

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ICBIM
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

GABRIEL OLIVEIRA JASINEVICIUS

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO T-786C DO GENE DA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (DAC)**

Uberlândia
2019

GABRIEL OLIVEIRA JASINEVICIUS

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO T-786C DO GENE DA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (DAC)**

Trabalho apresentado para conclusão do curso, TCC2, ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina sob orientação da Prof^a. Dr^a. Elisangela Rosa da Silva.

Uberlândia
2019

GABRIEL OLIVEIRA JASINEVICIUS

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO T-786C DO GENE DA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (DAC)**

Trabalho apresentado para conclusão do curso, TCC2, ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva- ICBIM/UFU

Profª Drª Valeska Barcelos Guzman-ICBIM/UFU

Profª Drª Elisângela Rosa da Silva ICBIM/UFU (orientador)

Agradecimentos:

Aos meus pais Renato e Carla, por me apoiarem na escolha do curso e estarem dispostos a me ajudar nas horas mais importantes. À minha irmã Isabela, por ser uma pessoa na qual posso desabafar meus pensamentos. Aos meus amigos do curso, que compartilharam ótimos momentos na minha vida. À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elisângela Rosa Silva por esclarecer minhas dúvidas, ensinar com dedicação e empenho e sempre manter a calma. À banca examinadora por aceitar o convite e dedicar tempo na leitura deste trabalho. À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação.

RESUMO

Atualmente as doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de mortalidade no mundo. Dentre as DCVs, destaca-se a doença arterial coronariana (DAC), por ser a que acomete um maior número de indivíduos e a que mais causa óbitos. A DAC caracteriza-se pela insuficiência de suprimento sanguíneo às células cardíacas devido ao desenvolvimento de placas de ateroma e de trombos na artéria coronariana. A doença possui um caráter multifatorial, sendo assim, não só as condições ambientais podem propiciar seu desenvolvimento, como também a herança genética do indivíduo. Este estudo contribui para elucidar, ao menos em parte, a influência do polimorfismo T-786C do gene da óxido nítrico sintase na manifestação da DAC. É sabido que a presença deste polimorfismo reduz a produção de óxido nítrico (NO) no sistema cardiovascular por alterar a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Neste estudo foram estudados 124 indivíduos e os resultados indicaram associação significativa ($p=0,0105$) e dependência ($p=0,0102$) do polimorfismo em pacientes caso em relação aos pacientes controle. Além disso, encontrou-se uma correlação positiva entre o surgimento da doença cardiovascular e o avanço da faixa etária devido ao caráter cumulativo da patologia. Com isso, torna-se de suma importância a detecção precoce da DAC e a estratificação de grupos de alto risco para a melhor abordagem no tratamento e prevenção da enfermidade.

Palavras-chave: Polimorfismo. Doença Arterial Coronariana. T-786C . Óxido Nítrico. Óxido Nítrico Sintase.

ABSTRACT

Currently, cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of mortality in the world. Among all CVDs, the coronary artery disease (CAD) stands out, as it is the most common and the leading cause of death of them. CAD is characterized by insufficient blood supply to the cardiac cells due to the development of thrombi and atheromatous plaque in the coronary artery. The disease has a multifactorial characteristic, therefore, not only the environmental conditions can promote its development but also the genetic inheritance of the individual. This study aims to clarify, or at least in part, the influence of the T-786C gene on CAD manifestation. This polymorphism decreases the formation of nitric oxide (NO) in the cardiovascular system by altering the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) production. This study was performed in 124 individuals and the results indicated a significant association ($p = 0.0105$) and dependence ($p = 0.0102$) between the polymorphism in individuals with CAD in comparison to the control group. In addition, it was found a positive correlation between the development of the cardiovascular disease and the age advancing due to the cumulative characteristic of the pathology. Summing up, it is extremely important to detect early CAD patients to define risk groups and provide a better approach in the prevention and treatment of the disease.

Key words: Polymorphism. Coronary Artery Disease. T-786C. Nitric Oxide. Nitric Oxide Synthase.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1-INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2-JUSTIFICATIVA..... | 6 |
| 3-OBJETIVO..... | 6 |
| 4-METODOLOGIA..... | 7 |
| 4.1-OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 7 |
| 4.2-GRUPOS..... | 7 |
| 4.3-PROCEDIMENTOS..... | 7 |
| 4.3.1-EXTRAÇÃO DE DNA..... | 7 |
| 4.3.2-AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO T786TC DO GENE DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (eNOS)..... | 8 |
| 4.4-ESTATÍSTICA..... | 8 |
| 5-RESULTADOS..... | 9 |
| 6-DISCUSSÃO E CONCLUSÃO..... | 14 |
| 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 17 |
| 8-ANEXO I - Termo de Consentimento Informado..... | 21 |
| 9-ANEXO II- Parecer do comitê de ética..... | 23 |

- Lista de abreviaturas:

- - cNOS: Óxido Nítrico Sintase constitutiva;
- DAC: Doença Arterial Coronariana;
- DCV: Doenças Cardiovasculares;
- DNA: Desoxirribonucleico Ácido, ou em português – ADN Ácido Desoxirribonucleico;
- eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial;
- ECA: Enzima Conversora de Angiotensina;
- GTP: Guanosina Trifosfato
- GMPc: Monofosfato Cíclico de Guanosina;
- HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica;
- iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida;
- LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade;
- NO: Óxido Nítrico;
- NOS: Óxido Nítrico Sintase;
- nNOS: Óxido Nítrico Sintase neuronal;
- PCR: Reação em Cadeia Polimerase.

1. INTRODUÇÃO:

A doença arterial coronariana (DAC) é uma patologia inflamatória que ocorre no sistema cardiovascular, sendo atualmente a mais comum e com a maior taxa de mortalidade dentre todas as doenças cardiovasculares, sendo o combate da doença responsável por consumir grande quantidade de recursos na área da saúde no Brasil. A enfermidade causa angina, infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita. Ela é desencadeada por um processo que envolve elementos sanguíneos, danos nas paredes vasculares, recrutamento de monócitos, acúmulo de lipídeos, necrose, calcificação, além de outros fatores que levam à aterosclerose da artéria coronariana. A principal característica da DAC consiste na isquemia cardíaca, sendo o desenvolvimento de placas de ateromas e sua ruptura que leva a formação de trombos os principais motivos para a falta de suprimento de oxigênio às células cardíacas (FALK et al, 1995; HUANG et al, 2015; SCHLATTER, HIRAKATA e POLANCZYK, 2017).

