

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

***Polimorfismos de Genes do Sistema
Renina-Angiotensina na Doença Arterial
Coronariana***

MESSIAS ANTÔNIO DE ARAÚJO

UBERLÂNDIA – MG

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
616.132.2
A653-P
TES/MEM

***Polimorfismos de Genes do Sistema
Renina-Angiotensina na Doença Arterial
Coronariana***

Aluno: Messias Antônio de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia para obtenção do Título de Doutor
em Genética e Bioquímica (Área de Genética)

UBERLÂNDIA - MG

2003

DEDICATÓRIA

Este trabalho eu dedico aos homens e mulheres que, no passado,
por meio de seus genes, trouxeram-me a esta vida, deixando suas marcas
a ferro e brasa para que se eternizassem, tornando possível a realização deste
estudo: meus avós paternos Messias Dias de Araújo, Adorama Naves Araújo
e maternos Antônio Ferreira Trindade, Divina Trindade;
meus pais Aparecido de Araújo e Zuleide Trindade Araújo.
E às mulheres que atualmente são o estímulo para o meu viver: minha esposa,
Hozana e filhas Nina, Aline e Maíra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o trabalho e esforço incansável de meu orientador professor Luiz Ricardo Goulart que, com seu otimismo e idealismo sempre esteve ao meu lado, tornando possível a materialização de um sonho: correlacionar o nível molecular com a manifestação clínica da doença arterial coronariana e, possivelmente, contribuir para compreender parte do mistério que envolve essa enfermidade que ceifa milhares de vidas anualmente.

- Aos discentes: Bruno Soares Menezes, Clauber Lourenço, Rodrigo Américo pela valiosa contribuição.
- Às mestrandas: Elisângela Rosa Cordeiro e Renata Ríspoli Gatti
- Ao professor-doutor Heyder Silva Diniz pelo excelente trabalho estatístico.
- À enfermeira Maria Aparecida Lemes pelo trabalho de coleta de amostras.
- À minha sogra Benedita Amélia de Pádua pelo esforço na digitação.
- À minha irmã Adorama Araújo Gonçalves pela tradução para o inglês.
- Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Índice

Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	x
Sumário Geral	x
General Abstract	xiv
Introdução Geral	1
Fundamentos	1
Mecanismos bioquímicos da aterosclerose coronariana.....	5
Mecanismos moleculares potenciais na gênese da doença arterial coronariana	12
O sistema renina-angiotensina.....	12
Outros mecanismos moleculares potenciais.....	14
Implicações clínicas	18
Considerações gerais	20
Hipóteses	20
Justificativas.....	21
Objetivos	21
Referências Bibliográficas.....	22
Capítulo I: A variante M235T do gene do angiotensinogênio na doença arterial coronariana: estudo comparado em pacientes com e sem infarto agudo do miocárdio	34
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução	36
Métodos	37
Resultados	40
Discussão	48
Referências.....	51

Capítulo II: Análise do polimorfismo no intron 16 do gene da enzima	
 conversora de angiotensina na doença arterial coronariana ..	54
Resumo.....	54
Abstract.....	55
Introdução	56
Métodos	57
Resultados	60
Discussão	66
Referências.....	69
Capítulo III: O polimorfismo A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II	
 no infarto agudo do miocárdio.....	73
Resumo.....	73
Abstract.....	74
Introdução	75
Métodos	77
Resultados	81
Discussão	88
Referências.....	91
Capítulo IV: Interação entre os polimorfismos gênicos do sistema renina-	
 angiotensina no infarto agudo do miocárdio.....	94
Resumo.....	94
Abstract.....	96
Introdução	98
Métodos	101
Resultados	106
Discussão	112
Referências.....	116
Anexos	
Termo de consentimento informado.....	120
Definições de termos e medidas	121

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1 – Características dos pacientes e controles vs genótipos do AGT	42
Tabela 2 – Fatores de risco vs genótipos do AGT	43
Tabela 3 – Fatores de risco controles vs genótipos do AGT	45
Tabela 4 – Análise estatística: DAC vs controles e IAM vs sem IAM	46
Tabela 5 – Análise de severidade da DAC vs genótipos	47

Capítulo II

Tabela 1 – Fatores de risco coronarianos: DAC vs controles	61
Tabela 2 – Fatores de risco coronarianos: controles vs genótipos da ECA	62
Tabela 3 – Fatores de risco coronarianos: DAC vs genótipos	63
Tabela 4 – Análise da frequência alélica e odds ratio: DAC vs controles e infarto vs controles	64
Tabela 5 – Fatores de risco: IAM vs genótipos da ECA	64

Capítulo III

Tabela 1 – Fatores de risco nos pacientes com IAM vs controles	81
Tabela 2 – Fatores de risco nos controles vs genótipos do AT1R	83
Tabela 3 – Fatores de risco: IAM vs genótipos do AT1R	84
Tabela 4 – Distribuição e análise estatística do AT1R: IAM vs controles	85
Tabela 5 – Análise estatística da severidade: DAC vs genótipos do AT1R	86

Capítulo IV

Tabela 1 – Fatores de risco coronariano nos infartados e controles	106
Tabela 2 – Distribuição dos genótipos do AGT, ECA, AT1R	108
Tabela 3 – Análise de regressão logística: fatores de risco e genótipos	109

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1 – Eventos moleculares envolvidos na gênese da DAC	6
Figura 2 – Via de síntese das angiotensinas	7
Figura 3 – Rotas metabólicas do sistema renina-angiotensina	13

Capítulo I

Figura 1 – Eletroforese da genotipagem da variante M235T do AGT	41
Figura 2 – Estimativa do risco (<i>Odds Ratio</i>) de DAC.....	44

Capítulo II

Figura 1 – Foto do gel de agarose do gene da ECA	60
Figura 2 – Estimativa do risco (<i>Odds Ratio</i>) de apresentar DAC e IAM	65

Capítulo III

Figura 1 – Gel de restrição enzimática do gene do AT1R	82
Figura 2 – Estimativa do risco (<i>Odds Ratio</i>) de apresentar IAM do AT1R.....	87

Capítulo IV

Figura 1 – Estimativa do risco de apresentar infarto do AGT, ECA, AT1R.....	110
Figura 2 – Estimativa do risco de IAM dos duplo homozigotos favoráveis	111
Figura 3 – Estimativa do risco de IAM dos alelos desfavoráveis	112

Lista de abreviaturas

AGT	angiotensinogênio
Ang	angiotensina II
AT1R	receptor tipo 1 da angiotensina II
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cm	centímetro(s)
DAC	doença arterial coronariana
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTO-5'	5'-desoxicitosina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP5'	5'-desoxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dnase	desoxirribonuclease
dNTPs	dexoxirribonucleotídeos trifosfato
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
ECA	enzima conversora de angiotensina I
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
IAM	infarto agudo do miocárdio
Kb	kilo-bases
KCl	cloreto de potássio
M	molar
mg	miligrama(s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mm	milímetro(s)
ng	nanograma
nm	nanômetro(s)
pb	pares de base
pmoles	pico-moles
RNA	ácido ribonucléico
RNA-m	ácido ribonucléico mensageiro
TBE	tris-borato - EDTA
U	unidade(s)
UV	ultravioleta
V	volts
Vs	<i>versus</i>
X	vezes
µg	micrograma
µL	microlítro(s)
µM	micromolar

Sumário Geral

O sistema renina-angiotensina (SRA) apresenta uma função primordial na homeostasia cardiovascular. A angiotensina II é o peptídeo chave do SRA e exerce influência no coração e na circulação por meio de seus efeitos hemodinâmicos (via influência na pré e pós-carga e determinando vasoconstricção coronariana) e através de efeitos celulares diretos (via ações sobre a proliferação celular). Numerosos estudos, nos últimos anos, têm demonstrado que a inibição farmacológica da enzima conversora de angiotensina (ECA) e o bloqueio dos receptores AT1 da angiotensina II (AT1R) aumentam a quantidade e a qualidade de vida dos portadores de hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca e doença isquêmica do coração. Estes estudos sugerem que o papel do SRA é o maior determinante de risco cardiovascular. Resultados recentes indicam que os fatores genéticos podem contribuir modulando os efeitos da angiotensina II sobre a fisiologia da circulação coronariana e da isquemia. Este estudo fez uma revisão das características fisiológicas e patológicas do SRA, particularmente dos aspectos genéticos e suas implicações na doença arterial coronariana (DAC).

Está bem comprovado na literatura que os fatores de risco clássicos para a doença arterial coronariana como antecedente familiar de coronariopatia, níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides, baixos níveis de colesterol HDL, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes melito, sedentarismo e obesidade podem explicar apenas 50% da sua etiologia, sendo que a modificação destes inibe a progressão da aterosclerose em apenas 40% dos pacientes. Assim, a procura de outros mecanismos participantes na gênese da aterosclerose é necessária para elucidar melhor a associação entre os vários fatores genéticos e a sua expressão fenotípica.

No primeiro capítulo foi avaliado, em 305 indivíduos de raça branca, o efeito do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (AGT) na DAC, na severidade da lesão aterosclerótica nas artérias coronárias e o seu papel no risco de desenvolver o infarto agudo do miocárdio (IAM).

Foram investigados 201 pacientes com DAC comprovada pela angiografia (lesão obstrutiva > 50%), sendo 110 com IAM e 91 sem IAM e 104 indivíduos

controles com artérias coronárias, angiograficamente, normais. A severidade da DAC foi avaliada pelo número de vasos lesados, morfologia da placa aterosclerótica e escore de risco coronário. O polimorfismo M235T do gene do AGT foi analisado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A hipertensão arterial, o tabagismo, o diabetes melito, a obesidade e os níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL predominaram nos pacientes com DAC. As frequências dos genótipos TT, MT e MM do AGT não foram estatisticamente diferentes entre os pacientes com DAC e controles, bem como nos grupos de infartados e não infartados. O risco relativo, *Odds Ratio* (OR), de desenvolver DAC e de ter IAM avaliado entre os genótipos TT vs MM, MT vs MM e TT+MM vs MM não foi significativo. Os critérios de severidade da aterosclerose coronariana no grupo de pacientes com DAC não tiveram correlação com os genótipos; estes resultados também foram encontrados na comparação dos grupos de infartados e não infartados. Este estudo concluiu que não há associação entre o polimorfismo M235T do gene do AGT com a DAC, com a sua severidade e nem com o IAM.

No segundo capítulo foi investigada a associação do polimorfismo I/D do gene da ECA com a DAC e o IAM na mesma população do estudo da variante M235T do AGT, utilizando-se, também, a técnica da PCR.

Dentre os fatores de risco coronariano clássicos somente o tabagismo, o diabetes melito, os níveis elevados de colesterol total e LDL e a hipertensão arterial predominaram no grupo com DAC. A distribuição dos genótipos entre os grupos com DAC e controles teve diferença estatística ($p = 0,009$), porém sem aumentar o risco de desenvolvê-la quando foram comparados os genótipos DD vs II (OR = 0,69; IC-95%: 0,36 – 1,34) e ID vs II (OR = 1,60; IC-95%: 0,81 – 3,14). Na comparação entre os pacientes com IAM e os controles os resultados foram similares; também foram estatisticamente significantes ($p = 0,011$) e não aumentou a chance de apresentar IAM. Finalmente, concluiu-se não haver evidência de associação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA com a DAC e o IAM.

No terceiro capítulo foi avaliada a associação do polimorfismo A1166C do gene do AT1R com o IAM e a severidade da DAC em 110 pacientes com IAM e lesão obstrutiva coronária significativa ($> 50\%$). Os controles foram 104 indivíduos

com artérias coronárias normais. O polimorfismo foi determinado por meio da PCR no DNA dos leucócitos do sangue periférico.

Os fatores de risco coronariano clássicos também foram analisados; destes, apenas o tabagismo teve predominância nos heterozigotos AC ($p = 0,02$). A distribuição dos genótipos nos pacientes infartados foi similar e não significativa em relação aos controles. Não houve aumento do risco de IAM nas comparações dos genótipos CC vs AA, AC vs AA e AA+AC vs AA. Nenhum dos critérios de severidade teve associação positiva com os genótipos. Portanto, concluiu-se não haver associação do polimorfismo A1166C do AT1R com o IAM e nem com a severidade da DAC.

O quarto capítulo analisou a interação entre os polimorfismos M235T do gene do AGT, I/D do gene da ECA e A1166C do gene do AT1R e o IAM. Foram investigados 110 pacientes com IAM com lesão coronaria significativa ($> 50\%$) e 104 indivíduos controles com coronárias angiograficamente normais. Os polimorfismos foram analisados pela PCR no DNA dos leucócitos.

A análise de regressão logística múltipla entre os fatores de risco coronariano clássicos e os polimorfismos M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AT1R demonstrou que o tabagismo, a história familiar, a hipertensão arterial e o colesterol estiveram associados a um maior risco de IAM. As frequências dos genótipos M235T do AGT foram semelhantes entre os pacientes infartados e controles; a chance de desenvolver IAM não foi diferente entre eles. Não houve associação dos genótipos da ECA com o risco relativo de desenvolver IAM como, também, nos genótipos do AT1R.

A combinação dos duplos homozigotos (MMII) dos genes do AGT e da ECA apresentou um menor risco de ter IAM ($OR = 0,34$) e as combinações genotípicas que incluem no mínimo um alelo desfavorável (T ou D), a chance de apresentar IAM foi 2,92 vezes maior em relação a estes. Resultados semelhantes foram encontrados nas associações dos genes do AGT – AT1R com os duplos homozigotos (MMAA) com um menor risco de IAM ($OR = 0,38$) e as demais combinações de alelos desfavoráveis com chances 2,63 vezes maior em relação aos MMAA. Na associação ECA – AT1R o risco dos duplos homozigotos também foi menor ($OR = 0,37$) e as demais combinações de alelos desfavoráveis

apresentou chances 2,68 vezes maior em relação aos homozigotos IIAA. Não houve interação positiva quando foram associados os genótipos dos três genes.

