



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

MESTRADO EM GENÉTICA

Aterosclerose: Análise do polimorfismo *T786C* do gene *eNOS*.

Goiânia

© 2017

ANDREIA MARCELINO BARBOSA

Aterosclerose: análise do polimorfismo *T786C* do gene *eNOS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética – MGene, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dr^a. Kátia Karina Verolli de O. Moura

Goiânia

© 2017

B238a

Barbosa, Andreia Marcelino

Aterosclerose[manuscrito]: análise do polimorfismo
T786C do gene eNOS/ Andreia Marcelino Barbosa.-- 2017.
55 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, 2017
Inclui referências f.39-47

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

CDU: 616.13-004.6(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 88 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 127/2017


MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS


DISCENTE: ANDREIA MARCELINO BARBOSA

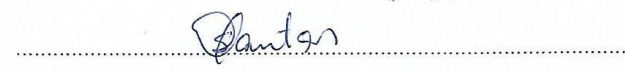
DEFENDIDA EM 03 DE MARÇO DE 2017 E APROVADA COM CONCEITO.....

O título foi alterado não () sim _____

BANCA EXAMINADORA


.....
Prof. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura
PUC Goiás (Presidente)


.....
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
PUC Goiás


.....
Prof. Dra. Sabrina Fonseca Ingênito Moreira Dantas
Membro externo (Fac. Alfredo Nasser)

DEDICATÓRIA

Este trabalho será dedicado a minha melhor amiga e conselheira, minha mãe, pela sua dedicação incondicional e ao Paulo Ricardo por ter permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho.

A vitória desta conquista dedico, com todo meu amor, a vocês!!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e a possibilidade de empreender esse caminho, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

A MINHA MÃE, por sempre acreditar em minha capacidade e me achar A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez acreditar que posso mais do que imagino. Obrigada pelo amor incondicional!

AO MEU NAMORADO, Paulo Ricardo, que mesmo sem entender muito sobre genética, sempre me escutava nos momentos de desespero e tentava de alguma forma me ajudar.

A MINHA FAMÍLIA, especialmente ao Tio Toninho e a Tia Maria Helena que se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho.

AOS AMIGOS de Mestrado que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado, especialmente, Monize, Débora, José Vitor e Fábio. Foi bom poder contar com vocês!

A MAGDA LAGARES, que sempre foi bastante presente nessa etapa, me ensinando a ser paciente e me tratando como uma filha!

A IASMIM RIBEIRO, que sempre me apoiou nos momentos difíceis com toda paciência. Minha colega de Doutorado!

A ANDREIA AMÂNCIO e ARIANE FRARE, que me escutavam e me entendiam nas horas mais desesperadoras.

A MINHA ORIENTADORA, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão e competência. Obrigada por me proporcionar mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

Aos colegas e funcionários do NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por propiciar o ambiente, os materiais e o conhecimento para tornar esse estudo real.

Agradeço, também, a CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	10
2. Revisão Bibliográfica	12
3. Objetivos	24
3.1 Objetivos Gerais	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. Materiais e Métodos	25
5. Resultados	29
6. Discussão.....	32
7. Conclusão	38
8. Referências Bibliográficas.....	39
ANEXO I.....	48
ANEXO II	50
ANEXO III.....	53

RESUMO

A doença arteriosclerótica coronariana (DAC) é a forma mais comum de doença cardiovascular. A DAC é uma doença multifatorial de etiologia complexa, influenciada por determinantes genéticos e ambientais. A lesão aterosclerótica é a anormalidade mais comum encontrada nas artérias decorrente inicialmente de dois processos básicos: acúmulo de colesterol e a proliferação de células musculares lisas na túnica íntima, desenvolvendo-se, portanto, sobre um substrato formado dessas células, leucócitos derivados do sangue e de uma quantidade variável de tecido conectivo formando uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen modificando a túnica média e levando a uma série de complicações circulatórias. O óxido nítrico (NO) produzido pelo óxido nítrico endotelial sintase (eNOS) é conhecido por alterar o fluxo sanguíneo, alterando processos envolvidos na aterosclerose, sendo considerado um importante ateroprotetor. Um dos polimorfismos mais estudados é um SNP na região promotora (T786C), frequentemente associado ao desenvolvimento de doença coronariana. O T786C é uma mutação de ponto importante, de timina para citosina, no códon-786 na região 50-flanqueadora do gene *eNOS*, o que poderia reduzir significativamente a atividade do promotor do gene e nível sérico de óxido nítrico. Esse polimorfismo reduz significativamente a atividade do gene promotor da *eNOS*. Foram coletadas 297 amostras de sangue periférico, de pacientes referenciados ao serviço de cardiologia e cirurgia vascular periférica, da Clínica Angiogyn no município de Goiânia, com diagnóstico prévio de doença aterosclerótica baseados em exame clínico e confirmados através de métodos de imagem (197 amostras) e grupo controle (100 amostras). As amostras coletadas foram submetidas a PCR para verificar presença dos polimorfismos. Os resultados foram comparados utilizando o Teste Qui-Quadrado e Teste G, com o auxílio do software Bioestat (version 5.3; biocistron.blogspot.com/). No presente estudo a frequência do genótipo TC apresentou-se mais frequente. Já no grupo controle a maior frequência foi observada no genótipo TC. Sendo essa diferença não estatisticamente significativa. Fazendo uma relação entre os genótipos TC/TT e CC no grupo caso; TC/TT e CC no grupo controle, obteve-se que essa diferença também não é significativa. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa quando analisados os genótipos (TT, TC e CC) associados a variável gênero sexual e tabagismo. Os resultados não foram significativos porque foi utilizado um padrão tradicional, onde normalmente existe o dobro de casos para o número de controles, e

também devido à aterosclerose ser uma doença muito comum. Vários trabalhos indicaram que quando o **n** trabalhado é o dobro de controle em relação ao número de casos, isso levaria a uma melhor estatística epidemiológica. Podemos concluir também que há forte tendência do alelo T, em dose única ou dose dupla, em associação com aterosclerose.

Palavras-chave: aterosclerose. gene *eNOS*. polimorfismo.

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is the most common form of cardiovascular disease. CAD is a multifactorial disease of complex etiology, influenced by genetic and environmental determinants. Atherosclerotic lesion is the most common abnormality found in the arteries resulting from two basic processes: cholesterol accumulation and the proliferation of smooth muscle cells in the tunica intima, thus developing on a substrate formed of these cells, leukocytes derived from blood and a variable amount of connective tissue forming a fibrous plaque that projects into the lumen modifying the middle tunica and leading to a series of circulatory complications. Nitric oxide (NO) produced by nitric oxide endothelial synthase (eNOS) is known to alter blood flow, altering processes involved in atherosclerosis, and is considered an important atheroprotective. One of the polymorphisms most studied is a SNP in the promoter region (T786C), often associated with the development of coronary disease. T786C is an important thymine to cytosine point mutation at codon-786 in the 50-flanking region of the eNOS gene, which could significantly reduce the activity of the gene promoter and serum nitric oxide level. This polymorphism significantly reduces the activity of the eNOS promoter gene. We collected 297 peripheral blood samples, from patients referred to the cardiology service and peripheral vascular surgery, of the Angiogyn Clinic in the city of Goiânia, with previous diagnosis of atherosclerotic disease based on clinical examination and confirmed by imaging methods (197 samples) and control group (100 samples). The collected samples were submitted to PCR to verify presence of polymorphisms. The results were compared using the Chi-Square test and Test G, with the aid of Bioestat software (version 5.3; biocistron.blogspot.com/). In the present study the frequency of the TC genotype was more frequent. In the control group, the higher frequency was observed in the TC genotype. This difference was not statistically significant. Making a relation between the TC/TT and CC genotypes in the case group; TC/TT and CC in the control group, we found that this difference is also not significant. No significant difference was found when genotypes (TT, TC and CC) were analyzed, associated with gender and smoking. The results were not significant because a traditional standard was used, where there is usually twice as many cases for the number of controls, and also because atherosclerosis is a very common disease. Several studies have indicated that when the **n** worked is double the control in relation to the number of cases, this would lead to a better epidemiological statistic. We can also conclude

that there is a strong tendency of the T allele, in single dose or double dose, in association with atherosclerosis.

Key words: atherosclerosis. gene *eNOS*. polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

A doença arteriosclerótica coronariana (DAC) é a forma mais comum de doença cardiovascular. A DAC é uma doença multifatorial de etiologia complexa, influenciada por determinantes genéticos e ambientais (NANNI et al. 2006).

As mudanças no estilo de vida observadas a partir da segunda metade do século XIX, incluindo alterações nos hábitos alimentares e a adoção de um estilo de vida sedentário, contribuíram para a epidemia crescente de doenças crônicas tais como a obesidade, o diabetes *mellitus* e a hipertensão arterial, condições que por sua vez frequentemente cursam com alterações lipídicas, hipercoagulabilidade e aumento do risco para doença cardiovascular (BURKE; BELL, 2000).

As doenças do aparelho circulatório passaram a ser a principal causa de morte no país a partir da década de 1960, superando a mortalidade por doenças transmissíveis. No ano de 1999, as doenças do aparelho circulatório responderam por 32,2% dos óbitos (BRASIL, 2004).

A probabilidade de alguma das doenças cardiovasculares ocorrerem aumenta na presença de múltiplos fatores de risco estabelecidos para aterosclerose. Eles podem ser modificáveis e não-modificáveis. Os não-modificáveis são a idade, o sexo e a história familiar. Os fatores modificáveis são a dislipidemia, a hipertensão arterial, os hábitos alimentares, o fumo, o diabetes *mellitus*, a obesidade e o sedentarismo (TOLFREY, 2002).

Em geral, as manifestações clínicas das doenças cardiovasculares têm início a partir da meia-idade. No entanto, estudo recente indica que o processo aterosclerótico começa a se desenvolver na infância. Estrias gordurosas, precursoras das placas ateroscleróticas, aparecem na camada íntima da aorta aos três anos de idade e nas coronárias durante a adolescência (FORD, 2003).

A maioria das doenças cardiovasculares resulta de complicações da aterosclerose. Um importante evento inicial para a aterosclerose pode muito bem ser o transporte de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) através do endotélio dentro da parede da artéria (NAVAB et al. 1996). A conversão do macrófago em células espumosas desempenha um papel crucial nos estágios iniciais da aterosclerose. A absorção de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) por macrófagos leva à acumulação intracelular de colesterol na forma de gotículas de gordura, e por sua vez a formação de células espumosas. Pelo fato dos

macrófagos serem incapazes de processar oxLDL, eles crescem e rompem o depósito de colesterol adicional na íntima arterial, resultando em inflamação crônica e estreitamento das artérias (BRICHKINA; DMITRY, 2012).

A lesão aterosclerótica é a anormalidade mais comum encontrada nas artérias decorrente inicialmente de dois processos básicos: acúmulo de colesterol e a proliferação de células musculares lisas na túnica íntima, desenvolvendo-se, portanto, sobre um substrato formado dessas células, leucócitos derivados do sangue e de uma quantidade variável de tecido conectivo formando uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen modificando a túnica média e levando a uma série de complicações circulatórias (GIMBRONE, 1999; MONTENEGRO, 1999; ROSS, 1999).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A doença cardiovascular tornou-se a causa mais frequente de morte em todo o mundo. Apesar de muitas doenças afetarem o sistema cardiovascular, o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral isquêmico, causados pela aterosclerose dominam as estatísticas de morte e invalidez em todas as regiões do mundo (MURRAY et al. 2012).

A previsão foi de que, a partir de 2015, 20 milhões de pessoas morrerão a cada ano por doença cardiovascular. Em torno de 8% dessas mortes ocorreram em países de renda média e baixa, e as principais causas são o tabagismo, a inatividade física e a dieta inadequada (WHO, 2005).

Segundo o site do Ministério da Saúde, no ano 2014 foram registradas 340.284 mortes por doenças do aparelho circulatório, sendo que destas, 1146 foram por aterosclerose (BRASIL, 2017).

