclerosis,” Hindaw Publishing Corporation, vol. 2013 Article ID 584715,14 pages

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

Marques e Sá, AC. O papel dos polimorfismos genéticos na doença cardíaca isquêmica. Dissertação de mestrado em medicina. Universidade do Porto, Portugal, 2011.

Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G,. Atherosclerosis research from past to present- on the track of two pathologists with opposing views, Carls von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* 2006; 449:96-103.

Mokretar K, Velinov H, Postadzhiyan A, Apostolova M. Association of Polymorphisms in Endothelial Nitric Oxide Synthesis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System with Developing of Coronary Artery Disease in Bulgarian Patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016 Feb;20(2):67-73.

Moon JI, Yoon S, Kim E, Shin C, Jo SA, Jo I. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Thromb Res*. 2002; 15. 107(3-4):129-34.

Nasr H, Dimassi S, M'hadhbi R, Debbabi H, Kortas M, Tabka Z, Chahed K. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obes Res Clin Pract*. 2016;10(4):465-75.

Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. “Homocisteína”. J Bras Patol Med Lab. 2004; 40: 311-320.

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

Phillips AN, Shaper AG, Pocock SJ, Walker M. Parental death from heart disease and the risk of heart attack. Eur Heart J. 1988; 9:243–251.

Ponnuswamy P, Schrott A, Ostermeier E, Gruner S, Huang PL, Ertl G, Hoffmann U, Nieswandt B, Kuhlencordt PJ. *eNOS* protects from atherosclerosis despite relevant superoxide production by the enzyme in apoE mice. PLoS One. 2012; 7: e30193.

Rafieian-Kopaei M, Asgary S, Adelnia A, Setorki M, Khazaei M, Kazemi S, et al. “The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits”. J Med Plants Res. 2011; 5:2670–6.

Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, and Nascri H. “Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes”, Int J Prev Med. 2014; 5(8): 927–946.

Reis A. Estudo da Associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireoide. [Manuscrito] Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. 2010

Rezende T. Papel do polimorfismo no gene da síntese do óxido nítrico endotelial (*eNOS*) na posição G894T na resposta pressórica em mulheres no climatério: efeito do treinamento físico. (Dissertação Mestrado). UNESP. 2009.

Saini V, Bhatnagar MK, Bhattacharjee J. “Association of endothelial dysfunction with endothelin, nitric oxide and NOS Glu298Asp gene polymorphism in coronary artery disease”. Disease markers. 2011;31(4):215-222.

Semenkovich CF, Goldberg AC, Goldberg JJ. “Disorders of lipid metabolism”, Williams textbook of endocrinology. In: Melmed S et al (Eds.), 12th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2011; 1633-74.

Sholtz RI, Rosenman RH, Brand RJ. The relationship of reported parental history to the incidence of coronary heart disease in the Western Collaborative Group Study. *Am J Epidemiol.* 1975; 102:350–356.

Silva M. Efeitos do tabagismo sobre o sistema cardiovascular: hemodinâmica e propriedades elásticas arteriais. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

Sinici I, Karahan S, Atalar E. Distribution of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish population. *J Investig Med.* 2009; 57(7):769-76.

Smith G, Shipley M, Rose G., “Intermittent claudication, heart disease risk factors, and mortality”. *Circulation.* 1990; 82: 1925-8.

Spence M, McGlinchey P, Patterson C, Allen A, Murphy G, Bayraktutan U, Fogarty D, Evans A, McKeeown P. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and ischemic heart disease, *Am Heart J.*2004; 148: 847-51.

Stacey J, Andrade M, Miller V., “Genetics of disease: Importance of sex and ethnicity”. *Atherosclerosis*, 03.021, 2015. *Stroke.* 1998; 29:900-907.

Tajehmiri A, Sadeghi H, Mehmandousti S, Kaveh N, Mohammadi F, Lotfi S, Mayali A, Mazdapour M. Association of the G894T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with migraine: an Iranian case-control study. *Journal of Biology and today's world.* 2013; 2 (9): 417-424.

Tardin O, Pereira S, Velloso M, Balieiro H, Alves T, Giro C, Pessoa L, Ribeiro G, Mesquita E. Polimorfismo G894T da Óxido Nítrico-Sintetase Endotelial e o Prognóstico na Insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(4):352-358.

Toda N, Ayajiki K. Vascular Actions of Nitric Oxide as Affected by Exposure to Alcohol. *Pharmacology and cell metabolism. Alcohol & Alcoholism.* 2010; 347–355.