O processo inflamatório é iniciado com a entrada de lipídeos, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), na camada íntima do endotélio de vasos sanguíneos. Após isso, ocorre a oxidação desses lipídeos subendoteliais e o recrutamento de monócitos que se diferenciam em macrófagos, com a formação de placas ateroscleróticas. Esses sítios se tornam propícios às inflamações, apoptose celular e redução da concentração de óxido nítrico (NO) (figura 1). Como consequência desses processos, pessoas que sofrem de DAC possuem uma diminuição de regulação no tônus vascular e das células musculares lisas, acúmulo de lipídeos na camada íntima do endotélio e aumento da inflamação na artéria coronariana. Tudo isso culmina na ruptura das placas ateroscleróticas possibilitando o extravasamento de material trombogênico e a agregação plaquetária (WU, et al,2017).

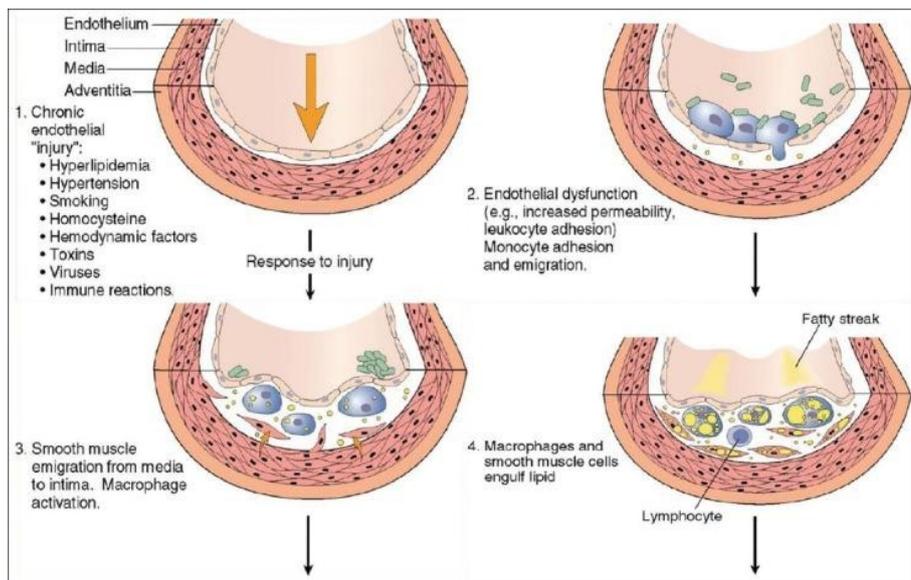


Figura 1: Processo de formação da placa de ateroma (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258672/>> acesso em 07/12/2019 às 16:16h)

O processo aterosclerótico relacionado à DAC produz alterações fisiológicas nos indivíduos afetados como a escassez do suprimento de oxigênio ao músculo cardíaco, propiciando a manifestação de sintomas como a angina. Esse sintoma está presente em aproximadamente 50% dos pacientes com DAC e se caracteriza por um desconforto na área torácica do indivíduo que pode irradiar para a mandíbula, ombros e às costas além de ocasionar falta de ar. O estresse emocional, o frio e a ingestão de refeições substanciais podem trazer à tona tais sintomas. Apesar disso, a doença pode apresentar efeitos secundários de forma mais intensa, normalmente em idosos, como a fadiga e o desconforto epigástrico. Em certos casos a doença é assintomática (CASSAR et al, 2009; SANIDAS & DANGAS, 2019).

As doenças relacionadas ao sistema cardiovascular resultam em aproximadamente 17 milhões de óbitos anualmente ao redor do mundo e há uma projeção de aumento para 23,3 milhões, atingindo principalmente países em desenvolvimento. A urbanização de um país em desenvolvimento propicia aos indivíduos hábitos como a falta de atividade física, a ingestão de uma dieta pouco saudável e o aumento do estresse que favorecem o aumento da DAC. Outros fatores de risco que colaboram para o desenvolvimento da DAC são a obesidade, a hipertensão arterial, o consumo excessivo de álcool, a diabetes e níveis altos de colesterol na corrente sanguínea. Já países desenvolvidos, possuem um quadro mais favorável em relação à doença e até uma queda em sua incidência devido ao melhor diagnóstico, a

ações preventivas como a melhora do estilo de vida e uma abordagem mais eficaz no tratamento da doença (NIEMEIJER et al, 2015; KIUCHI et al, 2019; GAUDEL et al, 2019).

O Brasil passou por um declínio progressivo da mortalidade dos indivíduos com a patologia cardiovascular (figura 3). Isso pode ser explicado devido à melhor capacitação dos cardiologistas frente à manifestação da DAC e ao aumento de procedimentos cirúrgicos realizados no país para se combater a doença. Contudo, em 2012, as DCVs somaram um total de mais de 297 milhões de dólares de gastos financiados pelo aparato público brasileiro. Além disso, o país registrou em 2011 um total de 384615 de óbitos, sendo 31% dessas mortes devido à DAC. Mais adiante, o Brasil possui uma distribuição desigual de recursos financeiros dedicados à saúde por cada região administrativa, diminuindo o poder financeiro de certos estados para enfrentar a enfermidade. A prevalência da doença ainda varia de 5% a 8% em adultos com mais de 40 anos. Sendo a doença de um caráter cumulativo, há uma tendência no aumento do número de afetados com o avanço na faixa etária. Tudo isso se agrava com o fenômeno do envelhecimento populacional no país, que poderá trazer ainda mais custos na resposta do Estado para a redução do quadro epidemiológico da disfunção cardíaca (LLOYD-JONES et al,1999; KAISER, 2004; POLANCZYK e RIBEIRO, 2009; RIBEIRO et al, 2016;MIRANDA, MENDES & SILVA, 2016).

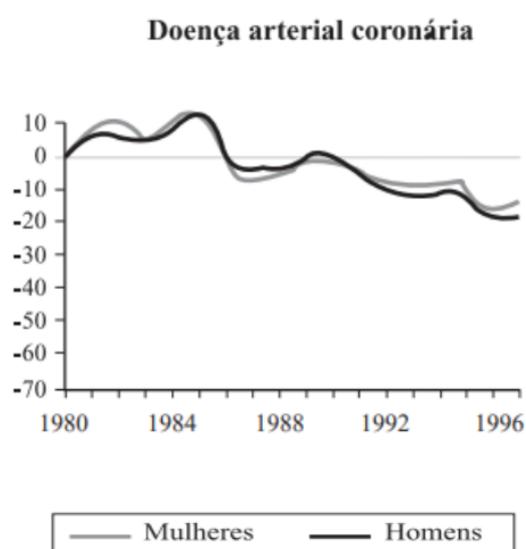


Figura 3: Mortalidade no Brasil por DAC de 1980 a 1996. Porcentagem de declínio ajustada por idade. (<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/9-4/epidemiologia.pdf>> acesso em 07/12/2019 às 16:15h).

