



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS PRÓ-
REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA**

**ATEROSCLERÓTICOS HIPERTENSOS E OS
POLIMORFISMOS DOS GENES *eNOS* (G894T e T786C),
GSTT1 e *GSTM1***

Goiânia – GO

2016

MONIZE PRADO DE MORAIS

**ATEROSCLERÓTICOS HIPERTENSOS E OS
POLIMORFISMOS NOS GENES *eNOS* (G894T e T786C),
GSTT1 e *GSTM1***

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kátia Karina Verolli De
O. Moura

Goiânia – GO

2016

M827a Morais, Monize Prado de
 Ateroscleróticos hipertensos e os polimorfismos nos
 genes eNOS (G894T e T786C), GSTTI e GSTMI[manuscrito]/
Monize Prado de Morais.-- 2016.
 70 f.; il. 30 cm

 Texto em português com resumo em inglês
 Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
 Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto
Sensu em Genética, Goiânia, 2016
 Inclui referências f.49-70

 1. Aterosclerose. 2. Hipertensão. 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 a Deus e à minha família, especialmente à Claudia, Romilda, Bruno e Raissa.

“O entendimento para aqueles que o possuem, é uma fonte de vida, mas a instrução dos tolos é a sua estultícia.”

Provérbios 16:22

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Senhor da minha vida.

À minha mãe, mulher virtuosa, que com amor incondicional cuidou de minha educação e formação para que eu pudesse chegar até aqui.

À vovó Romilda que cooperou grandemente me suprindo em tudo que eu precisei.

Ao meu irmão Bruno (e família) que além de me dar suporte em todas as coisas, mostrou nesta jornada um imenso carinho, atenção e zelo por mim, mesmo estando longe.

À minha irmã caçula, Raissa, que sempre acreditou em meus sonhos.

Aos meus tios Fernando e Andrea (e família), tio Renato, primo Thiago e amiga Talitha: amados, amáveis e solícitos.

Aos meus familiares e amigos que oraram por mim e que tornam a minha vida mais simples e divertida.

Aos meus colegas de orientação: Débora, Fábio, Iasmim, José Vitor, em especial Andreia, Magda, por todo trabalho, dedicação, ajuda mútua e compreensão em momentos difíceis.

Aos professores do mestrado, que me transmitiram muito conhecimento.

Aos meus colegas e funcionários do Replicon, Alessandra, Aldaires, Cristiano, Eduardo, Lilian, e as pessoas da iniciação científica que contribuíram de alguma forma com esta pesquisa, seja com o tempo, o trabalho, a atenção ou a solicitude para comigo.

À FAPEG a qual disponibilizou recursos que tornou possível esta pesquisa.

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

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

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profª Drª Kátia Karina Verolli O. Moura, por ter me aceito como sua orientanda, por ter contribuído imensamente com meu conhecimento (teórico e prático), pela paciência, pelo tempo gasto ao meu lado na sala da sua casa ou na PUC-GO, por estar sempre acessível até nas férias e feriados, pela compreensão, pelas correções, pela ajuda e pelo carinho que a senhora sempre me transmitiu.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	xi
ANEXOS	xii
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ATEROSCLEROSE	17
1.2 FATORES DE RISCO DA ATEROSCLEROSE	21
1.3 A HIPERTENSÃO COMO FATOR DE RISCO	21
1.3.1 ASPECTOS GENÉTICOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA ..	24
1.4 Genes candidatos	25
1.4.1 Gene da síntese de óxido nítrico endotelial (<i>eNOS</i>)	25
1.4.2 Glutathione S-Transferase (<i>GST</i>)	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Participantes da Pesquisa	29
3.1.1 Grupo Controle:	29
3.1.2 Grupo Caso:	30
3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras	30
3.3 Extração e quantificação de DNA	30

3.4	Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	30
3.5	Géis	31
3.6	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo G894T do gene <i>eNOS</i>	34
4.2	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo T786C do gene <i>eNOS</i>	35
4.3	Frequência do gene <i>GSTT1</i>	35
4.4	Frequência do gene <i>GSTM1</i>	36
4.5	Tabagismo	36
4.6	Bebida alcoólica	39
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1– O LDL fica retido no espaço subendotelial onde está sujeito a modificação oxidativa pelas células vasculares residentes, tais como células de músculo liso, células endoteliais e macrófagos. O LDL oxidado estimula a quimiotaxia de monócitos (A), impede a saída de monócitos (B), e auxilia a formação de células espumosas (C). Uma vez formado, o LDL oxidado também resulta em disfunção e lesão endotelial (D), e células espumosas se tornam necróticas, devido ao acúmulo de LDL oxidado (E). 19
- Figura 2 – A aterosclerose começa com lesão (A), que é caracterizado por aumento da permeabilidade endotelial e deposição lipoproteína de baixa densidade (LDL) no espaço subendotelial. Isto é seguido pela adesão de leucócitos e transmigração através do endotélio. Nas fases intermédias (B), ocorre a formação de células de espumosas e uma resposta à doença inflamatória, incluindo a ativação de células T, a adesão e agregação de plaquetas, e ainda a entrada de leucócitos para dentro da parede dos vasos com a migração de células do músculo liso para a íntima. Finalmente, avançada a aterosclerose (C) é caracterizada pelo acúmulo de macrófagos, formação do tampão fibroso, e necrose no núcleo da lesão. 20
- Figura 3 – Representação esquemática do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. A renina converte o angiotensinogênio (AGT) em angiotensina 1 (Ang 1). Ang 1 é então convertido em angiotensina II (Ang 2) ligada à ECA. Em seguida, a Angiotensina II liga-se ao receptor AT1. 23
- Figura 4 – Ilustração da deleção de *GSTM1*. São mostradas as posições relativas dos genes da classe Mu de GST, no cromossomo 1p, e a representação do alelo selvagem e polimórfico do gene *GSTM1*. 27
- Figura 5 – Ilustração da deleção de *GSTT1*. São mostradas as posições dos genes da classe Theta de GST, no cromossomo 22q, e a representação do alelo selvagem e polimórfico do gene *GSTT1*. 27
- Figura 6 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, indicando a presença ou ausência do alelo selvagem (G) do polimorfismo G894T do gene *eNOS*. O ladder

	confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 181 pb. As colunas de 1 a 4 mostram a amplificação da banda.	31
Figura 7 –	Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, indicando a presença ou ausência do alelo mutante (T) do polimorfismo G894T do gene <i>eNOS</i> . O ladder confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 171 pb. As colunas de 15, 19, 20 e 21 mostram a amplificação da banda.	32
Figura 8 –	Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. Polimorfismo T786C do gene <i>eNOS</i> . Colunas 1, 2, 3 e 4 indicam a presença do genótipos CC.	32
Figura 9 –	Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Genotipagem do gene GSTT1 : Peso Molecular (PM): 480pb; C+: controle positivo; Coluna 01: GSTT1 nulo; Colunas 02, 03, 04: GSTT1 presente.	32
Figura 10 –	Gel de agarose à 2% corado com brometo de etídeo. Genotipagem do gene GSTM1 : Peso Molecular (PM): 215pb; C+: controle positivo; Colunas 01: GSTM1 nulo; Colunas 02, 03 e 04: GSTM1 presente.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> dos genes <i>eNOS</i> (G894T e T786C), <i>GSTT1</i> e <i>GSTMI</i>	31
Tabela 2 – Distribuição do Polimorfismo do gene <i>eNOS</i> (G894T) nos grupos caso e controle.	34
Tabela 3 – Distribuição dos alelos G e T do gene <i>eNOS</i> (G894T) nos grupos caso e controle.	34
Tabela 4 – Distribuição do Polimorfismo do gene <i>eNOS</i> (T786C) nos grupos caso e controle.	35
Tabela 5 – Distribuição dos alelos T e C do gene <i>eNOS</i> (T786C) nos grupos caso e controle.	35
Tabela 6 – Distribuição do Polimorfismo do gene <i>GSTT1</i> nos grupos caso e controle.	36
Tabela 7 – Distribuição do Polimorfismo do gene <i>GSTMI</i> nos grupos caso e controle.	36
Tabela 8 – Associação do hábito de fumar com os polimorfismos nos grupos caso e controle.	37
Tabela 9 – Associação das pessoas que nunca fumaram com os polimorfismos nos grupos caso e controle.	38
Tabela 10 – Associação das pessoas que pararam de fumar há mais de 15 anos com os polimorfismos nos grupos caso e controle.	39
Tabela 11 – Associação dos participantes dos grupos caso e grupo controle que declararam consumir bebida alcoólica com os polimorfismos nos grupos caso e controle. . .	40
Tabela 12 – Associação dos participantes dos grupos caso e grupo controle que declararam não consumir bebida alcoólica com os polimorfismos nos grupos caso e controle.	41

ANEXOS

ANEXO A – QUESTIONÁRIO64
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO66

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGT	Angiotensinogênio
Ang 1	Angiotensina I
Ang 2	Angiotensina II
AVE	Acidente Vascular Encefálico
DA	Doença aterosclerótica
DAC	Doença Arterial Coronariana
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
ECA	Enzima conversora da angiotensina I
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
GST	Gene das Glutathione S-transferases
GSTM1	Glutathione S-transferase M1
GSTT1	Gene da Glutathione S-transferases T1
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IDL	<i>Intermediate-density lipoproteins</i>
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LD	Ladder
LDL	<i>Low-density Lipoprotein</i>
mM	Milimolar

MMP	Metaloproteinases
nNOS	óxido nítrico sintase neurona
NO	Óxido Nítrico
PA	Pressão arterial
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Polimorfismo único de nucleotídeo
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato de EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
VDS	Sistema de vídeo documentação
VLDL	<i>Very-low-density Lipoprotein</i>

RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A hipertensão arterial sistêmica é considerada o principal fator de risco para a formação das placas aterogênicas, aumentando o risco de eventos cardiovasculares em duas a três vezes. Vários genes estão envolvidos no processo da aterogênese e da hipertensão, nesta pesquisa foram estudados alguns polimorfismos de genes candidatos partícipes do processo que envolve ambas patologias, os polimorfismos G894T e T786C do gene *eNOS*, e os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTMI*. O objetivo deste trabalho foi analisar e associar tais polimorfismos em indivíduos ateroscleróticos hipertensos e em indivíduos com ausência de hipertensão e aterosclerose. Este estudo trata-se de um caso-controle onde foram analisadas 267 amostras sendo 100 do grupo controle e 167 do grupo caso. As amostras foram submetidas à extração de DNA, em seguida à PCR e analisadas em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio a 5 g/mL. Logo depois os resultados foram comparados utilizando o Teste Qui-Quadrado e o Teste G. Os resultados apontaram para uma prevalência do genótipo GT (76%) e do alelo mutante T (55,5%) do polimorfismo G894T (*eNOS*), com o *p* igual a 0,03. Já para o polimorfismo T786C (*eNOS*), o genótipo heterozigoto (TC) representou 58% da amostragem, com o alelo C prevalecendo com 61%, porém não houve significância estatística. Já na análise do gene *GSTT1* houve prevalência do genótipo presente (84%) assim como da presença de *GSTMI* (73%), sendo que em ambas associações o *p* detectado foi menor que 0,05. Foi encontrada associação entre o tabagismo apenas com o polimorfismo *GSTMI*. Quanto ao alcoolismo houve associação somente entre o *GSTT1* e o hábito de beber. São muitas as possíveis interações desses polimorfismos e o desenvolvimento da aterosclerose e hipertensão, mas ainda são necessários mais estudos para uma maior elucidação destas associações.

Palavras-chave: aterosclerose, hipertensão, *eNOS*, *GSTT1*, *GSTMI*.

ABSTRACT

The atherosclerosis is a multifactorial chronic inflammatory disease that occurs in response to the endothelial aggression, compromising the intimate layer of media and large caliber arteries. The systemic arterial hypertension is considered the main risk factor for the formation of atherogenic plates, increasing the risk of cardiovascular events between two and three times. Several genes are involved in the process of atherogenesis and hypertension, this research studies some polymorphisms for candidates genes that participates in the process which involves both pathologies, the polymorphisms G894T and T-786C of the genes *eNOS*, and the polymorphisms of the genes *GSTT1* and *GSTMI*. The objective of this work was to analyze and associate such polymorphisms in hypertensives atherosclerotics individuals and in individuals with absence of hypertension and atherosclerosis. This study deals with the control-case in which 267 samples were analyzed, of which 100 of control group and 167 of the group case. The samples were submitted to DNA extraction, then to PCR and analyzed in 1,5 % agarose gel, stained with ethidium bromide at 5µg/mL. Soon after, the results were compared using the Chi-Square test and the G-test. The results point to a prevalence of genotype GT (76%) and the mutant allele T (56%) of the polymorphism T786C (*eNOS*), with the p equal to 0.03. For the polymorphism T786C *eNOS*, the heterozygote genotype (TC) represented 58% of the sample, with the allele C prevailing with 61%, but there was no significant statistics. In the analysis of the gene *GSTT1* prevailed the present genotype (84%) as well as the presence of *GSTMI* (73%), in both associations the p detected was less than 0.05. Smoking association was found only in the polymorphism *GSTMI*. Regarding to alcoholism, there was only association between *GSTT1* and the habit of drinking. There are many possible interactions of these polymorphisms and the development of atherosclerosis and hypertension, but more studies are necessary for further elucidation of these associations.

Keywords: atherosclerosis, hypertension, *eNOS*, *GSTT1*, *GSTMI*.

1. INTRODUÇÃO

Leonardo da Vinci (1452–1519) em um de seus manuscritos apresentou uma das primeiras descrições conhecidas de aterosclerose – o entupimento de uma artéria em decorrência do acúmulo de gordura (KEELE, 1973). Curiosamente, a aterosclerose também é encontrada em estudos paleopatológicos em múmias antigas ou medievais. A primeira constatação da aterosclerose, confirmada em evidências morfológicas, foi feita em múmias egípcias de milhares de anos de idade no início do século XX (KIM et al., 2015).

A aterosclerose é caracterizada por lesões chamadas de placas de ateroma, que se projetam para as luzes vasculares onde podem causar obstruções e, por vezes, outras complicações tais como: insuficiência vascular periférica, acidente vascular encefálico (AVE), doenças cardíacas isquêmicas, infarto agudo do miocárdio (IAM) e morte súbita (SCHOEN et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2013). Essas complicações estão entre as principais causas de mortalidade do mundo (MURRAY et al., 2013).

As placas ateromatosas podem se iniciar durante a infância, mas só se observam as lesões arteriais no decorrer de décadas, quando surgem os sintomas da lesão (RIBEIRO & SHINTAKU, 2004). Além do histórico familiar, vários fatores de riscos podem ocasionar o aparecimento da doença, tais como: hipertensão arterial, diabetes mellitus, maus hábitos alimentares, tabagismo, alcoolismo, obesidade e sedentarismo (THOMPSON et al., 2013).