O presente estudo concluiu que há um maior risco de IAM quando houver associação gene a gene de alelos desfavoráveis e um menor risco na associação de duplos homozigotos favoráveis dos polimorfismos M235T do gene do AGT, I/D do gene da ECA e A1166C do gene do AT1R.

São muitos os mecanismos moleculares potenciais na gênese da DAC, no entanto estão cada vez mais evidentes as suas interações nessa complexa enfermidade de alta prevalência e de conseqüências clínico, econômico e social tão relevantes. O objetivo mais ambicioso da medicina preventiva é a implementação dos testes genéticos na profilaxia do IAM e da medicina clínica, é a terapia gênica que, esperamos, estejam brevemente disponíveis para uso clínico, tornando-se importante ferramenta para o cardiologista adotar a terapêutica mais adequada para o seu paciente.

General Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) plays a central role in cardiovascular homeostasis. The angiotensin II is the key peptide of the RAS and exerts its influence on the heart and blood vessels through its hemodynamic effects (via its influence on after-load and pre-load determining coronary vasoconstriction) and through the direct cell effects (via actions on cell proliferation). Numerous studies in the past ten years have demonstrated that the pharmacological inhibition of angiotensin converting enzyme and the block on the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) have improved the outcome and the life quality in patients with systemic arterial hypertension, heart failure and ischaemic heart disease.

These studies have suggested that the RAS is the highest cardiovascular risk determinant. Current results have demonstrated that the genetic factors may contribute to modulating the effects of the angiotensin II on coronary circulation physiology and on myocardial ischaemia. This study has taken some review of the RAS pathological and physiological characteristics, particularly on the genetic aspects and their consequences in the coronary artery disease (CAD).

It is well proved by the literature that the classical risk factors to the CAD such as: CAD familiar antecedent, high levels of total cholesterol, LDL cholesterol as well as triglycerides; low levels of HDL cholesterol, tabagism, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, sedentarism and obesity may explain only 50% of its ethiology. So the modification of them may inhibit the development of the coronary atherosclerosis disease in only 40% of all patients. Therefore, the search for other mechanisms in the atherosclerosis genesis is necessary in order to clarify the association among several genetic factors and their phenotypic expression.

In the first chapter it was evaluated the M235T variant of the angiotensinogen on CAD effect in 305 white people, the severity of the atherosclerosis disease in the coronary arteries and its risk in developing the acute myocardial infarction (AMI).

There were 201 patients with proved CAD by a coronary angiography (obstructive lesion > 50%). From this group 110 patients were with AMI and 91 were without it. There were also 104 control individuals with angiographically normal coronary arteries. The CAD severity was analyzed by the number of

diseased vessels, atherosclerotic plaque morphology and the jeopardy score. The M235T angiotensinogen polymorphism was analyzed by the polymerase chain reaction (PCR).

The arterial hypertension, tabagism, diabetes mellitus, obesity and the high levels of total and LDL cholesterol have predominated in the CAD patients. The genotypes frequencies TT, MT and MM of the AGT have been statistically different neither between CAD patients and controlled ones, nor between infarcted and non infarcted patients. The CAD and AMI relative risk (OR) analyzed between TT vs MM, MT vs MM and TT+MM vs MM genotypes presented no significance. The coronary atherosclerosis severity criteria in the CAD patients had no correlation with genotypes. These results were also found in the comparison between infarcted and noninfarcted groups. This study has concluded that there is no association between the M235T gene AGT polymorphism and CAD, neither with its severity nor with the AMI.

In the second chapter the association among polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene, CAD and acute myocardial infarction (AMI) in the same population of the study of the M235T variant of the AGT have also been investigated through PCR.

Among the classical coronary risk factors only tabagism, diabetes mellitus, high total cholesterol and LDL levels and arterial hypertension have predominated in the CAD group. Frequency distribution of genotypes between CAD groups and the controls had statistic difference ($p = 0.009$); however, there was no risk of developing it when the DD II genotypes were compared ($OR = 0.69$; $CI-95\%: 0.36 - 1.34$ and ID II ($OR = 1.60$; $CI - 95\%: 0.81 - 3.14$). In the comparison between the AMI patients and the controlled ones the results were similar; they were also statistically significant ($p = 0.011$) and there was no increasing risk of presenting AMI. Finally, it was concluded that there is no evidence of association between the I/D ACE gene polymorphism with CAD and AMI.

In the third chapter it was analyzed the A1166C angiotensin type 1 gene receptor (AT1R) polymorphism association with the AMI and the CAD severity in 110 patients with AMI and significant coronary obstructive lesion ($> 50\%$). The

controls were 104 individuals with normal coronary arteries. The polymorphism was determined through PCR in the peripheral blood leukocytes.

Classical coronary risk factors have also been analyzed from these ones, only the tabagism has predominated in AC heterozygotes ($p = 0.02$). Genotypes distribution in infarcted patients was similar and there was no significant difference related to controls. There was no AMI increasing risk in CC vs AA, AC vs AA and AA+AC vs AA genotypic comparisons. No severity criteria have had positive association with genotypes. Therefore, it was concluded that there was no association between either A1166C AT1R polymorphism and AMI or with CAD severity.

The fourth chapter has analyzed the interaction between M235T AGT gene, I/D ACE gene and A1166C AT1R gene polymorphisms and the AMI. There were 110 AMI patients with significant coronary artery lesion ($> 50\%$) and 104 controls with angiographically normal coronary arteries. The polymorphisms were analyzed by PCR in DNA of peripheral blood leukocytes.

The analysis of multiple logistic regression between the classical coronary factors and M235T of AGT, I/D of ACE and A1166C of AT1R polymorphisms have demonstrated that tabagism, family history, arterial hypertension and total cholesterol have been associated to the AMI risk. The M235T AGT genotypes frequencies were similar to each other between the infarcted patients and controls; the risk of developing AMI was not different between them. There was not ACE genotypes association with the relative risk of developing AMI as well as the AT1R genotypes.

Double homozygote combination of the AGT and ACE genes (MMII) has presented less AMI risk ($OR = 0.34$) and the genotypes combinations that include at least one unfavourable allele (T or D), the risk of presenting AMI was 2.92 times higher. Similar results were found in the AGT – AT1R genes associations with double homozygotes (MMAA) with less risk ($OR = 0.38$) and the other unfavourable alleles combinations with risk of 2.63 fold greater. In the ACE – AT1R association the risk of double homozygotes was also lower ($OR = 0.37$) and the other unfavourable alleles combinations have presented risk 2.68 times higher. There was not any positive interaction when the three gene genotypes were associated among themselves. In conclusion there is higher risk of AMI whenever

there is unfavourable alleles gene to gene association and lower risk in the double favourable homozygote association of polymorphisms M235T of AGT, I/D of ACE and A1166C of AT1R.

There are several potential molecular mechanisms in CAD, however it is getting more and more evident their interactions in this complex disease of high prevalence and clinical, economic and social consequences have been quite relevant. The most ambitious goal in preventive Medicine is the establishment of genetic tests in the prevention of myocardial infarction while in clinical Medicine it is the genetic therapy that will be available to clinical use the soonest it seems to be. So it becomes an important tool in order that the cardiologist adopts the most adequate treatment for his patient.

Introdução Geral

Fundamentos

A incidência da enfermidade cardiovascular experimentou um grande crescimento durante a primeira metade do século XX. Este crescimento não foi consequência da diminuição das doenças infecciosas, senão por um reflexo da adoção de hábitos de vida prejudiciais¹. Pode-se afirmar que a enfermidade coronariana é própria da civilização moderna. Ao observarmos os dados estatísticos, poderia parecer que nos últimos anos a mortalidade coronariana teria diminuído consideravelmente, porém seria mais exato dizer que houve um retardo de 10 anos. Assim, a enfermidade coronariana continua sendo a primeira causa de morte nos países desenvolvidos. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, seis milhões de pessoas morrem anualmente de doenças cardiovasculares, sendo três de cada quatro mortes. Calcula-se que no ano 2020 será a principal causa de morte em todo o mundo².

Os paradigmas atuais que norteiam o manuseio da cardiopatia isquêmica são:

- angina de peito: desequilíbrio entre a demanda e a oferta de oxigênio miocárdico;
- anatomia coronária: o conceito de que lesões de artérias coronárias epicárdicas com mais de 50% de estenose podem gerar isquemia, em situações de aumento de consumo de oxigênio miocárdico;
- isquemia induzível: a isquemia miocárdica pode ser induzida por teste de esforço e outros estímulos, sendo detectada por alterações eletrocardiográficas, alterações da função sistólica ou diastólica do ventrículo esquerdo ou, ainda, por estudos de perfusão miocárdica;
- trombose coronariana: o trombo oclusivo coronário é considerado consequência do processo de instabilização e ruptura da placa ateromatosa;
- tônus coronariano: a vasoreatividade é influenciada por alterações no tônus do leito vascular mediadas por fatores neurais, metabólicos e miogênicos, bem como por substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras liberadas pelo

endotélio, podendo ser um fator desencadeante da instabilização das lesões culpadas na angina instável e na isquemia, na ausência de lesões ateroscleróticas;

- bloqueio beta-adrenérgico: após o infarto agudo do miocárdio (IAM), ocorre uma ativação do sistema nervoso simpático e redução do tônus parassimpático, que pode ser documentado por estudos da variabilidade da frequência cardíaca, caracterizando um risco aumentado para eventos coronários³;
- remodelamento ventricular: estudos em animais⁴, demonstraram que a dilatação ventricular pós-IAM poderia ser minimizada com a administração de um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, resultando em redução da mortalidade. Posteriormente, os mesmos autores comprovaram que a administração do inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA) a seres humanos com IAM de parede anterior, atenuava a dilatação progressiva da cavidade ventricular^{5,6};
- radicais livres: moléculas de colesterol LDL, após sofrerem modificações oxidativas, atuam como partículas para a ligação com receptores de varredura de macrófagos, que se transformam, então, em células espumosas que fagocitam lipídios. Estas são as lesões precursoras do processo aterosclerótico. Além disso, partículas oxidadas de colesterol LDL servem como quimiotáticos para monócitos, são citotóxicas e atuam como imunógenos⁷. Adicionalmente, partículas de LDL minimamente oxidadas e que não são reconhecidas pelo receptor de varredura apresentam uma capacidade quimiotática própria para monócitos, por sintetizarem proteínas quimiotáticas que podem ser importantes nos estágios incipientes da aterogênese⁸.

A discussão dos paradigmas atualmente utilizados leva, claramente, à conclusão de que o manuseio da cardiopatia isquêmica é ainda muito impreciso. Porém, um grande avanço será dado com o melhor entendimento da fisiopatologia e o desenvolvimento de novos paradigmas, tais como:

- gatilhos para a indução de síndromes isquêmicas: identificados com base em estudos observacionais que determinaram o padrão circadiano de aparecimento dos eventos coronários ocorrendo, predominantemente, no período matutino no qual ocorreriam diversas modificações de variáveis

fisiológicas como frequência cardíaca, pressão arterial, resistência vascular periférica, agregabilidade plaquetária, viscosidade sangüínea, concentração de catecolaminas e cortisol plasmáticos que estão aumentadas nas primeiras horas da manhã, com efeito potencial na ruptura da placa e formação de trombo coronário⁹;

- aterosclerose como doença inflamatória: Virchow *apud* Robbins et al¹⁰, no final do século XIX (1856), já sugeria a implicação do processo inflamatório na gênese da aterosclerose. A conversão de uma placa estável, com um prognóstico relativamente benigno, para um estado de instabilidade e ruptura, clinicamente associado à angina instável, IAM e morte súbita, tem sido relacionada à ativação da inflamação quiescente na lesão ateromatosa¹¹. Wal et al, demonstraram o estado de ativação de leucócitos e células musculares lisas adjacentes ao local de ruptura de placas coronárias de pacientes que morreram por IAM, através da abundante expressão de antígenos HLA-DR nestas células. Níveis séricos elevados de diferentes marcadores do processo inflamatório agudo têm sido documentados em pacientes com síndrome coronariana aguda;
- papel do endotélio: além de uma barreira mecânica na parede vascular, sabe-se que o endotélio desempenha múltiplas funções que visam regular o tônus vascular e o fluxo sangüíneo. Estando intacto, mantém a homeostase vascular e uma superfície não trombogênica, prevenindo a adesão de plaquetas e células inflamatórias. Por isto, distúrbios da sua função estão associados à vasoconstrição e fenômenos trombóticos;
- alterações celulares na patogênese da aterosclerose: sabe-se que as alterações funcionais precedem as modificações anatômicas que ocorrem na aterosclerose coronariana, que são conseqüência de moléculas de adesão do endotélio que atraem células inflamatórias, como monócitos e linfócitos T que, posteriormente, migrarão para o espaço subintimal¹² ;
- agentes infecciosos: estudos atuais demonstram que eles podem ser participantes potenciais da cadeia de eventos na patogênese da aterosclerose. Antígenos anti-citomegalovírus foram demonstrados em tecido arterial humano de pacientes com aterosclerose que, possivelmente, induziriam ativação de uma cadeia imunoinflamatória local¹³. A *Chlamydia pneumoniae* também é

reconhecida como possível participante do processo aterosclerótico, sendo demonstrada imuno-histologicamente nas placas ateromatosas¹⁴. Estas observações têm estimulado o desenvolvimento de estudos para avaliar o real significado clínico da associação entre infecção e aterosclerose.