Com a introdução de hábitos mais saudáveis pela população como melhora da dieta e a prática regular de exercícios físicos e da diminuição de fatores de risco como o consumo exagerado de álcool e o acúmulo da gordura visceral, é possível a obtenção de melhores dados em relação à incidência da doença em questão. Contudo, a DAC possui um forte componente genético atribuído ao seu aparecimento. Sendo uma doença poligênica, não só os hábitos do indivíduo como também seus genótipos irão influenciar no seu surgimento (YIN et al, 2013; DIMOVSKI; ORHO-MELANDER & DRAKE, 2019). A herança genética influencia de 40% a 50% dos casos da DAC. Mais de 160 genes foram identificados correlacionando-se com a patologia cardíaca. Esses genes regulam fatores como o metabolismo de lipídios, a pressão arterial, a inflamação, a angiogênese, entre outros. É de grande importância reconhecer quais genes oferecem riscos ao desenvolvimento da enfermidade para o melhor desenvolvimento do tratamento individualizado dos pacientes (ERDMANN et a, 2018).

Um dos tipos de polimorfismos que podem contribuir para a DAC são os da enzima da óxido nítrico sintase (NOS). Essa enzima é responsável pela produção nos mamíferos de um gás inorgânico que é um radical livre, o óxido nítrico (NO). O processo consiste no uso da L-arginina e mais cinco outros substratos, como o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) para a obtenção de óxido nítrico. A NOS possui três isoformas agrupadas nas categorias de NOS induzível (iNOS) e NOS constitutiva (cNOS). A iNOS é produzida por macrófagos e células ativadas por citocinas. Além disso, a molécula possui propriedades citotóxicas como inativação de enzimas responsáveis pela síntese de DNA, proliferação celular e pelo ciclo de Krebs, não sendo liberada em condições fisiológicas. Já a cNOS age de forma fisiológica no corpo humano liberando pequenas quantidades de NO. A cNOS se subdivide nas isoformas NOS neuronal (nNOS), quando atua nos neurônios e NOS endotelial (eNOS), quando atua nos vasos sanguíneos e plaquetas (KONWLES e MONCADA, 1994; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003).

A liberação de NO pela eNOS nos vasos sanguíneos desencadeia efeitos como relaxamento da musculatura vascular lisa, inibição da adesão de plaquetas e leucócitos no endotélio, diminuição da oxidação de lipoproteínas aterogênicas de baixa densidade e redução da migração e proliferação de células do músculo liso vascular. O mecanismo celular pelo qual o NO ativa essas ações ocorre por meio do estímulo do seu receptor intracelular, a guanilato ciclase (GC) solúvel, que quando ativado converte a guanosina trifosfato(GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e ativa a proteína

quinase (PK) G-dependente . Com isso ocorre redução da concentração de cálcio intracelular e o relaxamento do vaso. Além disso, a inibição do gene da eNOS pode promover o surgimento da aterosclerose. Portanto, é de grande interesse o estudo da funcionalidade dos polimorfismos relacionados à eNOS pois a disfunção na expressão do gene pode estar envolvida com danos ao sistema circulatório (ROSSI et al, 2003; COLOMBO et al, 2003; PACHER, BECKMAN & LIAUDET, 2007).

O gene da eNOS está localizado no braço longo do cromossomo 7 (Gen Bank D26607), na região 7q35-36 (figura 4), apresentando um comprimento genômico de 4.4kpb compreendendo 25 íntrons e 26 éxons, sintetizando um RNAm de 4052 nucleotídeos (NOVAIS et al, 2010).

Existem diversos tipos de mutações que podem ocorrer nos genes, dentre elas as inserções e deleções de pequena escala, as variações de microssatélites, as de elementos repetitivos polimórficos e as de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs). O polimorfismo do gene da eNOS abordado neste estudo é um SNP chamado T-786C, que é caracterizado pela substituição de um único nucleotídeo - timina (T) por citosina (C) na região promotora do gene (NOGUEIRA et al, 2012). Os polimorfismos SNPs são comumente utilizados para identificação filogenética de diferentes populações (BRUMFIELD et al, 2003).

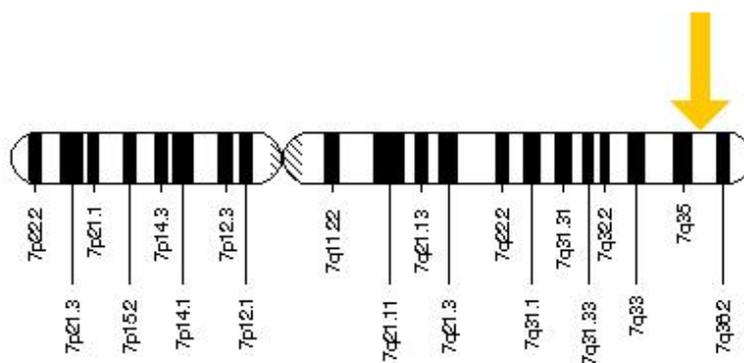


Figura 4: Cromossomo 7 com o gene da eNOS ressaltado pela seta

(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/NOS3/show/print>> acesso em 04/12/2019 às 11:28h).

O polimorfismo em questão está relacionado com a redução da conversão de L-arginina em NO e maior ocorrência de vasoconstrição, agregação plaquetária e trombose. Algumas consequências disso podem ser a supra-regulação de moléculas de adesão propiciando maior risco de inflamação e disfunções endoteliais. Levando em conta as variações causadas por esse polimorfismo, há uma tendência no seu estudo para

distúrbios como a DAC. Os alelos que não sofreram mutação apresentam uma base nucleotídica T e ocorrem numa frequência de aproximadamente 71% da população ao redor do mundo e os mutados são denominados C e ocorrem numa frequência de aproximadamente 29 % população mundial. Há outro estudo feito na região nordeste do Brasil que mostra as frequências dos genótipos (TT), (TC) e (CC) sendo respectivamente de 54,3%, 42% e 3,7% para indivíduos saudáveis (ROSSI et al, 2003; VILAS-BOAS et al, 2016; NCBI, 2019).