1.1 ATEROSCLEROSE

O termo aterosclerose deriva do grego “athero” cujo significado é mingau, papa ou caldo e “sclerosis” quer dizer endurecimento (GOTTIEB et al., 2005). Silenciosa e insidiosa, essa enfermidade representa o evento patológico inicial das doenças cardiovasculares como o infarto cerebral, as doenças cardíacas isquêmicas, infarto agudo do miocárdio e morte súbita (MARTELLI, 2014; NASCIMENTO et al., 2013). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (BEDI et al., 2010). É a causa primária de doença arterial coronária (DAC) e (AVE), sendo responsável por aproximadamente 50% das mortes em países ocidentais (ROBERTS, 1995; DZAU, 2004).

As lesões ateroscleróticas resultam da acumulação de lipídios e macrófagos/ linfócitos na íntima de artérias de grande calibre. A deposição desses materiais carregados pelo sangue e o conseqüente espessamento da parede muitas vezes podem comprometer significativamente a luz residual que levam a eventos isquêmicos distais e à estenose arterial. No entanto, essas lesões iniciais da camadas de gordura também podem evoluir para placas, as quais são susceptíveis à ruptura. A ruptura da placa inicia-se a partir da adesão de plaquetas, agregação na superfície vascular exposta e a ativação da cascata de coagulação (BADIMON et al., 2012).

Dependendo da atividade inflamatória apresentada é possível classificar as placas ateromatosas como estável, a qual apresenta maior conteúdo de colágeno, poucas células inflamatórias, com núcleo lipídico e necrótico menor, associado a capa fibrótica espessada e instável, quando esta 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).

O endotélio vascular saudável é responsável por promover a vasodilatação, inibir a ativação de plaquetas e leucócitos, inibir a angiogênese, prevenir trombose e proliferação de células musculares lisas, além de provocar alterações funcionais adaptativas causadas pela liberação de várias substâncias com atividades pró e anticoagulantes (FAVARATO et al., 2003). Contudo, o endotélio disfuncionante tem o potencial para exercer todos os efeitos contrários (GANZ et al., 2003).

O óxido nítrico (NO do inglês, “nitric oxide”) derivado do endotélio é um elemento de curta duração essencial à homeostasia vascular e participa de processos que incluem: a vasodilatação, a sinalização celular, a inibição da adesão de plaquetas, e a inibição da proliferação do músculo liso na parede do vaso. A perda dessa função protetora do endotélio exercida pelo NO pode ser um evento desencadeante da doença aterosclerótica em humanos, por isso é também um marcador precoce de risco de aterosclerose. Na presença de fatores inflamatórios e de risco cardiovascular, ocorre a diminuição do NO o que propicia o aumento da vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede vascular (LEE, 2016).

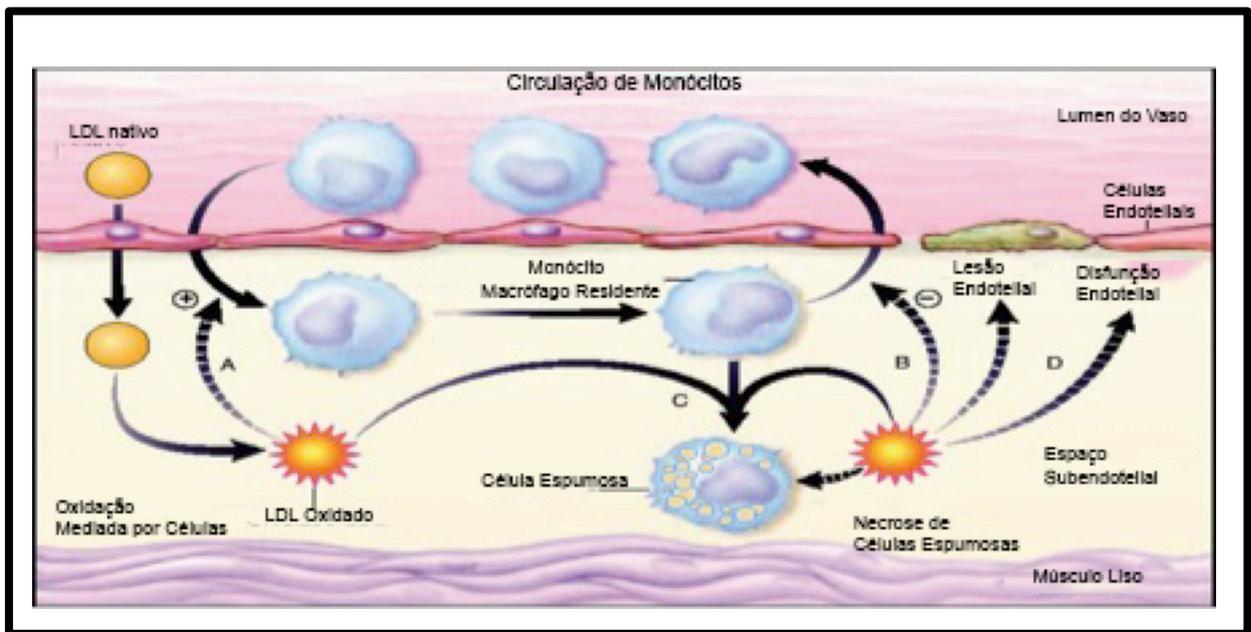


Figura 1 – O LDL fica retido no espaço subendotelial onde está sujeito a modificação oxidativa pelas células vasculares residentes, tais como células de músculo liso, células endoteliais e macrófagos. O LDL oxidado estimula a quimiotaxia de monócitos (A), impede a saída de monócitos (B), e auxilia a formação de células espumosas (C). Uma vez formado, o LDL oxidado também resulta em disfunção e lesão endotelial (D), e células espumosas se tornam necróticas, devido ao acúmulo de LDL oxidado (E). Fonte: adaptado de Stocker, 2004.

Devido a disfunção endotelial (Fig. 1) é iniciada a formação da placa aterosclerótica com a agressão ao endotélio vascular por causa dos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), HAS e o tabagismo o que aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção dessas no espaço subendotelial e diminuindo o NO circulante. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neoepítopos e tornando-as imunogênicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Partículas de LDL modificadas induzem a secreção de substâncias endoteliais quimiotáticas incluindo as selectinas e as integrinas, as quais favorecem a adesão, migração e o recrutamento de leucócitos (monócitos e linfócitos) para a parede arterial e a expressão de receptores de adesão celular (Fig. 2). A migração de monócitos ocorre preferencialmente em áreas onde a camada subendotelial é enriquecida com partículas de LDL modificadas e acontece principalmente através das junções entre as células endoteliais. Curiosamente, há algumas evidências recentes de que os níveis elevados de colesterol LDL recrutam

seletivamente monócitos distintos e subconjuntos de células T para a lesão aterosclerótica. Uma vez que os monócitos alcançam a camada íntima, o fator estimulante de colônia induz os monócitos a se transformarem fenotipicamente em macrófagos e expressarem receptores *scavengers*, o que promove a captação de muitas moléculas de colesterol e ésteres de colesterol contidos nas partículas de LDL modificadas, dando origem as células espumosas - característica da célula constituinte da lesão aterosclerótico. Células espumosas derivadas de macrófagos liberam citocinas, fatores de crescimento, as metaloproteinases (MMP), espécies reativas de oxigênio (ROS) e fator tecidual perpetuando a resposta inflamatória, induzindo a remodelação vascular e aumentando a susceptibilidade à ruptura da placa e subsequente formação de trombos (BADIMON et al., 2012).

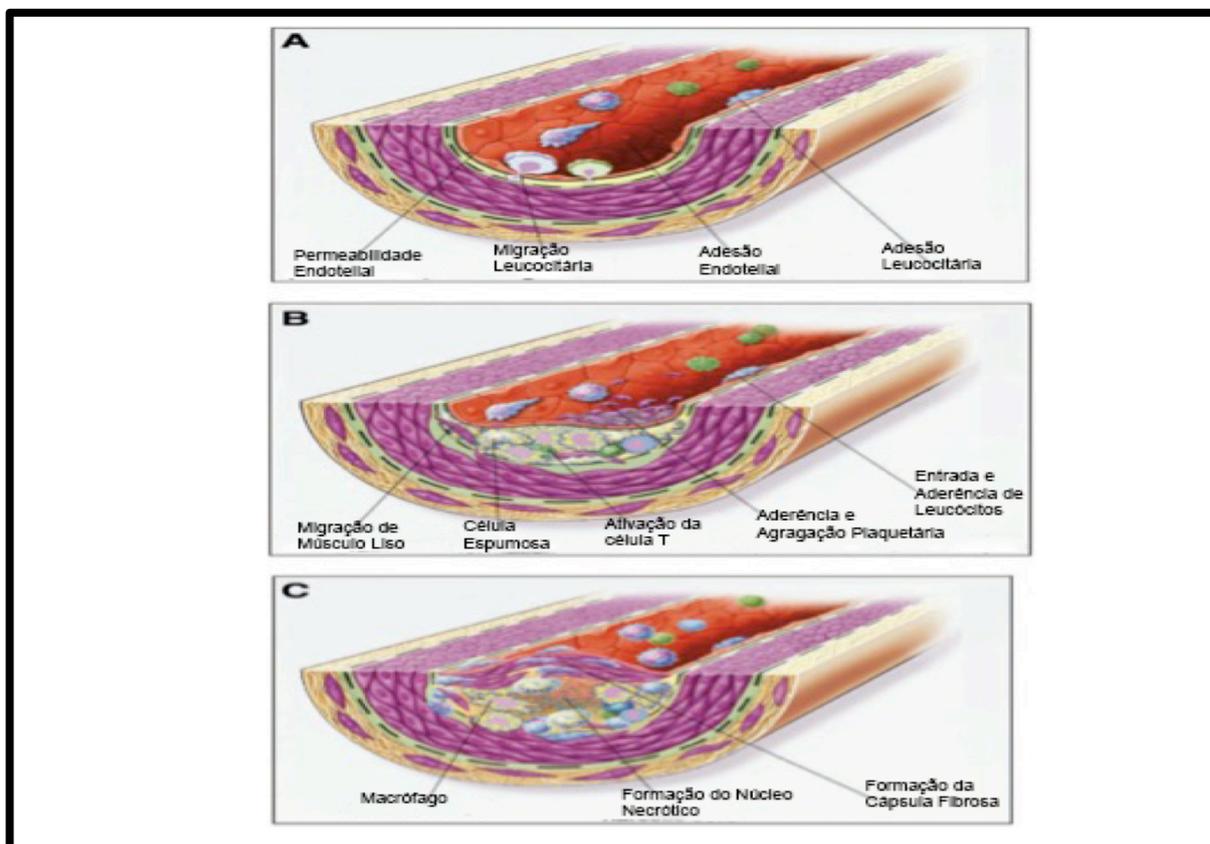


Figura 2 – A aterosclerose começa com lesão (A), que é caracterizado por aumento da permeabilidade endotelial e deposição lipoproteína de baixa densidade (LDL) no espaço subendotelial. Isto é seguido pela adesão de leucócitos e transmigração através do endotélio. Nas fases intermédias (B), ocorre a formação de células de espumosas e uma resposta à doença inflamatória, incluindo a ativação de células T, a adesão e agregação de plaquetas, e ainda a entrada de leucócitos para dentro da parede dos vasos com a migração de células do músculo liso para a íntima. Finalmente, avançada a aterosclerose (C) é caracterizada pelo acúmulo de macrófagos, formação do tampão fibroso, e necrose no núcleo da lesão. Fonte: adaptada de Ross, 1999.

1.2 FATORES DE RISCO DA ATEROSCLEROSE

Os principais fatores de risco da aterosclerose são: hipertensão arterial sistêmica (HAS), LDL aumentada, história familiar de DAC, diabetes mellitus, dislipidemias, obesidade, tabagismo, sedentarismo, alcoolismo e antecedente de acidente vascular cerebral. Idosos, mulheres após a menopausa e indivíduos com histórico familiar de doença coronária são mais propensos a desenvolver complicações decorrentes da doença aterosclerótica (LOPEZ et al, 2006; LLOYD-JONES et al, 2004).

A intensidade da participação destes fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose depende dos componentes ambientais e das características genéticas de cada indivíduo ou de uma população, por isso é considerada uma doença multifatorial (OPARIL et al, 2003).

1.3 A HIPERTENSÃO COMO FATOR DE RISCO

A hipertensão arterial sistêmica é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares auxiliando na formação de placas aterogênicas pela diminuição do NO devido a disfunção endotelial (KOHLMANN et al., 2006; CARVALHO et al., 2001). No Brasil 29,4% das causas de morte são devidas às DACs, uma vez que 12,8% destas são causadas por HAS (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2010).

Em 2000 a HAS possuía a prevalência de 25% na população mundial e a estimativa para o ano de 2025 é de 29% (TALAEI et al., 2014). Assim como a aterosclerose, a HAS é uma enfermidade multifatorial caracterizada por pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e uma pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg em indivíduos que não fazem o uso de medicação anti-hipertensiva. Esta doença associa-se a alterações nas funções, nas propriedades mecânicas e estruturais das artérias, que podem ser observadas nas células endoteliais, células musculares lisas e matriz extracelular com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares (O'BRIEN et al., 2005; CARVALHO, et. al., 2001).

Quanto a sua etiologia, a HAS é dividida em primária e secundária. A HAS primária (ou essencial) é definida quando nenhuma patologia de base pode ser encontrada que explique a doença, caracterizada por um distúrbio de mecanismo multifatorial, pois resulta da interação

entre diversos fatores ambientais (consumo excessivo de sódio, álcool, tabagismo, excesso de peso, estresse e sedentarismo) e os fatores genéticos responsáveis pela predisposição ainda tem sido estudados. A hipertensão essencial afeta mais de 20% da população adulta em países industrializados e 95% de todos os hipertensos. Os 5% restantes possuem hipertensão secundária, nos quais uma etiologia subjacente pode ser encontrada e quase sempre tratada (CARRANZA, 2012; ROSSKOPF et al., 2007; RAFIQ et al., 2010).

Essa patologia repercute no sistema cardiovascular, podendo desencadear a DAC, angina, IM, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), acidente vascular encefálico (AVE) ou insuficiência renal (CARRANZA, 2012). Em um estudo feito por Keidar e colaboradores (1997), foi demonstrado que a fração LDL em pacientes hipertensos é mais suscetível à oxidação que o LDL de pacientes normotensos. Uma vez que o LDL oxidado altera a função endotelial e a reatividade vascular, a hipertensão portanto torna-se um agente fundamental para aterogênese (STANDRIDGE, 2005).