- mecanismos moleculares como o gene do angiotensinogênio (AGT), o gene da ECA, o gene do receptor 1 da angiotensina II (AT1R) e outros, têm sido estudados como possíveis fatores de risco coronariano, independentes dos fatores classicamente reconhecidos¹⁵.

A importância dos fatores genéticos na patogênese da doença arterial coronariana (DAC) é sugerida pela freqüente associação familiar na doença prematura. Um grande número de estudos tem investigado a associação entre estes e a sua expressão fenotípica. Sabe-se que os fatores de risco clássicos para aterosclerose coronária como antecedente familiar de coronariopatia, níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides, baixos níveis de colesterol HDL, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes melito (DM), sedentarismo e obesidade podem explicar apenas 50% da sua etiologia, sendo que a modificação destes inibe a progressão da aterosclerose em apenas 40% dos pacientes¹⁶; assim, a procura de outros mecanismos participantes na gênese da aterosclerose é necessária¹⁷.

Estudos associando DAC a polimorfismos genéticos de proteínas vasculares como o AGT, a ECA, os receptores da angiotensina tipos I (AT1) e II (AT2), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), os fatores hemostáticos (fibrinogênio, protrombina, fatores II, V, VII e VIII da coagulação), o ativador do plasminogênio-1, o ativador tipo-tissular do plasminogênio, as glicoproteínas plaquetárias (GpP) IIb/IIIa, Ia/IIa e Ib-IX-V, a GpP Ib α , as apolipoproteínas e as citocinas envolvidas na proliferação celular (*transforming growth factor beta 1* – TGF- β 1, *tumor necrosis factor alpha* – TNF- α , *platelet growth factor receptor* - PGFR) têm revelado resultados interessantes¹⁸⁻²⁴. Evidências crescentes demonstram que a aterosclerose é uma doença imunologicamente mediada e que infecções crônicas podem ser agentes importantes na patogênese de síndromes coronarianas agudas, favorecendo o processo de aterosclerose e trombose pela elevação dos níveis sanguíneos de

fibrinogênio, leucócitos e citocinas e pela alteração do metabolismo e função das células endoteliais e macrófagos²⁵.

Os estudos correlacionando a expressão fenotípica da DAC a polimorfismos genéticos têm revelado resultados conflitantes. Isto é perfeitamente compreensível levando em consideração os seguintes aspectos: a natureza multigênica da DAC pela qual polimorfismos simples estão ligados para desempenhar um importante papel na expressão final da doença; os múltiplos mecanismos patogénéticos envolvidos nas complicações da placa ateromatosa (obstrução, ruptura, trombose, vasoespasmos) onde, cada um deles poderia ser influenciado por uma quantidade variável de genes e por vários fatores ambientais. Assim, um único polimorfismo gênico pode levar a resultados inconclusivos, devido a rotas metabólicas redundantes que substituem uma provável deficiência enzimática causada por este polimorfismo. Neste caso, pesquisas que demonstram o efeito de certas mutações isoladas são, provavelmente resultado de interações genotípicas complexas que podem ou não estar associadas a etnias específicas.

Os polimorfismos genéticos podem modificar os efeitos dos fatores de risco nas condições pré-clínicas e na doença. Os genes constitutivos possuem expressão gênica diferencial devido a polimorfismos herdados influenciando as principais rotas metabólicas. Os genes induzidos/reprimidos são altamente influenciados pelo ambiente e geralmente têm respostas complexas, pois envolvem vários genes e suas interações.

Dentre os possíveis eventos moleculares envolvidos na gênese da DAC os principais estão descritos na Figura 1.

1. Mecanismos bioquímicos da aterosclerose coronariana

O sistema renina-angiotensina – o AGT é uma glicoproteína (alfa-2-globulina) sintetizada e armazenada em pequenas quantidades no fígado sob controle positivo de estrógenos, hormônios glicocorticóides e tireoidianos e a angiotensina II (AII)²⁶. A renina, uma glicoproteína ácida sintetizada nas células justaglomerulares dos rins, uma vez liberada, age sobre a extremidade N-terminal do AGT formando o decapeptídico angiotensina I (AI). A AI é um pró-hormônio

inativo que, na circulação, sob a ação da ECA (convertase ou kininase II) que é uma peptidyl-dipeptidase, encontrada principalmente no pulmão, a hidrolisa convertendo-a, através da retirada de dois aminoácidos de sua extremidade C-terminal, num octapeptídico, a All, que é um hormônio potente e multifuncional²⁷. Essas reações da via clássica do SRA ocorrem no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, glândulas adrenais, ovários, músculo liso vascular e células endoteliais (Figura 2).

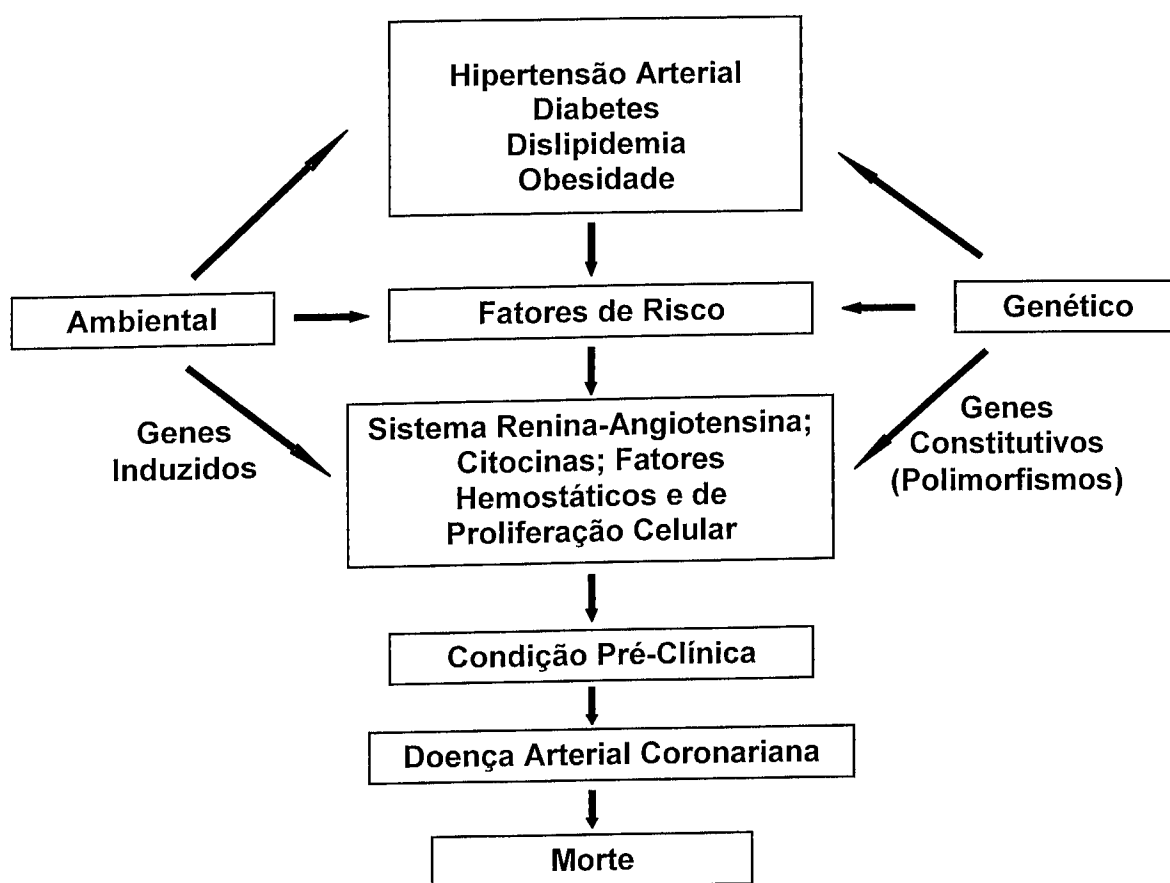


Figura 1. Eventos moleculares envolvidos na gênese da DAC.

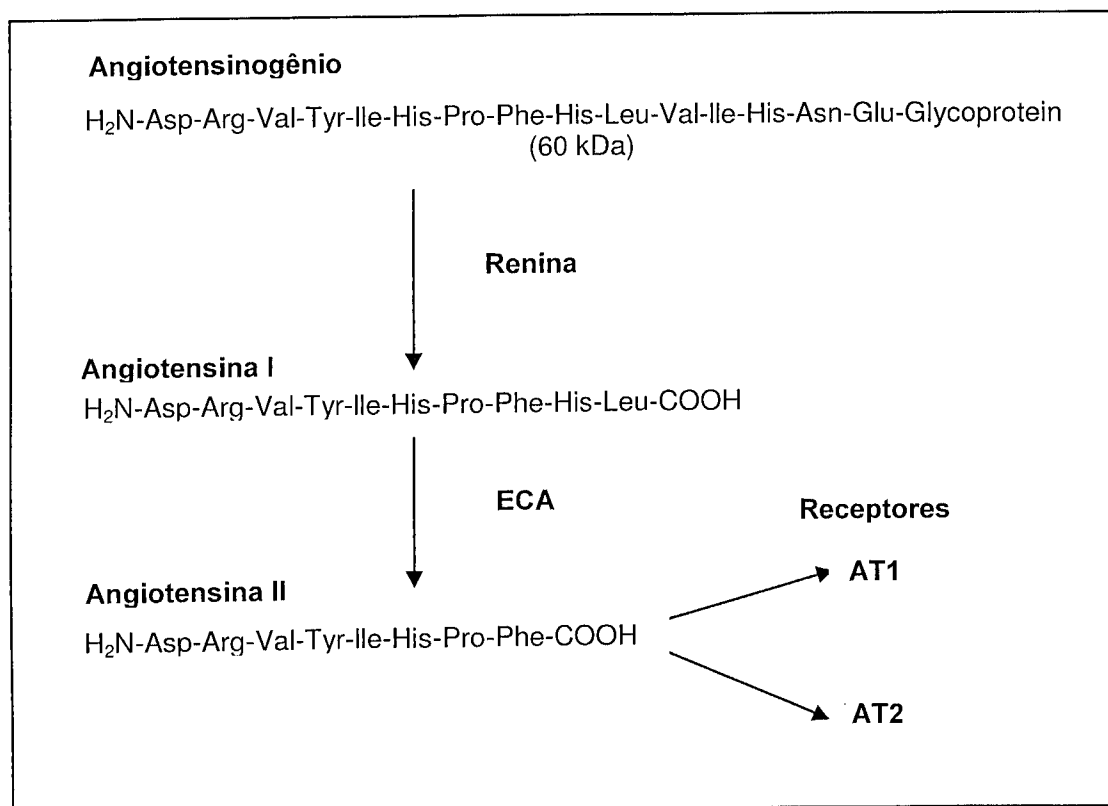


Figura 2. Via de síntese das angiotensinas a partir do angiotensinogênio.

A ECA cliva também a bradicinina em produtos inativos. A bradicinina é um potente estimulador dos receptores B2 nas células endoteliais relacionados à formação do óxido nítrico (ON) e prostraciclina. Além de seus efeitos vasodilatadores e de suas propriedades antiagregantes em nível de plaqueta, o ON inibe também a proliferação e a migração das células do músculo liso vascular. Em especial, a migração e a proliferação induzidas pela AII são reduzidas pelo ON. As propriedades biológicas do ON como vasodilatador e inibidor da ativação da agregação e adesão plaquetária, da invasão de monócitos e da proliferação e migração das células do músculo liso vascular são inibidas pela ação da AII.

A maioria dos efeitos fisiológicos da AII é mediada pela ativação de receptores do subtipo AT1, enquanto poucos efeitos, geralmente opostos àqueles desencadeados pela ativação de AT1, têm sido atribuídos à ativação de receptores AT2. Os receptores para a AII também pertencem à super família de receptores acoplados a proteínas G e, no caso dos receptores AT1, o acoplamento ocorre via proteínas Gq. Conseqüentemente, a estimulação de receptores AT1 ativa a fosfolipase C (PLC), aumenta os níveis de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3), eleva a concentração de Ca^{2+} intracelular e

promove ativação de várias quinases, modulando as funções celulares. A All também estimula o crescimento celular pela fosforilação de tirosina quinase e conseqüente ativação de proteínas envolvidas na transcrição do RNA. Entre as ações da All estão a contração e proliferação de células do músculo liso vascular, aumento da contratilidade e indução de hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona e liberação de vasopressina, ativação do sistema nervoso simpático e inibição da liberação de renina^{28,29}.

A proliferação endotelial – o endotélio mantém a estrutura da parede vascular e controla a passagem de pequenas e grandes moléculas e mesmo de células inteiras; controla a vasodilatação e a vasoconstrição local, seja em resposta a alterações do fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos; contribui, ainda, para a formação do coágulo na tentativa de reparar uma lesão vascular e também para a remoção do mesmo, se isso for necessário; promove o crescimento de novos vasos e a dilatação de colaterais quando o sangue precisa ser desviado para áreas isquêmicas; direciona, ainda, o sangue de capilares ou promove o seu fechamento quando não estão perfundidos. Entre os principais fatores endoteliais responsáveis pelo controle da proliferação vascular citam-se o óxido nítrico (ON), a endotelina (ET-1) e a angiotensina II. O ON modula o crescimento de células musculares lisas por mecanismos dependentes e independentes de GMP cíclico (monofosfato de guanosina)^{30,31}. Ele inibe o crescimento de células musculares lisas e esse efeito é mediado pela inibição de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular como Cdks (proteínas quinases dependentes de ciclina) e ciclinas (proteínas sem atividade enzimática, cujas concentrações variam de maneira cíclica, que ativam as Cdks), bem como pela ativação da proteína p21^{Cipl} (inibidor de Cdk)^{32,33}.