A opinião corrente é que o aumento da incidência de doenças cardiovasculares é provavelmente o resultado de uma alta prevalência de fatores de risco não tradicionais, incluindo inflamação, estresse oxidativo, agentes infecciosos e de fatores de risco tradicionais como hipertensão, dislipidemia (BALAGOPAL et al. 2011), tabagismo, aumento de glicemia, os quais contribuem para a cronicidade ou excesso de ativação do endotélio vascular. Estes fatores em conjunto e de forma sinérgica estimulam a produção de citocinas inflamatórias, peroxidação lipídica e estresse oxidativo, que aumentam a superfície adesiva do endotélio e diminuem a produção de fatores relaxantes e anticoagulantes derivados do endotélio (FELETOU; VANHOUTTE, 2006). Esses fatores de risco podem estar presentes desde a vida intrauterina, continuando por toda vida (BARKER; HANSON, 2004; BARKER, 2000).

Uma das características importantes da dislipidemia é a produção aumentada de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL), que estão envolvidas nas etapas-chave da proliferação de células vasculares e aterogênese (LIN et al. 2011). Na presença de disfunção/lesão endotelial (iniciada por fatores de risco de doenças cardiovasculares, estresse oxidativo e outras forças físicas ou químicas), a LDL (lipoproteína de baixa densidade) pode atravessar a barreira endotelial e entrar na parede arterial. Uma vez dentro da parede arterial, a LDL pode se tornar oxidada e convertida em LDL oxidada (oxLDL) (FUSTER et al. 1992; STEINBERG, 1997). A oxLDL induz ainda a ativação/lesão de células endoteliais e estimula a expressão da molécula de adesão (por exemplo, E-selectina, P-selectina e molécula de

adesão celular vascular), bem como vários fatores quimiotáticos (CUSHING et al. 1990; ROSS, 1999) que promovem a ligação e ativação de linfócitos e monócitos. Através da secreção de quimioatraentes, os monócitos e os leucócitos sofrem diapedese e transmigram para o espaço subendotelial, onde os monócitos são diferenciados para macrófagos. Macrófagos ingerem a oxLDL e formam células de espuma, que geralmente aparecem durante as primeiras décadas de vida. Este processo é contínuo e, à medida que as células espumosas se combinam com leucócitos, é formada uma sequência gordurosa. As células espumosas liberam substâncias químicas pró-inflamatórias que estimulam a migração das células do músculo liso vascular para a íntima, criando eventualmente uma lesão aterosclerótica avançada, que pode se transformar em uma placa fibrosa aterosclerótica com um grande núcleo lipídico que pode se projetar no lúmen do vaso, enquanto que em outras circunstâncias, o núcleo não sobressai para o lúmen, provavelmente como resultado de remodelação compensatória (FUSTER et al. 1992; LIBBY, 2006; LIBBY et al. 2006; LIBBY, 2002; ROSS, 1999).

A aterosclerose afeta as artérias de grande e médio porte, causando trombose ou estenose grave nas artérias, que conduz ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, lesão isquêmica dos rins e intestinos e muitas outras manifestações clínicas com risco de vida. Antes de se tornar clinicamente evidente, o processo aterosclerótico progride silenciosamente durante anos. Os médicos cientistas, portanto, devem não só tratar a doença cardiovascular aterosclerótica clinicamente manifesta, mas também identificar alvos para a prevenção e tratamento precoce em indivíduos aparentemente saudáveis. Ambas as tarefas exigem um entendimento da patogênese da aterosclerose (LIBBY, 2013).

É uma doença inflamatória crônica, multigênica (MANDUTEANU et al. 2012), também relacionada com a idade, de origem multifatorial e que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibres. É caracterizada por uma formação de placas ateroscleróticas que consistem em núcleos necróticos, regiões calcificadas, lipídeos modificados e acumulados, células musculares lisas inflamadas (SMCs), células endoteliais (ECs), leucócitos e células espumosas (ROSS, 1999). Pode ser considerada como um processo de vários estágios, começando a partir da lesão endotelial para a cobertura fibrosa e a formação de trombos na placa avançada. O cofator no desenvolvimento da aterosclerose é a oxidação da (LDL) e a acumulação das células vasculares, promovendo a formação de células espumosas (macrófagos repletos de lipídeos), bem como o aumento da secreção de mediadores de

inflamação, tais como a interleucina (IL)-1, IL-6 e de necrose tumoral fator (TNF)- α . O estado inflamatório, por sua vez, pode induzir o stress oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na parede vascular (HULSMAN et al., 2010), contribuindo para a progressão e desestabilização da placa aterosclerótica e, conseqüentemente, das doenças cardiovasculares. Sabe-se que as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo, representando aproximadamente 17,3 milhões de mortes por ano (WHO, 2011). A inflamação, abrangendo imunidade tanto inata e adaptativa, caracteriza a aterogênese e liga muitos fatores de risco tradicionais para função alterada das artérias. As vias inflamatórias tornaram-se o foco de intensa pesquisa na busca de novas estratégias preventivas e terapêuticas contra doenças cardiovasculares. Os avanços técnicos também permitiram a identificação de genes que contribuem para a doença cardiovascular aterosclerótica em humanos, mais recentemente utilizando estudos de associação do genoma (GWASs - Genome-wide association studies) (DELOUKAS et al. 2013).

Os processos inflamatórios são caracterizados por um aumento da permeabilidade microvascular (hiperpermeabilidade) às macromoléculas. O extravasamento de macromoléculas é um processo normal em curso, que ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares, e desempenha um papel importante na formação da função linfática e imune. No entanto, a fuga excessiva de macromoléculas para os tecidos causa edema, que pode interromper a homeostase e causar disfunção tecidual. Vários mediadores inflamatórios podem aumentar rapidamente a permeabilidade microvascular à macromoléculas através do endotélio venular. Os mecanismos pelos quais esses estímulos inflamatórios induzem a hiperpermeabilidade do endotélio têm sido uma área de intensa investigação (DURÁN et al. 2010).

A progressão da aterosclerose é caracterizada pelo desenvolvimento de placas no interior das artérias, que depois endurece e estreita as artérias, levando a redução da oferta de sangue rico em oxigênio para os órgãos e outras partes do corpo (PUDDU et al. 1995). A evolução da doença, de uma lesão inicial para uma ruptura da placa, se dá por causa dos muitos eventos celulares e moleculares em cada nível e, conseqüentemente, se dá o evento inflamatório (ROBERT, 2005). A atividade inflamatória desta doença não se limita a apenas um pequeno número de lesões ateroscleróticas, mas está presente, mais ou menos, em todas as lesões ao longo da árvore vascular. Assim, embora a inflamação da placa possa ser útil como um marcador de atividade da doença, provavelmente não é útil como um marcador autônomo para a vulnerabilidade da placa (RICCIONI; SBLENDORIO, 2012). Avanços recentes têm

estabelecido um papel crucial para a inflamação em todas as fases da aterosclerose, incluindo a iniciação, progressão, e a lesão avançada complicada (LIBBY, 2002; LIBBY et al. 2002). A inflamação tem emergido como uma força motriz importante na iniciação e progressão da formação da lesão aterosclerótica (LIBBY, 2002).

As placas ateroscleróticas consistem na acumulação de células vasculares do músculo liso (VSMC), células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T, células dendríticas) subjacentes a um endotélio disfuncional, em conjunto com o lipídeo extracelular, colágeno e matriz. O recrutamento de células inflamatórias circulantes é um evento precoce na aterosclerose, o que desencadeia a proliferação e a migração das células vasculares do músculo liso da parede do vaso. Há também uma evidência crescente de que as células circulantes podem transdiferenciar em células vasculares do músculo liso, que compreendem placas ateroscleróticas nativas e uma variedade de outras patologias vasculares (CAPLICE et al., 2003; SATA et al. 2002). Essas placas também estão associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KLIGERMAN et al. 2010).

As condições comuns de predisposição para aterosclerose tais como a hipercolesterolemia, a hipertensão, a diabetes e tabagismo, estão associadas com disfunção endotelial, que conduz a um fenótipo pró-inflamatório e pró-trombótico do endotélio. A compreensão avançada do patobiologia de aterosclerose sugere que essas alterações da função endotelial podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e suas complicações clínicas (LANDMESSER et al. 2004). Essa disfunção é considerada um marcador precoce para a iniciação e progressão da aterosclerose e um preditor de futuros eventos cardiovasculares (GIANNOTTI; LANDMESSER, 2007; LANDMESSER et al. 2004). Embora a aterosclerose esteja associada com uma vasta alteração no fenótipo endotelial, a avaliação da função vasodilatadora endotélio-dependente das artérias periféricas tem emergido como um indicador acessível da saúde do endotélio (CHARAKIDA et al. 2010).

A formação da placa aterosclerótica se inicia com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas. A acumulação de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à

concentração dessas lipoproteínas no plasma. Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica. A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Tem sido bem estabelecido que a placa arterial se desenvolve em determinadas áreas, como bifurcações e curvaturas, o que foi comprovado por exame diferenciais na dinâmica do fluxo sanguíneo (MALEK et al. 1999).

As lesões ateroscleróticas começam a se desenvolver no âmbito de um endotélio intacto, mas com vazamento, ativado e disfuncional. Mais tarde, as células endoteliais podem desaparecer e áreas desnudas do endotélio aparecem sobre lesões avançadas, com ou sem as plaquetas aderidas ao tecido subendotelial exposto (DAVIES et al. 1988). A disfunção endotelial é um evento precoce e importante que inicia a aterogênese. Isto é principalmente mediada através da regulação prejudicada do óxido nítrico endotelial sintase (eNOS) com uma diminuição do óxido nítrico vasoprotetor (NO) e aumento na produção espécies reativas de oxigênio (ROS) que promovem a lesão vascular (GORENNE et al. 2006). Antes de o ateroma aparecer, a disfunção é um evento-chave, assim como o estado subclínico da doença (BONETTI et al. 2003).

A perturbação da função endotelial é considerada um evento-chave no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (TOBOREK; KAISER, 1999) e contribui para o desenvolvimento de uma placa inflamada e rica em lipídeos (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006). O estado disfuncional do endotélio está ligado a um aumento da permeabilidade de partículas tais como as LDL e a inflamação da parede vascular (RONG et al. 1998).

Está bem estabelecido que as células endoteliais e células vasculares do músculo liso são dois componentes especializados que interagem com a parede vascular e que orquestram a

patogênese da aterosclerose por meio de cascatas de sinalização complexas (GORENNE et al. 2006). As células vasculares do músculo liso formam a camada média dos vasos sanguíneos e representam um componente dinâmico da artéria. Na artéria média normal elas têm um fenótipo diferenciado, contrátil. Com estímulos patológicos, elas podem sofrer hipertrofia ou adotar um fenótipo “desdiferenciado”, e sintetizar um excesso de matriz extracelular e citocinas inflamatórias, dividir e migrar para a íntima. Espécies reativas de oxigênio têm sido envolvidas em todas estas respostas (CLEMPUS; GRIENGLING, 2006). As células endoteliais estão localizadas na íntima - que é o revestimento interno da artéria e que controlam a função vascular respondendo a vários neurotransmissores, hormônios e fatores vasoativos que afetam a vasomotricidade, trombose, agregação plaquetária e inflamação (GALLEY; WEBSTER, 2004). A produção equilibrada destes fatores vasoativos é ateroprotetor, considerando que um ferimento no endotélio causa um problema na produção destes fatores. O desequilíbrio leva a uma disfunção endotelial, que é um indicador precoce da aterosclerose (LERMAN; ZEIHNER, 2005).

Como a aterosclerose é um processo inflamatório os macrófagos estão presentes em todas as fases da aterosclerose. Inicialmente, os monócitos atraídos por sinais pró-inflamatórios provenientes do endotélio inflamado se anexam aos locais problemáticos das artérias e se infiltram na íntima. Para ser atraente para monócitos e outras células do sistema imunológico, os locais vasculares problemáticos devem ser feridos por força hemodinâmica anormal e/ou acumulação de lipídeos oxidados na parede arterial (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2013). Os monócitos diferenciam-se para macrófagos na camada subendotelial, e se tornam pró-inflamatórios/anti-inflamatórios, dependendo dos estímulos locais e transformando-se em células espumosas (COLIN et al. 2014). A formação de células espumosas ocorre nas fases iniciais da aterosclerose e é uma característica da doença aterosclerótica (BOBRYSHV, 2006; STARY et al. 1994).