Tendo em vista a gravidade da DAC no contexto global da atualidade e a complexidade do seu surgimento, é necessário o esclarecimento dos fatores que levam a seu desenvolvimento. Um possível fator é do polimorfismo para o gene da eNOS na posição T786C. Com a descoberta de novos fatores para essa doença é possível que haja melhor compreensão e meios de combater a DAC.

2. JUSTIFICATIVA:

Devido à acentuada taxa de morbimortalidade e os gastos ao sistema de saúde causados pela DAC, é necessária a busca de biomarcadores para auxiliar na prevenção e no combate à doença que diminuam tais números. A medicina preventiva é uma via que propicia isso e ainda promove uma melhor qualidade de vida ao paciente.

Através da identificação de variáveis genéticas, no caso o polimorfismo da eNOS, é possível produzir um diagnóstico precoce e uma maior chance na prevenção e tratamento da DAC. Além disso, esse estudo propicia um melhor entendimento do papel do polimorfismo da eNOS na fisiopatologia da doença.

3. OBJETIVOS:

Investigar por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) o polimorfismo T-786C do gene da eNOS nos pacientes caso e nos pacientes controle.

Comparar a ocorrência da doença em relação aos genótipos encontrados, analisando se há ou não associação entre estas duas variáveis e se há associação com outros fatores de risco como a idade, sexo e a hipertensão arterial sistêmica (HAS).

4. METODOLOGIA:

4.1 - Obtenção das amostras:

Amostras de sangue periférico de 198 pacientes foram obtidas de forma aleatória no Setor de Cardiologia (Dor Torácica / Laboratório de Hemodinâmica) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no ano de 2018.

A coleta de sangue foi realizada em tubo vacutainer de 3 ml com EDTA, após o paciente ler e assinar o termo de consentimento (anexo I) assinado pelos pacientes e conforme autorizado pela Comissão de Ética Humana da UFU parecer 189.679 (anexo II).

4.2 Grupos:

Inicialmente, os pacientes foram divididos em 2 grupos, caso e controle, e posteriormente foram subdivididos de acordo com os genótipos apresentados.

A: Pacientes: Foram elegíveis os indivíduos com o diagnóstico de síndrome coronariana aguda (Angina Instável, IAM) baseada em dados clínicos, eletrocardiográficos, enzimáticos e com a DAC comprovada pela angiografia coronária.

B: Controles: Indivíduos submetidos à angiografia coronária e que não apresentem lesões coronárias (sem DAC).

- Critérios de exclusão:
- Doenças malignas sistêmicas.
- Enfermidades crônicas terminais.
- Portadores de doenças infectocontagiosas.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Extração de DNA:

A extração do DNA foi feita com o reagente Brazol segundo especificações do fabricante (LGC Biotecnologia Ltda) e protocolo de Chomczynski (1993).

4.3.2 Amplificação do polimorfismo T-786C do gene do óxido nítrico sintetase (eNOS):

A variante T-786C (rs2070744) foi amplificada segundo Serrano et. al, 2004, com os seguintes iniciadores:

Sense- 5'-TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A-3' e

Anti sense- 5'-GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC-3'

As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram calibradas e usamos 100 ng de DNA genômico, 25 pmol de cada primer, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,5mmol/L de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume de reação de 30µL. A PCR foi feita utilizando-se o programa: 35 ciclos a 94° C por 30 seg (desnaturação), 54° C por 1 min. (anelamento) e 72° C por 1 min. (extensão) e ao final foi acrescentado uma extensão de 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados resultaram em um fragmento de 180pb.

E estes foram digeridos com a enzima de restrição MspI, durante 9 horas a 37°C, produzindo fragmentos de 140 e 40 pb para a presença do alelo T e fragmentos de 90, 50 e 40 bp para o alelo C.

Os produtos amplificados e de restrição foram analisados em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.

Ao todo foram selecionadas 130 amostras para a genotipagem de DNA, destas amostras, foram excluídas 6 por falta ou inconsistência de dados clínicos, obtendo-se 124 pacientes genotipados.

4.4- Estatística:

As análises de correlação e de regressão foram estimadas adotando o modelo de Mather & Jinks (1984). O programa BIOSTAT versão nº 5.8 foi usado para realizar as análises estatísticas. Em todas elas foi admitido o erro menor que 5% ($p < 0,05$) para o nível de significância. O teste do qui-quadrado (X^2) foi utilizado para verificar diferenças entre as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle.

Análises de matriz correlação, com $p < 0,05$, foram realizadas para verificar todas as possíveis associações entre fatores de risco e o polimorfismo.

O teste de regressão logística linear foi utilizado para verificar a dependência

entre a DAC e o polimorfismo da T-786C da eNOS.

5. RESULTADOS:

A integridade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de 1%, como mostra a figura 5.

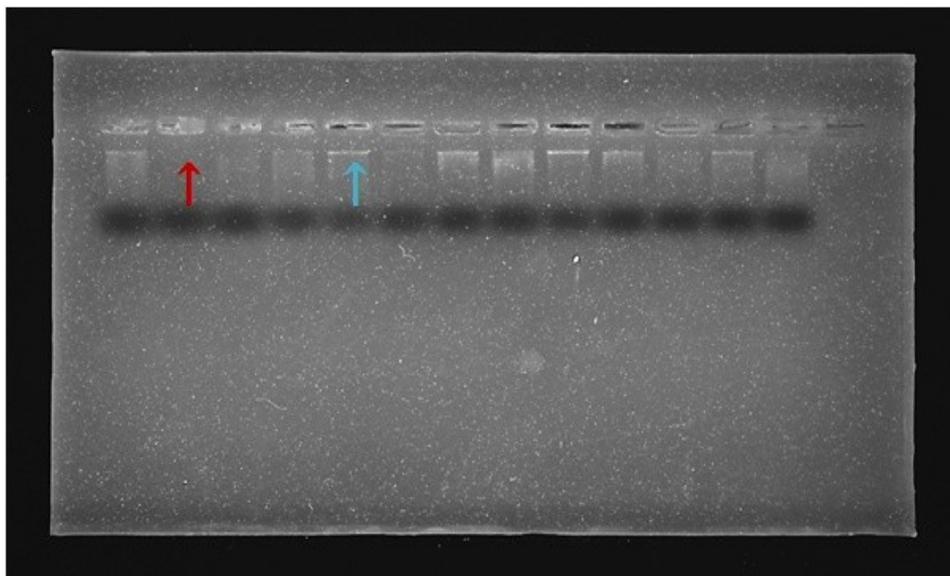


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, TBE -0,5 % a 120Volts- para verificar a integridade dos DNAs extraídos. A seta vermelha indica um exemplo de amostra não utilizada e a seta azul indica um exemplo de amostra utilizada.