Doadores de ON têm sido utilizados para demonstrar os efeitos antiproliferativos do ON nas células de músculo liso. Análogos da L-arginina que inibem a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e, conseqüentemente, a produção de ON, como o L-NAME (L-nitro-arginina-metil-éster), também têm sido utilizados para se investigar os efeitos do ON^{34,35}. Como a inibição da eNOS por si só levaria a aumento da hipertrofia vascular e cardíaca, alguns autores sugerem que o L-NAME tem efeitos antiproliferativos independentemente da sua ação inibitória sobre a eNOS³⁶. O ON, além de inibir a

proliferação de células musculares lisas, inibe a produção de níveis basais de colágeno, inibe a divisão celular e a produção de matriz extracelular estimuladas por ET-1 e AII, além de estimular a apoptose, efeitos estes dependentes de GMP cíclico^{37,38}.

A ET-1 é considerada um mitógeno fraco em vários tipos celulares, mas é um potente agente indutor de crescimento/mitogênese em condições específicas ou em associação a fatores de crescimento³⁹. A ET-1 também influencia a deposição de matriz extracelular por estimular a síntese de colágeno, por diminuir a atividade de collagenases e metaloproteinases e por regular a migração e adesão celular através da indução de moléculas de adesão⁴⁰.

A AII atua como mitógeno em células de músculo liso vascular através da ativação de várias vias de sinalização, incluindo fosfolipase C (PLC), fosfolipase A₂ (PLA₂) e fosfolipase D (PLD), bem como pela ativação de um grande número de quinases: tirosinaquinases, MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), quinase c-src, Janus e receptores com atividade de tirosina quinase⁴¹. A AII também estimula fatores de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1), ativadores de transdução de sinal e transcrição (STATs) e o fator nuclear *kappa* B (NFkB)^{42,43}. Vários estudos demonstram que os efeitos proliferativos da AII são mediados pela ativação de receptores AT1 e que a ativação de receptores AT2 pela AII contribui para a inibição do crescimento celular e estimulação de apoptose, sendo um mecanismo contra-regulatório da ativação de AT1.

A aterogênese – adesão e a subsequente migração de leucócitos circulantes para a camada íntima são mecanismos precoces e importantes para o início e a progressão da aterogênese. Sugere-se que o denominador comum de todos os fatores de risco para aterosclerose seja a estimulação da quimiotaxia e a adesão leucocitária às células endoteliais^{44,45}. A adesão de leucócitos é coordenada por interações complexas entre glicoproteínas presentes na superfície dos leucócitos e seus correspondentes receptores nas células endoteliais. Muitas moléculas de adesão foram descobertas e elas podem ser subdivididas em três grupos: a família das selectinas: E- (ELAM-1), P- (GMP-140 e a L-selectina (LECCAM)); o grupo das integrinas: LFA-1 e MAC-1 (CD-11a/CD18 e CD11b/CD18) e a superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM). A interação inicial entre leucócito e endotélio é de baixa afinidade e se manifesta

como comportamento de rolar dos leucócitos. As selectinas são a família de moléculas que mediam esse comportamento. A L-selectina está normalmente expressa em muitos leucócitos circulantes enquanto seu ligante somente está presente no endotélio ativado. L-selectina deve ser destacada da superfície do leucócito ativado para que se possa passar para a etapa seguinte que é a de aderir firmemente ao endotélio (etapa importante para o processo de transmigração endotelial). Na etapa de aderência são expressas na superfície do leucócito as $\beta 2$ integrinas (CD11a, CD11b, CD11c que se ligam ao CD18) que interagem com as moléculas da superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM-1)^{46,47}.

Quando o endotélio é ativado em resposta a doenças inflamatórias por citocinas, no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, a expressão dessas moléculas aumenta marcadamente. Isoformas solúveis estão presentes na circulação e tem sido demonstrado que estão aumentadas em várias doenças. O aparecimento dessas moléculas no plasma pode ser resultado da ruptura de sua ligação à superfície endotelial. Como a sua expressão está sujeita a controle rigoroso, pois migração exagerada pode ser danosa, o nível aumentado das formas solúveis pode refletir inflamação/ativação endotelial e aumento da expressão na superfície celular^{48,49}.

A manutenção da função de barreira do endotélio vascular é crítica para a homeostasia e pode ser comprometida por mediadores inflamatórios, citocinas ou oxidantes. A expressão, secreção de fatores de crescimento e envolvimento na migração aumentada de células na parede vascular são mecanismos pelos quais a alteração da função endotelial contribui para a proliferação do músculo liso e formação da matriz extracelular^{50,51}.

A trombogênese – em condições normais, o endotélio forma uma superfície não trombogênica que impede a aderência de plaquetas e de outras células sangüíneas, bem como a ativação da cascata da coagulação. Essa propriedade de tromborresistência não é, ainda, completamente compreendida. Atualmente uma série de fatores coagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários são responsabilizadas por essa propriedade. O endotélio está em estreito e constante contato com agentes gerados na corrente circulatória que podem colocar em risco a integridade dos vasos sangüíneos e a homeostasia dos constituintes

sangüíneos. Está cada vez mais claro o conceito de que o endotélio representa mecanismo de defesa potente contra esses agentes e para isso expressa uma série de moléculas, constituindo-se essa em uma das suas principais funções como vasoprotetor e tromborresistente. Algumas dessas moléculas são expressas constitutivamente, enquanto outras são produzidas em resposta a estímulos. Algumas são expressas na superfície endotelial e outras são liberadas.

Entre as moléculas importantes fisiologicamente para suprimir a ativação plaquetária e a interação plaqueta-parede vascular encontram-se a ecto-ADPase, que é expressa na superfície endotelial, a prostaciclina (PGI_2) e o ON, que são secretados e agem de forma parácrina. O endotélio normal é capaz de manter nível basal constante de PGI_2 , enquanto a produção basal de ON ainda não está clara. Os estímulos que mantêm a síntese de PGI_2 e do ON constitutivamente são muitos, incluindo trombina, histamina, força de cisalhamento e mediadores lipídicos. A atividade ADPásica da superfície endotelial conferida pela ecto-ADPase é importante na degradação de ADP proveniente da agregação plaquetária, o que indica que essa enzima pode ter papel fisiológico importante limitando a extensão da agregação plaquetária⁵².

Entre as moléculas envolvidas no controle da coagulação incluem-se a trombo-modulina, moléculas semelhantes a heparina, fator de von Willebrand, proteína S e inibidor do fator tecidual, todas elas sintetizadas pelo endotélio e presentes na superfície endotelial. Além disso, o endotélio é o principal sítio de síntese e secreção do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) após estímulos como trombina, força de cisalhamento entre outros, e que promovem a fibrinólise. Para controlar a atividade do tPA o endotélio produz, ainda, o inibidor da atividade tPA⁵³.

2. Mecanismos moleculares potenciais na gênese da doença arterial coronariana

O sistema renina-angiotensina

A investigação da expressão gênica dos componentes do SRA tem evidenciado que os diversos polimorfismos gênicos e seus alelos mutantes têm implicações importantes na elevação dos níveis séricos, principalmente do AGT e da ECA^{54,55}. Em adição, o papel fisiológico do receptor AT1 da AII sugere que ele possa interagir com o polimorfismo da ECA influenciando no IAM, em nível endotelial e na remodelação miocárdica. Uma das formas terapêuticas que, comprovadamente, levaram a uma melhoria da morbi-mortalidade no IAM foi a introdução dos inibidores da ECA, que promovem um aumento dos níveis de AI circulante, assim como ocorre com a AII na vigência da utilização de antagonistas do receptor AT1. Conseqüentemente, a associação de inibidores da ECA e antagonistas AT1R promove vasodilatação e inibição da proliferação celular endotelial e miocárdica. O aumento dos níveis séricos de angiotensina I pode aumentar a atividade da sua via alternativa de metabolismo que está intimamente associada a endopeptidase neutra (NEP 24.11), enzima que possui função complexa na geração e metabolismo de peptídeos vasoativos. Ela atua inativando os peptídeos bradicinina, AII e o fator natriurético atrial formando o peptídeo Angiotensina 1-7 [Ang (1-7)] a partir da angiotensina I^{56,57}. Foi observado um aumento da Ang (1-7) durante a terapêutica com inibidores da ECA sugerindo uma alteração nas vias de geração e degradação de peptídeos da angiotensina na circulação de animais hipertensos⁵⁸. Estudos recentes demonstraram que a Ang (1-7) aumenta a vasodilatação induzida pela bradicinina⁵⁹ e produz hipotensão quando injetada, em presença de bradicinina, em ratos anestesiados⁶⁰, sugerindo que os sistemas caliceína-cininas e o SRA possam estar conectados pela interação entre Ang (1-7) e bradicinina, contribuindo assim, para o efeito vasodilatador produzido pelos inibidores da ECA (Figura 3).

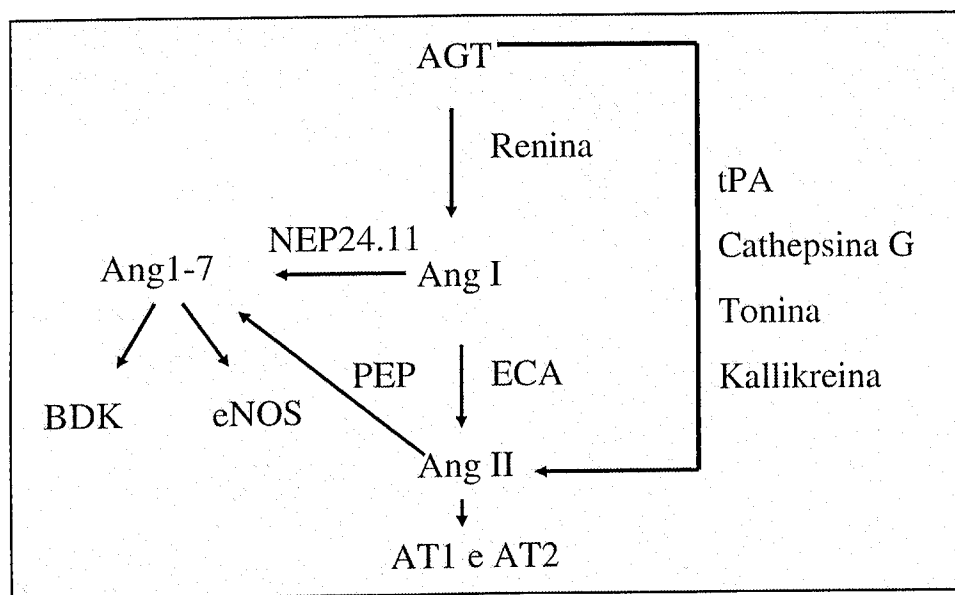


Figura 3. Rotas metabólicas do sistema renina-angiotensina. AGT (Angiotensinogênio), Ang I (Angiotensina I), Ang1-7 (Angiotensina 1-7), Ang II (Angiotensina II), AT1 (Receptor 1 da Angiotensina II), AT2 (Receptor 2 da Angiotensina II), BDK (Bradicinina), ECA (Enzima Conversora da Angiotensina), eNOS (Óxido Nítrico Sintase endotelial), NEP 24.11 (Endopetidase Neutra 24.11), PEP (Prolil-endorpeptidase), tPA (Ativador do Plasminogênio Tecidual).

O gene do angiotensinogênio – localiza-se no cromossomo 1q. Uma mutação no exon 2 desse gene possui a presença de treonina no lugar de metionina no resíduo 235 da proteína madura e é denominada de T235⁶¹. Ela está associada a HAS estando presente em aproximadamente 19% dos indivíduos da população ocidental⁶². Indivíduos portadores do genótipo homozigoto M235/M235 apresentam médias menores de nível de angiotensinogênio plasmático; os heterozigotos M235/T235 têm níveis intermediários e os homozigotos T235/T235 possuem as médias maiores do nível de angiotensinogênio plasmático⁶³. Estes apresentam um risco de doença cardiovascular duas vezes maior que os homozigotos M235/M235⁶⁴. A relação significativa observada entre estas variantes do AGT, seus produtos protéicos e os fenótipos da doença cardiovascular sustenta a evidência de um possível papel do AGT elevado circulante na patogênese da DAC.

O gene da enzima conversora de angiotensina – está localizado no cromossomo 17 e é caracterizado por um polimorfismo baseado na presença

(Inserção-I) ou ausência (Deleção-D) dentro do intron 16 de um par da base 287 seqüência repetida da Alu resultando em três genótipos: DD e II homozigotos e ID heterozigoto⁶⁵. O genótipo DD está associado com o dobro do nível da atividade sérica da ECA do que o genótipo II, e níveis intermediários nos heterozigotos. O estudo multicêntrico ECTIM⁶⁶ avaliou esse polimorfismo e constatou que o alelo D estava associado à história paterna de IAM fatal, e que era mais freqüente nos pacientes masculinos. O efeito co-dominante do alelo D foi comprovado pelo risco de infarto do miocárdio (IM), com riscos relativos de 1,57 para DD versus II e 1,26 para ID versus II. Em indivíduos considerados de baixo risco para IAM de acordo com os fatores de risco clássicos, o risco relativo de DD versus ID+II foi 2.7 ($p < 0,0005$)⁶⁷⁻⁶⁹.