A migração dos leucócitos aderentes depende em grande parte da expressão de citocinas quimiotáticas reguladas por sinais associados a fatores de risco tradicionais e emergentes para a aterosclerose. Uma vez residente na íntima arterial, os leucócitos sanguíneos - principalmente fagócitos mononucleares e linfócitos T – se comunicam com as células endoteliais, as do músculo liso e as células endógenas da parede arterial. As principais mensagens trocadas entre os tipos de células envolvidas na aterogênese dependem de mediadores de inflamação e imunidade, incluindo pequenas moléculas que possuem os mediadores lipídicos, tais como prostanóides e outros derivados de ácido araquidônico, por

exemplo, os leucotrienos. Outros autacóides, tais como a histamina, regulam o tônus vascular e aumentam a permeabilidade vascular. Recentemente, muita atenção tem sido dada aos mediadores proteicos de inflamação e imunidade, incluindo as citocinas e componentes do complemento (LIBBY; THEROUX, 2005).

Lipoproteínas e suas alterações são muito frequentemente associadas com o risco aumentado de desenvolvimento de doença aterosclerótica (EREN et al. 2012). Dependendo do tamanho e concentração, as moléculas de plasma e partículas de lipoproteínas extravasam por meio do endotélio ferido e defeituoso para o espaço subendotelial, onde as lipoproteínas potencialmente aterogênicas são retidas e modificadas (por exemplo, oxidadas) e se tornam citotóxicas, pró-inflamatórias, quimiotáticas, e pró-aterogênicas. Os mecanismos responsáveis pela modificação de LDL aterogênico são desconhecidos, mas poderão incluir a oxidação mediada pela mieloperoxidase, 15-lipoxigenase, e/ou de óxido nítrico sintase (NOS) (GLASS; WITZTUM, 2001). O aumento da absorção de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (oxLDL) e/ou a redução de efluxo de colesterol leva à deposição de colesterol esterificado no citoplasma da macrófagos e geração de células espumosas (YU et al. 2013). O LDL se acumula no interior do espaço da íntima e, subsequentemente, sofre modificações, tal como a oxidação, conversão de LDL em LDL oxidada, que atua como um importante imunogênico (WILENSKY; HAMAMDZIC, 2007). A oxidação da LDL no espaço da íntima ainda não está totalmente explicada; no entanto, lipoxigenases, mieloperoxidase, óxido nítrico sintase e NADPH oxidases tem capacidade de oxidação da LDL (LI; GLASS, 2002). Elevados níveis séricos de LDL resultam em um aumento do risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose, enquanto que a lipoproteína de alta densidade (HDL) protege contra a aterosclerose (BALLANTYNE, 1998). Muitos estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais têm indicado que a redução do alto nível sérico de LDL é uma forma eficaz de prevenir a aterosclerose e doenças cardiovasculares (TANNOCK, 2008).

Quando a LDL oxidada (oxLDL) entra em contato com uma parede da artéria, a artéria é danificada. Isto inicia uma série de reações para reparar que inclui o recrutamento de monócitos, os quais são então influenciados a se diferenciarem em macrófagos por os fatores estimuladores secretados por colônias de macrófagos circundantes. Estes macrófagos ingerem oxLDL, levando a uma acumulação intracelular do colesterol sob a forma de gotículas de gordura e a formação de células espumosas. Como macrófagos não são capazes de processar oxLDL, eles crescem e se rompem, depositando o colesterol oxidado adicional na parede da artéria. Isso desencadeia ainda mais a resposta imune, continuando o ciclo. Eventualmente, a

artéria fica inflamada, e a placa faz com que as células musculares se ampliem e formem uma capa dura sobre a área afetada, reduzindo assim a artéria e o fluxo de sangue. Em casos agressivos, isso pode provocar acidente vascular cerebral e ataque cardíaco (GLASS; WITZTUM, 2001).

O estresse pode estimular a parede dos vasos e pode ativar as vias de sinalização intracelular, que conduz à diferenciação celular vascular, migração, proliferação e apoptose (LI; XU, 2007). Isto pode causar hiperplasia neointimal ou aterosclerose (LI et al. 2012). Esse estresse da parede pode promover a produção, por células do músculo liso, de proteoglicanos que podem se ligar e reter partículas de lipoproteínas, facilitando a sua modificação oxidativa e assim promovendo uma resposta inflamatória nos locais de formação de lesão (LEE et al. 2001).

Doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, aterosclerose e diabetes *mellitus* estão associadas à diminuição da bioatividade do óxido nítrico (NO), causada pela redução na produção de NO pelas eNOS e/ou um aumento da inativação de NO após a reação com superóxido (LI; FORSTERMANN, 2009). Outra possível molécula relacionada com aterosclerose é o tipo de NO endotelial sintase (eNOS). eNOS derivados de óxido nítrico (NO) possui várias funções importantes, incluindo a regulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo regional, a supressão da proliferação de células do músculo liso vascular e modulação de interações leucócito-endotélio (DAVIGNON; GANZ, 2004).

O endotélio vascular modula a homeostase da parede dos vasos sanguíneos através da produção de fatores que regulam o tônus vascular, o estado da coagulação, o crescimento celular, a morte celular e o tráfico de leucócitos (VANE et al. 1990).

Numerosos estudos sugerem que a disfunção endotelial desempenha um papel crucial na iniciação e progressão da aterosclerose, a patologia fundamental da DAC (doença arterial coronariana). Um elemento chave na disfunção endotelial é a perda de óxido nítrico derivado do endotélio. O NO tem múltiplos papéis na fisiologia e fisiopatologia cardiovascular, incluindo a regulação do tônus vasomotor, adesão celular ao endotélio, inibição da agregação plaquetária, proliferação de células do músculo liso vascular e limitação da oxidação aterogênica de lipoproteínas de baixa densidade (SCHULZ et al. 2008).

O óxido nítrico (NO) tem se mostrado um agente terapêutico promissor. É sintetizado a partir da L-arginina através do óxido nítrico sintase (NOS), que tem três isoformas: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). eNOS é regulado pelo estrogênio e é alterado por drogas, incluindo o cigarro, e por muitas doenças, incluindo hipercolesterolemia, diabetes

e hipertensão (LI et al. 2002). A biodisponibilidade do óxido nítrico é regulada principalmente pelo óxido nítrico endotelial sintase (eNOS), uma enzima essencial para a manutenção da integridade vascular e homeostase. O stress oxidativo, inflamação, o tabagismo e diabetes debilitam a vasodilatação do endotélio e causa a apoptose de células endoteliais prejudicando a síntese de eNOS (EDIRISINGHE et al. 2008; PARK et al. 2009). A atividade enzimática da eNOS é inibida por vários mecanismos associados à aterosclerose e hiperlipidemia (FERON et al. 1999).

O óxido nítrico (NO) produzido pelo óxido nítrico endotelial sintase (eNOS) é conhecido por alterar o fluxo sanguíneo, alterando processos envolvidos na aterosclerose, sendo considerado um importante ateroprotetor (VANHOUTTE, 2009). É um oxidante potente produzido por células endoteliais e macrófagos que parecem exercer os efeitos protetores e aterogênicos, dependendo da sua fonte de produção. O óxido nítrico produzido pelo NOS endotelial tem função vasodilatadora e é potencialmente ateroprotetor. Em contraste, o óxido nítrico produz muito mais do que a capacidade induz NOS em macrófagos, servindo com funções antimicrobianas com base nas suas potentes propriedades oxidantes, sendo potencialmente pró-aterogênico (FALK, 2006).

O endotélio é um alvo direto e sensível para os efeitos prejudiciais dos fatores de risco aterogênicos, como evidenciado pela introdução experimental de fatores de risco em indivíduos saudáveis (KANANI et al. 1999). A disfunção endotelial corresponde à diminuição da capacidade das células endoteliais de regular o tônus arterial, adesão de leucócitos, a agregação plaquetária e a proliferação de células do músculo liso. Normalmente, este estado, se caracteriza pela redução da biodisponibilidade do NO. Isto pode ser devido ao aumento do estresse oxidativo, aumento de inibidores do eNOS e redução da transcrição do gene eNOS, entre outros fatores (NAPOLI et al. 2006; TZIOMALOS et al. 2010). Algumas destas alterações nas células endoteliais, incluindo a diminuição da atividade de óxido nítrico endotelial sintase (eNOS) e diminuição da produção de óxido nítrico (NO), pode levar a um tônus vascular desregulado e um ambiente pró-aterosclerótico e pró-trombótico (SIMIONESCU, 2007; VEISARI et al. 2009; YILDIZ, 2007). Além disso, NO diminui a expressão de moléculas de adesão de superfície endoteliais, tais como a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) (DE CATERINA et al. 1995).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula lipofílica gasosa de curta duração produzida em quase todos os tecidos e órgãos (ASAKIMORI et al. 2002; MONCADA et al. 1991). É um radical livre formado pela oxidação do terminal de azoto de guanidina da L-arginina. Esta

oxidação é principalmente controlada pelo óxido nítrico sintase endotelial, que é ativada por substâncias como acetilcolina, bradicinina, substância P e adenosina difosfato (CAI; HARRISON, 2000; HARRISON; CAI, 2003).

A atividade do sistema NOS-NO pode ser interrompida através de vários mecanismos, tais como danos vasculares mediados por radicais livres e aumento no stress oxidativo vascular, bem como a ativação de vias inflamatórias (HARRISON; CAI, 2003; LIBBY, 2006; LIBBY et al. 2006). NO também inibe a produção de fator tecidual, uma molécula que desempenha um papel crítico na propensão de placas ateroscleróticas causar trombose intravascular (YANG; LOSCALZO, 2000). Embora tenha sido descoberto como um vasodilatador, o NO medeia muitas das funções protetoras do endotélio (KINLAY et al. 2001). No estabelecimento de fatores de risco e na aterosclerose, a perda da atividade biológica do NO derivado do endotélio é acompanhada por outras alterações no fenótipo endotelial que aumentam ainda mais a propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede vascular (GIMBRONE, 1995). Assim, a disfunção endotelial tem o potencial de contribuir para eventos-chave no curso da aterosclerose humana (GANZ; VITA, 2003). O NO tem múltiplos papéis anti-aterogênicos através da inibição da proliferação das células do músculo liso vascular, agregação plaquetária e adesão dos leucócitos (IGNARRO, 2002).

Vários fatores contribuem para a perda da biodisponibilidade de NO, incluindo a síntese de NO reduzida e a eliminação de NO por espécies reativas de oxigênio (ROS). Sob condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a produção de NO endotelial e ROS. No entanto, as doenças vasculares estão associadas com aumento da geração de ROS, que são uma família de moléculas que inclui o oxigênio molecular e seus derivados produzidos em todas as células aeróbias. A produção excessiva de ROS, superando os mecanismos de defesa dos antioxidantes endógenos, tem sido implicada em processos nos quais eles oxidam macromoléculas biológicas, como DNA, proteína, carboidratos e lipídios. Esta condição tem sido comumente referida como estresse oxidativo (CAI; HARRISON, 2000).

Um declínio na biodisponibilidade de NO pode ser causado por uma expressão diminuída da NO sintase de células endoteliais (eNOS) (WILCOX et al. 1997). O NO tem efeitos anti-ateroscleróticos, pois pode inibir a adesão dos monócitos ao endotélio, a quimiotaxia das células do músculo liso e a proliferação destas células (IGNARRO, 1989).