Uma vez que a HAS surge como fator de risco para as doenças cardiovasculares, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) também está relacionado com a aterosclerose. Esse sistema é fundamental para o controle das funções renais e para regulação da pressão sanguínea influenciando a homeostase (DANILCZYK e PENNINGER, 2006; PAILLARD et al., 1999). Segundo Muthusamy (2016), existem estudos abordando as evidências de que o sistema renina-angiotensina-aldosterona contribua para a formação da placa de ateroma, pois a angiotensina II tem um amplo espectro de efeitos que podem promover ou facilitar a aterogênese, sendo eles: aumento da geração de superóxido (O₂), estimulação da proliferação de músculo liso vascular, redução do relaxamento arterial endotélio-dependente, aumento da aderência de monócitos ao endotélio, inibição da ativação do plasminogênio e estimulação da produção de lipoxigenase por macrófagos, com subsequente aumento da capacidade dos mesmos para oxidar a lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Os rins são os órgãos responsáveis por este mecanismo enzimático/hormonal do SRAA e a ativação desse sistema é relacionado diretamente com a regulação da pressão sanguínea da seguinte forma: a pressão arterial baixa, a partir da pró-renina estimula a

produção de renina (proteína plasmática de origem renal) responsável pela conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, esta quando passa pelos vasos pulmonares é rapidamente convertida em angiotensina II, por meio da enzima conversora da angiotensina I (ECA). Por sua vez, a angiotensina II produz vasoconstrição nas arteríolas, através da ligação aos receptores de membrana (AT1 e AT2), o que faz com que a pressão arterial aumente até os níveis normais. Este hormônio também estimula as glândulas suprarrenais a secretarem aldosterona, a qual exerce um efeito direto sobre o rim, reduzindo a excreção tanto de água como de Na⁺ na urina. Como consequência, tanto a água quanto o Na⁺ ficam retidos no sangue, o que aumenta o volume sanguíneo, fazendo com que a pressão arterial retorne ao normal (Figura 3) (GUYTON, 2011).

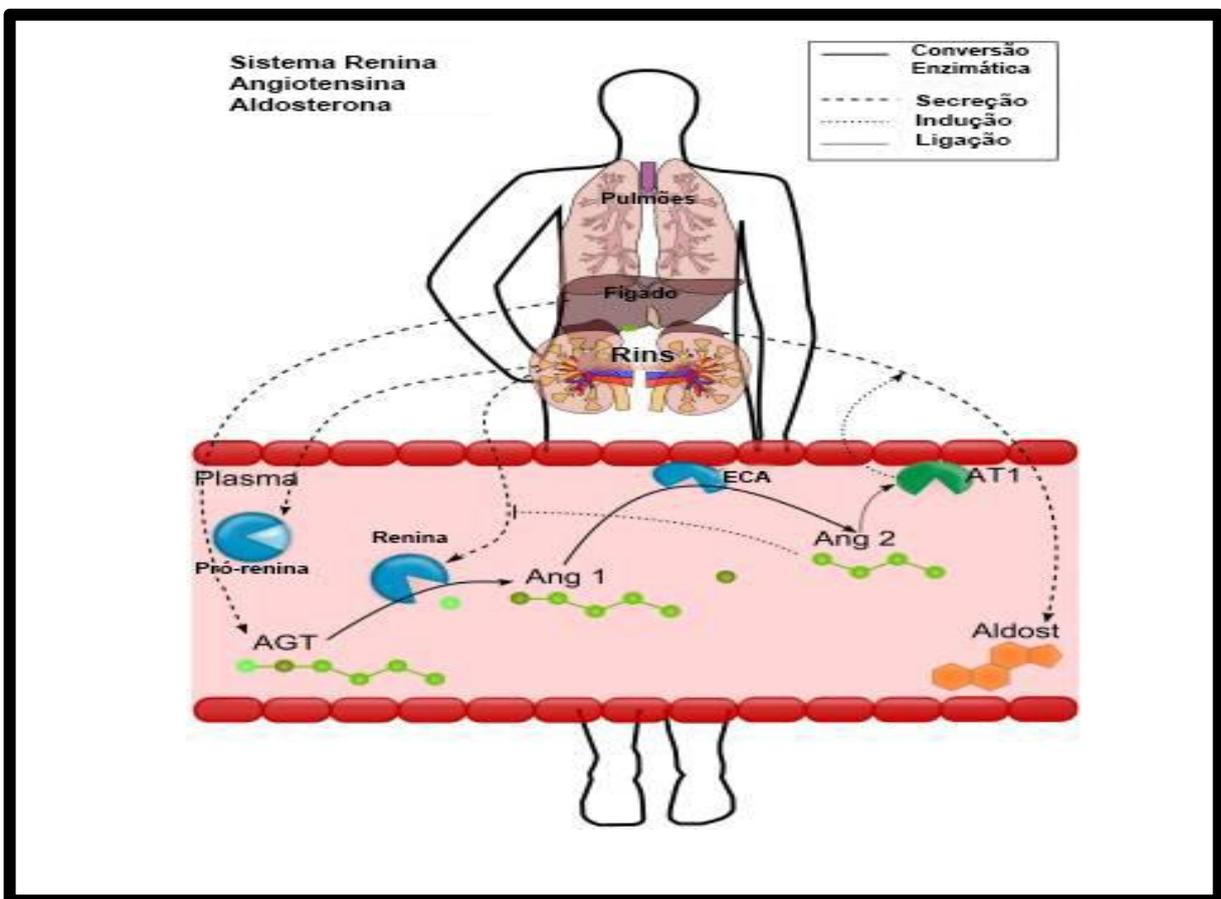


Figura 3 – Representação esquemática do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. A renina converte o angiotensinogênio (AGT) em angiotensina 1 (Ang 1). Ang 1 é então convertido em angiotensina II (Ang 2) ligada à ECA. Em seguida, a Angiotensina II liga-se ao receptor AT1. Fonte: adaptado de Claassen, 2013.

A maioria das ações da angiotensina II relaciona-se à ativação do receptor AT1. Esse receptor tem importantes funções na aterogênese, pois a sua ativação pela produção de radicais livres provoca a disfunção endotelial, proliferação de células musculares lisas, expressão de vários genes responsáveis pela modulação e transcrição de moléculas pró-inflamatórias, aumenta a oxidação de LDL, promove a captação de LDL oxidada por macrófagos gerando as células espumosas e tudo isso está na base do processo aterosclerótico (LUFT et al, 1999).

1.3.1 ASPECTOS GENÉTICOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A pressão arterial (PA) passou a ser alvo de estudos genéticos por volta da década de 1980, (HARRAP, 2009). Hoje novas tecnologias facilitam a detecção de variantes genéticas com os estudos de genes candidatos classicamente relacionados à regulação da PA. A pressão arterial é uma característica hereditária e estimativas de herdabilidade sugerem que 15-60% podem ser atribuídas a fatores genéticos (NORTON et al., 2010). A arquitetura genética da regulação da PA, a qual é definida pelo número de variantes genéticas, suas frequências e seus efeitos nos fenótipos, ainda não foi bem elucidada (ARORA, 2010).

Quando uma variante genética alcança uma frequência maior ou igual a 1% na população mundial passam a ser denominadas de polimorfismos genéticos. (BALASUBRAMANIAN et al., 2004), diferentemente de mutações, as quais são raras e demonstram alta penetrância e pouca influência de fatores ambientais. Além disso, os polimorfismos funcionam como fatores de baixa penetrância e podem apresentar susceptibilidade variável a fatores ambientais de risco (FILHO e ASGO, 2005).

A HAS possui muitos genes candidatos que tem sido analisados, incluindo os que codificam componentes do SRAA (ROSSKOPF et al., 2007). Dentro desse sistema destacamos os seguintes genes: gene da ECA (enzima conversora de angiotensinogênio) que está associado à hipertensão arterial na maioria da população (PROCOPCIUC et al., 2002), com um polimorfismo de Inserção/Deleção de 287pb no íntron 16 (NAKAI et al., 1994) o qual pode influenciar a concentração sérica de ECA e afetar a pressão arterial através de mudanças na Angiotensina II, aldosterona, e/ou outras substâncias vasoativas (HARRAP et al., 1993). O gene do AGT (angiotensinogênio) com a localização citogenética 1q42-43,

(GAILLARD-SANCHEZ et al, 1990) é composto por cinco éxons e quatro íntrons distribuídos em 13kb de sequências genômicas (NIU et al., 1999). O gene da renina está localizado no cromossomo 1q32.1 e possui seis éxons e quatro íntrons (SUNDER-PLASSMANN et al, 2002) sendo que o polimorfismo G2646A no gene da renina está situado no íntron nove do gene e onde há a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 2646 (FROSSARD et al, 1998). O gene para o receptor tipo 1 da angiotensina II está localizado no cromossomo 3, composto por 5 éxons distribuídos em 45 kb (SCHMIDT et al., 1997; ERDMANN et al., 1999) que se correlaciona com a hipertensão arterial (PIROLA, 2000), provavelmente por uma interação epistática com o polimorfismo de I/D do gene da ECA e, possivelmente, associando-se também às doenças coronarianas (TIRET et al., 1994). E por fim o gene da aldosterona sintetase (CYP11B2) situando-se no cromossomo 8q24, possui um tamanho de 7.3 kb, com um polimorfismo bialélico de nucleotídeo único, -344C®T, ou seja, a transição de uma citosina por uma timina, situado na região promotora deste gene (WHITE et al., 1995).

1.4 Genes candidatos

Nesta pesquisa foram estudados alguns polimorfismos de genes candidatos partícipes do processo que envolve a hipertensão arterial e também está presente na aterogênese, sendo eles: *eNOS*, *GSTT1*, *GSTM1*.

1.4.1 Gene da síntese de óxido nítrico endotelial (*eNOS*)

O óxido nítrico (NO) é produzido pelas enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). Sendo que a eNOS é a principal fonte do NO gerado no sistema vascular, sintetizada a partir de L-arginina, possui uma importante função no controle cardiovascular especialmente para a vasodilatação (CHANNON et al., 2002; NASCIMENTO, 2013; RUSH et al., 2005). O NO derivado do endotélio influencia o relaxamento das células musculares lisas vasculares, inibe plaquetas e leucócitos aderidos ao endotélio vascular, impede a migração e proliferação de células musculares lisas, além de limitar a oxidação da LDL (YANG et al., 2015)

O gene *eNOS* humano está localizado no cromossomo 7 (7q35-36) que é composto por 26 éxons e 25 íntrons, com um comprimento de 21 kb e é constitutivamente expresso em

células endoteliais vasculares (MARSDEN et al., 1993). A atividade alterada do gene da *eNOS*, em razão de polimorfismos, pode levar a deficiência de NO propiciando a hipertensão, enfarte do miocárdio, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca, além de associarem-se com o aumento do risco de complicações cardiovasculares e hipertensão (GONZÁLEZ, 2009). Vários polimorfismos têm sido identificados no gene da *eNOS*, dentre eles abordaremos neste estudo o G894T e o T786C sendo estes polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) (VALLANCE et al., 1989).

No SNP G894T, há uma substituição de uma guanina por uma timina no éxon 7 fazendo a troca de um glutamato por um aspartato na posição 298 da proteína (Glu298Asp) (PICCOLI et al., 2008). Valdman e colaboradores (2002) relatou em seus estudos que essa alteração é capaz de reduzir a produção de NO a nível basal. Pesquisas sugerem que consequências funcionais desse polimorfismo esteja associada a uma diminuição de até 80% da atividade da eNOS e a um aumento da susceptibilidade à clivagem da proteína eNOS (WANG et al., 2000; TESAURO et al., 2000).

A presença de uma mutação T786C da região promotora (5'- região flanqueadora) do gene *eNOS* ocorre uma substituição de um nucleótido T por um C na posição 786 resultando na diminuição da síntese do óxido em aproximadamente 50% (ROPERS, 2007; ZHANGZ et al., 2008). Um estudo feito por Hyndman et al., 2002, relataram que o polimorfismo T786C é significativamente associada com hipertensão em uma população masculina adulta saudável.

1.4.2 Glutathione S-Transferase (GST)

As GSTs são encontrados em praticamente todas as espécies eucarióticas e geralmente são distribuídas na natureza, sendo que oito classes distintas de GSTs foram identificados: a(GSTA), m(GSTM), Y(GSTT), P(SGPC), S(GSTs), K(GSTK), O (GSTO), e T (GSTZ) (STRANGE et al., 2001). Neste trabalho abordaremos dois loci em particular: *GSTM1* e *GSTT1*. A variante mais comum dos genes *GSTM1* e *GSTT1* é a deleção homocigótica, ou seja, genótipo nulo (*GSTT1-nulo* e *GSTM1-nulo*) o qual tem sido associado com a perda de atividade enzimática e o aumento da susceptibilidade à danos citogenéticos (HAYES et al., 2000; NORPPA., 2004) tendo em vista que essas enzimas metabolizam os xenobióticos os quais tem ação protetora contra o estresse oxidativo endógeno e potenciais toxinas exógenas.

Hussain e colaboradores (2012), concluíram que tais polimorfismos podem ser um fator de risco para hipertensão. Além disso, estudos indicaram que a ausência de *GSTM1* e *GSTT1* está associada com um aumento significativo do risco de doença cardíaca coronária (figuras 3 e 4) (WANG et al., 2010).

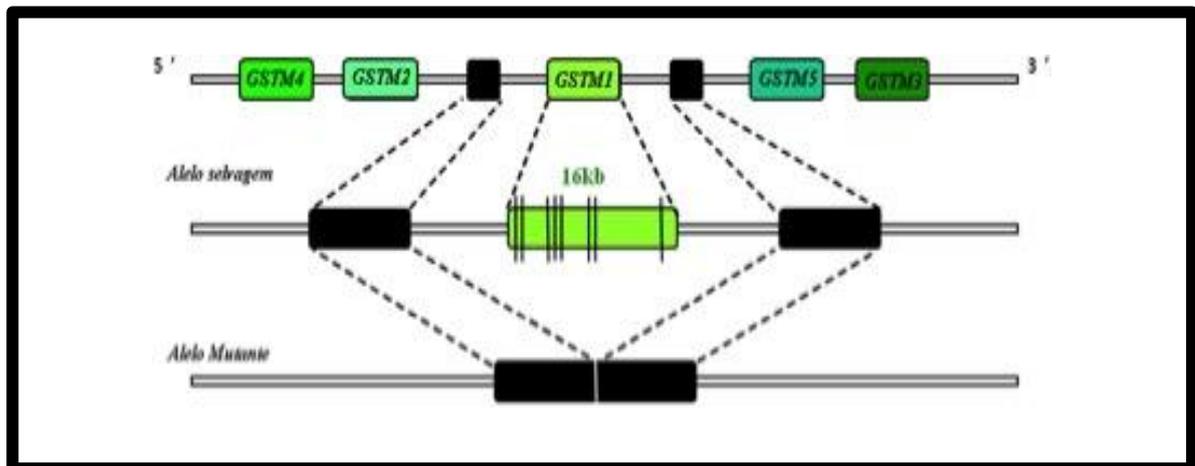


Figura 4 – Ilustração da deleção de *GSTM1*. São mostradas as posições relativas dos genes da classe Mu de GST, no cromossomo 1p, e a representação do alelo selvagem e polimórfico do gene *GSTM1*. Fonte: adaptado de Parl, 2005 e Reis 2010.