O gene do receptor 1 da angiotensina II – com a clonagem do cDNA do receptor AT1 foi possível identificar um polimorfismo na região 3', não traduzível e correspondente a uma transversão A-C na posição do nucleotídeo 1166 da seqüência do mRNA. O polimorfismo A1166C do gene AT1R está associado com IM e hipertrofia ventricular esquerda. O alelo A e o genótipo AA atuam como efeito protetor sobre o desenvolvimento de DAC de manifestação prematura, enquanto o genótipo CC e o alelo C aumentariam o risco. O efeito protetor do genótipo AA é mais significativo que a ação predisponente do homozigoto CC^{70,71}.

3. Outros mecanismos moleculares potenciais

Fatores ligados à coagulação sanguínea e à agregação plaquetária – uma variação genética na região 3'-UTR do gene da protrombina substitui uma Guanina por Adenina no nucleotídeo 20210 e foi associada, recentemente, como um importante fator de risco para a DAC^{72,73}. Foi observado que pacientes com DAC apresentavam valores significativamente elevados do fragmento de protrombina F1+2⁷⁴.

Altos níveis plasmáticos do fator VII da coagulação têm sugerido uma maior mortalidade devido a DAC⁷⁵ e deve também influenciar um risco do IM familiar⁷⁶. O polimorfismo do gene do fator VII pode ter influência neste risco. Isto

é possível, pois seu efeito parece promover alterações nos níveis de fator VII⁷⁷. Foi descrita uma nova variação de alelo no intron 1a do gene do fator VII humano que está geralmente associado como efeito protetor em indivíduos com alelos de 10 pb e Q353 no promotor e na região catalítica do mesmo gene. Esta mutação intrônica, sozinha ou em associação com o polimorfismo do gene do fator VII, parece conferir maior proteção contra IM em indivíduos jovens⁷⁸.

Investigações clínico-angiográficas têm demonstrado o papel da formação do trombo na patogênese das síndromes coronárias agudas. O processo de formação do trombo é iniciado pela adesão das plaquetas aos vasos lesados que libera fatores de crescimento e leva à proliferação de células vasculares⁷⁹. A glicoproteína (Gp) IIb/IIIa tem papel fundamental na aterotrombose já que funciona como um receptor para fibrinogênio e fator de von Willebrand durante a agregação plaquetária^{80,81}. O polimorfismo inserção/deleção da Gp IIb/IIIa tem papel central na trombose arterial e pode estar associado ao aumento de risco de complicações trombóticas após implante de *stent* coronário⁸². O alelo PIA2 da Gp IIb/IIIa está associado ao IM em pessoas idosas. Pacientes com alelo PIA1/PIA2 apresentam maior risco da condição trombótica que pacientes com genótipo PIA1/PIA1⁸³, sendo que o primeiro está associado à trombose venosa⁸⁴. Isso é explicado por seu papel chave na agregação plaquetária e hiperplasia da íntima após trauma endotelial, estando, portanto, relacionado à progressão da DAC^{85,86}.

A formação de uma adesão estável entre células sangüíneas circulantes, tais como plaquetas e leucócitos, e um vaso lesado requer mecanismos de adesão especializados; e a adesão destas células é dependente de uma ligação inicial do complexo receptor Gp1b α - fator V - fator IX ao fator de von Willebrand⁸⁷. A Gp 1b α é o maior dos polipeptídeos do complexo Gp1b α V-IX e contém dentro da sua porção N-terminal o sítio de ligação ao fator de von Willebrand⁸⁸. Desempenha um papel fundamental na adesão e agregação das plaquetas, formação de trombos e hiperplasia da íntima após trauma endotelial estando, portanto, também relacionada à progressão da DAC^{89,90}.

A associação entre o genótipo da GP1b α e o risco de ocorrência de DAC foi encontrada em dois polimorfismos no gene que codifica esta glicoproteína. O principal é uma transição C/T que resulta em um dimorfismo de aminoácidos (Thr/Met) no resíduo 145 da cadeia α da GP1b, localizado dentro do domínio de

ligação ao fator de von Willebrand. As conseqüências funcionais destes dois polimorfismos no receptor ainda não estão bem estabelecidas.

O polimorfismo da apolipoproteína-E (ApoE), presença do alelo epsilon-4, parece influenciar o desenvolvimento da DAC e IM. Este risco também pode ser explicado por sua atuação nos níveis de trigliceremia. Fatores genéticos que contribuem para doenças isquêmicas do coração podem atuar em conjunto ou independentes. A ApoE é um exemplo independente de risco da DAC⁹¹, podendo também estar relacionado a reestenose pós-*stent*⁹². Um homozigoto E2 com hiperlipoproteinemia tipo III, que ocorre raramente na população, mas corresponde à cerca de 1% dos pacientes com IM, tem um risco aumentado para DAC, enquanto que o risco do homozigoto E2 com colesterol plasmático normal ou subnormal pode ser considerado menor que na população em geral⁹³. O polimorfismo 219GT da região regulatória de ApoE emerge como um novo fator de risco para IM⁹⁴. A influência da ApoE como fator de risco no IM parece se dar por meio de outros mecanismos, que não somente, nos efeitos da trigliceridemia pós-prandial⁹⁵.

O envolvimento da resposta imune – evidências crescentes demonstram que a aterosclerose é uma doença imunologicamente mediada, na qual a produção de citocinas aterogênicas e ateroprotetoras presta importante papel através da infiltração de células mononucleares⁹⁶. Citocinas, como TNF- α , participam da DAC e do IAM aumentando a lesão miocárdica, havendo, inclusive, correlação entre tamanho da área infartada e níveis de TNF- α ⁹⁷. Além disso, seus níveis estão aumentados em pacientes com risco para recorrência de eventos coronarianos⁹⁸. É possível que o TNF- α module o crescimento e a função dos miócitos e fibroblastos⁹⁹ e contribua para a resposta angiogênica em tecidos isquêmicos¹⁰⁰, além de induzir a apoptose de cardiomiócitos¹⁰¹.

Estudos que investigaram a expressão dos genes das interleucinas (IL), IL-10, IL-6, TNF- α e interferon-gama (INF- γ), por meio das técnicas semiquantitativas de PCR-Transcriptase Reversa (RT-PCR) em ratos transplantados, concluíram que citocinas Th2 (IL-10, IL-6, TNF- α) apresentaram níveis de expressão gênica cronicamente elevados, sugerindo ser um fator de promoção da DAC. Por outro lado, o INF- γ teve sua expressão máxima na fase aguda da doença diminuindo

rapidamente logo após¹⁰². No entanto, estudos envolvendo pacientes deficientes em INF- γ demonstram que ele é requerido para o surgimento da DAC¹⁰³.

O TGF- β 1 apresenta importante papel na modulação do crescimento celular, diferenciação, produção e degradação da matriz extracelular e está envolvido na fisiopatologia da DAC¹⁰⁴. A All estimula a expressão gênica da TGF- β 1 e a produção de proteínas por fibroblastos cardíacos o que pode agir como um estímulo para a formação de colágenos. A produção de TGF- β 1 por estas células pode modular o antagonista específico do receptor de All sugerindo um benefício potencial na prevenção e atenuação da fibrose miocárdica patológica¹⁰⁵. O TGF- β 1 é importante regulador do remodelamento vascular e está envolvido na patogênese da aterosclerose. O alelo T do gene TGF- β 1 parece ser um fator de risco para uma maior susceptibilidade genética ao infarto¹⁰⁶.

Através de técnicas de imunohistoquímica observou-se que a angiotensina II induz a produção de IL-6, contribuindo para o processo inflamatório na parede vascular, levando ao desenvolvimento de síndromes coronarianas agudas¹⁰⁷. Alguns estudos demonstraram que a deleção genética da IL-10 aumenta a infiltração neutrofílica no tecido miocárdico reperfundido, aumentando a extensão da área infartada, além de elevar os níveis de TNF- α ¹⁰⁸. A IL-6, citocina pró-inflamatória, também tem participação na patogênese da DAC, como foi demonstrado através do aumento dos seus níveis séricos em pacientes com IAM, ao contrário daqueles que só apresentaram angina pectoris. A sua participação no processo inflamatório da DAC baseia-se também no fato de estar presente não só nas síndromes coronárias agudas, como na isquemia miocárdica crônica¹⁰⁹. A análise de seus níveis pode indicar um risco futuro de IAM¹¹⁰. No entanto a IL-10, citocina antiinflamatória, encontra-se aumentada em pacientes com angina de peito¹¹¹, apresentando função protetora do miocárdio isquêmico e reperfundido através da supressão do recrutamento de neutrófilos¹¹² assumindo, assim, papel importante na definição prognóstica em pacientes com IAM severo¹¹³.

As citocinas Th1, como o interferon-gama, estão associadas à injúria imunológica do miocárdio promovendo inflamação crônica¹¹⁴.

Acredita-se que o VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*) esteja associado com isquemia pré-infarto, sendo que seu aumento após IAM seria devido a hipóxia provocada pela isquemia aguda do miocárdio¹¹⁵. A extensão da

lesão miocárdica contribui para o aumento dos níveis de VEGF, representando um importante papel na melhora da função ventricular esquerda e promovendo angiogênese e reendotelização após IAM¹¹⁶.

Infecções crônicas associadas à doença arterial coronariana – agentes infecciosos podem apresentar importância fundamental na patogênese de síndromes coronarianas agudas, favorecendo o processo de aterosclerose e trombose pela elevação dos níveis sanguíneos de fibrinogênio, leucócitos e citocinas e pela alteração do metabolismo e função das células endoteliais e macrófagos^{83,104}. Estudos recentes sugerem o envolvimento causal dos seguintes agentes: citomegalovírus (CMV), *chlamydia pneumoniae*, *haemophilus influenzae*, *mycoplasma pneumoniae*, *helicobacter pylori* e o vírus Epstein-Barr¹¹⁸⁻¹²⁰. É provável que a infecção pelo herpes vírus e pelo CMV esteja associada com aterogênese e reestenose coronária, visto que o herpes vírus pode ser detectado em lesões ateroscleróticas e o CMV pode ter participação na aterogênese em pacientes transplantados¹²¹. Pesquisas a procura do genoma do CMV humano e antígenos, em secções histológicas de coronárias de pacientes transplantados, utilizando-se imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e PCR, revelaram que apenas a PCR evidenciou linfócitos humanos CMV positivos⁷⁹. Estes podem ser reativados na vigência de situações de estresse devido a hiperatividade simpática, como observado em pacientes que tiveram IAM¹²². A infecção prévia por CMV pode, ainda, aumentar o risco de fenômenos trombóticos coronarianos pós-colocação de *stent*¹²³. A infecção crônica por *chlamydia pneumoniae* também tem papel na imunopatogênese da aterosclerose¹²⁴. Estudos clínicos têm demonstrado títulos mais altos de anticorpos anti-clamídea em pacientes com IAM (60-70%) e angina estável e instável (50-60%) se comparados a grupos controles (12-15%), existindo associação temporal entre reinfecção por *chlamydia pneumoniae* e IAM, que sugere que uma infecção aguda superposta a uma crônica ou latente possa levar ao IAM. Existem estudos demonstrando seu DNA através de técnicas de PCR em lesões ateromatosas de artérias coronárias¹²⁵⁻¹²⁷.

Implicações clínicas

Apesar de suas limitações, a hipótese de que a enfermidade coronariana esteja relacionada a um conjunto de polimorfismos desfavoráveis e suas interações com os fatores ambientais, pode proporcionar um maior entendimento da contribuição de genes específicos para o risco de DAC e IM. Além do mais, a análise do genoma funcional por meio da determinação do nível de expressão gênica, poderia contribuir na elucidação da interação dos mecanismos genéticos e ambientais envolvidos nessa enfermidade de etiologia multifatorial. Portanto, estes estudos podem ser um caminho para desvendar o elo entre o polimorfismo genético e a expressão gênica na DAC. As possíveis consequências destes novos conceitos são:

1. A descoberta do perfil genômico (diagnóstico molecular) poderá elucidar mais precocemente a natureza da DAC permitindo um diagnóstico preciso da susceptibilidade genética, um tratamento mais efetivo e melhora do prognóstico.
2. Identificar polimorfismos genéticos favoráveis e desfavoráveis que podem interagir com os fatores ambientais e fatores de riscos, como hipertensão arterial e diabetes, em condições pré-clínicas (disfunção endotelial).
3. Após o desenvolvimento da doença, determinar os mecanismos genéticos que podem afetar seu curso, inclusive se será ou não fatal.
4. Identificar os pacientes de alto risco, individualizando-os e fazendo o tratamento mais apropriado.
5. Farmacogenômica: os testes genéticos poderão ser de utilidade na predição da eficácia de um medicamento – tratamento baseado em um padrão genético individual e específico.
6. Cardiologia intervencionista genômica: os procedimentos terapêuticos cardíacos por intervenção percutânea poderão ser otimizados pelo conhecimento prévio da predisposição genética como, por exemplo, a reestenose pós-*stent* coronário.
7. Possível benefício na estratificação precoce de risco genético por exames de DNA e RNA (perfil genômico funcional do indivíduo), complementando o diagnóstico bioquímico tradicional.

Considerações gerais

São muitos os mecanismos moleculares potenciais na gênese da doença arterial coronariana, no entanto estão cada vez mais evidentes as suas interações nessa complexa enfermidade de alta prevalência e de consequências clínico, econômico e social tão relevantes.

O objetivo mais ambicioso da medicina preventiva é a implementação dos testes genéticos na profilaxia do infarto do miocárdio e da medicina clínica é a terapia gênica que, possivelmente, estará em breve disponível para uso clínico, tornando-se importante ferramenta para o cardiologista adotar a terapêutica mais adequada para o seu paciente.