NO é formado a partir do seu precursor L-arginina por uma família de NO sintases (NOSs). O sistema NOS consiste em três isoformas distintas, codificadas por três genes

distintos, incluindo neuronais (*nNOS* ou *NOS-1*), indutíveis (*iNOS* ou *NOS-2*) e endoteliais (*eNOS* ou *NOS-3*). O gene que codifica a eNOS está localizado no cromossomo 7 (7q35-q36) e contém 26 éxons, com um comprimento total de 21 kb (BREDT; SNYDER, 1994; TSUTSUI et al. 2009).

eNOS é uma enzima do tipo citocromo p450 redutase, que catalisa o transporte de elétrons, mediado por flavina, a partir do doador de elétrons NADPH, para um grupo heme protético. A enzima requer tetra-hidrobiopterina, ligada perto deste grupo heme, para transferir elétrons para um nitrogênio guanidino de L-arginina para formar óxido nítrico. Na ausência de L-arginina ou tetra-hidrobiopterina (BH₄), a eNOS pode produzir O₂ e H₂O₂. Este fenômeno foi referido como desacoplamento da NOS. Houve várias demonstrações deste fenômeno em estudos da enzima purificada (HEINZEL et al. 1992; POU et al. 1992; VASQUEZ-VIVAR et al. 1998).

eNOS contribui para a prevenção da apoptose em células endoteliais por espécies reativas de oxigênio (ROS) (DIMMELER; ZEIHNER, 1999). Além disso, na presença de NO, a proliferação de células do músculo liso é inibida através da proibição da síntese de DNA (NAKAKI et al. 1990; NUNOKAWA; TANAKA, 1992). O aumento do nível de ferro pode levar à produção de radicais livres de hidroxila resultando em oxidação de LDL (ORIMADEGUN et al. 2007) que é especificado como um fator chave na patogênese da aterosclerose e doenças cardiovasculares (SENGOELGE et al. 2005) devido a uma acumulação de lipídeos em macrófagos e células espumosas, que é tóxico para células (RAMAKRISHNAN et al. 2002).

Os polimorfismos genéticos da enzima eNOS demonstraram ter um efeito significativo nos níveis de NO, nos lipídeos plasmáticos e foram associados com diabetes *mellitus* (MONTI et al. 2003), insuficiência cardíaca (MCNAMARA et al. 2003), espasmo coronariano (LÜSCHER; NOLL, 1999), aterosclerose (PARADOSSI et al. 2004), infarto do miocárdio, hipertensão (YOSHIMURA et al. 2003) e reestenose coronariana intra-stent (GOMMA et al. 2002). Devido aos efeitos pleiotrópicos do NO, vários estudos têm investigado a ligação entre os polimorfismos do gene óxido nítrico endotelial sintase (*eNOS*) e o desenvolvimento de eventos coronarianos. Entre os muitos polimorfismos relatados do gene *eNOS*, dois polimorfismos, nomeadamente o polimorfismo Glu298Asp (G:T) localizado no éxon 7 e T-786C no promotor, têm recebido muito interesse relativamente à possível associação entre tais polimorfismos e a doença arterial coronária (DAC) (COLOMBO et al. 2002; HINGORANI et al. 1999).

Um dos polimorfismos mais estudados é um SNP (single nucleotide polymorphism) na região promotora (T786C), frequentemente associado ao desenvolvimento de doença coronariana (MIYAMOTO et al. 2000; NAKAYAMA et al. 2000). Este SNP, que envolve uma substituição do nucleotídeo timina (T) pela citosina (C) no locus 786 do gene eNOS, é referido como o SNP eNOS T-786C e está associado com uma susceptibilidade aumentada ao vasoespasma coronário em homozigotos (C/C) e heterozigotos (T/C), isto é, indivíduos que expressam o alelo mutante (alelo C) (LUSCHER; NOLL, 1999; NAKAYAMA et al. 1999). Relatórios anteriores mostraram que a incorporação do alelo C na posição -786 cria um local de ligação para a proteína de replicação A1 (RPA1) (MIYAMOTO et al. 2000) e reduz a atividade do promotor (NAKAYAMA et al. 1999).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar o polimorfismo *T786C* do gene *eNOS* em um grupo de indivíduos com diagnóstico de aterosclerose e em um grupo controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o polimorfismo *T786C* do gene *eNOS* nos grupos caso e controle.
- Verificar a distribuição do polimorfismo *T786C* do *eNOS* em relação aos grupos caso e controle, além dos fatores como: gênero, tabagismo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC GOIÁS (Número: 35321614.3.0000.0037). Todos os pacientes foram entrevistados (anexo I) com dados relativos a nome, hábito de fumar, hábito de ingerir bebida alcoólica, etnia, medicamentos em uso, exames realizados e intervenção cirúrgica, bem como assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (anexo II e III).

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 197 pacientes com diagnóstico prévio de doença aterosclerótica, baseado em exame clínico, e confirmado através de método de imagem, e 100 amostras para o grupo controle baseadas nas manifestações clínicas e método de imagem não invasivo. As amostras foram de pacientes do serviço de cardiologia e cirurgia vascular periférica, da Clínica Angiogyn no município de Goiânia, no período de outubro de 2014 a fevereiro de 2015. As amostras de sangue periférico foram coletadas e submetidas a testes moleculares a fim de detectar o polimorfismo do gene *eNOS* (*T786C*).

Os critérios de inclusão para o grupo caso foram pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares intervencionistas, que aceitaram responder à entrevista e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os exames de imagem usados como métodos de diagnóstico baseados na clínica foram: Eco color Doppler, angiotomografia e/ou angiografia digital, angiotomografia e/ou cine-angiocoronariografia.

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

Em relação ao hábito de fumar, tanto o grupo caso e quanto o controle foram dispostos em três grupos: fumantes atuais, nunca fumaram, e ex- fumantes. Entende-se como fumante (tabagista) toda pessoa que faz uso regular de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado, independentemente do tempo em que fuma e ex-fumante (ex-tabagista), o indivíduo que, no

passado, fez uso de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado e, no momento, não fuma. Sendo que o indivíduo que compõem o grupo dos ex-fumantes foram aqueles que cessaram de fumar no período maior ou igual 15 anos, baseado no Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira de 2013.

A extração de DNA foi realizada de acordo com as instruções do kit Kaswi® (Genomic DNA Purification Kit). Após a extração as amostras foram submetidas à quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus de acordo com as instruções do fabricante, tendo relevância apenas as amostras cujos resultados da quantificação em relação a concentração de DNA forem superior a 5ng/μl. O DNA foi mantido à temperatura de -20°C até a amplificação pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Após a extração do DNA as amostras foram submetidas à amplificação por PCR (do inglês, Polymerase Chain Reaction – PCR) para detectar o polimorfismo do gene *eNOS* (*T786C*), sendo o volume final de 25μL, de acordo com o protocolo proposto por Frare (2011). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Esses fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x, em um campo elétrico de 10 V/cm. Os géis foram corados com brometo de etídio (5μg/mL) e o registro visual foi feito no Fotodocumentador BIORAD.

Para a genotipagem do gene *eNOS* (*T786C*), foi utilizada uma ARMS-PCR que é referida como oligonucleótido alelo-específico de PCR e é uma técnica que foi originalmente designada por Newton et al. (1989) para a detecção de polimorfismos de sequência conhecidas. Nesta técnica, dois pares de primers em um único tubo de PCR, pode simultaneamente amplificar ambos os alelos mutantes e normais bem como permitir a amplificação de um controle interno de DNA. Esta técnica foi aplicada no estudo de diferentes mutações (WANGA et al. 2014; VANNUCCHI et al. 2006; OLD et al. 1990).

Na figura 1 temos as sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação da região.

O protocolo utilizado para amplificação do polimorfismo do gene *eNOS* (*T786C*) foi especificado na tabela 1 e o protocolo de termociclagem na tabela 2.

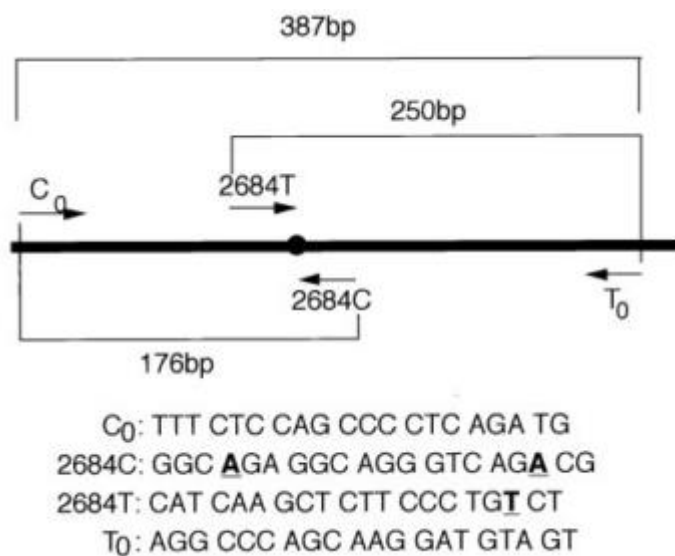


Figura 1: Sequência nucleotídica dos primers *eNOS* (T786C) (FATEMEH et al., 2012).

Tabela 1: Protocolo para a amplificação do polimorfismo do gene *eNOS* (T786C) para PCR.

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL. PARA1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,5µl
dNTPs	1,25 mM de cada	0,75µlde cada = 3,0 µl
Taqpolimerase (5 U/µl)	2,5 U/µl	0,3 µl
Primer Co	20 pM	0,7µl
Primer To	20 pM	0,7µl
Primer 2684T	20pM	1,0 µl
Primer 2684C	20pM	1,0 µl
H ₂ O MiliQ	---	12,3µl
DNA amostra	200 ng/µl	2,0 µl
Volume final		25,0 µl

Tabela 2: Protocolo de termociclagem para amplificação dos primers *eNOS* (T786C).

	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	40 seg	
Anelamento	54°C	40 seg	36
Polimerização	72°C	45 seg	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

Os resultados do polimorfismo do gene *eNOS* (*T786C*) foram organizados em planilhas do Excel, constituindo um banco de dados. Foi utilizada a análise estatística de Teste G e qui-quadrado (χ^2) para analisar a relação entre o polimorfismo e a doença aterosclerótica. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Estes testes estatísticos foram feitos com o auxílio do programa BioEstat® 5.3 (Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq).

5. RESULTADOS

O grupo caso foi constituído por 197 indivíduos sendo que a média de idade dos pacientes foi de 61,3 anos e o grupo controle composto por 100 indivíduos apresentando uma média de 50,2 anos.

As frequências genótípicas encontradas no polimorfismo *eNOS* (*T786C*) no grupo caso foram de 10,15% (20/197) para o genótipo homozigoto TT, 59,39% (117/197) para o genótipo heterozigoto TC e 30,46% (60/197) para CC. No grupo controle as frequências genótípicas foram de 5,00% (5/100) TT, 64,00% (64/100) TC e 31,00% (31/100) CC. Verificou-se que houve uma maior prevalência do alelo TC tanto no grupo caso quanto no grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos caso e controle em relação à distribuição genotípica ($p=0,3120$) (Tabela 3).

Tabela 3: Frequências genótípicas do polimorfismo do gene *eNOS* nos grupos de caso e controle.

	TT		TC		CC		Total		p*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Caso	20	10,15	117	59,39	60	30,46	197	100,00	0,3120
Controle	5	5,00	64	64,00	31	31,00	100	100,00	

*Teste Qui-quadrado

Analisados os genótipos TC e TT simultaneamente, no grupo caso foi encontrada uma frequência de 30,46% (60/197) para o genótipo CC e 69,54% (137/197) para o TC/TT. No grupo controle foi de 31,00% (31/100) CC e de 69,00% (69/100) TC/TT. Não apresentou diferença significativa ($p=0,9236$) (Tabela 4).

Tabela 4: Frequências dos genótipos CC e TC/TT do polimorfismo do gene *eNOS*.

	CC		TC/TT		TOTAL		p*
	n	%	n	%	n	%	
Caso	60	30,46	137	69,54	197	100,00	0,9236
Controle	31	31,00	69	69,00	100	100,00	

*Teste Qui-quadrado

Nos pacientes do sexo masculino, do grupo caso, foi constatado a presença de 7,86% (7/89) com o genótipo TT, 58,43% (52/89) com o genótipo TC e 33,71% (30/89) com o CC.

Já nos pacientes controles, verificou-se que 3,78% (2/53) apresentaram o genótipo TT, 67,92% (36/53) o genótipo TC e 28,30% (15/53) o CC. A diferença entre os genótipos do gene *eNOS* (*T786C*) de ambos os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,4196$) (Tabela 5).

Quando analisado o grupo caso das pacientes do sexo feminino a frequência dos genótipos TT, TC e CC foram de 12,04% (13/108), 60,18% (65/108) e 27,78% (30/108), respectivamente. Entre as pacientes do grupo controle foi observado que 6,38% (3/47) possuíam o genótipo TT, 59,58% (28/47) possuía o genótipo TC e 34,04% (16/47) o genótipo CC. Não sendo estatisticamente significativa essa diferença ($p=0,4642$) (Tabela 5).