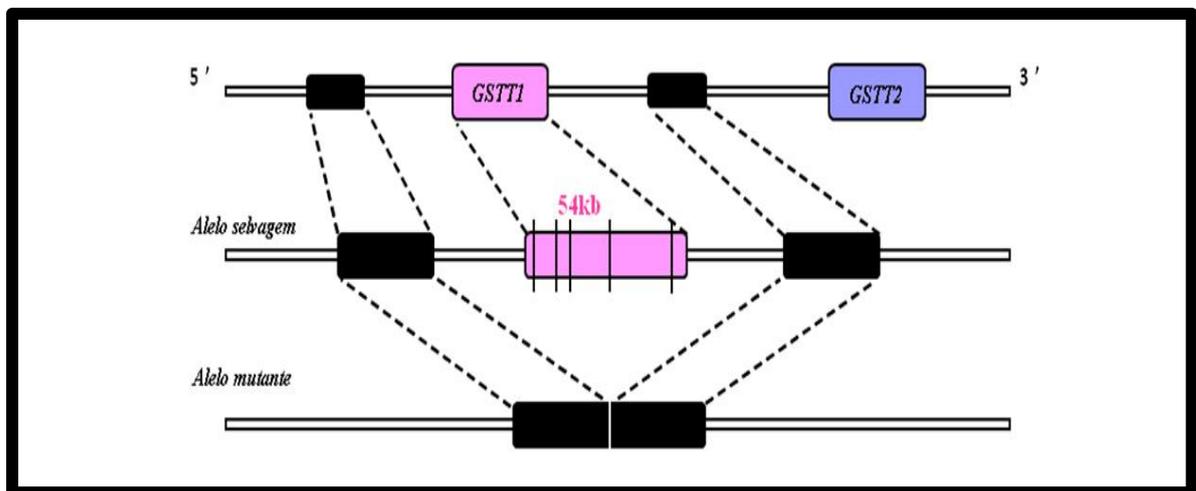


Figura 5 – Ilustração da deleção de *GSTT1*. São mostradas as posições dos genes da classe Theta de GST, no cromossomo 22q, e a representação do alelo selvagem e polimórfico do gene *GSTT1*. Fonte: adaptado de Parl (2005) e Reis (2010).

2 OBJETIVOS

Analisar os polimorfismos G894T e T786C do gene *eNOS*, e os polimorfismos de *GSTMI* e *GSTTI* em indivíduos ateroscleróticos diagnosticados com hipertensão (grupo caso) e indivíduos com ausência de hipertensão e aterosclerose (grupo controle).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar os polimorfismos G894T e T786C do gene *eNOS* nas populações estudadas;
- Detectar a presença ou ausência dos genes *GSTTI* e *GSTMI* nas populações estudadas;
- Analisar a associação dos polimorfismos G894T, T786C, *GSTTI* e *GSTMI* no grupo caso e no grupo controle;
- Verificar qual é o genótipo mais frequente de cada um dos polimorfismos estudados associando-o à aterosclerose e hipertensão na população estudada;
- Verificar possíveis associações entre os polimorfismos G894T (*eNOS*), T786C (*eNOS*), *GSTTI* e *GSTMI* com os fatores de risco: hábito de ingerir bebida alcoólica e hábito de fumar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto recebeu a anuência da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos através do CEP/PUC GOIÁS cujo número da aprovação é: 35321614.3.0000.0037. Todos os participantes da pesquisa receberam e assinaram um questionário (Anexo A) pertinente ao projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

3.1 Participantes da Pesquisa

O grupo amostral foi composto por 267 participantes, sendo subdividido em dois grupos: o grupo controle, o qual foi constituído por 100 participantes e grupo caso constituído por 167 pessoas. Exceto para a detecção do polimorfismo T786C do gene *eNOS*, pois duas amostras foram insuficiente no grupo caso, sendo então composto por 165 indivíduos.

O diagnóstico prévio da doença aterosclerótica foi baseado em exame clínico e confirmado através de métodos de diagnósticos por imagem, sendo eles: eco color Doppler, angiotomografia e/ou angiografia digital, angiotomografia e/ou cineangiocoronariografia variando de acordo com o quadro do paciente.

Nesta pesquisa foram considerados pacientes hipertensos somente aqueles indivíduos que estavam em tratamento medicamentoso para hipertensão.

3.1.1 Grupo Controle

Critério de inclusão: ter aceito responder ao questionário (anexo A) e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo B); com idade superior à 38 anos, e que não apresentasse diagnóstico de doença aterosclerótica nem hipertensão baseados em critérios clínicos (anamnese, exame clínico, ausência de sintomas, sem alterações vasculares periféricas e diagnóstico clínico laboratorial) e/ou exame de imagem não invasivo (Eco Doppler).

Critério de exclusão: pessoas menores de 38 anos e/ou que não aceitassem participar da pesquisa.

3.1.2 Grupo Caso

Critério de inclusão: ter aceito responder ao questionário (anexo A) e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo B); idade superior à 38 anos, com diagnóstico de aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares intervencionistas (angiografia) e em tratamento medicamentoso; estar em tratamento para hipertensão. Haja visto que o diagnóstico prévio da doença aterosclerótica foi baseado em exame clínico e confirmado através dos exames de imagem (Eco color Doppler, angiotomografia e/ou angiografia digital, angiotomografia e/ou cine-angiocoronariografia) indicados de acordo com a clínica de cada paciente.

Critério de exclusão: menores de 38 anos e/ou que não aceitasse participar da pesquisa.

3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras

A coleta das amostras foi realizada na Clínica Angiogyn no município de Goiânia de pacientes da rede privada e credenciados no Sistema Único de Saúde (SUS). As amostras consistiam em sangue periférico venoso sendo coletadas em tubos contendo heparina. As amostras foram levadas ao Laboratório do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás afim de serem armazenadas em criotubos, preservados a -20°C, para posterior extração do DNA.

3.3 Extração e quantificação de DNA

A obtenção do DNA foi realizada utilizando-se o kit Kaswi® (Genomic DNA Purification Kit), em seguida os produtos da extração foram quantificados no espectrofotômetro NanoVue™ Plus, sendo selecionadas apenas as amostras cujas concentrações fossem superiores a 5ng/μl depois as mesmas foram submetidas à técnica da Reação em Cadeia Polimerase (PCR).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Para a investigação dos polimorfismos dos genes *eNOS* (G894T e T786C), *GSTT1* e *GSTMI* foram realizadas PCRs (sempre em duplicata) com o volume final de 25μL. Os primers utilizados para a pesquisa destes polimorfismos foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência nucleotídica dos *primers* dos genes *eNOS* (G894T e T786C), *GSTT1* e *GSTM1*.

G894T (Adaptado de Tajehmiri et al, 2013)	F C: 5' AAGGCAGGAGAGACAGTGGATG 3'	181 pb
	R N: 5' TGAAGGAAGAGTTCTGGTGGC 3'	171 pb
	R M: 5' TGAAGGAAGAGTTCTGGTGGGA 3'	
T786C (Adaptado de Fernandes, 2016)	C0: 5' TTT CTC CAG CCC CTC AGA TG 3'	387 pb
	2684C : 5' GGC AGA GGC AGG GTC AGA CG 3'	250 pb
	2684T: 5' CAT CAA GCT CTT CCC TGT CT 3'	176 pb
GSTT1 (Adaptado de Martins, 2016)	T0: 5' AGG CCC AGC AAG GAT GTA GT 3'	
	F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	
	R: 5' TCACCGGATGGCCAGCA 3'	480 pb
GSTM1 (Adaptado de Rodrigues, 2016)	F: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3'	
	R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215 pb

3.5 Géis

Após a realização da PCR, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose com solução Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. Os géis foram corados com brometo de etídio (5 g/mL) e visualizados no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA) (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10).

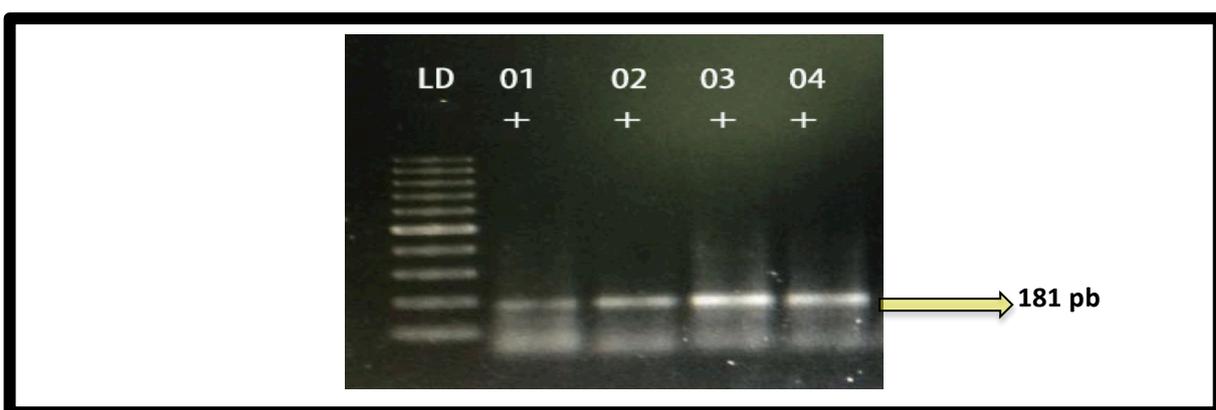


Figura 6 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, indicando a presença ou ausência do alelo selvagem (G) do polimorfismo G894T do gene *eNOS*. O ladder (LD) confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 181 pb. As colunas de 1 a 4 mostram a amplificação da banda.

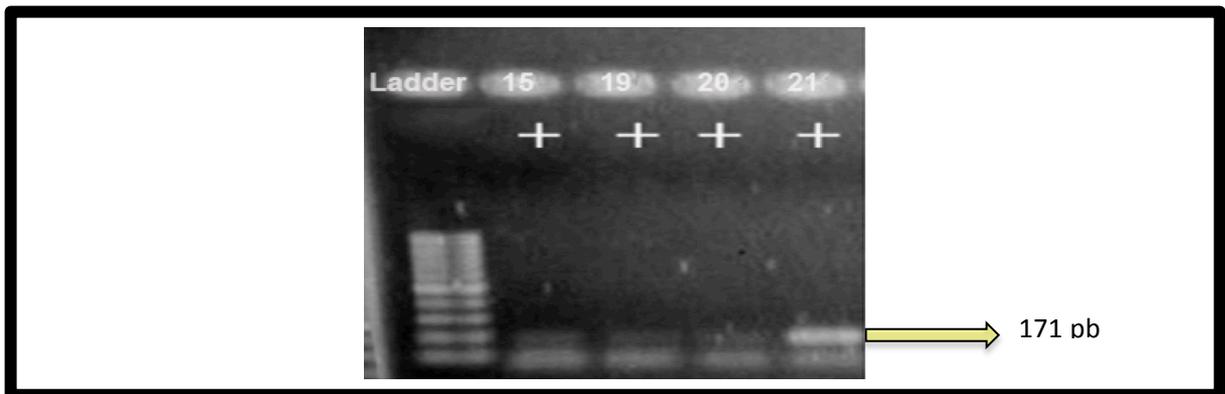


Figura 7 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, indicando a presença ou ausência do alelo mutante (T) do polimorfismo G894T do gene *eNOS*. O ladder confirma que os fragmentos amplificados são constituídos por 171 pb. As colunas de 15, 19, 20 e 21 mostram a amplificação da banda.

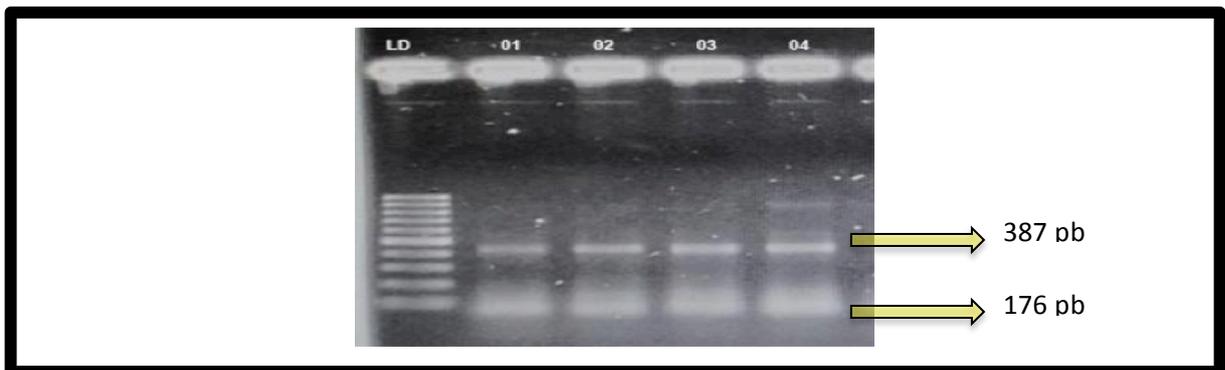


Figura 8 – Produto de PCR-ARMS em Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. Polimorfismo T786C do gene *eNOS*. Colunas 1, 2, 3 e 4 com as bandas de 176 pb indicam a presença do genótipo CC, sendo que as bandas com 387 pb indicam a presença do controle.