Ao todo, 68 amostras da extração de sangue foram excluídas devido a falta de integridade ou quantidade não significativa de DNA extraído.

As amostras de DNA selecionadas foram amplificadas pela PCR segundo o procedimento padrão e um fragmento de 180pb foi amplificado. Esse fragmento foi visualizado após eletroforese a 130 volts em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. (figura 6).

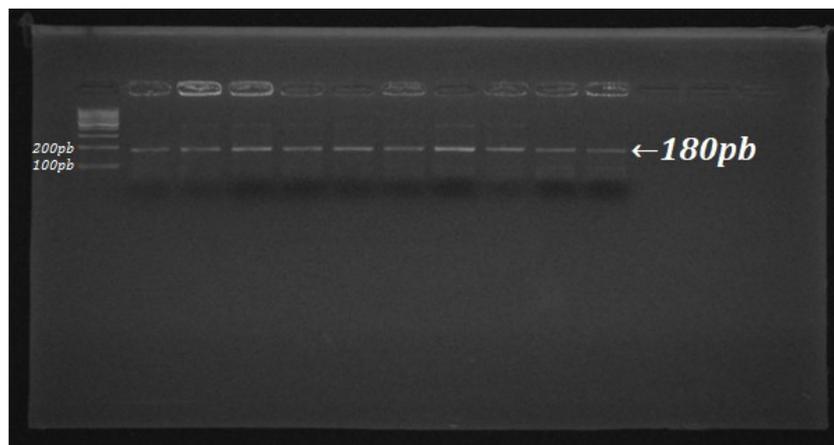


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo, a 130Volts para confirmar a presença dos fragmentos de DNA de 180pb com o uso do marcador de peso molecular de 100 pb na primeira coluna, correspondentes ao gene da eNOS, amplificados pela PCR.

Por fim, foi feita a restrição enzimática com o uso da *Msp*I e um termociclador a 37°C por 9 horas para digerir as amostras amplificadas. Observa-se na figura 6 a produção de fragmentos de 140 e 40 pb para o alelo T e fragmentos de 90, 50 e 40 pb para o alelo C. Levando isso em conta foi possível genotipar 130 pacientes do HC -UFU em TT, TC e CC.

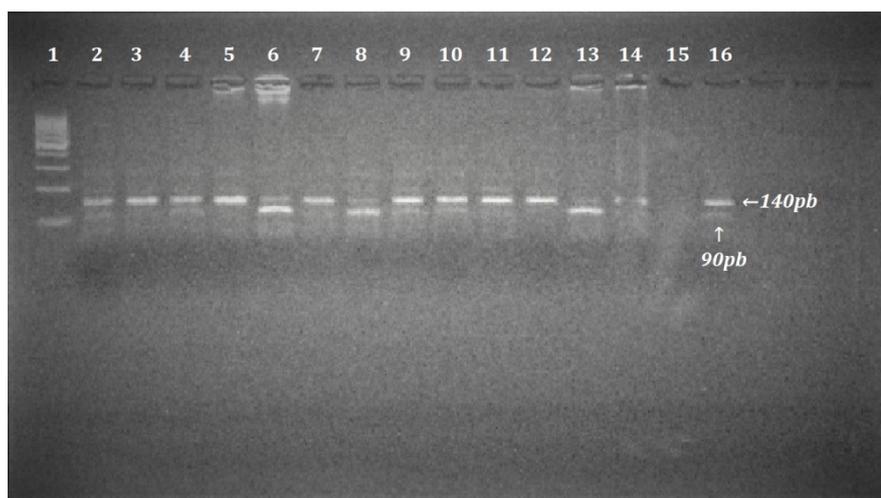


Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 4 %, TBE -0,5% a 150Volts após a restrição do produto de PCR pela enzima *Msp*I.

Coluna1- marcador de peso molecular de 100 pb

Colunas :2,4,6,8,9,10,16- indivíduos heterozigotos T/C

Colunas: 3, 5,7, 11,12,14- indivíduos T/T

Coluna: 13 indivíduo homozigoto C/C

Coluna: 15 branco

Ao todo foram genotipadas 130 amostras, porém 6 pacientes foram excluídos por falta de dados no prontuário. Dos 45 indivíduos do grupo controle genotipados para a variante T-786C 64,45% são homozigotos T/T, 26,7% são heterozigotos T/C e 8.85%

são homozigotos mutantes C/C. Dos 79 pacientes com DAC 40,5% são homozigotos normais T/T, 46,83% são heterozigotos T/C e 12,65 % são homozigotos mutantes C/C (tabela-1). O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a diferença entre os grupos controle e DAC em relação aos genótipos e aos alelos. De acordo com a análise obtida, existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos e os genótipos sendo o valor de $\chi^2 = 6,65$ e o valor de $p = 0,035$. Pode-se observar também que as frequências dos genótipos T/C e C/C são maiores no grupo de pacientes caso (59%) do que no grupo controle (35%) e que a frequência dos genótipos TT no grupo controle é maior que nos pacientes com DAC. Também houve uma diferença significativa na frequência alélica entre os dois grupos, $\chi^2 = 4,44$ e $p = 0,035$, mostrando um aumento na presença do alelo C no grupo dos pacientes com DAC e uma diminuição da presença do alelo T neste mesmo grupo.

Tabela 1- Frequência genotípica e alélica do polimorfismo T-786C entre os pacientes caso e os pacientes controle

| | | Controle | DAC | |
|-----------|---------------|--------------|--------------|--|
| Genotipos | | N=45(36.29%) | N=79 (63,7%) | |
| TT | | 29(64,45%) | 32((40,5%) | |
| TC | | 12(26,7%) | 37(46,83%) | |
| CC | | 4(8,85%) | 10(12,65%) | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Alelos | | | |
| T | | 77,80% | 64% | |
| C | | 22,20% | 36% | |

A análise de correlação foi utilizada para verificar o grau de associação entre DAC e os fatores de risco: idade, sexo, hipertensão arterial (HAS) e o polimorfismo T-786C, utilizamos o teste de Matriz de correlação de Pearson (tabela- 2). Os dados amostrais disponíveis mostraram que há associação positiva entre a idade e a DAC ($P < 0.0001$) e entre o polimorfismo T-786C (presença do alelo C) e a DAC ($p = 0,0105$), sendo que pelo o coeficiente de Pearson ajustado R^2 podemos inferir que 12,74% dos casos de DAC são devido à idade e 5,13% à presença do genótipo (TC+CC). Os demais fatores não mostraram associação significativa.