Quanto à distribuição do polimorfismo do gene em relação ao sexo dos pacientes dos grupos caso e controle, inferiu-se que no grupo controle de ambos os gêneros a presença do genótipo homozigoto selvagem (TT) foi menor, sendo 3,78% nos homens e 6,38% nas mulheres.

Tabela 5: Distribuição do polimorfismo do gene *eNOS* (*T786C*) em relação ao sexo nos grupos caso e controle.

SEXO	TT		TC		CC		TOTAL	p*
	n	%	n	%	n	%		
MASCULINO								
Caso	7	7,86	52	58,43	30	33,71	89	0,4196
Controle	2	3,78	36	67,92	15	28,30	53	
FEMININO								
Caso	13	12,04	65	60,18	30	27,78	108	0,4642
Controle	3	6,38	28	59,58	16	34,04	47	

*Teste G

Quanto ao tabagismo, 94 pacientes (32,30%) declararam ser fumantes, 145 pacientes (49,83%) declararam que nunca fumaram e 52 (17,87%) declararam ser ex-fumantes, totalizando 291 pacientes. A diferença entre esses e o total se deu visto que 1 paciente do grupo caso (CC) não mencionou se fuma ou se não fuma; 2 pacientes do grupo caso com genótipo TC e 1 com genótipo CC declararam ser ex-fumantes mas não disseram a quanto tempo pararam de fumar e 2 pacientes do grupo controle (TC e CC) declararam ser ex-fumantes mas não disseram a quanto tempo pararam de fumar.

Ao analisarmos o polimorfismo do gene *eNOS* (*T786C*), do grupo caso, nos indivíduos que se declararam fumantes foi encontrado 11,59% (8/69) com o genótipo TT, 59,42%

(41/69) com o genótipo TC e 28,99% (20/69) com o CC. Dos 83 pacientes ateroscleróticos que relataram nunca ter fumado 12,05% (10/83) tinham o genótipo TT, 62,65% (52/83) tinham o genótipo TC e 25,30% (21/83) o CC. Nos pacientes considerados ex-fumantes, ou seja, aqueles que cessaram o hábito de fumar no período igual ou superior a 15 anos, observou-se que a frequência do genótipo TT foi de 4,88% (2/41), do genótipo TC foi de 53,66% (22/41) e do CC foi de 41,46% (17/41). Não sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,3487$) (Tabela 6).

Quanto ao grupo controle, aqueles que possuíam o hábito de fumar apresentaram o genótipo TC em 64,00% (16/25) e o genótipo CC em 36,00% (9/25). Nenhum indivíduo com o genótipo TT declarou ser fumante. Dos pacientes que nunca fumaram, 8,06% (5/62) apresentaram o genótipo TT, 64,52% (40/62) apresentaram o genótipo TC e 27,42% (17/62) o genótipo CC. Nos pacientes considerados ex-fumantes verificou-se que a frequência do genótipo TC foi de 63,64% (7/11) e do genótipo CC foi de 36,36% (4/11). Nenhum indivíduo com o genótipo TT foi considerado ex-fumante. Não havendo diferença estatística significativa ($p=0,2742$) (Tabela 6).

Tabela 6: Associação do tabagismo com polimorfismo do gene *eNOS (T786C)* nos grupos caso e controle (\geq de 15 anos).

GRUPOS	TT		TC		CC		TOTAL	p*
	n	%	n	%	n	%		
CASO								
Fuma	8	11,59	41	59,42	20	28,99	69	0,3487
Nunca Fumou	10	12,05	52	62,65	21	25,30	83	
Ex-Fumantes	2	4,88	22	53,66	17	41,46	41	
CONTROLE								
Fuma	0	0,00	16	64,00	9	36,00	25	0,2742
Nunca Fumou	5	8,06	40	64,52	17	27,42	62	
Ex-Fumantes	0	0,00	7	63,64	4	36,36	11	

*Teste G

6. DISCUSSÃO

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

Atualmente, são conhecidos mais de 300 marcadores de risco para a doença aterosclerótica, o que obscurece a capacidade de compreender integralmente os mecanismos de sua fisiopatogenia (GOKCE; FREI, 1996).

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

No presente estudo, verificou-se uma prevalência de 2,3 vezes maior dos genótipos TC/TT em relação ao genótipo selvagem (CC), tanto no caso quanto no controle, resultado semelhante ao de Piccoli et al (2012), onde analisou uma população sul-brasileira e encontrou uma maior presença do genótipo TC nos pacientes com SCA (síndrome coronariana aguda) e controles. Quando foi analisado os genótipos CC e TC+TT este resultado também foi ao encontro deste. O estudo de Ragia et al. (2010) encontrou em seus que o genótipo TC (55,2% - caso e 54,8% - controle) teve uma maior prevalência em relação aos outros genótipos e também não encontrou uma diferença estatisticamente significativa quando estudou pacientes que fizeram a cirurgia de revascularização do miocárdio.

Em outra pesquisa, realizada por Chen et al. (2014), foi analisado pacientes com pré-eclâmpsia e controles; foi encontrado uma maior prevalência do genótipo TC tanto no caso, quanto no controle (45% e 42,8%). Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição do genótipo ou nas frequências alélicas entre os pacientes e os controles, corroborando com o presente resultado. Assim como um estudo realizado em uma população caucasiana afetada pela aterosclerose carotídea. Não demonstrou associação entre polimorfismos T-786C e ateroma carotídeo, pois houve uma maior frequência do genótipo TC (FATINI et al. 2004).

Em um estudo realizado no Departamento Pediátrico No. 4 da *Bogomoletz National Medical University*, Ucrânia, observou que em adolescentes com hipertensão, foi encontrado

uma maior prevalência do genótipo TC o que vai ao encontro do presente estudo (DOSENKO et al. 2006a). Nakayama et al. (1999) foram os primeiros a relatar sobre a perda de atividade do promotor após uma substituição T → C na posição -786. Tal como o estudo Khurana et al. (2003) que realizou um estudo prospectivo de caso-controle, os pacientes (casos) foram diagnosticados com HAS (hipertensão arterial sistêmica) aneurismática com base em achados clínicos e radiológicos (incluindo angiografia cerebral em cada caso) e os controles selecionados aleatoriamente. Não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos do gene eNOS T-786C entre os casos e os controles. Houve uma maior prevalência do genótipo TC.

Em um estudo em que foi analisado pacientes com estenose ACI (artéria carótida interna) moderada a grave e controles saudáveis a distribuição do genótipo foi significativamente diferente entre os casos e os controles. A frequência do genótipo homocigoto CC foi duas vezes mais elevada nos doentes em comparação com os controles (26% *versus* 13%). Os achados sugerem que a homocigose para C no polimorfismo T786C da NOS3 está associada com estenose ACI. A análise da homocigose mutante CC e outros fatores de risco principais para aterosclerose mostrou que o genótipo CC mutante do gene NOS3 parece ser um preditor fiável da estenose ACI. O estudo realizado por Ghilardi et al. (2002), encontrou resultados semelhantes a presente pesquisa, onde controles e pacientes foram todos italianos, e a distribuição genotípica nos controles foi de 54 TT (41%), 61 CT (46%) e 18 CC (13%).

Entretanto o estudo realizado pelo Grupo Florence Nightingale Hospital (Istambul, Turquia) sobre o polimorfismo T-786C do gene eNOS, constatou que a frequência do genótipo CC era a mais prevalente no grupo SCA (síndrome coronariana aguda) em comparação com os grupos DAC e controle. E o TT foi o genótipo mais frequentemente observado em ambos os pacientes com DAC (ÇIFTÇI et al. 2008). Diferentemente do nosso estudo. Da mesma forma, Dosenko e colaboradores (2005), ao estudarem pacientes com SCA na população ucraniana, encontraram variantes patológicas C/C da região 5'-flanqueadora do gene eNOS 2,7 vezes mais frequentemente em pacientes com SCA do que no controle. Eles sugeriram que esse polimorfismo alélico pode ser considerado como um dos fatores de risco genético do desenvolvimento da SCA. Do mesmo modo, Gluba et al. (2009) descobriram que na população jovem polaca, o polimorfismo T786C não aumenta o risco de infarto do miocárdio. Esses resultados não estão de acordo com o estudo de Rossi et al. (2003), de acordo com o qual o alelo C está associado à DAC no paciente caucasiano ou com risco

significativo de estreitamento da artéria coronária multiarterial, especialmente quando ocorrem fatores de risco adicionais.

No estudo de Jaramillo e colaboradores (2010), o polimorfismo T786C foi analisado em pacientes chilenos com diagnóstico de DAC e grupo controle. A frequência de genótipo CC para o polimorfismo T786C foi de 6% nos pacientes com DAC e de 4% no grupo controle. Neste estudo apresentou uma maior frequência do genótipo TT e a distribuição do genótipo não foi significativamente diferente entre os indivíduos com DAC e controle. Possuindo esse estudo resultado contrários a presente pesquisa. Igualmente, no estudo de Scribner et al. (2003), encontraram uma diferença significativa na frequência da mutação T-786C do gene eNOS entre os pacientes não diabéticos e os grupos controle. O genótipo que apresentou maior prevalência foi o TC em pacientes não diabéticos e o TT no grupo caso. Recentemente, vários estudos revelaram que existem várias mutações no gene eNOS e estas mutações podem ser um fator de risco para DAC (MAYER; HEMMENS, 1997). Rossi et al. (2003) relataram que encontraram uma associação significativa entre a mutação T-786C e a DAC. De acordo com Nakayama et al. (1999), o alelo 786C estaria associado a uma atividade do promotor do gene eNOS significativamente reduzida. A redução da produção endotelial de NO nas artérias coronárias predispõe os portadores do alelo C ao espasmo coronariano. O espasmo coronariano pode ser mais grave e prolongado em homozigotos CC, aumentando o risco de DAC (JARAMILLO et al. 2008).

Ao analisar o polimorfismo do gene *eNOS* em relação ao gênero, foi observado uma maior prevalência do genótipo TC em ambos os sexos. No estudo de Agema et al. (2004) foram analisados pacientes do sexo masculino com DAC diagnosticada e pacientes do sexo masculino controle. Observou-se uma maior prevalência do genótipo TC, tanto no grupo caso quanto no grupo controle, sendo este resultado não estatisticamente significativo e corroborando com a presente pesquisa. Já o estudo realizado por Alp e colaboradores (2009), na Turquia, relatou uma maior prevalência do genótipo TT em paciente do sexo masculino com DAC (50,6%) contradizendo o presente estudo.

No estudo de Dosenko et al. (2006b), realizado em Kiev, Ucrânia, foi encontrado uma maior prevalência do genótipo TT em pacientes com SCA e controle. No gênero masculino este mesmo genótipo foi o que apresentou maior frequência, diferentemente do gênero feminino o qual apresentou no grupo caso uma maior frequência do genótipo TT e no grupo controle o TC. O promotor transversal (T-786 → C), de acordo com dados de pesquisadores

japoneses (174 pacientes com espasmo coronariano e 164 controles), é mais frequente em pacientes com DCI (doença cardíaca isquêmica) (NAKAYAMA et al. 2000).

Fumar é conhecido por induzir o estresse oxidativo, que é um potente supressor da atividade eNOS (HYNDMAN et al. 2002). Analisando o polimorfismo do gene *eNOS* em relação ao hábito de fumar, observou-se uma maior prevalência do genótipo TC, sendo os resultados não estatisticamente significativos. Bem como Nasreen et al. (2002) avaliou, as frequências genotípicas também não diferiram significativamente entre si. Sabe-se que o tabagismo induz o estresse oxidativo, que é um potente supressor da atividade da eNOS (OTA et al. 1997; WANG et al. 2000). Alternativamente, tal estresse oxidativo pode promover a degradação do NO (KITIYAKARA; WILCOX, 1998; ROBERTS et al. 2000). Nakayama et al. (1999) mostraram que o risco de espasmo coronariano nos pacientes com alelo C-786 foi maior nos fumantes do que nos não-fumantes.