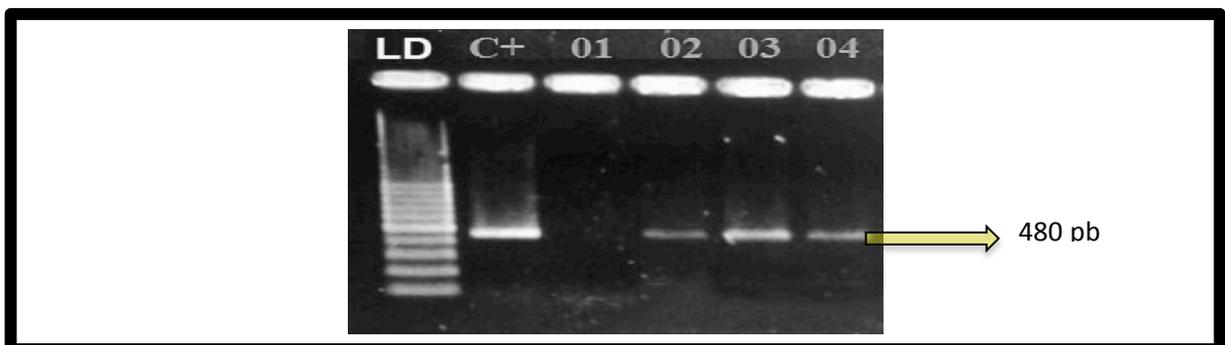


Figura 9 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Análise do gene *GSTT1*: Peso Molecular (PM): 480 pb; C+: controle positive; Coluna 01: *GSTT1* nulo; Colunas 02, 03, 04: *GSTT1* presente.

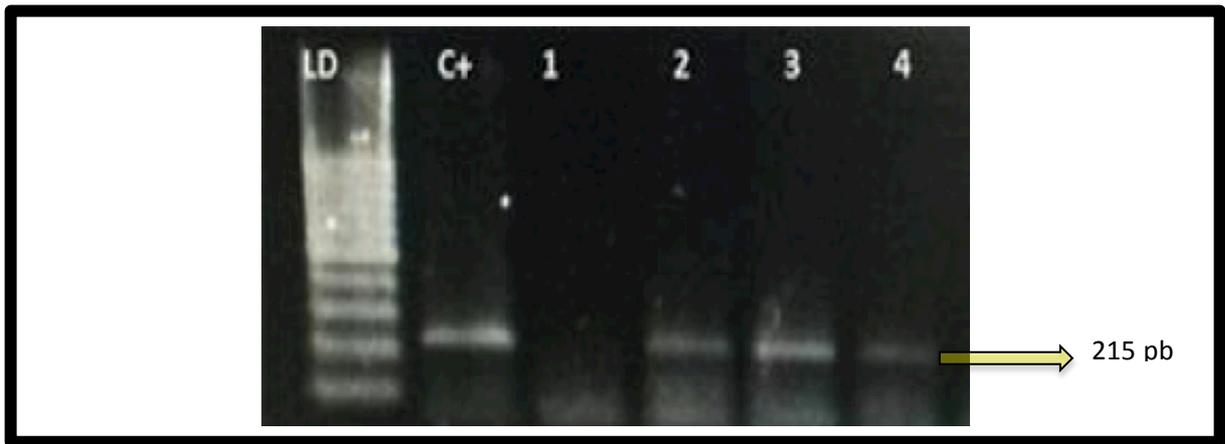


Figura 10 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Análise do gene *GSTM1*: Peso Molecular (PM): 215pb; C+: controle positivo; Colunas 01: *GSTM1* nulo; Colunas 02, 03 e 04: *GSTM1* presente.

3.6 Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas do coeficiente p foram utilizados o teste Qui-quadrado e o teste G com o auxílio do software Bioestat (version 5.0; biocis-tron.blogspot.com/).

4 RESULTADOS

A média de idade dos participante do grupo caso foi de 61,99 anos, sendo constituído por 167 participantes. E a média do grupo controle foi de 50,27 anos, com 100 participantes, exceto para análise do polimorfismo T786C do gene *eNOS* em que as amostras de dois participantes não foram suficientes, sendo o grupo caso composto então por 165 pessoas, portanto a média de idade para este foi de 62,08.

4.1 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo G894T do gene *eNOS*

Na investigação do polimorfismo G894T do gene *eNOS* foi encontrado no grupo caso 13% (17/167) de homozigotos para o alelo selvagem (GG), 76% (127/167) de heterozigotos (GT) e 14% (23/167) homozigotos para o alelo mutante (TT). No grupo controle foi encontrado 2% (2/100) de homozigotos para o alelo selvagem (GG), 85% (85/100) de heterozigotos (GT) e 13% (13/100) de homozigotos para o alelo mutante (TT). Foram detectados 6,5 vezes mais homozigose GG em pacientes do grupo caso do que no grupo controle, o *p* obtido foi igual a 0,03 (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição do Polimorfismo do gene *eNOS* (G894T) nos grupos caso e controle.

	GG		GT		TT		Total		<i>p</i> *
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Caso	17	13%	127	76%	23	14%	167	100%	0,03
Controle	2	2%	85	85%	13	13%	100	100%	

*Teste Qui-quadrado

Quanto a frequência alélica do gene *eNOS* (G894T) no grupo caso foi encontrado 48% do alelo selvagem (G) e 52% do alelo T, já no grupo controle a frequência do alelo G foi de 44,5% e 55,5% do alelo T. O *p* obtido foi maior que 0,05 (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos alelos G e T do gene *eNOS* (G894T) nos grupos caso e controle

	G		T		Total		<i>p</i> *
	n	%	n	%	n	%	
Caso	161	48%	173	52%	334	100%	0,4
Controle	89	44,5%	111	55,5%	200	100%	

*Teste Qui-quadrado

4.2 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo T786C do gene *eNOS*

A frequência genotípica do polimorfismo T786C do gene *eNOS* no grupo caso foi de 32% (53/165) de homozigotos do alelo C (CC), 58% (96/165) de heterozigotos (TC) e 10% (16/165) de homozigose TT. No grupo controle foi obtido 31% (31/100) de indivíduos com genótipo CC, 64% (64/100) heterozigotos (TC) e 5% (5/100) homozigotos para o alelo T (TT). O valor de *p* encontrado foi maior que 0,05. No entanto, foi detectado que o genótipo TT é duas vezes mais frequente no grupo caso (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição do Polimorfismo do gene *eNOS* (T786C) nos grupos caso e controle.

	CC		TC		TT		Total		<i>p</i> *
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Caso	53	32%	96	58%	16	10%	165	100%	0,3
Controle	31	31%	64	64%	5	5%	100	100%	

*Teste Qui-quadrado

A frequência alélica T/C encontrada no grupo caso foi respectivamente de 39% e 61%, já no grupo controle foi de 32% (T) e 68%(C). Não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos alelos T e C do gene *eNOS* (T786C) nos grupos caso e controle.

	T		C		Total		<i>p</i> *
	n	%	n	%	n	%	
Caso	128	39%	202	61%	330	100%	0,08
Controle	74	32%	159	68%	233	100%	

*Teste Qui-quadrado

4.3 Frequência do gene *GSTT1*

No estudo do gene *GSTT1* foi analisada a ausência ou presença do gene. Dessa maneira foi encontrada a presença deste gene em 84% (141/167) no grupo caso e apenas 65% (65/100) dos participantes do grupo controle, os demais obtiveram o genótipo nulo. Sendo assim a presença do *GSTT1* foi 1,3 vezes maior no grupo de participantes ateroscleróticos hipertensos em relação ao grupo controle. O valor de *p* foi igual a 0,0003 (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição do Polimorfismo do gene *GSTT1* nos grupos caso e controle.

	Presente		Nulo		Total		<i>p</i> *
	n	%	n	%	n	%	
Caso	141	84%	26	16%	167	100%	0,0003
Controle	65	65%	35	35%	100	100%	

*Teste Qui-quadrado

4.4 Frequência do gene *GSTMI*

Para a análise do gene *GSTMI* foi verificada a presença ou ausência no grupos caso (167 participantes) e controle (100 participantes). No primeiro grupo a presença do gene foi detectada em 73% (122/167), no segundo a presença foi de 60% (60/100). A frequência do gene *GSTMI* encontrada em pacientes ateroscleróticos hipertensos foi 1,2 vezes maior quando comparada ao grupo controle. O valor de *p* foi de 0,02 (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição do Polimorfismo do gene *GSTMI* nos grupos caso e controle.

	Presente		Nulo		Total		<i>p</i> *
	n	%	n	%	n	%	
Caso	122	73%	45	27%	167	100%	0,02
Controle	60	60%	40	40%	100	100%	

*Teste Qui-quadrado

4.5 Tabagismo

Foram analisados os polimorfismos genéticos associado ao tabagismo nos grupos caso e controle. O número de amostras do grupo caso foi de 164 participantes e do grupo controle foi de 98, pois 5 não responderam sobre o uso ou não de tabaco. Lembrando que duas amostras não foram suficientes para a realização da técnica de PCR no polimorfismo T786C do gene *eNOS*.

Foi avaliada a associação entre os pacientes declarados fumantes nos grupos caso e controle com suas respectivas frequências genotípicas (Tabela 6). Para o polimorfismo G894T do gene *eNOS* no grupo caso foi obtido 15% (8/54) GG, 76% (41/54) GT e 5% (5/54) TT, no grupo controle, esta associação, apresentou frequência de 5% (1/22) GG, 82% (18/22) GT e

14% (3/14) TT, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p= 0,37$). No polimorfismo T786C do gene *eNOS* no grupo caso, foram encontrados 35%(19/54) CC, 58% (31/54) TC e 7%(4/54) TT, no grupo controle os valores obtidos foram: 18% (18/22) CC, 0% (0/22) TC e 73% (16/22) TT, sendo o p igual a 0,06 sem diferença estatística significativa. Para o gene GSTT1 foi detectado no grupo caso a presença em 81% dos fumantes e no grupo controle 73% onde o p foi igual a 0,4. O gene *GSTM1* no grupo caso estava presente em 80% dos fumantes e no grupo controle 55%, com o p igual a 0,03 (Tabela 8).

Tabela 8 – Associação do hábito de fumar com os polimorfismos nos grupos caso e controle.

Polimorfismo	Genótipo	Caso				Controle				p^{**}
		Fumante		Total		Fumante		Total		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
G894T	GG	8	15%	54	100%	1	5%	22	100%	0,37
	GT	41	76%	54	100%	18	82%	22	100%	
	TT	5	9%	54	100%	3	14%	22	100%	
T786C	CC	19	35%	54	100%	4	18%	22	100%	0,06
	TC	31	58%	54	100%	18	82%	22	100%	
GSTT1	TT	4	7%	54	100%	0	0%	22	100%	0,4
	Presente	44	81%	54	100%	16	73%	22	100%	
GSTM1	nulo	10	19%	54	100%	6	27%	22	100%	0,03
	Presente	43	80%	54	100%	12	55%	22	100%	
	nulo	11	20%	54	100%	10	45%	22	100%	

** Teste G

Foi analisada também a associação entre os participantes que nunca fumaram dos grupos caso e controle. Os resultados obtidos com o polimorfismo G894T do gene *eNOS* no

grupo caso foram: 6% (4/66) GG, 73% (48/66) GT, 21% (14/66) TT, no grupo controle foram: 0% (0/63) GG, 86% (54/63) GT, 14% (9/63) TT, com o p igual a 0,03. No polimorfismo T786C do gene *eNOS* no grupo caso, foram encontrados 26% (17/65) CC, 62% (40/65) TC, 12% (8/65) TT, no grupo controle 27% (17/63) CC, 65% (41/63) TC, 8% (5/63) TT, não houve diferença estatística significativa. Para o gene *GSTT1* foi detectado no grupo caso a presença em 89% dos fumantes e no grupo controle 60% onde o p foi menor que 0,0001. O gene *GSTM1* no grupo caso estava presente em 73% dos fumantes e no grupo controle 62%, com o p igual a 0,1 (Tabela 9).

Tabela 9 – Associação das pessoas que nunca fumaram com os polimorfismos nos grupos caso e controle.

Polimorfismo	Genótipo	Caso				Controle				p^{**}
		Nunca Fumou		Total		Nunca Fumou		Total		
		n	%	Total	total	n	%	n	%	
G894T	GG	4	6%	66	100%	0	0%	63	100%	0,03
	GT	48	73%	66	100%	54	86%	63	100%	
	TT	14	21%	66	100%	9	14%	63	100%	
T786C	CC	17	26%	65	100%	17	27%	63	100%	0,71
	TC	40	62%	65	100%	41	65%	63	100%	
	TT	8	12%	65	100%	5	8%	63	100%	
GSTT1	Presente	59	89%	66	100%	38	60%	63	100%	<0,0001
	nulo	7	11%	66	100%	25	40%	63	100%	
GSTM1	Presente	48	73%	66	100%	39	62%	63	100%	0,1
	nulo	18	27%	66	100%	24	38%	63	100%	

** Teste G

Também foram associados os participantes dos grupos caso e controle ex-fumantes, foram considerados assim aqueles que relataram deixar de fumar há mais de 15 anos. As frequências obtidas do polimorfismo G894T do gene *eNOS* no grupo caso foram: 7% (3/44) GG, 82% (36/44) GT, 11% (9/44) TT e grupo controle: 0% (0/13) GG, 92% (12/13) GT, 8% (1/13) TT, com o p igual a 0,4. No polimorfismo T786C do gene *eNOS* no grupo caso, foram encontrados 33% (14/43) CC, 60% (26/43)TC, 7% (3/43) TT, no grupo controle foram: 54%

(13/7) CC, 38% (5/13) TC, 8% (1/13) TT, com o p igual a 0,4. O gene *GSTT1* foi detectado em 82% dos fumantes do grupo caso e no grupo controle 77% onde o p foi igual a 0,7. O gene *GSTM1* no grupo caso estava presente em 73% dos fumantes e no grupo controle 62%, com o p igual a 0,4 (Tabela 10).

Tabela 10 – Associação das pessoas que pararam de fumar há mais de 15 anos com os polimorfismos nos grupos caso e controle.

Polimorfismo	Genótipo	Caso				Controle				p^{**}
		(Ex-fumante)		Total		(Ex-fumante)		Total		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
G894T	GG	3	7%	44	100%	0	0%	13	100%	0,4
	GT	36	82%	44	100%	12	92%	13	100%	
	TT	5	11%	44	100%	1	8%	13	100%	
T786C	CC	14	33%	43	100%	7	54%	13	100%	0,4
	TC	26	60%	43	100%	5	38%	13	100%	
GSTT1	TT	3	7%	43	100%	1	8%	13	100%	0,7
	Presente	36	82%	44	100%	10	77%	13	100%	
GSTM1	nulo	8	18%	44	100%	3	23%	13	100%	0,4
	Presente	32	73%	44	100%	8	62%	13	100%	
	nulo	12	27%	44	100%	5	38%	13	100%	

** Teste G

4.6 Bebida alcoólica

Foi realizada a análise dos polimorfismos genéticos em relação ao consumo de bebida alcoólica. O número amostral do grupo caso foi de 164 pessoas (três não responderam se consumia ou não álcool) com exceção da análise do polimorfismo T786C do gene *eNOS* que foi de 162. Já o grupo controle foi composto por 100 participantes.