Tabela 2- Matriz de Correlação entre DAC , idade, sexo, HAS e polimorfismo T-786C .

| | DAC/ idade | DAC/ sexo | DAC /genótipo(alelo C) | DAC/ HAS | Idade/sexo | Idade/ genótipo | Idade/HAS | sexo/genótipo | Sexo/HAS | Genótipo/ HAS |
|---------------------------------|--------------------|--------------|-------------------------------|--------------|-----------------|--------------------|--------------|---------------|--------------|------------------|
| n (pares) = | 124 | 124 | 124 | 124 | 124 | 124 | 124 | 124 | 124 | 124 |
| r (Pearson) = | 0.357 | -0.1192 | 0.2264 | 0.1318 | 0.0961 | 0.0373 | 0.0975 | -0.0841 | 0.0651 | 0.0904 |
| IC 95% = | 0.19 a 0.50 | -0.29 a 0.06 | 0.05 a 0.39 | -0.04 a 0.30 | -0.08 a 0.27 | -0.14 a 0.21 | -0.08 a 0.27 | -0.25 a 0.09 | -0.11 a 0.24 | -0.09 a 0.26 |
| IC 99% = | 0.14 a 0.54 | -0.34 a 0.11 | 0.00 a 0.43 | -0.10 a 0.35 | -0.13 a 0.32 | -0.19 a 0.26 | -0.13 a 0.32 | -0.31 a 0.15 | -0.16 a 0.29 | -0.14 a 0.31 |
| R2 = | 0.1274 | 0.0142 | 0.0513 | 0.0174 | 0.0092 | 0.0014 | 0.0095 | 0.0071 | 0.0042 | 0.0082 |
| t = | 4.2724 | -1.3427 | 2.5991 | 1.4867 | 1.0789 | 0.4169 | 1.095 | -0.9436 | 0.7298 | 1.0152 |
| GL = | 122 | 122 | 122 | 122 | 122 | 122 | 122 | 122 | 122 | 122 |
| (p) = | < 0.0001 | 0.1818 | 0.0105 | 0.1396 | 0.2827 | 0.6775 | 0.2756 | 0.3472 | 0.4669 | 0.312 |
| | 0.994 | 0.3779 | 0.8215 | 0.4331 | 0.2835 | 0.1068 | 0.289 | 0.2398 | 0.1785 | 0.2625 |
| Matriz de Correlação | 0.9665 | 0.1597 | 0.5948 | 0.1973 | 0.1022 | 0.0009 | 0.1053 | 0.0778 | 0.0443 | 0.0903 |
| | Coluna 7 | Coluna 2 | Coluna 3 | Coluna 5 | Coluna 12 | | | | | |
| Coluna 7 | 1 | --- | --- | --- | --- | | | | | |
| Coluna 2 | 0.357 | 1 | --- | --- | --- | | | | | |
| Coluna 3 | -0.1192 | 0.0961 | 1 | --- | --- | | | | | |
| Coluna 5 | 0.2264 | 0.0373 | -0.0841 | 1 | --- | | | | | |
| Coluna 12 | 0.1318 | 0.0975 | 0.0651 | 0.0904 | 1 | | | | | |

No estudo de correlação procura-se verificar a magnitude e o sentido da associação que possa existir entre as variáveis, sem haver qualquer grau de dependência de uma em relação à outra. No teste de regressão, ao contrário, a finalidade é determinar a dependência de uma variável em relação à chamada variável independente ou preditora. Assim, também fizemos um teste de Regressão logística para verificar se há uma dependência entre a manifestação da DAC e a presença do polimorfismo T-786C (presença do alelo C) (tabela-3). O resultado deste teste revelou que há sim uma dependência significativa da variável dependente (DAC) em função variável independente (Genótipo), pois o valor de F (0,0102) é significativo.

Tabela 3- Teste de regressão linear para verificar a dependência da DAC em relação ao polimorfismo T-786C (alelo C).

| FONTES DE VARIAÇÃO | GL | SQ | QM |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|------------|
| REGRESSÃO | 1 | 1.5043 | 1.5043 |
| ERRO | 123 | 27.8343 | 0.2227 |
| TOTAL | 124 | 29.3386 | --- |
| F (REGRESSÃO) = | 6.7554 | p = 0.0102 | |
| VARIÁVEL DEPENDENTE = | DAC | | |
| VARIÁVEL INDEPENDENTE = | Genótipo | | |
| MÉDIA (X) = | 0.5197 | | |
| MÉDIA (Y) = | 0.6378 | | |
| COEF. DE DETERMINAÇÃO (R2) = | 0.0513 | | |
| R2 (AJUSTADO) = | 0.0437 | | |
| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO = | 0.2264 | | |
| INTERCEPTO (A) = | 0.5246 | t = 8.6826 | p < 0.0001 |
| COEF. DE REGRESSÃO (B) = | 0.2178 | t = 2.5991 | p = 0.0105 |
| IC 95% (A) | 0.406 a 0.643 | | |
| IC 95% (B) | 0.054 a 0.382 | | |
| EQUAÇÃO | Y' = a + bX | | |

H0: a DAC não sofre influência do genótipo: $\beta = 0$;

H1: DAC é influenciada pelo genótipo : $\beta \neq 0$; Nível de decisão: alfa = 0.05.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

A DAC é responsável por um grande número de mortes e gastos públicos. Vale ressaltar o gasto de mais de 297 milhões de dólares no tratamento das DCVs em 2012. Apesar de nos últimos anos estes números estarem em declínio, esta patologia tem gerado preocupação e estimulado estudos acadêmicos que colaborem para um diagnóstico e tratamento individualizado, melhorando a qualidade de vida dos portadores e evitando possíveis complicações como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC) (RIBEIRO et al, 2016).