Viswanathan M, Raj D, Prasanth H, Gopal P, Remaand M, Enas A, Lipoprotein(a) is an independent risk factor for coronary artery disease in NIDDM patients in South India. *Diabetes Care*. 1998; 21: 1819–1823.

Vogt MT, Cauley JA, Scott JC, Kuller LH, Browner WS. Smoking and mortality among older women. *Arch Intern Med*. 1996; 156: 630-6.

Wan, Ke et al. “The Association between Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio and All-Cause Mortality in Acute Coronary Syndrome after Coronary Revascularization.” Ed. Christina Bursill. *PLoS ONE* 10.4. 2015; e0123521.

Welch GN, Upchurch JR, Loscalzo J. “Hyperhomocysteinemia and atherothrombosis”. *Ann N Y Acad Sci*. 1997; 811:48-58.

Wenger NK. Preventive cardiology in the elderly. *Current Opinion in Cardiology*. 1997; 12: 195-201.

Winham S, de Andrade M, Miller V. Genetics of cardiovascular disease: Importance of sex and ethnicity. *Atherosclerosis*. 2015; 241(1):219-28.

World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014 [Internet]. 2014. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1.

Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, Fonseca FA, dos Santos JE, Santos RD, Bertolami MC, Faludi AA, Martinez TLR, Diamant J, Guimarães A, Forti NA, Moriguchi E, Chagas ACP, Coelho OR, Ramires JAF. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivo Bras Cardiol*. 2013; 101(4.1): 1-22.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004; 364:937–952.

Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med.* 2002; 252:247–254.

Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, et al. Plasma protein insudation as an index of early coronary atherogenesis. *Am J Pathol.* 1993; 143: 496–506.

Zigra A, Rallidis Loukianos S., Anastasiou G, Merkouri E, Gialeraki A. *eNOS* gene variants and the risk of premature myocardial infarction. *Disease Markers* 34. 2013; 431–436.

APÊNDICES

APÊNDICE I

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

Nº PRONTUÁRIO: _____ INICIAIS- _____ Nº TUBO _____

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ IDADE: (___)

SEXO: () M ; () F COR DA PELE: _____ (Branco, negro ou pardo)

FILHOS: () SIM () NÃO.

QUANTOS: HOMENS (___) MULHERES

(___) ABORTO: _____ QTOS _____ NATURALIDADE: _____

RESIDE EM: _____

TELEFONE: _____ TEL. CONTATO: _____

PROFISSÃO _____

1. ATUALMENTE FUMA: () SIM () NÃO

QUANTO TEMPO: () MAIS 10 ANOS () MENOS 10 ANOS INICIOU COM _____ ANOS

2. EX-FUMANTE () INICIOU COM QUANTOS ANOS (___) PAROU COM QUANTOS ANOS (___)

QUANTOS CIGARROS: 5-10/DIA () 10-20/DIA () 20 OU MAIS (), CARGA TABÁGICA: _____ MAÇOS/ANOS

2. BEBE () SIM () NÃO FREQUÊNCIA _____

VINHO () CERVEJA () CACHAÇA () OUTROS _____

1 COPO () 2-3 COPOS () 3 OU + COPOS ()

DIAGNÓSTICO: _____

INICIO DOS SINTOMAS AOS: _____ ANOS

SINTOMAS: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____. INÍCIO DO TRATAMENTO _____

CO-MORBIDADES: HAS () DM () DISLIPIDEMIA () HIPERHOMOCISTEINEMIA () IRC ()
DIALÍTICO (____)

D. ISQ. CORONARIANA () IAM () ____ / ____ AVE () ____ / ____

OUTRAS: _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

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

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

COMPLICAÇÕES? _____

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

FAZ USO DE CLOPIDOGREL? SIM () DOSE: ____ MG NÃO (). POR QUANTO TEMPO? ____
PAROU? () QUANTO TEMPO? ____ INÍCIO ANTES DE INTERVENÇÃO () APÓS
INTERVENÇÃO () TRATAMENTO CLÍNICO: SIM () NÃO ()

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE II

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos aos participantes, estando relacionados á acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Caso ocorra qualquer tipo de dano à saúde e à integridade física

e/ou psicológica do paciente em decorrência dos procedimentos da pesquisa, este teratendimento integral e irrestrito garantido pelo pesquisador responsável.

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

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

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

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

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

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

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

_____/_____/_____

Assinatura do participante Data

_____ / ____ / _____

Assinatura do responsável pelo estudo Data

APÊNDICE III

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-GRUPO CONTROLE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas 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