A associação dos participantes que responderam sim para o consumo de álcool para o polimorfismo G894T do gene *eNOS* resultou nos seguintes valores do grupo caso: 0% GG, 100% (15/15) GT e 0% TT e no grupo controle: 0% GG, 85% (17/20) GT e 15% (3/20)TT, com o p igual a 0,17. Para o polimorfismo T786C ainda no gene *eNOS* os resultados do grupo caso foram: 40% (6/15) CC, 40% (6/15) TC e 20% (3/15) TT, no grupo controle foram: 25% (5/20) CC, 70% (14/20) TC, 5% (1/20) TT, não havendo diferença estatística significante

($p=0,16$). O gene *GSTT1* estava presente em 100% do grupo caso, p igual a 0,005. O gene *GSTM1* foi encontrado em 11% do grupo caso onde o p foi igual a 0,59 (Tabela 11).

Tabela 11 – Associação dos participantes dos grupos caso e grupo controle que declararam consumir bebida alcoólica com os polimorfismos G894T (*eNOS*), T786C (*eNOS*), *GSTT1*, *GSTM1*.

Polimorfismo	Genótipo	Grupo Caso				Grupo Controle				p^{**}
		SIM		Total		SIM		Total		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
G894T	GG	0	0%	15	100%	0	0%	20	100%	0,17
	GT	15	100%	15	100%	17	85%	20	100%	
	TT	0	0%	15	100%	3	15%	20	100%	
T786C	CC	6	40%	15	100%	5	25%	20	100%	0,16
	TC	6	40%	15	100%	14	70%	20	100%	
	TT	3	20%	15	100%	1	5%	20	100%	
GSTT1	Presente	15	100%	15	100%	14	70%	20	100%	0,005
	nulo	0	0%	15	100%	6	30%	20	100%	
GSTM1	Presente	11	73%	15	100%	13	65%	20	100%	0,59
	nulo	4	27%	15	100%	7	35%	20	100%	

**Teste G

Foi analisada também a associação dos participantes que declararam “não” para o consumo de álcool com os polimorfismos pesquisados. O polimorfismo G894T do gene *eNOS* resultou nos seguintes valores do grupo caso: 11% (16/149) GG, 74% (110/149) GT e 15% (23/149) TT e no grupo controle: 3% (2/80) GG, 79% (63/80) GT e 13% (10/80)TT, sendo o p igual a 0,05. Para o polimorfismo T786C ainda no gene *eNOS* os resultados do grupo caso foram: 31% (46/147) CC, 60% (88/147) TC e 9% (13/147) TT, no grupo controle foram: 25% (5/20) CC, 70% (14/20) TC, 5% (1/20) TT, não houve diferença estatística significativa ($p=0,63$). O gene *GSTT1* estava presente em 100% do grupo caso. E o gene *GSTM1* foi encontrado em 11% do grupo caso. Em ambos os genes da família GST foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 12).

Tabela 12 – Associação dos participantes dos grupos caso e grupo controle que declararam não consumir bebida alcoólica com os polimorfismos G894T (*eNOS*), T786C (*eNOS*), *GSTT1*, *GSTMI*.

Polimorfismo	Genótipo	Grupo Caso				Grupo Controle				<i>p</i> **
		NÃO		Total	total	NÃO		Total		
		n	%					n	%	n
G894T	GG	16	11%	149	100%	2	3%	80	100%	0,05
	GT	110	74%	149	100%	63	79%	80	100%	
	TT	23	15%	149	100%	10	13%	80	100%	
T786C	CC	46	31%	147	100%	24	30%	80	100%	0,63
	TC	88	60%	147	100%	47	59%	80	100%	
	TT	13	9%	147	100%	4	5%	80	100%	
<i>GSTT1</i>	Presente	123	83%	149	100%	49	61%	80	100%	0,005
	nulo	26	17%	149	100%	26	33%	80	100%	
<i>GSTMI</i>	Presente	110	74%	149	100%	44	55%	80	100%	0,02
	nulo	39	26%	149	100%	31	39%	80	100%	

** Teste G

5 DISCUSSÃO

No estudo do polimorfismo G894T do gene *eNOS*, foi observada uma maior presença de homozigotos (GG) em pacientes com aterosclerose e hipertensão, pois este foi 6,5 vezes mais frequente em pacientes do grupo caso em relação ao grupo controle, uma vez que ocorreu diferença estatística significativa entre os grupos. Também em outros estudos casos-controles foram detectadas maiores frequências do genótipo GG no grupo caso, como Mollsten e colaboradores (2009) na Dinamarca onde encontraram 64% de GG no grupo caso e 57% no grupo controle, além desse, Cai e colaboradores (1998) na Inglaterra acharam 55,6% de GG no grupo caso e 52,11% no grupo controle.

A maioria dos participantes apresentaram o genótipo heterozigoto do polimorfismo G894T do gene *eNOS*, assim como Tardin e colaboradores (2013), no Rio de Janeiro, em um estudo que associava esse mesmo polimorfismo e a insuficiência cardíaca, encontrou maior frequência de heterozigotos na população estudada, ou seja, 48,3% de GT, 40% de GG e 11,7% de TT. Na Universidade de Florença, Itália, a pesquisadora Fatini e colaboradores (2005) constatou maior frequência do genótipo GT em pacientes com aneurisma da aorta abdominal (doença associada a aterosclerose), onde 74% do grupo caso era composto por hipertensos ($p < 0,0001$), similarmente ao nosso estudo.

Diferente dos resultados aqui encontrados, estudos feitos em outras regiões do mundo do polimorfismo G894T do gene *eNOS* registraram a prevalência da homozigose selvagem (GG) na população estudada como por exemplo na Índia, em que Saini e colaboradores (2011) pesquisaram a associação da disfunção endotelial e a variação polimórfica G894T em pacientes com história documentada de DAC, sendo 70% desses pacientes hipertensos, e encontraram as frequências genotípicas no grupo caso de 75% para GG e 25% para GT, e no grupo controle 88% de GG e 12% de GT.

Hillermann e colaboradores (2005) na África do Sul detectaram uma baixa frequência do genótipo TT (2,4%) do polimorfismo G894T do gene *eNOS*. Alguns estudos relataram a ausência do genótipo TT em suas populações estudadas (SAINI et al., 2011; MOON et al., 2002; KATO et al., 1999; NISHEVITHA, et al., 2009).

A análise da distribuição dos alelos G e T do polimorfismo G894T do gene *eNOS* nos grupos caso e controle mostrou não haver diferença estatisticamente significativa. Uma vez que o alelo G estava presente em 52% no grupo caso e 56% no grupo controle. Corroborando com este resultado, em um estudo realizado em 2013 por José Hinz e colaboradores foi avaliada a influência desse mesmo polimorfismo na evolução clínica precoce em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e encontraram uma frequência alélica de 71% para o alelo G e 29% para o alelo T sendo 500 pacientes, dentre esses 72,4% eram hipertensos com os seguintes genótipos: GG (50,82%), GT (39,78%) e TT (40%).

Uma meta-análise de 34 estudos envolvendo 21.068 participantes foi conduzida para investigar a associação entre o polimorfismo G894T e infarto agudo do miocárdio (IAM). Constataram que o alelo T está associado ao aumento do risco IAM em asiáticos. Os resultados indicaram que a etnia desempenha um papel importante na associação entre o polimorfismo G894T do gene *eNOS* e IAM (LUO, 2014).

Com relação a hipertensão e o polimorfismo G894T do gene *eNOS*, em uma outra metanálise realizada por Niu e colaboradores (2011) com 19.284 participantes do grupo caso e 26.003 do grupo controle verificou-se que o alelo T em todas as populações de estudo teve um risco aumentado de 16% para a hipertensão ($p = 0,001$).

No estudo do polimorfismo T786C do gene *eNOS*, foi observada uma maior porcentagem de pacientes com aterosclerose e hipertensão na presença do genótipo homocigoto (TT), pois este foi 2 vezes mais frequente em pacientes do grupo caso em relação ao grupo controle, contudo não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Semelhante aos nossos resultados, em um estudo polonês Kosior-Jarecka e colaboradores (2016) encontraram 45,4% no grupo caso e 36,4% no grupo controle, também sem diferença estatística significativa.

Com relação ao genótipo prevalente, assim como neste estudo, em uma população italiana foi constatada a maior prevalência do genótipo TC do gene *eNOS* (T786C) em ambos os grupos num estudo caso-controle que abordava pacientes com danos cardiovasculares e hipertensão, onde foram encontrados 55,1% no grupo caso e 61% no grupo controle (COLOMBA, 2008). Também Colombo e colaboradores (2003) encontraram maior

prevalência do genótipo TC na duas populações estudadas com as frequências genótípicas 52,5% no grupo caso e 51,4% no grupo controle. Similarmente, Khurana e colaboradores (2003) encontraram em uma população americana uma maior frequência do genótipo TC, sendo (51%) no grupo controle e 67% no grupo caso.

No presente estudo as frequências do genótipo CC do polimorfismo T786C do gene *eNOS* foram semelhantes quando comparadas as duas populações estudadas, dessa mesma forma no trabalho de Colomba e colaboradores (2008) cujas frequências encontradas em ambos os grupo foi de 29%.

Na análise da distribuição alélica de T e C do polimorfismo T786C do gene *eNOS*, destaca-se, o alelo C presente em 61% do grupo caso, assim como Colombo (2003), que encontrou 51% para o mesmo alelo. Enquanto que AliReza (2012) detectou 8% da presença do alelo C nos pacientes estudados. Pesquisas in vitro indicam que a presença do alelo C reduz em cerca de 50% a atividade do promotor, assim como os níveis celulares de RNA mensageiros e conseqüentemente diminui a produção de óxido nítrico (NAKAYAMA et al., 1999).

Na análise do gene *GSTT1* neste estudo foi observada uma maior frequência da presença do mesmo no grupo caso, sugerindo haver uma associação entre aterosclerose e a hipertensão com *GSTT1*/ presente, o qual foi 1,3 vezes mais frequente no grupo caso.

Também em um estudo brasileiro, no estado de São Paulo, Bazo e colaboradores investigaram pacientes submetidos à angiografia com diagnóstico de DAC e constataram a prevalência de *GSTT1*/ presente. Já na população da cidade de Vitória no Espírito Santo, o genótipo *GSTT1*/nulo foi em maior porcentagem (MACIEL et al., 2009).

Semelhante ao nosso estudo, na Índia, Girisha e colaboradores (2004) associaram o genótipo *GSTT1*/presente com a DAC, sendo este detectado em 92,34% das amostras do grupo caso, e 81,82 no grupo controle. Assim como na Turquia, onde Turkanoglu e colaboradores (2010) identificaram em pacientes isquêmicos o genótipo presente de *GSTT1* em maior porcentagem. E também na Sérvia, Zivković e colaboradores, (2014) constataram a prevalência do genótipo *GSTT1*/presente no grupo caso, composto por pacientes com aterosclerose sendo que 88,9% desse grupo eram hipertensos.

Na análise do polimorfismo do gene *GSTM1* foi constatada uma prevalência significativa da presença do gene em ambos os grupos, sendo 1,2 vezes maior no grupo caso o que pode indicar haver uma associação entre aterosclerose e hipertensão com a presença deste gene.

A proporção de indivíduos com genótipo nulo do gene *GSTM1* no grupo controle (40%) está de acordo com os dados da literatura, se aproximando das frequências reportadas em estudos caso controle realizadas no Brasil (45,7%, BURIM et al., 2004; 41,3%, COLOMBO et al., 2004) e na Europa (46,9%, D'ALO et al., 2004).

Tal qual nossos achados, em São Paulo, Grignoli e colaboradores (2009) analisaram o polimorfismo do gene *GSTM1* e sua relação com outras patologias dentre elas a aterosclerose e relataram que o *GSTM1*/presente foi mais prevalente (57,0%) em relação ao genótipo *GSTM1*/nulo (43,0%). Em Vitória (ES), Maciel e colaboradores analisou 1577 indivíduos da população geral, e constatou uma maior prevalência do *GSTM1*/ presente.

Semelhantemente aos nossos resultados, porém em outros locais do mundo, como na Turquia, Taspinar e colaboradores (2012) detectaram a presença de *GSTM1* em 58,2% no grupo caso e 53,5% no grupo controle. Além desse, Wilson e colaboradores (2000) no Reino Unido, verificaram maior frequência do genótipo *GSTM1*/presente no grupo caso (52,0%), contudo foi observada uma menor prevalência desse genótipo no grupo controle (42,8%).

Quando se avalia estudos em diferentes lugares do mundo as frequência dos genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* são diferentes dos nossos resultados. Nos Emirados Árabes Unidos, em Dubai, Huassain (2012) e colaboradores concluíram que a deleção de *GSTT1* e *GSTM1* podem ser considerados um fator de risco para hipertensão. Também Wang e colaboradores (2012) na China, concluíram que o polimorfismo nulo de *GSTT1* e de *GSTM1* podem interagir sinergicamente com hipertensão, diabetes mellitus, tabagismo e aumenta o risco da incidência de acidente vascular cerebral isquêmico. Assim como na Turquia, Türkanoglu (2010) e colaboradores mostraram que os genótipos *GSTT1*/nulo e *GSTM1*/nulo, em conjunto com a hipertensão, podem desempenhar um papel significativo na patogênese de acidente vascular cerebral isquêmico.

Os resultados encontrados foram conflitantes como descritos anteriormente, tanto para o gene *eNOS* avaliando os polimorfismos G894T e T786C, assim como os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTMI* o que pode ser devido as diferenças na composição étnica da população brasileira (ARRUDA et al., 1998) e também diferenças quanto aos critérios de exclusão e inclusão dos grupos destes estudos que enfocaram outras patologias. Posto isso faz-se necessário mais estudos para o esclarecimento da associação desses polimorfismos com a aterosclerose e com a hipertensão.

Apesar de haver uma contribuição genética elevada na patogênese da aterosclerose e da HAS, mecanismos complexos envolvendo outros fatores, tais como bebida e tabagismo, podem interagir uns com os outros e a longo prazo podem esconder o verdadeiro papel de eventuais polimorfismos genéticos (COLOMBA, 2008).

Em relação ao hábito de fumar e os polimorfismos aqui estudados, foi encontrada a associação apenas com o gene *GSTMI* assim com Sultana e colaboradores em 2011. Em quanto que não obtivemos esta associação com o polimorfismo G894T (*eNOS*) do mesmo modo que Castro (2006). Não houve associação com o polimorfismo T786C (*eNOS*) corroborando com os resultados encontrados por Colombo e colaboradores (2003). Semelhantemente, em um estudo feito por Maciel e colaboradores (2009) não encontrou associação entre o polimorfismo do gene *GSTT1* e o hábito de fumar.