Assim, vários estudos com marcadores moleculares têm sido desenvolvidos no intuito de caracterizar essa doença de origem multifatorial. O polimorfismo T-786C da eNOS tem sido associado a uma queda da produção de óxido nítrico e consequente suscetibilidade a doenças cardiovasculares como a DAC (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; Villas-Boas et al, 2016).

Os dados analisados no presente estudo indicam que há diferença significativa ($p=0,035$) entre as frequências genotípicas e alélicas entre os pacientes caso e o grupo controle. As frequências dos genótipos T/C e C/C são maiores no grupo de pacientes caso do que no grupo controle e há uma diferença significativa na frequência alélica entre os dois grupos, mostrando um aumento na frequência do alelo C no grupo dos pacientes com DAC e uma diminuição da presença do alelo T neste mesmo grupo. Estes resultados estão de acordo com os estudos de RAI et al.;2014 e MAHMOODI, et al 2017 que encontram um aumento da frequência do alelo C em relação à DAC.

A matriz de correlação mostrou uma associação positiva entre idade e DAC e entre a presença do alelo C e a DAC. A associação idade/DAC era esperada, visto tratar-se de um fator de predisposição clássico. Esse resultado corrobora com dados coletados em 1999 que definem a DAC como uma doença de risco cumulativo em relação à faixa etária até os 94 anos para homens e mulheres. O artigo também mostra o risco de um adulto saudável desenvolver a DAC de acordo com a faixa etária na qual está inserido (LLOYD-JONES et al, 1999). A importância desse achado corrobora para a melhor identificação dos grupos de risco para a prevenção e o tratamento da doença.

A associação significativa entre DAC e a presença do alelo C ($p=0,015$), demonstra que este polimorfismo pode influenciar para o desencadeamento da doença, mas esse tipo de análise não nos permite verificar se há dependência entre as variáveis. Para confirmar esse resultado foi feita um teste de regressão logística linear, o qual

confirmou que há uma dependência entre a manifestação da DAC e a presença do alelo C ($p= 0,0102$). Estes resultados, encontrados nas amostras estudadas, são semelhantes aos resultados publicados em vários estudos, dentre eles os estudos de TANGUREK et al, 2006, HAN et al, 2010, LIU et al, 2014, RAI et al, 2014 e MAHMOODI, et al 2017.

A consequência primordial do polimorfismo em questão é a expressão prejudicada do gene da eNOS. A presença do alelo C está relacionada a uma menor concentração da enzima óxido nítrico sintase nos vasos sanguíneos, ocasionando a menor conversão de L-arginina em NO. Os efeitos positivos da NO no sistema cardiovascular incluem a manutenção do tônus vascular e da pressão arterial, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e inibição da proliferação da camada muscular nos vasos sanguíneos. Em contrapartida, a redução desses efeitos, os pacientes afetados pela mutação T-786C terão um sistema cardiovascular mais suscetível a patologias como a DAC que possuem como característica a obstrução de vasos sanguíneos coronarianos (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; VILLAS-BOAS et al, 2016).

A diminuição da concentração de NO no sistema circulatório prejudica também seu efeito antioxidante (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003). Isso possibilita o aumento de lipídios oxidados que contribuem para a formação da aterosclerose (DREXLER & HORNIG, 1999; AMBROSE & SINGH, 2015). Dessa forma, um dos fatores que contribuem para a formação da DAC estará mais propenso a ocorrer no indivíduo.

Possivelmente, devido ao n amostral, a correlação entre a HAS e a presença de DAC não foram significativas, apesar do p (0,1396) estar relativamente próximo de 0,05. Também não encontramos diferença significativa entre os sexos, feminino e masculino, e a presença de DAC, $p=10,1818$.

O Brasil passa por uma situação de gastos crescentes na receita do Estado com o tratamento de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular através de intervenções médicas e farmacológicas. Isso corrobora com a necessidade da implementação de ações preventivas que ajudem a controlar o aparecimento dessas doenças. (POLANCZYK & RIBEIRO, 2009).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular propiciam estudos de identificação de genes e peptídeos que possibilitam explicar, pelo menos em parte, a influência destes na manifestação de algumas patologias, como a DAC. Estudos na determinação da associação genética com a doença nem sempre são de fácil

compreensão, mas tem se tornado ferramentas poderosas na escolha de tratamentos e prevenção de doenças.

Em suma, os resultados apresentados mostraram que indivíduos portadores do polimorfismo T-786C possuem maior propensão no desenvolvimento da DAC. Além disso, foi possível confirmar que a faixa etária de um indivíduo é fator relevante quanto ao risco de se manifestar a doença. É de grande relevância para pesquisas futuras a identificação de genes e peptídeos que possibilitam explicar, pelo menos em parte, a influência destes na manifestação de patologias como a DAC. Com a identificação dos fatores predisponentes genéticos e ambientais é possível direcionar com mais exatidão os pacientes portadores de DAC e outras cardiopatias ao tratamento e prevenção adequados, além de se buscar novas formas de terapias individualizadas e de custo acessível.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BRUMFIELD, R. T. et al. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology & Evolution**. V. 18, p.249-256, 2003.

CASSAR, A. et al .Chronic Coronary Artery Disease: Diagnosis and Management. **Mayo Clinic Proceedings**.V. 84, p. 1130–1146, 2009.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**. V.15, p.532-534,1993.

COLOMBO, M. G. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease. **Clinical Chemistry**. V. 49, p. 389-395, 2003.

DIMOVSKI, K., ORHO-MELANDER, M. & DRAKE, I. A favorable lifestyle lowers the risk of coronary artery disease consistently across strata of non-modifiable risk factors in a population-based cohort. **BMC public health**. V. 19, 2019

DUSSE L. M. S., VIEIRA L. M., CARVALHO M. G. **Revisão sobre óxido nítrico**. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial* [online]. V. 39, p.343-350, 2003.

ERDMANN, J. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. **Cardiovascular research**. V. 114, p. 1241-1257, 2018.

FALK, E., SHAH, K. P., FUSTER, V. CORONARY PLAQUE DISRUPTION. **Journal of the American Heart Association**. V. 92, p. 657–671, 1995.

GAUDEL, P. et al.Lifestyle-related risk factors among patients with coronary artery disease in Nepal. **Scandinavian Journal of Caring Sciences**. 2019.

HAN Y, et al. T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. **Pharmacology**. V. 85, p. 211-216, 2010.

HUANG, S. et al. AhR expression and polymorphisms are associated with risk of coronary arterial disease in Chinese population. **Scientific Reports**. V. 5, p. 8022, 2015.