Hipóteses

Baseado em diversas evidências em animais e humanos supõe-se que a aterosclerose coronariana possa resultar da interação de mecanismos genéticos e ambientais, dentre estes o SRA parece desempenhar um papel importante. O defeito chave nessa via é, possivelmente, determinado por polimorfismos genéticos e a regulação da expressão gênica junto ao endotélio vascular. Portanto, os seguintes modelos serão avaliados: 1) a variante M235T do gene do AGT está associada com a DAC e com o IAM; 2) o polimorfismo I/D do gene da ECA está implicado na gênese da DAC; 3) o polimorfismo A1166C do AT1R está associado com o desenvolvimento do IAM; 4) existe uma interação positiva entre os genes do AGT (variante M235T), da ECA (polimorfismo I/D) e do AT1R (polimorfismo A1166C) para o desenvolvimento do IAM.

Justificativas

A descoberta da influência simultânea de diversos marcadores genéticos poderá identificar precocemente e elucidar a natureza da DAC e do IM permitindo um diagnóstico mais preciso, um tratamento mais efetivo e melhora do prognóstico dessa enfermidade de alta prevalência e de conseqüências clínico-econômico-sociais tão relevantes. Os trabalhos presentemente publicados que tratam isoladamente dos genes do AGT, ECA e AT1R têm tido resultados contraditórios. O presente estudo analisa as evidências que estão correntemente disponíveis e suas conseqüências funcionais sobre os três polimorfismos do SRA (M235T do AGT, I/D da ECA, A1166C do AT1R), a fim de buscar explicação para o efeito isolado e o da interação de genes nas associações entre estes polimorfismos, a DAC e o IAM. Caso esta análise seja eficiente, este diagnóstico mais complexo poderá vir a fazer parte da avaliação da condição pré-clínica para os pacientes, tornando-se importante ferramenta para o cardiologista na escolha e implementação da profilaxia e da melhor terapêutica.

Objetivos

1. Avaliação do papel da variante M235T do gene do AGT em pacientes com DAC comprovada angiograficamente, com e sem IAM.
2. Analisar a participação do polimorfismo I/D do gene da ECA na gênese da DAC.
3. Estudar o polimorfismo A1166C do gene do AT1R em pacientes com IAM.
4. Estudar a interação entre a variante M235T do gene do AGT, com o polimorfismo I/D do gene da ECA e o polimorfismo A1166C do AT1R.
5. Analisar a associação entre os fatores de risco convencionais e o polimorfismo genético dos genes do SRA (AGT, ECA, AT1R) e sua relação com o IAM.

Referências bibliográficas

1. Braunwald E. Hattuck. Lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. *N Engl J Med* 1997; 337:1360-9.
2. Lenfant C. Heart research: celebration and renewal. *Circulation* 1997; 96:3822-3.
3. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JTJ et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after myocardial infarction. *Am J Med* 1987; 59: 256-62.
4. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72: 416-22.
5. Pfeffer MA, Lamas GA, Vaughan DE, Parisi AF, Braunwald E. Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1988; 319: 80-6.
6. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. *N Engl J Med* 1992; 327; 669-77.
7. Simionescu M, Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathological changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J* 1993; 7: 359-66.
8. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein I in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 5134-8.
9. Muller JE, Abela GS, Nesto RW, Tofler GH. Triggers, acute risk factors and vulnerable plaques: the lexicon of a new frontier. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 809-13.
10. Robbins L, Cotram RS, Kumar V. Patologia estrutural e funcional. 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara SA, 1986: 39.
11. Wal AI, Becker AE, Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by

- inflammatory process irrespective of dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44.
12. Mazzone A, Servi S, Ricevuti G et al. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993; 88: 358-63.
 13. Persoons MCJ, Daemen MJAP et al. Active cytomegalovirus infection of arterial smooth muscle cells in immunocompromised rats. A clue to herpes virus-associated atherogenesis? *Circulation Research* 1994; 75: 214-20.
 14. Linnanmäki E, Leinonen M, Mattila K, Nieminen MS, Valtonen V, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae*-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 1993; 87: 1130-4.
 15. Berge KE, Bakken A, Bohn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism at the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet* 1997; 52: 77-82.
 16. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. Genetics of atherosclerosis. In: Topol EJ, editor. *Textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia; Lippincott-Raven, 1988: 2389-496.
 17. Cambien F, Gelas FA, Herbeth B, et al. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genetic* 1988; 43: 774-80.
 18. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, et al. A meta analysis of the association of angiotensin-converting enzyme gene with the myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 708-12.
 19. Cambien F, Costerousse O, Tiret L, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90: 669-76.
 20. Tiret L, Kee F, Poirier O, et al. Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 1993; 341: 991-2.
 21. Tiret L, Bonnadeaux A, Poirier O, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type receptor gene polymorphism on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344: 910-4.

22. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin I converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic A R* 1992; 20: 1433.
23. Katsuya T, Koibe G, Yee TW, et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-3.
24. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 196-202.
25. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, et al. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 15.
26. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-180.
27. Inoue I, Rohrwasser A, Helin C, et al. A mutation of angiotensinogen in a patient with pre-eclampsia leads to altered kinetics of the renin-angiotensin system. *J Biol Chem* 1995; 270: 11430-6.
28. Krieger EM, Santos RAS. Angiotensinas: Aspectos fisiológicos. *Hipertensão* 1998; 1: 7-10.
29. Wood AJJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *Drug Therapy* 1996; 334: 1649-54.
30. Garg UC, Hassid A. Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide generating vasodilators. *Am J Physiol* 1989; 257: 60-6.
31. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-7.
32. Guo K, Andres V, Walsh K. Nitric oxide-induced down-regulation of Cdk2 activity and cyclinL: A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1998; 257: 2066-72.
33. Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojima H, Ogata J. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Sdi/Cipl/Wafl) by nitric oxide generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J. Biol Chem* 1997; 272: 10050-7.

34. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
35. Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens* 1993; 15: 527-37.
36. El Mabrouk M, Singh A, Touyz RM, Schiffrin EL. Antiproliferative effect of L-NAME on rat smooth muscle cells. *Life Sc* 2000; 67: 1613-23.
37. Rizvi MA, Myers PR. Nitric oxide modulates basal and endothelin-1 induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1779-89.
38. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996; 79: 748-56.
39. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ETA receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis* 1999; 146: 351-9.
40. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 32: 2-13.
41. Freeman EJ. The angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase D-mediated signaling mechanism. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374: 363-70.
42. Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge M S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000; 212: 155-69.
43. Haendeler J, Berk BC. Angiotensin II - mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Reg Pept* 2000; 95: 1-7.
44. De Caterina R, Basta G, Dell'Omo G, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a bio-humoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2646-54.
45. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leuc Biol* 2000; 67: 591-602.

46. Henricks PAJ, Nijkamp FP. Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. *Eur J Pharmacol* 1998; 344:1-13.
47. Panés J, Perry M, Granger DN. Leucocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Brit J Pharmacol* 1999; 126: 537-50.
48. Haller H. Hypertension, the endothelium and the pathogenesis of chronic vascular disease. *Kid Blood Press Res* 1996; 19:166-71.
49. Verhaar MC, Beutler JJ, Gaillard CA, et al. Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating r-selectin. *J Hypertens* 1998; 16: 45-50.
50. Neal CR, Michel CC. Opening in frog microvascular endothelium induced by high intravascular pressures. *J Phys* 1996; 492:39-52.
51. Kurose I, Kubes P, Wolf R, et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanism of vascular albumin leakage. *Circ Res* 1993; 73:164-71.
52. Lip GYH, Beevers DG. Abnormalities of rheology and coagulation in hypertension. *J Hum Hypertens* 1994; 8: 693-701.
53. Chien S, Fan F, Lee MM, Handley, DA. Effects of arterial pressure on endothelial transport of macromolecules. *Biorheology* 1984; 21: 631-41.
54. Rigat B, Hubert C, Alhene-Gela F, et al. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme level. *J. Clin. Invest* 1990; 86: 1343-6.
55. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure on a genetic isolate. *Circulation* 1994; 90: 2207-12.
56. Stephenson SL, Kenny AJ. Metabolism of neural peptides: Hydrolysis of angiotensins, bradkynin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem J* 1987; 241: 237-47.
57. Stephenson SL, Kenny AJ. The hydrolysis of human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar is initiated by endopetidase 24.11. *Biochem J.* 1987; 243: 183-187.
58. Yamamoto T, Chappell MC, Brosnihan B, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19: 692-6.

59. Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension* 1998; 26: 1154-9.
60. Abbas A, Gorelik G, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 1997; 30: 217-21.
61. Katsuya T, Koike G, Yee TW, et al. Association of angiotensinogen gene t235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-3.
62. Hata A, Namikawa C, Sasaki M, et al. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest* 1994; 93: 1285-7.
63. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure on a genetic isolate. *Circulation* 1994; 90: 2207-12.
64. Rodriguez-Pérez JC, Esparragón FR, Perera OH, et al. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:1536-42.
65. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analysis of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 484-92.
66. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-3.
67. Schunkert, H. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J. Mol. Med* 1997; 75: 867-75.
68. Danser AHJ, Schalekamp MADH, Bax WA, et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92:1387-8.
69. Faure-Delanef L, Baudin B, Benéteau-Burnat B, et al. Plasma concentration, kinetic constants, and gene polymorphism of angiotensin I-converting enzyme in centenarians. *Clin Chem* 1998; 44: 2083-7.

70. Bonnardeaux A, Daves E, Jeunemaitre X, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-9.
71. Paxton WC, Ruglissi, Horulst C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II at 1 receptor. *Am J Physiol* 1993; 264: 989-95.
72. de Winter RJ, Middeldorp S, Gaffar S, et al. Acute myocardial infarction with large bilateral intracoronary thrombi in a young patient with the prothrombin 20210 GA mutation. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1998; 44: 427-30.
73. Watzke HH, Schuttrumpf J, Graf S, Huber K, Panzer S. Increased prevalence of a polymorphism in the gene coding for human prothrombin in patients with coronary heart disease. *Thromb Res* 1997; 87: 521-6.
74. Giannitsis E, Siemens HJ, Mitusch R, et al. Prothrombin fragments F1+2, thrombin-antithrombin III complexes, fibrin monomers and fibrinogen in patients with coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol* 1999; 68: 269-74.
75. Girelli D, Russo C, Ferraresi P, et al. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 774-80.
76. Di Castelnuovo A, D'Orazio A, Amore C, Falanga A, Donati MB, Iacoviello L. The decanucleotide insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the coagulation factor VII gene and the risk of familial myocardial infarction. *Thromb Res* 2000; 98: 9-17.
77. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 79-85.
78. Peyvandi F, Mannucci PM, Bucciarelli P, et al. A novel polymorphism in intron 1a of the human factor VII gene (G73A): study of a healthy Italian population and of 190 young survivors of myocardial infarction. *Br J Haematol* 2000; 108: 247-53.
79. Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress dependent platelet activation. *Circulation* 1997; 96: 3281-6

80. Bottiger C, Kastrati A, Koch W, et al. A. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 83: 559-62.
81. Gardemann A, Humme J, Stricker J, et al. Association of the platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 214-7.
82. Kastrati A, Koch W, Gawaz M, et al. PIA polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of adverse events after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 84-9.
83. Tereshchenko SN, Levchuk NN, Drozdov VN, Shaikhaev GO, Leont'ev SG, Kirienko AI, Moiseev VS. Polymorphism of GPIIIA platelet glycoprotein gene PIA1/A2 compared to plasma hemostasis in myocardial infarction patients. *Ter Arkh* 1999; 71: 66-70.
84. Hooper WC, Lally C, Austin H, et al. 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* 1999; 116: 880-6.
85. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, et al. Glycoprotein IIIa PI (A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2573-8.
86. Samani NJ, Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 693-7.
87. Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* 2002; 99: 159-67.
88. Kharghan VA, Li CQ, Khoshnevis M, López JA. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Iba gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GPIb-IX-V complex. *Blood* 1999; 94: 186-91.

89. Mikkelsen J, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ. Platelet glycoprotein Ib alpha HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction in sudden cardiac death. *Circulation* 2001; 104: 876-80.
90. Sonoda A, Murata M, Ito D, et al. Association between platelet glycoprotein Ib α genotype and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000; 31: 493-7.
91. Biggart S, Chin D, Fauchon M, et al. Association of genetic polymorphisms in the ACE, ApoE, and TGF beta genes with early onset ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 1998; 21: 831-6.
92. van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Gibbons FA, Burke V, Taylor RR. Angiotensin converting enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 1995; 92: 2066-71.
93. Utermann G, Hardewig A, Zimmer F. Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction. *Hum. Genet* 1984; 65: 237-41.
94. Lambert JC, Brousseau T, Defosse V, et al. Independent association of an apoE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased apoE plasma concentrations - the ECTIM study. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 57-61.
95. Dallongeville J, Tiret L, Visvikis S, et al. Effect of apoE phenotype on plasma postprandial triglyceride levels in young male adults with and without a familial history of myocardial infarction: the EARS II study. *European atherosclerosis research study. Atherosclerosis* 1999; 145: 381-8.
96. Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen MS, Asikainen S. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 719-34.
97. Halawa B, Salomon P, Jolda-Mydlowska B, Zysko D. Levels of tumor necrosis factor (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) in serum of patients with acute myocardial infarction. *Pol. Arch Med Wewn* 1999; 101: 197-203.
98. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149-53.
99. Jacobs M, Staufenberger S, Gergs U, et al. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1949-59.