Um outro fator aqui estudado foi o consumo de bebida alcoólica, sendo analisadas possíveis associações com os polimorfismos estudados. Embora hajam relatos das associações dos polimorfismos G894T (*eNOS*), T786C (*eNOS*), *GSTT1* e *GSTMI* (IDRISSI et al., 2016; LIU et al., 2013; SYED et al., 2010; MARCHIONI et al., 2011), em nossa pesquisa não foram detectadas as associações destes polimorfismos com o alcoolismo, exceto para o gene *GSTT1*, em que o p obtido foi menor que 0,05.

A aterosclerose e a HAS são patologias multifatoriais e conseqüentemente um desafio para a genética molecular (PADMANABHAN et al., 2010). São muitas as possíveis interações desses polimorfismos e o desenvolvimento da aterosclerose e hipertensão, mas ainda são necessários mais estudos para uma maior elucidação destas associações.

6 CONCLUSÃO

- A análise da distribuição do polimorfismo G894T do gene *eNOS* nos grupos caso e controle mostrou uma diferença estatística significativa, onde o indivíduo homozigoto do alelo selvagem (G) foi 6,5 vezes mais frequente em pacientes do grupo caso. Isso pode sugerir que a presença do genótipo GG tenha maior suscetibilidade à doença aterosclerótica e à HAS.
- A análise da distribuição dos alelos G e T do polimorfismo G894T do gene *eNOS* nos grupos caso e controle revelou não haver diferença estatisticamente significativa.
- O genótipo GT do polimorfismo G894T do gene *eNOS* foi a maior frequência nas duas populações estudadas.
- Com relação à análise da frequência genotípica do polimorfismo T786C do gene *eNOS* nos grupos caso e controle não houve uma diferença estatística significativa.
- Quanto a associação da frequência alélica de T e C do polimorfismo T786C gene *eNOS* nos grupos caso e controle não houve uma diferença significativa entre os grupos estudos.
- A presença do gene *GSTT1* nos grupos caso e controle foi 1,3 vezes maior no grupo de participantes ateroscleróticos hipertensos em relação ao grupo controle com um resultado estatisticamente significativo.
- A frequência do gene *GSTM1* encontrada em pacientes ateroscleróticos hipertensos foi 1,2 vezes maior quando comparada ao grupo controle, com uma diferença estatística significativa.
- A associação com o hábito de fumar foi observada apenas no polimorfismo do gene *GSTM1*.
- Foram detectadas associações entre as pessoas que declararam nunca ter fumado com os polimorfismos G894T (*eNOS*) e *GSTT1*.

- Não houve nenhuma associação entre as pessoas que pararam de fumar há mais de 15 anos (ex-fumantes) com os polimorfismos.
- Para a variável alcoolismo, em que os participantes declararam “sim” para o consumo de bebida alcoólica, associada aos polimorfismos estudados houve associação apenas com *GSTT1*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z., EL-ZEIN R. A., ANWAR, W. A., AU W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996

ALIREZA, Y., FATEMEH, K. K., MOHAMMAD, R. N. T-786C Polymorphism of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Serum Level of Nitric Oxide in Nonsmoker and Nondiabetic Patients *Suffering* from Coronary Artery Disease. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 2012.

ARORA, P., NEWTON-CHEH, C. Blood pressure and human genetic variation in the general population. *Current Opinion in Cardiology*, 2010.

ARRUDA, V. R., GRIGNOLLI, C. E., GONÇALVES, M. S., et al. (1998) Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 54: 210-214.

BADIMON, L., PADRÓ, T., VILAHUR, G. Atherosclerosis, platelets and throm-bosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2012 Apr; 1(1): 60–74.doi: 10.1177/2048872612441582

BALASUBRAMANIAN, S. P., COX A., BROWN N. J., REED M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(6):593-601.

BAZO, A.P., SALVADORI D. JR, SALVADORI R.A., SODRÉ L.P., DA SILVA G. N., DE CAMARGO E. A., RIBEIRO L. R, SALVADORI D. M. DNA repair gene polymorphism is associated with the genetic basis of atherosclerotic coronary artery disease. *Cardiovascular Pathology* 20 (2011) 9–15.

BEDI, U. S., SINGH, M., SINGH, P.P., BHURIYA, R., BAHEKAR, A., MOLNAR, J., KHOSLA, S, ARORA, R. *Effects* of statins on progression of carotid atherosclerosis as

measured by carotid intimal–medial thickness: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010.

BURIM, R. V., CANALLE, R., MARTINELLI, L., TAKAHASHI, C. S. Poly-morphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*, v. 19, p. 291-98, 2004.

CAI, H., WANG, X., COLAGIURI, S., DAVID, E. L. WILCKEN, E. L. A Common Glu298!Asp (894G!T) Mutation at Exon 7 of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Vascular Complications in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* Dec 1998, 21 (12) 2195-2196; DOI: 10.2337/diacare.21.12.2195.

CARRANZA, J. R., FERMIN A., NEWMAN MICHAEL, G. *Periodontia Clínica*. Trad. Sob direção de Cararanza's clinical periodontology. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p. 449.

CARVALHO, M. H. C., NIGRO, D., LEMOS, V. S., TOSTES, R. C. A., FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens* 8: 76-88, 2001.

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.

CHANNON, K. M., GUZIK, T. J.. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol*. 2002; 53 (4 Pt 1): 515-24.

CHARLES, I. G. Et al. Expression of human nitric oxide synthase isozymes. *Methods in Enzymology*. v. 268, p. 449-60, 1996.

ÇİFTÇİ Ç., MELİL S., ÇEBİ Y., ERSÖZ M., ÇAĞATAY P., KİLİÇGEDİK M., DUMAN B. S. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids in Health and Disease*. 2008;7:5. doi:10.1186/1476-511X-7-5.

COLOMBA, D., DURO, G., CORRAO, S., ARGANO, C., DI CHIARA, T., NUZZO, D., LICATA, G. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study. *Immunity & ageing: I & A*. 2008;5:4. doi:10.1186/1742-4933-5-4.

COLOMBO, J. ROSSIT A.R.B, CAETANO A, BORIM A.A, WORNATH D., SILVA A.E.. *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. *World Journal of Gastroenterology*. 2004;10(9):1240-1245. doi:10.3748/wjg.v10.i9.1240.

COLOMBO, M. G., PARADOSSI, U., ANDREASSI, M. G., BOTTO, N., MAN-FREDI, S., MASETTI, S., CLERICO, A. Endothelial nitric oxide synthase gene poly-morphisms and risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry*, 49(3), 389–395. <http://doi.org/10.1373/49.3.389>, 2003,

CONNELL, J. M., DAVIES, E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005.

CRISAN, D. E CARR, J. Angiotensin Converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn*, v.2, n.3, Aug, p.105-15. 2000.

CRUZ-GONZÁLEZ, I., CORRAL, E., SÁNCHEZ-LEDESMA, ANGEL SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M., MARTÍN-LUENGO, C., GONZÁLEZ-SARMIENTO, R. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2009.

D'ALO, F., VOSO, M. T., GUIDI, F., MASSINI, G., SCARDOCCI, A., SICA S., PAGANO, L., HOHAUS, S., LEONE, G. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*, v. 89, p. 664-670, 2004.

DANILCZYK, U. PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circulation Reserch*, v. 98, n.4, p.463-471, 2006.

DU, Y., HONGMIN WANGXIN FURONGQING SUNYUQIAN LIU. GSTT1 null genotype contributes to coronary heart disease risk: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 2012.

DZAU, V.J. Markers of malign across the cardiovascular continuum: interpretation and application. *Circulation*, 2004.

ERDMANN, J, et al. Characterization of polymorphisms in the promoter of the human angiotensin II subtype 1 (AT1) receptor gene. *Ann Hum Genet.*; 63 (pt 4): 369-74. 1999.

FATINI C., 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.

FAVARATO, D., LUZ, PL. Hipertensão e aterosclerose. Aspectos fisiopatológicos. Sociedade Brasileira de hipertensão 2003.

FERNANDES, S.G. Análise dos Polimorfismos dos Genes eNOS (T786C), (G894T) e CYP2c19*2 em Pacientes com Catarata . pp 30,31. Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina, PUC-GO, Goiânia, 2016.

FROSSARD, P.M., et al., An MboI two-allele polymorphism may implicate the human renin gene in primary hypertension *Hypertens Res.* p. 221- 5, 1998.

GAILLARD-SANCHEZ, I., MATTEI, M. G., CLAUSER, E., CORVOL, P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum. Genet.* 84: 341-343, 1990.

GANZ, P., VITA, J. Z. A. Testing vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation.* 2003.

GHILARDI, G., BIONDI, M.L., DEMONTI, M., BERNINI, M., TURRI, O., MASSARO, F., GUAGNELLINI, E., SCORZA, R. Independent Risk Factor for Moderate to Severe Internal Carotid Artery Stenosis: T786C Mutation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Molecular Diagnostics and Genetics*, 2002.

GIRISHA, K. M., GILMOUR, A., MASTANA, S., SINGH, V.P., SINHA N., TEWAR, S., RAMES, V., SANKAR, V. H., AGRAWAL, S. T1 And M1 Polymorphism In Glutathione S Transferase Gene and coronary artery disease in north indian population Indian. *J Med Sci.* 20004; 58 (12).

GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Scientia Medica*, 2005.

GRIGNOLI, C.R.E., RE, A.I., BERTONCIN, A.C. Polimorfismos dos genes das enzimas glutaniona S-Transferase MU1 e TETA1. *Pensamento Plural: Revista Científica do São João da Boa Vista*. 2009; 3 (1).

GUYTON, A.C. Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica 12ª edição, 2011.

HARRAP, S.B., DAVIDSON, H.R., CONNOR, J.M., SOUBRIER, F., CORVOL, P., FRASER, R., CHRIS, J.W. FOY, GRAHAM C.M. Watt. The Angiotensin I Converting Enzyme Gene and Predisposition to High Blood Pressure. *Hypertension Vol 21*, 1993.

HARRAP, S.B. Blood pressure genetics: time to focus. *J Am Soc Hypertens*, 2009.

HASSANI, I.H., HMIMECH, W., DIAKITE, B, et al. Association of G894T eNOS, 4G/5G PAI and T1131C APOA5 polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction in Morocco. *Meta Gene*. 2016;9:56-61. doi:10.1016/j.mgene.2016.03.004.

HAYES, J.D., STRANGE, R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 2000 61: 154–166. PMID: 10971201.

HILLERMANN, R., CARELSE, K., GEBHARDT, G.S. 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.

HINZ, J., SCHÖNDORF, D., BIRETA, C., et al. The eNOS 894G/T gene polymorphism and its influence on early and long-term mortality after on-pump cardiac surgery. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2013;8:199. doi:10.1186/1749-8090-8-199.

HUSSAIN, K., SALAH N., HUSSAIN, S., HUSSAIN, S. Investigate the Role of Glutathione S Transferase (GST) Polymorphism in Development of Hypertension in UAE Population. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2012;14(8):479-482.

HYNDMAN, M. E., PARSONS, H. G., VERMA, S., BRIDGE P. J., EDWORTHY S., JONES C., LONN E., CHARBONNEAU F., ANDERSON T. J. The 786->C Mutation in Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Associated With Hypertension. *Hypertension*, 2002.

JIAN-QUAN LUO, JIA-GEN WEN, HONG-HAO ZHOU, XIAO-PING CHEN, WEI ZHANG. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene G894T Polymorphism and Myo-cardial Infarction: A Meta-Analysis of 34 Studies Involving 21068 Subjects. *PLoS One*, 2014.

KATO, N., SUGIYAMA, T., MORITA, H., NABIKA, T., KURIHARA, H., YA-MORI, Y., YAZAKI, Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*, 1999; 33(4):933-6.

KEELE, K.D. Leonardo da Vinci's views on arteriosclerosis. *Med Hist*, 1973;17:304–308.

KEIDAR, S., ATTIAS, J. Angiotensin II injection into mice increases the uptake of oxidized LDL by their macrophages via a proteoglycan mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 239, p. 63–67, 1997.

KIM, M. J., KIM, Y-S, OH, C.S., GO, J-H, LEE, S.I., WON-KYU PARK, SEOK-MIN CHO, SOON-KWAN KIM, DONG HOON SHIN. Anatomical Confirmation of Computed Tomography-Based Diagnosis of the Atherosclerosis Discovered in 17th Century Korean Mummy. *PLOS ONE* 2015.

KOHLMANN, O., OIGMAN, W., MION, D., ROCHA, J. C., GOMES, M. A. M., SALGADO, N., FEITOSA, G. S., DALLAVERDE, E., RIBEIRO, A. B. Avaliação de Eficácia e Tolerabilidade da Combinação Fixa de Anlodipino e Losartana no Tratamento da Hipertensão Arterial Primária. Estudo “LOTHAR”. São Paulo, SP. 2006.

KOSHY, L., EASWER, H. V., NEETHA, N. V., NATARAJAN, C., BHATTA-CHARYA, R. N., BANERJEE, M. Role of endothelial nitric oxide synthase gene poly-morphisms in predicting aneurysmal subarachnoid hemorrhage in South Indian patients. *Dis Markers*. 2008

KOSIOR-JARECKA E., ŁUKASIK U., WRÓBEL-DUDZIŃSKA D, et al. Risk Factors for Normal and High-Tension Glaucoma in Poland in Connection with Poly-morphisms of the

Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. Acott TS, ed. PLoS ONE. 2016;11(1):e0147540. doi:10.1371/journal.pone.0147540.

LEE J., EUN HUI BAE SEONG KWON MA, SOO WAN KIM. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. Chonnam Med J. 2016.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002.

Lifton R.P., Gharavi A.G., Geller D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. Cell, 2001.

LIMA, J. M., SERAFIM, P.V.P., SILVA, I.D.C.G., FORONES N/M. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em cancer colorretal. Arq. Gastroente-rol. vol.43 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2006

LIU, C-S, HUANG, R-J, SUNG, F-C, LIN, C-C, YEH, C-C. Association between Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Risk of Metabolic Syndrome. Disease markers. 2013;34(3):187-197. doi:10.3233/DMA-120961.

LLOYD-JONES, D. M., LEIP, E. P, LARSON, M. G, D'AGOSTINO, R. B, BEISER, A., WILSON, P. W, et al. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. Circulation. 2006;113(6):791-8.

LOPEZ, A. D. MATHERS, C. D., EZZATI, M., JAMISON, D. T., MURRAY C. J. L. Global Burden of Disease and Risk Factors. Oxford University Press; New York 2006.