No estudo de Agema et al. (2004), foi analisado pacientes com histórico de infarto do miocárdio e a relação com o fumo. Tanto nos pacientes que se declaram fumantes e aqueles não fumantes houve uma maior prevalência do genótipo TT, sendo o resultado contrário ao presente estudo. Alp et al. (2009) também encontraram uma maior prevalência do genótipo TT (54,8%) em pacientes que relataram fumar; aqueles que relataram não fumar apresentou o genótipo TC+CC com maior prevalência. Rios et al. (2007) relataram que o fumo interagiu com a variante do promotor eNOS 786C aumentando o risco de DAC em grupos étnicos caucasianos e afro-brasileiros. Em outro estudo, foi encontrada associação significativa entre polimorfismo T786C e DAC grave na população brasileira (RIOS et al. 2005). Nakayama e colaboradores (1999) e outros mostraram que o fumo prejudica a dilatação arterial coronária dependente do endotélio em humanos (KUGIYAMA et al. 1996; MOTOYAMA et al. 1997; ZEIHHER et al. 1995) e que o tabagismo é um importante fator de risco para o espasmo coronariano (KUGIYAMA et al. 1996; SUGIISHI; TAKATSU, 1993). Assim, fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na patogênese do espasmo coronariano. Kugiyama e colaboradores (1996) e Sugiishi; Takatsu (1993), realizaram o estudo de associação tanto nos grupos fumantes como não-fumantes. Na análise preliminar revelou que a mutação T-786C está significativamente associada com espasmo coronariano em cada grupo. Estas mutações estão fortemente associadas ao espasmo coronário. Além disso, demonstraram que a mutação T-786C reduz substancialmente a atividade do promotor do gene eNOS. Tomados em conjunto, estes achados sugerem fortemente que a mutação T-786C no gene eNOS

compromete a síntese de NO endotelial e predispõe os pacientes com o alelo mutante ao espasmo coronário.

No estudo de Rios et al. (2007), foi analisado as frequências de polimorfismo eNOS em casos de DAC e controles de acordo com o status de tabagismo em caucasianos e afro-brasileiros. Independente da origem étnica, quando o tabagismo foi referido, a frequência de alelos 786C foi aumentada nos casos (36% nos caucasianos e 30,8% nos afro-brasileiros) quando comparada com a dos controles (23%, $p = 0,011$ em Caucasião-brasileiro e 15%, $p=0,003$ em afro-brasileiros). No entanto, quando o tabagismo foi negativo, a frequência 786C não diferiu entre os casos e controles em ambos os grupos étnicos. Este estudo sobre DAC avaliado em caucasianos e afro-brasileiros sugeriu que o tabagismo interagiu com a variante do promotor eNOS 786C aumentando o risco de DAC em ambos os grupos étnicos. Apresentou uma maior prevalência do genótipo TC em pacientes que se declaram fumantes, caucasianos no grupo caso; no grupo controle foi o genótipo TT. Já nos declarados afro-brasileiros o genótipo com maior frequência foi o TT. Aqueles pacientes que se declaram não fumantes e caucasianos apresentaram o genótipo TC como mais frequente no grupo caso e no grupo controle observamos uma igualdade entre TT e TC. Nos afro-brasileiros houve uma maior frequência do TT. O alelo -786C foi associado com DAC tanto em caucasianos quanto em afro-brasileiros de forma dependente ao fumo. Alvarez et al. (2001) relataram achados semelhantes em caucasianos fumantes de Espanha, e a associação em caucasianos brasileiros também corroborou com um relatório anterior, em brasileiros de ascendência europeia e outras populações (MIYAMOTO et al. 1999; RIOS et al. 2005). Nos africanos e seus descendentes, houve poucos estudos sobre variantes de eNOS e seu efeito sobre a DAC (HOOPER et al. 1999) e ainda não havia nenhuma análise sobre a interação do alelo-786C com o tabagismo. A fumaça de cigarro é uma fonte rica de óxido nítrico exógeno que pode afetar o óxido nítrico endógeno diminuindo sua produção (SARKAR et al. 1999). Estes achados sugerem um mecanismo funcional para a interação observada entre o polimorfismo do promotor T-786C e o tabagismo no efeito sobre o risco de DAC (WANG et al. 2002).

Assim, parece que, numa condição que implica um estresse oxidativo aumentado, tal como hipertensão arterial, a predisposição genética para gerar menos NO pode tornar-se aparente e, em longo prazo, pode ser prejudicial e resultar em susceptibilidade à aterogênese. Rossi e colaboradores (2003) descobriram que a concomitância de pelo menos um importante fator de risco cardiovascular aumentou ainda mais o risco adicional associado ao alelo C, e que a concorrência de múltiplos fatores de risco aumentou acentuadamente os efeitos nefastos

do alelo C. Assim, na maioria das condições que implicam estresse oxidativo, como envelhecimento, tabagismo, hipercolesterolemia, sexo masculino (falta de estrogênio) e sobrepeso ou obesidade, a predisposição genética para gerar menos NO associado ao alelo C poderia contribuir para diminuir a biodisponibilidade do NO e, assim, ocorrer o desencadeamento da aterogênese coronária (ROSSI et al. 2003).

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os grupos (caso e controle) em relação ao polimorfismo T-786C do gene *eNOS*.

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa quando analisados os genótipos (TT, TC e CC) associados a variável gênero sexual e tabagismo.

Os resultados não foram significativos porque foi utilizado um padrão tradicional, onde normalmente existe o dobro de casos para o número de controles, e também devido à aterosclerose ser uma doença muito comum.

Vários trabalhos indicaram que quando o n trabalhado é o dobro de controle em relação ao número de casos, isso levaria a uma melhor estatística epidemiológica.

Podemos concluir também que há forte tendência do alelo T, em dose única ou dose dupla, em associação com aterosclerose.

Estamos realizando mais coletas para o próximo estudo com o fim de verificar se isso realmente é um viés.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGEMA W. R. P.; MAAT M. P. M.; ZWINDERMAN A. H.; et al. 2004. **An integrated evaluation of endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphisms and coronary artery disease in men.** *Clinical Science*, v. 107, p. 255–261.
2. ALP E.; MENEVSE S.; TULMAC M.; et al. 2009. **Lack of Association Between Matrix Metalloproteinase-9 and Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease in Turkish Population.** *Dna and Cell Biology*, v. 28, n. 7.
3. ALVAREZ R.; GONZALEZ P.; BATALLA A.; et al. 2001. **Association between the NOS3 (-786T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease.** *Nitric Oxide*, v. 5 n. 4, p. 343–8.
4. ASAKIMORI Y.; et al. 2002. **T(-786)→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene influences the progression of renal disease.** *Nephron*, v. 91 n. 4, p. 747–751.
5. BALAGOPAL P. B.; DE FERRANTI S.D.; COOK S.; et al. 2011. **Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association.** *Circulation*, v. 123, p. 2749-2769.
6. BALLANTYNE C. M. 1998. **Low-density lipoproteins and risk for coronary artery disease.** *Am J Cardiol*, v. 82, p. 3Q–12Q.
7. Barker D. J. 2000. **In utero programming of cardiovascular disease.** *Theorigenology*, v. 53 n. 2, p. 555-74.
8. BARKER D. J.; HANSON M. A. 2004. **Altered regional blood flow in the fetus: the origins of cardiovascular disease?** *Acta Paediatr*, v. 93n. 12, p. 1559-60.
9. BOBRY SHEV Y. V. 2006. **Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis.** *Micron*, v. 37, p. 208–22.
10. BONETTI P. O.; LERMAN L. O.; LERMAN A. 2003. **Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk.** *ArteriosclerThrombVascBiol*, v. 23, p. 168-175.
11. BRASIL (2004). Fundação Nacional de Saúde. 100 anos de Saúde Pública: a visão da Funasa / Fundação Nacional de Saúde - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2004.
12. BRASIL (2017). Departamento de Informática do SUS (DATASUS) [Internet] Brasília: Ministério da Saúde (BR). Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Sistema de informação sobre mortalidade (SIM). [acesso 10 jan 2017]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
13. BREDT D. S.; SNYDER S. H. 1994. **Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.** *Annu Rev Biochem*, v. 63, p. 175–195.
14. BRICHKINA A.; DMITRY V. 2012. **Bulavin WIP-ing out atherosclerosis with autophagy.** *Autophagy*, v. 8, n. 10, p. 1545–1547.
15. BURKE, G. L.; BELL, R. A. 2000. **Trends in cardiovascular disease: incidence and risk factors.** *Preventive Cardiology*, p. 21-46.
16. CAI H.; HARRISON D. G. 2000. **Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.** *Circ Res.*, v. 87, p. 840–844.
17. CAPLICE N. M.; BUNCH T. J.; STALBOERGER P. G.; et al. 2003. **Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation.** *ProcNatlAcadSci USA*, v. 100, p. 4754-9.

18. CHARAKIDA M.; MASI S.; LUSCHER T. F.; et al. 2010. **Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation.** *Eur Heart J*, v. 31, p. 2854–2861.
19. CHEN Y.; WANG D.; ZHOU M.; et al. 2014. **Polymorphisms of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Preeclampsia in a Han Chinese Population.** *Gynecol Obstet Invest*, v. 77, p. 150–155.
20. ÇİFTÇİ Ç.; MELİL S.; ÇEBİ Y.; et al. 2008. **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*, v. 7, p. 5.
21. CLEMPUS R. E.; GRIENDLING K. K. 2006. **Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells.** *Cardiovasc Res*, v. 71, n. 2, p. 216–225.
22. COLIN S.; CHINETTI-GBAGUIDI G.; STAELS B. 2014. **Macrophage phenotypes in atherosclerosis.** *Immunol Rev*, v. 262, p. 153–66.
23. COLOMBO M. G.; ANDREASSI M. G.; PARADOSSI U.; et al. 2002. **Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease.** *Heart*, v. 87, p. 525-528.
24. CUSHING S. D.; BERLINER J. A.; VALENTE A. J.; et al. 1990. **Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.** *Proc Natl Acad Sci, USA*, v. 87, n. 13, p. 5134-5138.
25. DAVIES M. J.; WOOLF N.; ROWLES P. M.; et al. 1988. **Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries.** *Br Heart J*, v. 60, p. 459–64.
26. DAVIGNON J.; GANZ P. 2004. **Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis.** *Circulation*, v. 109, p. III-27–III-32.
27. DE CATERINA R.; LIBBY P.; PENG H-B.; et al. 1995. **Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines.** *J. Clin. Invest.*, v. 96, p. 60.
28. DELOUKAS P.; KANONI S.; WILLENBORG C.; et al. 2013. **Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease.** *Nat. Genet.*, v. 45, p. 25–33.
29. DIMMELER S.; ZEIHNER A. M. 1999. **Nitric oxide-an endothelial cell survival factor.** *Cell Death and Differentiation*, vol. 6, n. 10, p. 964–968.
30. DOSENKO V. E.; ZAGORIY V. Y.; HAYTOVICH N. V.; et al. 2006a. **Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations.** *Acta Biochim Pol.*, v. 53, n. 2, p. 299–302.
31. DOSENKO V. E.; ZAGORIY V. Y.; LUTAY Y. M.; et al. 2006b. **Allelic polymorphism in the promoter (T-786→C), but not in exon 7 (G894→T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population.** *Exp Clin Cardiol*, v. 11, n. 1.
32. DOSENKO VIE; ZAHORIŇ VIU; LUTAŇ IAM; et al. 2005. **Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase (T(-786)->C) promoter gene as risk factor of acute coronary syndrome.** *Fiziol Zh.*, v. 51, n. 1, p. 72-6.
33. DURÁN W. N.; BRESLIN J. W.; SÁNCHEZ F. A. 2010. **The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability.** *Cardiovascular Research*, v. 87, p. 254–261.
34. EDIRISINGHE I.; YANG S. R.; YAO H.; et al. 2008. **VEG- FR-2 inhibition augments cigarette smoke- induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction.** *FASEB J*, v. 22, p. 2297–310.