KAISER, S. E. Aspectos epidemiológicos nas doenças coronariana e cerebrovascular. **Revista da SOCERJ**. V. 17, p. 11-18,2004

KIUCHI, M. G. et al. New Approaches in the Management of Sudden Cardiac Death in Patients with Heart Failure-Targeting the Sympathetic Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**. V.20, p. E2430, 2019.

KNOWLES, R. G., MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**. V. 298, p. 249-258, 1994.

LIU D, et al. Association between the- 786T > C 1polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. **Gene**. V. 545, p.175-183, 2014.

LLOYD-JONES, D. M. et al .Lifetime risk of developing coronary heart disease. **The Lancet**. V. 353, p.89-92, 1999.

MAHMOODI K., SOLTANPOUR M. S., KAMALI K. Assessment of the role of plasma nitric oxide levels, T-786C genetic polymorphism, and gene expression levels of endothelial nitric oxide synthase in the development of coronary artery disease. **Journal of Research in Medical Sciences** 22:34. 2017.

MIRANDA, G. M. D., MENDES, A. C. G. & SILVA, A. L. D. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. V. 19, 2016.

NIEMEIJER, M. N. et al. Declining incidence of sudden cardiac death from 1990-2010 in a general middle-aged and elderly population: The Rotterdam Study. **Heart Rhythm**. V. 12 p. 123-129. 2015

NOGUEIRA, I.C *et al.* Efeitos do exercício físico no controle da hipertensão arterial em idosos: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, 2012.

NOVAIS, I. P. et al. Associação entre o polimorfismo do gene da óxido nítrico sintase na posição 786T>C com os níveis plasmáticos de triglicérides em mulheres. **Revista Digital Buenos Aires**. V. 15, 2010.

NCBI.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA400167> ID: 400167 **Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Whole Genome Sequencing (WGS) Project**. Acesso em 13/06/19.

PACHER, P., BECKMAN J.S. & L. LIAUDET. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**. V. 87, p. 315–424, 2007.

POLANCZYK, C. A. & RIBEIRO J. P. Coronary artery disease in Brazil: contemporary management and future perspectives. **Heart**. V. 95 p. 870-876, 2009

RAI H. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: An updated meta-analysis and systematic review. **PLOS ONE**.V. 9, p. E113363, 2014

RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. **International Journal of Preventive Medicine**. V.5, p. 927.946, 2014.

RIBEIRO, A. L. P. et al. Cardiovascular Health in Brazil Trends and Perspectives. **Circulation**. V. 133, p.422-433, 2016.

ROSSI, G.P. *et al.* The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. **Journal of American College of Cardiology**, v. 41, n. 6, p. 930-7, Mar. 2003.

SANIDAS, E. A & DANGAS, G. D. “Nothing Aches Like A Heart”. **Hellenic Journal of Cardiology**. 2019.

SCHLATTER, R. P., HIRAKATA, V. N. & POLANCZYK, C. A. Estimating the direct costs of ischemic heart disease: evidence from a teaching hospital in BRAZIL, a retrospective cohort study. **BMC Cardiovascular Disorders**. V. 17, p.180-191, 2017.

SERRANO, N. C. *et al.* Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. **Hypertension**. v.44, p.702–7, 2004.

TANGUREK B. *et al.* The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. **Heart Vessels**. V. 21, 285-290, 2006.

VILAS-BOAS, W. *et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase (-786T>C) and Endothelin-1 (5665G>T) Gene Polymorphisms as Vascular Dysfunction Risk Factors in Sickle Cell Anemia. **Gene Regulation and Systems Biology**. V. 10, p. 67-72, 2016.

WU, M. Y. *et al.* New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **International Journal of Molecular Science**. V. 18, p. E2034, 2017.

YIN, Y. W. *et al.* Association between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and the Risk of Coronary Artery Disease in Chinese Population: Evidence from a Meta-Analysis of 40 Studies. **PLOS ONE**. V. 8, p. E66924, 2013.

ZHANG, Q. *et al.* Association between interleukin-8 gene -251 A/T polymorphism and the risk of coronary artery disease: A meta-analysis. **Medicine** .V.98,p. e14715. 2019.

8. ANEXO I:

Termo de Consentimento Informado

Título do estudo: *Polimorfismos de Genes do Sistema Renina-Angiotensina, do gene da eNOS e atividade das angiotensinas – II e 1,7 na Doença Arterial Coronariana.*

Este estudo tem o objetivo de avaliar alguns polimorfismos gênicos do sistema renina-angiotensina, do gene da eNOS e a atividade das Angiotensinas II e 1,7, no desenvolvimento da doença aterosclerótica coronária.

Para esta investigação, é necessário a coleta de dois tubos de 3 ml de sangue periférico, empregando-se material descartável. Não há desconforto ou risco adicional nestes procedimentos, pois já fazem parte da rotina clínica e laboratorial.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames bioquímicos e de DNA.

É importante enfatizar que os resultados obtidos terão apenas implicação diagnóstica e não terapêutica.

Se você concordar em participar do estudo isto não vai implicar em nenhuma vantagem pessoal ou financeira para você ou para a sua família. Garantimos ainda que todos os seus dados são confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações que poderão ser usadas apenas para esta pesquisa e publicações científicas.

Você pode se recusar a participar do estudo ou mesmo retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isto altere o seu tratamento no Hospital das Clínicas.

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o decorrer do estudo ou obter informações diretas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFU, situado na Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Bloco A - Sala 224-Campus Santa Mônica Avenida João Naves de Ávila, 2121 Santa Mônica - Uberlândia - MG 38400-098. Além disso, você poderá obter com os pesquisadores, por meio do telefone : (34)- 3218 2200 ou email; os resultados conseguidos no estudo.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento e se quiser, antes de assiná-lo, poderá consultar alguém de sua confiança.

Os pesquisadores podem decidir sobre a sua saída do estudo por razões científicas, sobre as quais você será devidamente informado

▪ **Termo de consentimento**

Eu,

_____ voluntariamente, aceito participar desta pesquisa, realizada no Instituto de Ciências Biomédicas e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Pelo presente termo apresentado,

Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Paciente _____

Médico responsável _____

Local e Data: _____, ____ de _____ de 2016

Testemunhas:

9. ANEXO II:**Parecer do comitê de ética:****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Polimorfismos Genéticos na Doença Coronariana

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Versão: 3

CAAE: 01736412.9.0000.5152

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 189.679

Data da Relatoria: 01/02/2013