LUFT, F.C., MERVAALA, E., MULLER, D.N. et al. Hypertension-induced end-organ damage: a new transgenic approach to an old problem. Hypertension, v. 33, p. 212–218, 1999

MACIEL, S. S, PEREIRA, C. A., SILVA, G. J., RODRIGUES, M. V., MILL, J. G., KRIEGER, J. E. Association between glutathione S-transferase polymorphisms and triglycerides and HDL-cholesterol. Atherosclerosis .2009;206:204-8.

MARCHIONI, D. M. L. et al . Interação entre consumo alimentar e polimorfismos da GSTM1 e GSTT1 no risco para o câncer de cabeça e pescoço: estudo caso-controle em São Paulo, Brasil. Cad. Saúde Pública, v. 27, n. 2, p. 379-387, 2011 .

MARINKOVIĆ, N., PAŠALIĆ, D., POTOČKI, S. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. *Biochem Med*, 2013.

MARSDEN, P. A., HENG, H. H., SCHERER, S. W., STEWART, R. J., HALL, A. V., SHI, X. M., TSUI, L. C., SCHAPPERT, K. T. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993;68:17478–17488.

MARTELLI, A. Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle. *Revista Saúde e Desenvolvimento Humano*, 2014

MARTINS, J.V.M. Análise Molecular Do Polimorfismo GSTT1 Em Pacientes Com Aterosclerose De Goiânia, Goiás.. Dissertação de mestrado em Genética, PUC-GO, Goiânia, 2016.

MELO, L.G. P. Análise dos polimorfismos genéticos GSTM1 e GSTT1 em fumantes e nunca fumantes. Dissertação em Ciências da Saúde, UEL, Londrina, 2014.

MIYAMOTO, Y., SAITO, Y., KAJIYAMA, N., YOSHIMURA, M., SHIMASAKI, Y., NAKAYAMA, M., KAMITANI, S., HARADA, M., ISHIKAWA, M., KUWAHARA, K., OGAWA, E., HAMANAKA, I., TAKAHASHI, N., KANESHIGE, T., TERAOKA, H., AKAMIZU, T., AZUMA, N., YOSHIMASA, Y., YOSHIMASA, T., ITOH, H., MASUDA, I., YASUE, H., NAKAO, K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 1998.

MOLLSTEN, A., LAJER, M., JORSAL, A., TARNOW, L. The endothelial nitric oxide synthase gene and risk of diabetic nephropathy and development of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2009.

MOON, J., 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.

MURRAY, C.J., LOPEZ, A.D. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*. 2013.

MUTHUSAMY, V.V. BR 08-3 MANAGEMENT OF DYSLIPIDEMIA IN HYPERTENSION. J Hypertens, 2016.

NAKAI, K., FUSAZAKI, T., ZHANG, T., SHIROTO, T., OSAWA, M., KAMATA, J., ITOH, M., NAKAI, K., HABANO, W., KIUCHI T., YAMAMORI S., HIRAMORI, K. Deletion polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. Circulation, v.90, n.5, Nov, p.2199-202. 1994.

NAKAYAMA. M., YASUE H., YOSHIMURA M., SHIMASAKI Y., KUGIYAMA K., OGAWA H., MOTOYAMA T., SAITO Y., OGAWA Y., MIYAMOTO Y., NAKAO K. T-786C Mutation in the 5' -Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Coronary Spasm. Clinical Investigation and reports, 1999.

NASCIMENTO, J. F. C. G, JUNIOR, L. A. G., PASQUALUCCI, A. C, FILHO, W. J. Atherosclerose: diagnóstico macroscópico nas autópsias. Diagn Tratamento. 2013;18(2):65-8

NISHEVITHA, N., ANGELINE, T., JEYARAJ, N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298! Asp polymorphism (G894T) among south Indians. Indian J Med Res, 2009; 129:68-71.

NIU, T., YANG, J., WANG, B., CHEN, W., WANG, Z., LAIRD, N., WEI, E., FANG, Z., LINDPAINTNER, K., JOHN, J. ROGUS, XU X. Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M: no excess transmission to hypertensive Chinese. Hypertension, 1999.

NIU, W., QI, Y. An Updated Meta-Analysis of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene: Three Well-Characterized Polymorphisms with Hypertension. PLoS One, 2011.

NORPPA H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. Toxicol, 2004. PMID: 15093278

NORTON, G. R., BROOKSBANK, R., WOODIWISS, A. J. Gene variants of the renin-angiotensin system and hypertension: from a trough of disillusionment to a welcome phase of enlightenment? Clin Sci (Lond), 2010

O'BRIEN, E., ASMAR, R., BEILIN, L., IMAI, Y., MANCIA, G., MENGDEN, T., MYERS, M., PADFIELD, P., PALATINI, P., PARATI, G., PICKERING, T., REDON, J., STAESSEN, J., STERGIOU, G., VERDECCHIA, P. Practice guidelines of the European Society of Hypertension for clinic, ambulatory and self blood pressure measurement. *Journal of Hypertension*, 2005.

OKUBO, T., HARADA, S., HIGUCHI, S., MATSUSHITA, S. Association analyses between polymorphisms of the phase II detoxification enzymes (GSTM1, NQO1, NQO2) and alcohol withdrawal symptoms. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003.

OPARIL S., ZAMAN M.A., CALHOUN D.A. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med*, 2003.

PADMANABHAN, S., MELANDER, O., JOHNSON, T., et al. Genome-Wide Association Study of Blood Pressure Extremes Identifies Variant near UMOD Associated with Hypertension. Schork NJ, ed. *PLoS Genetics*. 2010;6(10):e1001177. doi:10.1371/journal.pgen.1001177.

PAILLARD, F., CHANSEL, D., BRAND, E., BENETOS, A., THOMAS, F., CZEKALSKI, S., ARDAILLOU, R., SOUBRIER, F. Genotype-phenotype relationships for the renin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension*, 1999.

PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Letters*, v. 221, p. 123–129, 2005.

PICCOLI, J.C. et al. Association between 894G>T Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Metabolic Syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008.

PIROLA C.J. Molecular genetics of essential hypertension. Susceptibility and resistance genes. *Medicina*;60:59-66. 2000.

PROCOPCIUC, L., JEBELEANU, G., SURCEL, I., PUSCAS, M. Angiotensinogen gene M235T variant and pre-eclampsia in Romanian pregnant women. *J Cell Mol Med*. 2002 Jul-Sep;6(3):383-8.

RAFIQ, S., ANAND, S., ROBERTS, R. Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful? *J Cardiovasc Transl Res.* 2010 Jun;3(3):189-96. doi: 10.1007/s12265-010-9183-9.

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

REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO 2003. Caso Clínico. Impacto da hipertensão arterial sistêmica sobre o risco cardiovascular.

RIBEIRO, K.C., SHINTAKU, R.C.O. A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. *ConScientiae Saúde*, v. 3, p. 73-83, 2004.

ROBERTS, W.C. Preventing and arresting coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1995;130:580-600.

RODRIGUES, D.A. Análise do Polimorfismo do gene GSTM1 em Pacientes com Aterosclerose. Dissertação de mestrado em Genética, PUC-GO, Goiânia, 2016.

ROBERS, H-H.. New Perspectives for the Elucidation of Genetic Disorders *Am. J. Hum. Genet*, v.81, p.199–207, 2007.

ROSS R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340 (1999), pp. 115–126

ROSSI, G.P., TADDEI, S, VIRDIS, A., CAVALLIN, M., GHIADONI, L., FA-VILLA, S, VERSARI, D., SUDANO, I., PESSINA, A.C., SALVETTI, A. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene *affect* the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. Elsevier, 2013.

ROSSKOPF, D., SCHÜRKS, M., RIMMBACH, C., SCHÄFERS, R. Genetics of arterial hypertension and hypotension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2007.

RUSH J.W., DENNISS S.G., GRAHAM D.A. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol.* 2005; 30 (4): 442-74.

SAINI, V., BHATNAGAR, M.K., BHATTACHARJEE, J. Association of Endothelial Dysfunction with Endothelin, Nitric Oxide and eNOS Glu298Asp Gene Polymorphism in Coronary Artery Disease. *Disease markers*. 2011;31(4):215-222. doi:10.3233/DMA-2011-0819.

SCHMIDT, S., et al. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens*;15:1385–8. 1997

SCHOEN, F.J., COTRAN, R.S. The Blood Vessels. In: Kumar, Cotran, Robbins, editors. *Robbin's Basic Pathology*. 7th ed. New Delhi: Saunders; 2002.

SHIMASAKI, Y., YASUE, H., YOSHIMURA, M., NAKAYAMA, M., KUGIYAMA, K., OGAWA, H., HARADA, E., MASUDA, T., KOYAMA, W., SAITO, Y., MIYAMOTO, Y., OGAWA, Y., NAKAO, K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998, 31:1506–1510.

SHOJI, M., TSUTAYA, S., SAITO, R., TAKAMATU, H., YASUJIMA, M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci*. 2000 May 19;66(26):2557-62.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol*. vol.88 suppl.1 São Paulo, 2007

STANDRIDGE, J.B. Hypertension and atherosclerosis: clinical implications from the ALLHAT Trial. *Curr Atheroscler Rep*, 2005.

STOCKER, R., JOHN, F. KEANEY. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews* Published 1, 2004.

STRANGE, R.C., SPITERI, M.A., RAMACHANDRAN, S., FRYER, A.A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat*, 2001. Res 482: 21–26. PMID: 11535245

SULTANA, S., VENKATA, KOLLA, K., VIDYULLATHA, P., YASOVANTHI JE-EDIGUNTA, PRANAY PENAGALURU K., SINDHU JOSHI, USHA RANI P., REDDY P. P. “Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms in south Indian stroke patients.” *J Med Genet Genomics* 3 (2011): 65-70.

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

SUNDER-PLASSMANN, G., et al. Angiotensin converting enzyme DD genotype is associated with hypertensive crisis. *Crit Care Med*, Vol. 30, No. 10, 2002

TAJEHMIRI, A., MOUSAMAYALI, A. R., & HONARI, P. (2014). Evaluation of eNOS G / T 894 Polymorphism in Iranian patients affected by Catatonic Schizophrenia with type 2 Diabetes. *Advances in BioResearch*, 5(September), 21–25. <http://doi.org/10.15 515/abr.0976-4585.5.3.2125>

TALAEI, M., SADEGHI, M., MOHAMMADIFARD, N., SHOKOUH, P., OVEISGHARAN, S., SARRAFZADEGAN, N. Incident hypertension and its predictors: the Isfahan Cohort Study. *J Hyertension*. 2014;32(1):30-8.

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.

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

TESAURO, M., THOMPSON, W.C., ROGLIANI, P., QI L., CHAUDHARY, P.P., MOSS, J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with

differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:2832–2835.

THOMPSON, R. C., ALLAM, A. H., LOMBARDI, G. P., WANN, L. S., SUTHERLAND, M. L., SUTHERLAND, J. D., SOLIMAN, M. A., FROHLICH, B., MININBERG, D. T., MONGE, J. M., VALLODOLID, C. M., COX, S. L., ABD EL-MAKSOUUD G., BADR I, MIYAMOTO, M. I., EL-HALIM NUR EL-DIN A., NARULA J., FINCH C. E., THOMAS G.S. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet*, 2013.

TIRET L., et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet*. 344(8927):910-3. 1994.

TURKANOLU, A., DEMIRDOĞAN, B.C., DEMIRKAYA, S., BEK, S., ADALI, O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *Neurol Sci* (2010) 31:727–734.

UNGER, T. The role of renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 89 (2A):3A-9A. 2002.

VALLANCE, P., COLLIER, J., MONCADA, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989;2(8670):997-1000.

VELDMAN, B. A., SPIERING, W., DOEVENDANS, P. A., VERVOORT, G, KROON, A. A., DE LEEUW, P. W., SMITS, P. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 2002, 20:2023–2027.

VINI, G. KHURANA, YOUVRAJ R. SOHNI, WELLS I. MANGRUM, ROBYN L. MCCLELLAND, DENNIS J. O’KANE, FREDRIC B. MEYER AND IRENE MEISSNER. Endothelial Nitric Oxide Synthase T-786C Single Nucleotide Polymorphism: A Putative Genetic Marker Differentiating Small Versus Large Ruptured Intracranial Aneurysms. Crossref DOI link: <https://doi.org/10.1161/01.str.0000096994.53810.59> , 2003.

WANG, J., ZOU, L., HUANG, S., LU, F., LANG, X., HAN, L., SONG, Z., XU, Z. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of coronary heart disease. *Mutagenesis*. 2010;25:365–369.

WANG, R., WANG, Y., WANG, J., YANG, K. Association of glutathione S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms with ischemic stroke risk in the Chinese Han population. *Neural Regeneration Research*. 2012;7(18):1420-1427. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2012.18.009.

WANG, X. L; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. V. 70, n. 4, p. 241-51, 2000.

WHITE, P.C., SLUTSKER, L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res.*;21:437–42, 1995.

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

WUNSCH FILHO V., ZAGO, M.A. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. *Rev Saude Publica*. 2005;39:490-7.

Y. YANG, B, P.K. QIA, B, Z.L. YANG, B, N. HUANG Nitric oxide based strategies for applications of biomedical devices. *Biosurface and Biotribology*, 2015.

YOSHIMURA, M., YASUE, H., NAKAYAMA, M., SHIMASAKI, Y., SUMIDA, H., SUGIYAMA, S., KUGIYAMA, K., OGAWA, H., OGAWA, Y., SAITO, Y., MIYAMOTO, Y., NAKAO, K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998, 103:65–69.

ZHANG, M. X. et al. Biogenesis of short intronic repeat 27–nucleotide small RNA from endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biology Chemistry*. V. 283, n.21, p. 14685-93, 2008.

ZIVKOVIĆ, M., STANKOVIĆ, A., DJURIĆ, T., KONČAR, I., KOLAKOVIĆ, A., DJURDJEVIĆ, V., DAVIDOVIĆ, L., ALAVANTIC, D. Effects of glutathione S-transferase

T1 and M1 deletions on advanced carotid atherosclerosis, oxidative, lipid and inflammatory parameters. *Mol Biol Rep* (2014) 41:1157–1164.

ANEXOS

ANEXO A

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:

ANEXO B

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 arroxado. Caso ocorra qualquer tipo de dano à saúde e à integridade física e/ou psicológica do paciente em decorrência dos procedimentos da pesquisa, este terá atendimento integral e irrestrito garantido pelo pesquisador responsável.

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

VII. O material será utilizado somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente estudo, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, 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

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 indivíduo 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