35. EREN E.; YILMAZ N.; AYDIN O. 2012. **High density lipoprotein and it's dysfunction.** *The Open Biochemistry Journal*, vol.6, p. 78–93.
36. FALK E. 2006. **Pathogenesis of Atherosclerosis.** *Journal of the American College of Cardiology*, v. 47, n. 8, Suppl C, p. C7–12.
37. FATEMEH K.; ALI REZA Y.; MORTEZAGHOJAZADEH; et al. 2012. **Association between T-786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and level of the vessel dilation factor in patients with coronary artery disease.** *Molecular Biology Research Communications*, v.1, p. 1-7.
38. FATINI C.; SOFI F.; GENSINI F.; et al. 2004. **Influence of eNOS Gene Polymorphisms on Carotid Atherosclerosis.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* v. 27, p. 540–544.
39. FELETOU M.; VANHOUTTE P. M. 2006. **Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture).** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 291, p. H985–H1002.
40. FERON O.; DESSY C.; MONIOTTE S.; et al. 1999. **Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase.** *J Clin Invest*, v. 103, p. 897–905.
41. FORD E. S. 2003. **C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000.** *Circulation*, v. 108, p. 1053-8.
42. FORSTERMANN U.; MUNZEL T. 2006. **Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace.** *Circulation*, v. 113, p. 1708–1714.
43. FRARE, Ariane Bocalleto. *Investigação dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em mulheres com endometriose* (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-Goiás, Goiânia-Brasil, 2011.
44. FUSTER V.; BADIMON L.; BADIMON J. J.; et al. 1992. **The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes.** *N Engl J Med.*, v. 326, n. 5, p. 310-318.
45. GALLEY H.F.; WEBSTER N.R. 2004. **Physiology of the endothelium.** *Br J Anaesth*, v. 93, p. 105-13.
46. GANZ P.; VITA J. A. 2003. **Testing Endothelial Vasomotor Function: Nitric Oxide, a Multipotent Molecule.** *Circulation*, v. 108, p. 2049-2053.
47. GHILARDI G.; BIONDI M. L.; DEMONTI M.; et al. 2002. **Independent Risk Factor for Moderate to Severe Internal Carotid Artery Stenosis: T786C Mutation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene.** *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 7, p. 989–993.
48. GIANNOTTI G.; LANDMESSER U. 2007. **Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis.** *Herz*, v. 32, n. 7, p. 568–572.
49. GIMBRONE M. A. JR. 1995. **Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis.** *Am J Cardiol.*, v. 75, p. 67B–70B.
50. GIMBRONE M. A. JR. 1999. **Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis.** *Am J Pathol*, v. 155, n. 1, p. 1-5.
51. GIMBRONE M. A. JR.; GARCÍA-CARDEÑA G. 2013. **Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis.** *Cardiovasc Pathol.*, v. 22, p. 9–15.
52. GLASS C. K.; WITZTUM J. L. 2001. **Atherosclerosis. The road ahead.** *Cell*, v. 104, p. 503–16.
53. GLUBA A.; BANACH M.; RYSZ J.; et al. 2009. **Is Polymorphism Within eNOS Gene Associated With the Late Onset of Myocardial Infarction? A Pilot Study.** *Angiology*, v. 60, n. 5, p. 588-595.
54. GOKCE N.; FREI B. 1996. **Basic research in antioxidant inhibition of steps in atherogenesis.** *J Cardiovasc Risk*, v. 3, p. 352–357.

55. GOMMA A. H.; ELRAYESS M. A.; KNIGHT C. J.; et al. 2002. **The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis.** *Eur Heart J*, v. 23, p. 1955-1962.
56. GORENNE I.; KAVURMA M.; SCOTT S.; et al. 2006. **Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis.** *Cardiovasc Res.*, v. 72, p. 9–17.
57. HARRISON D. G.; CAI H. 2003. **Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production.** *Cardiol Clin.*, v. 21, n. 3, p. 289-302.
58. HEINZEL B.; JOHN M.; KLATT P.; et al. 1992. **Ca²⁺ /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase.** *Biochem J.*, v. 281, p. 627–630.
59. HINGORANI A. D.; LIANG C. F.; FATIBENE J.; et al. 1999. **A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK.** *Circulation*, v. 100, p. 1515-1520.
60. HOOPER W. C.; LALLY C.; AUSTIN H.; et al. 1999. **The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans.** *Chest*, v. 116, n. 4, p. 880–6.
61. HYNDMAN M. E.; PARSONS H. G.; VERMA S.; et al. 2002. **The T-786 C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension.** *Hypertension*, v. 39, p. 919-922.
62. IGNARRO L. J. 1989. **Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein.** *Circ Res*, v. 65, p. 1–21.
63. IGNARRO L. J. 2002. **Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview.** *J Physiol Pharmacol.*, v. 53, p. 503–514.
64. JARAMILLO P. C.; LANAS C.; LANAS F. 2008. **T-786C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Chilean subjects with coronary artery disease and controls.** *Clin. Chim. Acta.*, v. 387, p. 105-108.
65. JARAMILLO P. C.; LANAS C.; LANAS F.; et al. 2010. **Polymorphisms of the NOS3 gene in Southern Chilean subjects with coronary artery disease and controls.** *Clinica Chimica Acta*, v. 411, p. 258–262.
66. KANANI P. M.; SINKEY C. A.; BROWNING R. L.; et al. 1999. **Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans.** *Circulation*, v. 100, p. 1161–1168.
67. KHURANA V. G.; SOHNI Y. R.; MANGRUM W. I.; et al. 2003. **Endothelial Nitric Oxide Synthase T-786C Single Nucleotide Polymorphism: A Putative Genetic Marker Differentiating Small Versus Large Ruptured Intracranial Aneurysms.** *Stroke*, v. 34, p. 2555-2559.
68. KINLAY S.; LIBBY P.; GANZ P. 2001. **Endothelial function and coronary artery disease.** *Curr Opin Lipidol.*, v. 12, p. 383–389.
69. KITTYAKARA C.; WILCOX C.S. 1998. **Antioxidants for hypertension.** *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, v. 7, p. 531–538.
70. KLIGERMAN A. D.; MALIK S. I.; CAMPBELL J. A. 2010. **Cytogenetic insights into DNA damage and repair of lesions induced by a mono-methylated trivalent arsenical.** *Mutat Res*, v. 695, p. 2-8.
71. KUGIYAMA K.; YASUE H.; OHGUSHI M.; et al. 1996. **Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers.** *J Am Coll Cardiol.*, v. 28, p. 1161–1167.
72. LANDMESSER U.; HORNIG B.; DREXLER H. 2004. **Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?.** *Circulation*, v. 109, n. 21, p. II27–II33.

73. LEE R. T.; YAMAMOTO C.; FENG Y.; et al. 2001. **Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells.** *J BiolChem*, v. 276, p. 13847–13851.
74. LERMAN A.; ZEIHNER A. M. 2005. **Endothelial Function: Cardiac Events.** *Circulation*, v. 111, p. 363-8.
75. LI A. C.; GLASS C. K. 2002. **The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention.** *Nature Medicine*, v. 8, p. 1235–1242.
76. LI C.; XU Q. 2007. **Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo.** *Cellular signaling*, v. 19, n. 5, p. 881–91.
77. LI H.; FORSTERMANN U. 2009. **Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system.** *Curr Pharm Des*, v. 15, p. 3133–3145.
78. LI H.; WALLERATH T.; MUNZEL T.; et al. 2002. **Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs.** *Nitric Oxide*, v. 7, p. 149–164.
79. LI Y.; LIU S.; ZHANG Z.; et al. 2012. **RAGE mediates accelerated diabetic vein graft atherosclerosis induced by combined mechanical stress and AGEs via synergistic ERK activation.** *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e35016.
80. LIBBY P. 2002. **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature*, v. 420, p. 868–874.
81. LIBBY P. 2006. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** *Am J Clin Nutr.*, v. 83, n. 2, p. 456S-460S.
82. LIBBY P. 2013. **Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy.** *N. Engl. J. Med.*, v. 368, p. 2004–2013.
83. LIBBY P.; AIKAWA M.; JAIN M. K. 2006. **Vascular endothelium and atherosclerosis.** *Handb Exp Pharmacol.*, v. 176, pt. 2, p. 285-306.
84. LIBBY P.; RIDKER P. M.; MASERI A. 2002. **Inflammation and atherosclerosis.** *Circulation*, v. 105, p. 1135–1143.
85. LIBBY P.; THEROUX P. 2005. **Pathophysiology of Coronary Artery Disease.** *Circulation*, v. 111, p. 3481-3488.
86. LIN F. Y.; LIN Y. W.; HUANG C. Y.; et al. 2011. **GroEL1, a heat shock protein 60 of Chlamydia pneumoniae, induces lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 expression in endothelial cells and enhances atherogenesis in hypercholesterolemic rabbits.** *J Immunol*, v. 186, p. 4405-4414.
87. LÜSCHER T.; NOLL G. 1999. **Is it all in genes...? Nitric oxide synthase and coronary vasospasm.** *Circulation*, v. 99, p. 2855-2857.
88. MALEK A. M.; ALPER S. L.; IZUMO S. 1999. **Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis.** *JAMA*, v. 282, p. 2035-42.
89. MANDUTEANU I.; SIMIONESCU M. 2012. **Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders. Cellular Dysfunction in Inflammatory Related Vascular Disorders Review Series.** *J. Cell. Mol. Med.*, v. 16, n. 9, p. 1978-1990.
90. MARQUES E SÁ A. C. *O Papel dos Polimorfismos Genéticos na Doença Cardíaca Isquêmica.* [Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina]. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar Universidade do Porto, 2011.
91. MAYER B.; HEMMENS B. 1997. **Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells.** *Trends. Biochem. Sci.*, v. 22, p. 477-481.
92. MCNAMARA D. M.; HOLUBKOV R.; POSTAVA L.; et al. 2003. **Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure.** *Circulation*, v. 107, p. 1598-1602.
93. MIYAMOTO Y.; SAITO Y.; NAKAYAMA M.; et al. 1999. **RPA1 represses the eNOS gene with T–786C mutations: a molecular mechanism for predisposition to coronary spastic angina.** *Circulation*, v. 100, suppl. I, p. I-754.

94. MIYAMOTO Y.; SAITO Y.; NAKAYAMA M.; et al. 2000. **Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina.** *Hum Mol Genet*, v. 9, n. 18, p. 2629-37.
95. MONCADA S.; PALMER R. M.; HIGGS E. A. 1991. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Rev*, v. 43, n. 2, p. 109-142.
96. MONTENEGRO M. R. 1999. **Atherosclerosis morphology and pathogenesis.** *Annu Rev Biomed Sci*, v. 1, p. 133-44.
97. MONTI L. D.; BARLASSINA C.; CITTERIO L.; et al. 2003. **Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome.** *Diabetes*, v. 52, p. 1270-1275.
98. MOTOYAMA T.; KAWANO H.; KUGIYAMA K.; et al. 1997. **Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C.** *Am J Physiol.*, v. 273, p. H1644-H1650.
99. MURRAY C. J.; VOS T.; LOZANO R.; et al. 2012. **Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.** *Lancet*, v. 380, p. 2197-2223.
100. NAKAKI T.; NAKAYAMA M.; KATO R. 1990. **Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells.** *European Journal of Pharmacology*, v. 189, n. 6, p. 347-353.
101. NAKAYAMA M.; YASUE H.; YOSHIMURA M.; et al. 2000. **T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis.** *Am J Cardiol*, v. 86, n. 6, p. 628-34.
102. NAKAYAMA M.; YASUE H.; YOSHIMURA M.; et al. 1999. **T-786-C Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Coronary Spasm.** *Circulation*, v. 99, p. 2864-2870.
103. NANNI L.; ROMUALDI C.; MASERI A.; et al. 2006. **Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases.** *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 41, p. 934-948.
104. NAPOLI C. N. F.; WILLIAMS-IGNARRO S.; PIGNALOSA O.; et al. 2006. **Nitric oxide and atherosclerosis: an update.** *Nitric Oxide*, v. 15, p. 265-279.
105. NASREEN S.; NABIKA T.; SHIBATA H.; et al. 2002. **T-786C Polymorphism in Endothelial NO Synthase Gene Affects Cerebral Circulation in Smokers: Possible Gene-Environmental Interaction.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 22, p. 605-610.
106. NAVAB M.; BERLINER J. A.; WATSON A. D.; et al. 1996. **The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 16, p. 831-842.
107. NEWTON C. R.; GRAHAM A.; HEPTINSTALL L. E.; et al. 1989. **Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS).** *Nucleic Acids Res*, v. 17, p. 2503-2516.
108. NUNOKAWA Y.; TANAKA S. 1992. **Interferon- γ inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 188, n. 1, p. 409-415.
109. OLD J. M.; VARAWALLA N. Y.; WEATHERALL D. J. 1990. **Rapid detection and prenatal diagnosis of beta-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK.** *Lancet*, v. 336, n. 8719, p. 834-837.
110. ORIMADEGUN A. E.; FAWOLE O.; OKEREKE J. O.; et al. 2007. **Increasing burden of childhood severe malaria in a Nigerian tertiary hospital: implication for control.** *Journal of Tropical Pediatrics*, v. 53, n. 3, p. 185-189.