100. Willam C, Koehne P, Jurgensen JS, et al. Tie2 receptor expression is stimulated by hypoxia and proinflammatory cytokines in human endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87: 370-7.
101. Krown KA, Page MT, Nguyen C, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid-signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854-65.
102. Furukawa Y, Matsumori A, Hwang MW, et al. Cytokine gene expression during the development of graft coronary artery disease in mice. *Jpn Circ J* 1999; 63: 775-82.
103. Nagano H, Mitchell RN, Taylor MK, Hasegawa S, Tilney NL, Libby P. Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J Clin Invest* 1997; 100: 550-7.
104. Cambien F, Ricard S, Troesch A, et al. Polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. *Hypertension* 1996; 28: 881-7.
105. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1947-58.
106. Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29C polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation* 2000; 101: 2783-7.
107. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000; 101: 1372-8.
108. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2000; 101: 1019-26.
109. Kanda T, Inoue M, Kotajima N, et al. Circulating interleukin-6 and interleukin-6 receptors in patients with acute and recent myocardial infarction. *Cardiology* 2000; 93: 191-6.

110. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Tanaka H, Bando K, Fukuda N. Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* 2000; 93: 168-74.
111. Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, Janowska J, Jastrzebska-Maj E, Szymanski L. The selected pro- and anti-inflammatory cytokines in the patients with coronary heart disease: preliminary communication. *Pol Arch Med Wewn* 1999; 102: 677-84.
112. Gabriel AS, Ahnve S, Wretling B, Martinsson A.. IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction. *J Intern Med* 2000; 248: 61-6.
113. Shibata M, Endo S, Inada K, et al. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 145-50.
114. Yang Z, Zingarelli B, Szabó C. Effect of genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase on delayed production of inflammatory mediators and delayed necrosis during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulatory Shock* 2000; 13: 60-6.
115. Ogawa H, Suefuji H, Soejima H, et al. Increased blood vascular endothelial growth factor levels in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* 2000; 93: 93-9.
116. Biasucci LM, Liuzzo G, Angiolillo DJ, Sperti G, Maseri A.. Inflammation and acute coronary syndromes. *Herz* 2000; 25: 108-12.
117. Choussat R, Montalescot G, Collet J, et al. Effect of prior exposure to chlamydia pneumoniae, helicobacter pylori, or cytomegalovirus on the degree of inflammation and one-year prognosis of patients with unstable angina pectoris or non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2000; 86: 379-84.
118. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ, Wang F.. Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. *Circulation* 1998; 98: 2796-9.
119. Leinonen M, Saikku P. Infections and atherosclerosis. *Scand Cardiovasc J* 2000; 34: 12-20.

120. Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J. Am Coll Cardiol* 1998; 32: 35-41.
121. Sambiasi NV, Higuchi ML, Nuovo G, et al. CMV and transplant-related coronary atherosclerosis: an immunohistochemical, in situ hybridization, and polymerase chain reaction in situ study. *Mod Pathol* 2000; 13: 173-9.
122. Prosch S, Wendt CE, Reinke P, et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 2000; 272: 357-65.
123. Neumann FJ, Kastrati A, Miethke T, Pogatsa-Murray G, Seyfarth M, Schomig A, et al. Previous cytomegalovirus infection and risk of coronary thrombotic events after stent placement. *Circulation* 2000; 101: 11-3.
124. Ossewaarde JM, Feskens EJ, De Vries A, Vallinga CE, Kromhout D. *Chlamydia pneumoniae* is a risk factor for coronary heart disease in symptom-free elderly men, but *helicobacter pylori* and cytomegalovirus are not. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 93-9.
125. Blasi F, Fagetti L, Allegra L. *Chlamydia pneumoniae* detection in atherosclerotic plaques in Italy. *J. Infect Dis* 2000; 181: S444-S446.
126. Mahony JB, Chong S, Coombes BK, Smieja M, Petrich A. Analytical sensitivity, reproducibility of results, and clinical performance of five PCR assays for detecting *chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 622-7.
127. Akira Hata. Role of angiotensinogen in the genetics of essential hypertension. *Life Sciences* 1995; 57: 2385-95.

Capítulo I

A variante M235T do gene do angiotensinogênio na doença arterial coronariana: estudo comparado em pacientes com e sem infarto agudo do miocárdio

Resumo

Objetivo – Estudar o efeito do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (AGT) na doença arterial coronariana (DAC), na sua severidade em pacientes com e sem infarto agudo do miocárdio (IAM).

Métodos – Estudo transversal com 305 indivíduos de raça branca que foram alocados em 2 grupos. O primeiro com 201 pacientes com DAC comprovada pela angiografia (lesão obstrutiva > 50%), sendo 110 com IAM e 91 sem IAM. O segundo, 104 indivíduos controles com artérias coronárias normais. Três critérios angiográficos avaliaram a severidade da DAC: o número de vasos lesados, a morfologia da placa aterosclerótica e o escore de risco coronário. Os fatores de risco coronariano clássicos também foram analisados. O polimorfismo M235T do AGT foi analisado pela PCR-RFLP.

Resultados – A hipertensão arterial, o tabagismo, o diabetes melito, a obesidade e os níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL predominaram nos pacientes com DAC. A frequência dos genótipos TT, MT e MM do AGT não foi estatisticamente diferente entre os pacientes com DAC e controles ($\chi^2 = 0,123$; $p = 0,939$) bem como nos grupos de infartados e não infartados ($\chi^2 = 2,171$; $p = 0,338$). O risco relativo de desenvolver DAC e de apresentar IAM analisado entre os genótipos TT vs MM, MT vs MM e TT+MT vs MM não foi significativa. A análise da severidade da doença aterosclerótica no grupo de pacientes com DAC mostrou não haver correlação com os genótipos; resultado semelhante foi encontrado na comparação entre os grupos com e sem IAM.

Conclusão – Este estudo concluiu que não há associação entre o polimorfismo M235T do gene do AGT com a DAC, com a sua severidade e nem com o IAM.

The M235T variant of the angiotensinogen gene in the coronary artery disease: compared study between patients with and without acute myocardial infarction

Abstract

Objective – To study the effect of the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene (AGT) in the coronary artery disease (CAD) and in its severity in patients with and without acute myocardial infarction (AMI).

Methods – A transversable study was carried out with 305 white people who were allocated into two groups. One group with 201 patients with proved CAD by a coronary angiography (obstructive lesion > 50%) was further subdivided into two subgroups; 110 patients with AMI and 91 without it. The second group consisted of 104 controls with normal coronary arteries. Three angiographic criteria have evaluated the severity of CAD: the number of diseased vessels, the morphology of the atherosclerosis plaque and the jeopardy score. The factors of classical coronary risk were also analyzed. The M235T AGT gene polymorphism was evaluated by PCR-RFLP.

Results – The arterial hypertension, tabagism, diabetes mellitus, obesity, high total and LDL cholesterol levels predominated in CAD patients. The AGT gene TT, MT and MM genotypic frequencies were neither statistically different between CAD patients and controls ($\chi^2 = 0.123$; $p = 0.939$) nor between patients AMI subgroups ($\chi^2 = 2.171$; $p = 0.338$). The CAD and AMI risk analyzed between TT vs MM, MT vs MM and TT+MT vs MM genotypes were not significant. The severity of atherosclerotic disease analysis within the CAD patients group did not demonstrate correlation with genotypes. Similar results were found between groups with and without AMI.

Conclusion – This study has concluded that there is no association between the angiotensinogen gene M235T polymorphism and the CAD, neither with its severity nor with the AMI.

Introdução

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem fundamental importância na homeostasia cardiovascular. O angiotensinogênio (AGT) é o peptídeo chave neste sistema que, sob a ação da renina forma o decapeptídeo angiotensina I. Ela é um pró-hormônio inativo que sob a ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) será transformada, por meio da retirada de dois aminoácidos de sua extremidade C-terminal, no octapeptídeo angiotensina II que é um potente e multifuncional hormônio primariamente envolvido na manutenção do tônus vascular e na reabsorção do sódio pelos rins¹. Entre as suas ações estão, também, a contração e proliferação de células do músculo liso vascular por fosforilação de tirosina quinase e conseqüente ativação de proteínas envolvidas na transcrição do DNA, com importante efeito mitógeno². Portanto, o angiotensinogênio é um dos componentes que pode estar atuando na patogênese da doença arterial coronariana (DAC) e suas diversas síndromes³.

O gene do AGT localiza-se no cromossomo 1q 42-43. Uma mutação denominada de variante M235T está localizada no exon dois do gene, correspondendo a uma transição de aminoácidos de metionina para treonina na posição 235 da proteína madura e é denominada de T235. Foi demonstrada uma importante associação entre a T235 e a variante molecular no promotor proximal do gene do angiotensinogênio, uma adenina no lugar da guanina seis nucleotídeos acima do local de iniciação da transcrição, A (-6). A substituição A/G no nucleotídeo seis afeta especificamente interações entre pelo menos um fator nuclear de transcrição e do promotor do AGT, influenciando assim a velocidade basal de transcrição do gene⁴. Este achado muito provavelmente explica porque os homozigotos T235 possuem níveis plasmáticos de AGT de 10-20% maior que os homozigotos M235. A variante T235/T235 ocorre em frequência elevada na população japonesa⁵ e na população ocidental está presente em aproximadamente 19%. Indivíduos portadores do genótipo homozigoto M235/M235 apresentam médias menores de nível de AGT plasmático; os heterozigotos M235/T235 têm níveis intermediários e os homozigotos T235/T235 possuem as médias maiores do nível de AGT plasmático⁶.

A relação observada entre o polimorfismo M235T do gene do AGT (TT, MT e TT), os seus produtos protéicos e os fenótipos da DAC sustentam a evidência de um possível papel dos níveis elevados do AGT circulante na sua patogênese. Este estudo tem como objetivo analisar o papel da variante M235T do gene do AGT na doença arterial coronariana, na severidade da lesão aterosclerótica coronária e a sua participação no desenvolvimento do infarto agudo do miocárdio (IAM).

Métodos

Estudo prospectivo de delineamento transversal com processo de amostragem consecutiva realizada nos serviços de hemodinâmica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e do Instituto do Coração do Triângulo Mineiro e análises moleculares no Instituto de Genética e Bioquímica (UFU) com 305 indivíduos de raça branca.

Os critérios de inclusão foram determinados para 201 pacientes elegíveis com o diagnóstico de DAC comprovados pela angiografia coronária (lesão obstrutiva > 50%) sendo 110 pacientes portadores de DAC com IAM e diagnóstico baseado em dados clínicos, eletrocardiográficos e enzimáticos segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde⁷ e 91 pacientes com DAC sem IAM. Os 104 controles foram indivíduos com diagnósticos de doença cardíaca valvular, dor torácica atípica e doadores para transplante renal, com angiografia coronária normal. Os pacientes infartados foram submetidos à cinecoronariografia em até duas semanas após o IAM; os não infartados e o grupo controle, logo após a realização do diagnóstico clínico. A cineangiocardiorrafia avaliou a severidade da DAC com os seguintes critérios: número de vasos acometidos (uniarterial ou multiarterial)⁸; característica morfológica da placa aterosclerótica (A, B1, B2, C) conforme descrito por Ellis et al⁹; escore de risco coronariano que é um método simples para estimar a quantidade de músculo cardíaco em risco baseado na localização proximal, média, distal e grau de estenose da lesão obstrutiva sendo que os escores mais elevados estão associados com uma baixa fração de ejeção

do ventrículo esquerdo propiciando uma maior informação prognóstica segundo Califf et al¹⁰.

Foram realizadas em todos os indivíduos histórias clínicas, avaliação dos fatores de risco coronariano convencionais como antecedente familiar de coronariopatia (primeiro grau), níveis de colesterol total, LDL, HDL e triglicérides, antecedentes de tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes melito (DM), sedentarismo, obesidade (índice de massa corpórea – IMC > 25 Kg/m²).

Foram excluídos os pacientes com doença maligna sistêmica, enfermidade crônica terminal, antecedentes de infarto do miocárdio, angioplastia coronariana e cirurgia de revascularização do miocárdio.

Todos os procedimentos, riscos e benefícios potenciais foram informados aos pacientes por meio de formulário próprio para seu consentimento formal.

O protocolo foi submetido à apreciação e liberação pelo conselho de ética da Universidade Federal de Uberlândia.

Análise do polimorfismo M235T do angiotensinogênio

A análise do polimorfismo M235T do gene do AGT foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). As extrações de DNA foram feitas segundo Sambrook et al¹¹. A coleta de sangue periférico foi feita em tubo *vacutainer* de 5 mL com EDTA, armazenado a 4 °C, centrifugado para separação da camada de leucócitos. Uma alíquota de 500 µL da camada de leucócitos foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL e acrescentou-se 1,0 mL de tampão de lise de hemácias (TLH) [NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 1mM] em cada amostra, misturando por inversão durante 30 segundos. Esta mistura foi centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos para peletizar os núcleos. Descartou-se o sobrenadante, repetindo-se o passo por 2 a 3 vezes, até que o pelete adquirisse uma coloração creme claro. Foram adicionados 150 µL do Tampão de Lise do Núcleo (TLN) [Tris - HCL 10 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, NaCl 400 mM] e ressuspendeu-se o pelete. Adicionaram-se, então, 5 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% gelado e 2,5 µL de proteinase K (20 mg/mL) à solução e as amostras foram incubadas por 6 horas à 60 °C, após o que 100 µL de NaCl saturado foram adicionados às amostras que

foram colocadas em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante e adicionaram-se 800 µL de etanol absoluto gelado, misturando-se por inversão até que ocorresse a precipitação. Girou-se o tubo em seu eixo no sentido horizontal, para prender o DNA à parede do tubo, descartando-se o sobrenadante. O pelete foi lavado em 1,0 mL de etanol 70%. Descartou-se o álcool e os peletes foram ressuspensos em volume variável de TE [TRIS - HCL 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4)] de acordo com o tamanho dos mesmos. A seguir foi feito o cálculo da concentração de DNA por espectrofotômetro a 260 nm. O fragmento do gene do AGT, com 332 pb, contido no exon dois, códon 235, foi amplificado por meio da PCR, utilizando os seguintes *primers*¹²:

1-5'-GGA AGG ACA AGA ACTGCA CCT C-3'

2-5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'

As reações foram feitas nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico, 10 pmoles de cada primer, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume final de 30 µL. A PCR foi feita em termociclador *MJ. Research, Inc.* utilizando o seguinte programa: 90 °C por 5 min, 10 ciclos de 94 °C por 40 s, 63 °C 1 min, 72 °C 1 min; seguidos por 25 ciclos de 94 °C 40 s, 63 °C 40 s, 72 °C 1 min e uma extensão final de 72 °C por 10 min. O produto amplificado de 332 pb foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com 3 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL). Dez microlitros do produto de PCR foram digeridos com a enzima Tth 111-1 (*Amersham Pharmacia*) segundo especificações do fabricante. As reações foram incubadas por 3 h a 65 °C que reconhece o seguinte sítio de restrição:

5'-GACN ↓ NNGTC-3'

3'-CTGNN ↑ NCAG-5'

O produto da restrição foi visualizado em gel de agarose 3% corado por brometo de etídeo, após eletroforese a 140 volts por 1 hora.