111. OTA Y.; KUGIYAMA K.; SUGIYAMA S.; et al. 1997. **Impairment of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract-role of free radicals and attenuation by captopril.** *Atherosclerosis*, v. 131, p. 195–202.
112. PARADOSSI U.; CIOFINI E.; CLERICO A.; et al. 2004. **Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu298 → Asp and T-786→ C polymorphisms.** *Stroke*, v. 35, p. 1305-1309.
113. PARK C. W.; KIM H. W.; LIM J. H.; et al. 2009. **Vascular endothelial growth factor inhibition by dRK6 causes endothelial apoptosis, fibrosis, and inflammation in the heart via the Akt/eNOS axis in db/db mice.** *Diabetes*, v. 58, p. 2666–76.
114. PICCOLI J. C. E.; MANFREDINI V.; HAMESTER F. I.; et al. 2012. **Interaction Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (-786T>C, 894G>T and Intron 4 a/b) and Cardiovascular Risk Factors in Acute Coronary Syndromes.** *Archives of Medical Research*, v. 43, p. 205-211.
115. POU S.; POU W. S.; BREDT D. S.; et al. 1992. **Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase.** *J Biol Chem.*, v. 267, p. 24173–24176.
116. PUDDU P.; PUDDU G. M.; BASAGLI L.; et al. 1995. **Coronary and cerebrovascular atherosclerosis: two aspects of the same disease or two different pathologies?** *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 20, p. 5–22.
117. RAGIA G.; NIKOLAIDIS E.; TAVRIDOU A.; et al. 2010. **Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms –786T > C and 894G > T in coronary artery bypass graft surgery patients.** *Human Genomics*, v. 4, n. 6, p. 375–383.
118. RAMAKRISHNAN U.; KUKLINA E.; STEIN A. D. 2002. **Iron stores and cardiovascular disease risk factors in women of reproductive age in the United States.** *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, n. 6, p. 1256–1260.
119. RICCIONI G.; SBLENDORIO V. 2012. **Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment.** *Journal of Geriatric Cardiology*, v. 9, p. 305–317.
120. RIOS D. L.; CALLEGARI-JACQUES S. M.; HUTZ M. H. 2005. **Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis.** *Clin Chim Acta*, v. 362, p. 138–146.
121. RIOS D. L.S.; D'ONOFRIOB L. O.; SOUZAB J. K.; et al. 2007. **Smoking-dependent and haplotype-specific effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on angiographically assessed coronary artery disease in Caucasian- and African-Brazilians.** *Atherosclerosis*, v. 193, p. 135–141.
122. ROBERT, S. R. 2005. **HDL-C and diabetic patient: target for therapeutic intervention.** *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 68S2, p. S36– S42.
123. ROBERTS C. K.; VAZIRI N. D.; WANG X. Q.; et al. 2000. **Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet.** *Hypertension*, v. 36, p. 423–429.
124. RONG J. X.; RANGASWAMY S.; SHEN L.; et al. 1998. **Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 18, p. 1885–1894.
125. ROSS R. 1999. **Atherosclerosis—an inflammatory disease.** *N. Engl. J. Med*, v. 340, p. 115–26.
126. ROSSI G. P.; CESARI M.; ZANCHETTA M.; et al. 2003. **The T-786C Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype Is a Novel Risk Factor for Coronary Artery Disease in Caucasian Patients of the GENICA Study.** *JACC*, v. 41, n. 6, p. 930–7.
127. SAINI V.; BHATNAGAR M. K.; BHATTACHARJEE J. 2011. **Association of endothelial dysfunction with endothelin, nitric oxide and NOS Glu298Asp gene polymorphism in coronary artery disease.** *Disease markers*, v. 31, n 4, p. 215-222.

128. SARKAR R.; GELABERT H. A.; MOHIUDDIN K. R.; et al. 1999. **Effect of cigarette smoke on endothelial regeneration in vivo and nitric oxide levels.** *J Surg Res*, v. 82, n. 1, p. 43–7.
129. SATA M.; SAIURA A.; KUNISATO A.; et al. 2002. **Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis.** *Nat Med*, v. 8, p. 403–9.
130. SCHULZ E.; JANSEN T.; WENZEL P.; et al. 2008. **Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension.** *Antioxid. Redox. Signal.*, v. 10, p. 1115–1126.
131. SCRIBNER A. W.; LOSCALZO J.; NAPOLI C. 2003. **The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress.** *Eur. J. Pharmacol.*, v. 482, n. 1-3, p. 95–9.
132. SENGOELGE G.; SUNDER-PLASSMANN G.; H.HÖRL W. 2005. **Potential risk for infection and atherosclerosis due to iron therapy.** *Journal of Renal Nutrition*, v. 15, n. 1, p. 105–110.
133. SIMIONESCU M. 2007. **Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, p. 266–274.
134. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (2007). IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol*, v.88, suppl. 1, São Paulo, 2007.
135. STARY H. C.; CHANDLER A. B.; GLAGOV S.; et al. 1994. **A definition of initial, fatty streak, and inter- mediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.** *Circulation*, v. 89, p. 2462–78.
136. STEINBERG D. 1997. **Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance.** *J Biol Chem.*, v. 272, n. 34, p. 20963–20966.
137. SUGIISHI M.; TAKATSU F. 1993. **Cigarette smoking is a major risk factor for coronary spasm.** *Circulation*, v. 87, p. 76–79.
138. TANNOCK L. R. 2008. **Advances in the management of hyperlipidemia-induced atherosclerosis.** *Expert Rev Cardiovasc Ther*, v. 6, p. 369–383.
139. TOBOREK M.; KAISER S. 1999. **Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis.** *Basic Res Cardiol*, v. 94, p. 295– 314.
140. TOLFREY K. 2002. **Intraindividual variability of children’s blood, lipid and lipoprotein concentrations: a review.** *Prev Cardiol.*, v. 3, p. 145–51.
141. TSUTSUI M.; et al. 2009. **Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice.** *Circ J*, v. 73, n. 6, p. 986–993.
142. TZIOMALOS K.; ATHYROS V. G.; KARAGIANNIS A.; et al. 2010. **Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v. 20, p. 140–146.
143. VANE JR.; ANGGARD E. E.; BOTTING R. M. 1990. **Regulatory functions of the vascular endothelium [Review].** *N Engl J Med*, v. 323, p. 27–36.
144. VANHOUTTE P. M. 2009. **Endothelial Dysfunction - The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis.** *Circ J*, v. 73, p. 595–601.
145. VANNUCCHI A. M.; PANCRAZZI A.; BOGANI, C.; et al. 2006. **A quantitative assay for JAK2 (V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis.** *Leukemia*, v. 20, p. 1055–1060.
146. VASQUEZ-VIVAR J.; KALYANARAMAN B.; MARTASEK P.; et al. 1998. **Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors.** *Proc Natl Acad Sci, USA*, v. 95, p. 9220–9225.

147. VEISARI D.; DAGHINI E.; VIRDIS A.; et al. 2009. **The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man.** *Exp Physiol*, v. 94, p. 317–321.
148. WANG J.; DUDLEY D.; WANG X. L. 2002. **Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, n. 5, p. e1–4.
149. WANG X. L.; SIM A. S.; WANG M. X.; et al. 2000. **Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity.** *FEBS Lett.*, v. 471, p. 45–50.
150. WANG Y. Z.; ZHUA Z.; ZHANG H. Y.; et al. 2014. **Detection of hepatitis B virus A1762T/G1764A mutant by amplification refractory mutation system.** *Braz. J. Infect. Dis*, v. 18, n. 3, p. 261–265.
151. WILCOX J. N.; SUBRAMANIAN R. R.; SUNDELL C. L.; et al. 1997. **Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 17, p. 2479–2488.
152. WILENSKY R. L.; HAMAMDZIC D. 2007. **The molecular basis of vulnerable plaque: potential therapeutic role for immunomodulation.** *Current Opinion in Cardiology*, v. 22, p. 545–551.
153. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). **Health systems: improving performance.** Cardiovascular Diseases. Geneva: WHO, 2005.
154. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011). **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control.** Mendis S, Puska P, Norrving, B (Editors), WHO, 2011.
155. YANG Y.; LOSCALZO J. 2000. **Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide.** *Circulation*, v. 101, p. 2144–2148.
156. YILDIZ O. 2007. **Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging.** *Ann NY Acad Sci*, v. 1100, p. 353–360.
157. YOSHIMURA T.; HISATOMI A.; KAJIHARA S.; et al. 2003. **The relationship between insulin resistance and polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease.** *J Atheroscler Thromb*, v. 10, p. 43–47.
158. YU X. H.; FU Y. C.; ZHANG D. W.; et al. 2013. **Foam cells in atherosclerosis.** *Clin Chim Acta*, v. 424, p. 245–52.
159. ZEIHNER A. M.; SCHAACHINGER V.; MINNERS J. 1995. **Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function.** *Circulation*, v. 92, p. 1094–1100.

ANEXO I – ENTREVISTA: PROJETO DE PESQUISA POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA

Nº PRONTUÁRIO: _____ INICIAIS- _____ Nº TUBO _____

NOME: _____

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

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

FILHOS: () **SIM** () **NÃO**.

QUANTOS: HOMENS (____) MULHERES

(____)ABORTO: _____ QTOS _____ NATURALIDADE: _____

RESIDE EM: _____

TELEFONE: _____ TEL. CONTATO: _____

PROFISSÃO _____

1. ATUALMENTE FUMA: () **SIM** () **NÃO**

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

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

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

2. BEBE () **SIM** () **NÃO** FREQUÊNCIA _____

VINHO () CERVEJA () CACHAÇA() OUTROS _____ 1 COPO() 2-3 COPOS() 3 OU + COPOS ()

DIAGNÓSTICO: _____

INICIO DOS SINTOMAS AOS: _____ ANOS

SINTOMAS: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____. INÍCIO DO TRATAMENTO _____

TRATAMENTO CLÍNICO: SIM() NÃO()

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

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

OUTRAS: _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

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

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

COMPLICAÇÕES? _____

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

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

OBSERVAÇÕES:

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CASO

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

Meu nome é JOSE VITOR MAGAHAES MARTINS, sou o pesquisador (a) responsável pelo projeto. As informações e esclarecimentos a respeito da pesquisa serão repassados e caso aceite participar do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias. A primeira será de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização. Qualquer dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a coordenadora responsável **Dra. Katia Karina Verolla de O. Moura** no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail kkverolli@pucgoias.edu.br

Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que estará sob consulta e com o diagnóstico de aterosclerose (acúmulo de placas de gordura nos vasos sanguíneos) será contatado e informado da pesquisa. Caso aceite deverá assinar o TCLE e caso se recuse ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

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

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

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

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado á Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

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

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

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

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

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

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

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

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

_____/_____/_____ / ____/____/_____

Assinatura do participante Data Assinatura do responsável pelo estudo Data

ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE

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

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

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

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

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

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

IV. As amostras de sangue periférico do grupo controle coletadas serão submetidas a testes de sangue, para verificar a ausência das variações genéticas. Para o grupo controle os critérios de inclusão serão idade superior a 38 anos, e que não apresentem diagnóstico de doença aterosclerótica baseados em resultados de exames de imagem. Os de exclusão são os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar

dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado á Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

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

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

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

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

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

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

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do

estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do participante

Assinatura do responsável pelo estudo

___/___/___

Data

___/___/___

Data