Análise estatística

O programa Statistica 5.5 *Statsoft, Inc.*¹³ foi utilizado para fazer as análises. Para indicar o nível de significância estatística foi considerado o erro α menor que 5% ($p < 0,05$). O teste de χ^2 de Pearson foi utilizado para analisar as diferenças das frequências dos genótipos entre casos e controles e entre fatores de risco coronarianos convencionais com os genótipos. As variáveis foram transformadas em numéricas, atribuindo-se o valor zero para ausência e 1 para a presença. As variáveis contínuas foram expressas como média - desvio padrão e as diferenças entre os grupos foram comparadas usando o teste t de Student.

O risco relativo foi avaliado pelo cálculo da razão de chances (*Odds Ratio* – OR) e seus intervalos de confiança (IC). As diferenças entre as frequências de pacientes, quanto aos fatores de risco convencionais, em relação às classes genotípicas foram avaliadas via modelos lineares generalizados tendo a distribuição da variável resposta binomial, adotando como função de ligação a função logística.

Resultados

Genotipagem

Os resultados obtidos pela restrição enzimática estão na Figura 1, demonstrando que a variante M235T apresenta ou não sítio de restrição para a enzima Tth111-1; na presença de C (citosina) na posição 704, códon 235, o produto amplificado é clivado, resultando em três fragmentos de 332 pb, 308pb e 24 pb, correspondendo ao genótipo MT e na presença de T (timina) na mesma posição o fragmento não sofre clivagem, resultando em um fragmento de 332 pb correspondendo ao genótipo MM. Indivíduos homozigotos para o alelo T235 apresentam dois fragmentos de 308pb e 24 bp correspondendo ao genótipo TT.

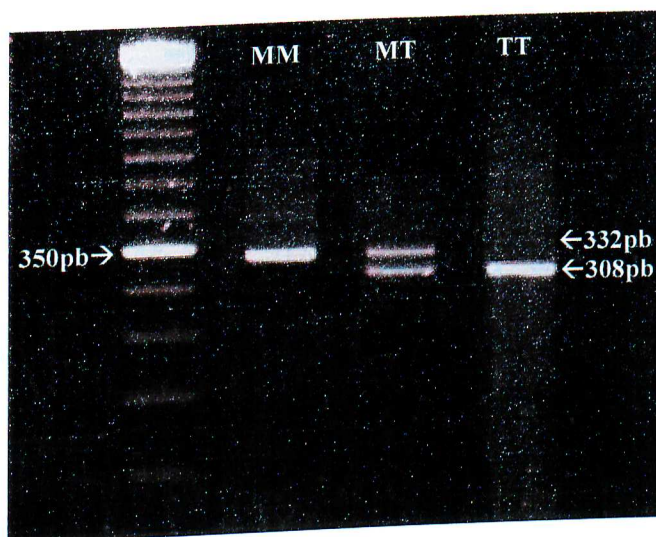


Figura 1. Produtos de restrição enzimática da variante M235T do gene do angiotensinogênio. Homozigotos MM → 332 pb. Heterozigotos MT → 332 pb, 308 pb, 24 pb. Homozigotos TT → 308 pb e 24 pb. O fragmento de 24 pb não é visualizado devido à baixa resolução do gel para fragmentos menores do que 50 pb.

Análise dos pacientes com doença arterial coronariana e dos controles

As características principais da população de pacientes com DAC e dos indivíduos controles estão descritas na Tabela 1. Nos 201 pacientes com DAC houve predominância de homens (55,72% masculino e 44,28% feminino) e nos 104 indivíduos controles a prevalência foi das mulheres (42,3% masculino e 57,7% feminino). A média de idade dos pacientes com DAC foi de 61,58 – 10,85 anos sendo esta, estatisticamente diferente dos controles; 56,69 – 11,52 anos ($p < 0,05$). O hábito do tabagismo, a hipertensão arterial sistêmica, o diabetes melito, os níveis elevados de colesterol total e LDL foram os fatores de risco coronarianos convencionais significativamente mais freqüentes nos pacientes com DAC. A história familiar de coronariopatia, a obesidade ($\text{IMC} > 25 \text{ Kg/m}^2$), o sedentarismo e os níveis altos de triglicérides não mostraram diferença significativa.

Tabela 1. Parâmetros comparados em pacientes com doença arterial coronariana e controles.

Variáveis	DAC n = 201 (%)	Controles n = 104 (%)	p
História Familiar de DAC	83 (41,3)	33 (31,7)	0,103
Hipertensão Arterial	162 (80,6)	70 (67,3)	0,010
Fumantes	84 (41,8)	26 (25,0)	0,004
Diabetes melito	47 (23,4)	13 (12,5)	0,023
IMC > 25kg/m ²	109 (54,2)	57 (54,8)	0,923
Sedentarismo	128 (63,7)	60 (57,7)	0,308
Colesterol (mg/dL)			
Total > 200	139 (69,2)	41 (39,4)	0,0001
HDL < 35	26 (12,9)	15 (14,4)	0,718
LDL > 159	176 (87,6)	62 (59,6)	0,0001
Triglicérides > 200 mg/dL	42 (20,9)	15 (14,4)	0,169

Estratificação dos genótipos do angiotensinogênio entre pacientes com doença arterial coronariana e controles

Os pacientes com DAC foram estratificados pelos genótipos do AGT e realizados cruzamentos com os fatores de risco cardiovascular convencional onde foi observado que nenhum deles apresentou diferença estatística significativa (Tabela 2). O mesmo fato foi constatado nestes cruzamentos nos indivíduos controles (Tabela 3).

A frequência dos genótipos do AGT foi testada e estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3,9708$; $p = 0,1373$). A distribuição dos genótipos do AGT nos pacientes com DAC foi de 41,2% no MM, 50,2% no MT e 8,5% no TT; nos controles foi de 41,3%, 49,0% e 9,6%, respectivamente ($\chi^2 = 0,123$; $p = 0,939$). (Tabela 4). As estimativas de risco (OR) de desenvolver DAC associadas aos genótipos do AGT com os respectivos intervalos de confiança foram de 0,88 (0,37 – 2,08) para os genótipos TT em relação aos MM; de 1,02 (0,62 – 1,68) dos MT em relação aos MM e de 1,00 (0,61 – 1,62) dos TT+MM em relação aos MM (Figura 2).

Tabela 2. Fatores de risco coronarianos nos pacientes com doença arterial coronariana estratificados pelos genótipos da angiotensinogênio.

Variáveis	TT	MT	MM	p
	n = 17 (%)	n = 101 (%)	n = 83 (%)	
História Familiar de DAC	05 (29,4)	42 (41,6)	36 (43,4)	0,565
Hipertensão Arterial	13 (76,5)	83 (82,2)	66 (79,5)	0,815
Fumantes	06 (35,3)	43 (42,6)	35 (42,2)	0,850
Diabetes melito	04 (23,5)	24 (23,8)	19 (22,9)	0,990
IMC > 25 kg/m ²	08 (47,1)	53 (52,5)	48 (57,8)	0,634
Sedentarismo	10 (58,8)	70 (69,3)	48 (57,8)	0,249
Colesterol (mg/dL)				
Total > 200	11 (64,7)	68 (67,3)	60 (72,3)	0,705
HDL < 35	01 (5,9)	16 (15,8)	09 (10,8)	0,400
LDL > 159	14 (82,4)	90 (89,1)	72 (86,7)	0,706
Triglicérides > 200mg/dL	01 (5,9)	24 (23,8)	17 (20,5)	0,243

Análises dos pacientes com doença arterial coronariana infartados e não infartados

Dos 201 pacientes portadores de DAC, 91 apresentavam DAC sem IAM e 110 DAC com IAM. No grupo de DAC com IAM houve predominância do sexo masculino sobre o feminino (63,6 *versus* 36,4%) e do sexo feminino no grupo de DAC sem IAM (46,2 *versus* 53,8%). O hábito do tabagismo, o sedentarismo, a hipertensão arterial sistêmica, a história familiar de coronariopatia, o diabetes melito, a obesidade, os baixos níveis de colesterol HDL, os níveis elevados de colesterol total, LDL e triglicérides não mostraram diferença estatística significativa entre os dois grupos.

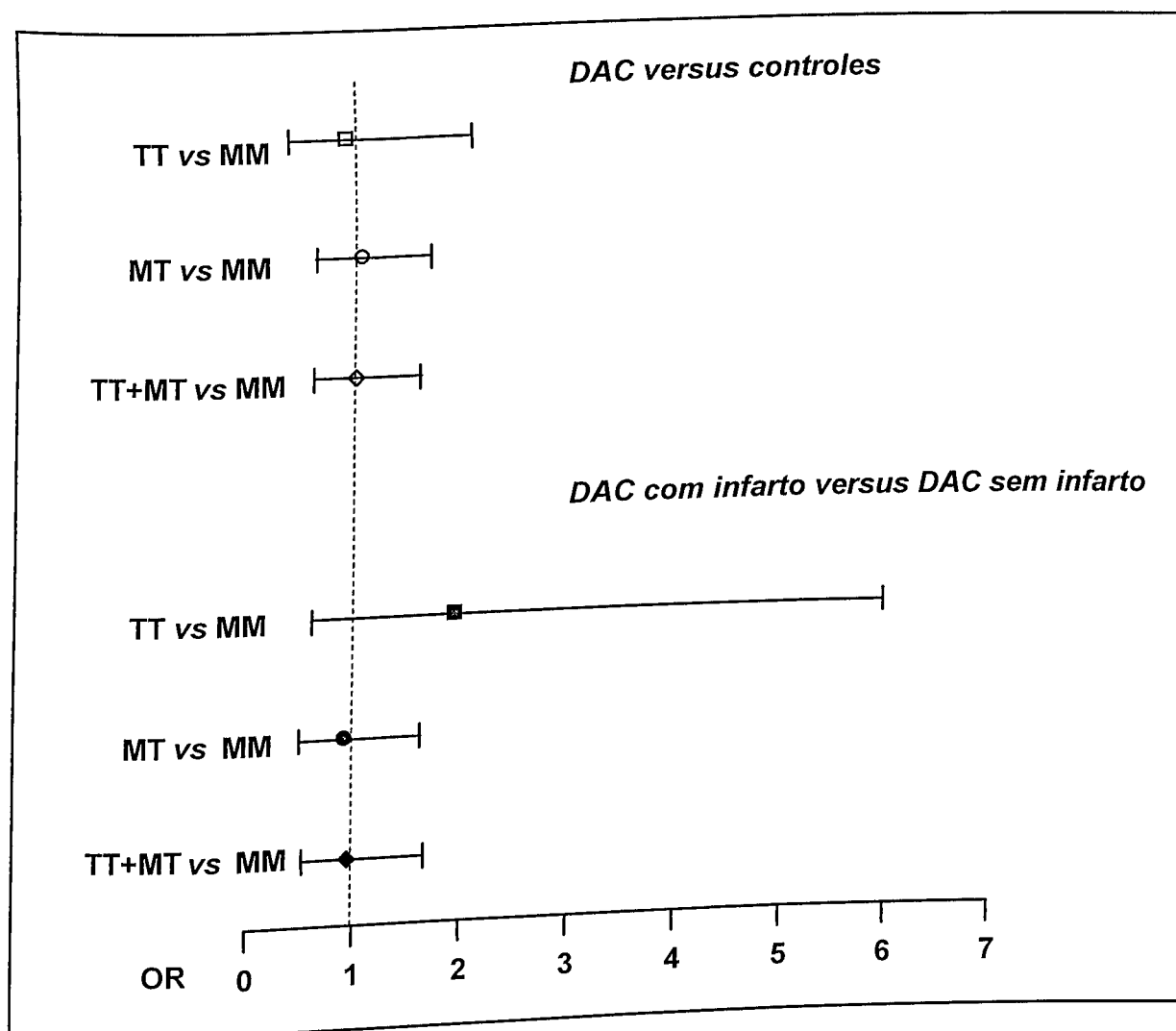


Figura 2. Estimativa do risco de apresentar DAC associado ao polimorfismo M235T do AGT entre os grupos DAC vs controles e, de ter infarto entre os DAC com IAM vs sem IAM. Odds ratio das comparações dos genótipos TT vs MM, MT vs MM e TT+MT vs MM.

A distribuição dos genótipos do AGT no grupo de DAC sem IAM foi de 37 pacientes MM (40,7%), 49 MT (53,8%) e 5 TT (5,5%). No grupo de DAC com IAM foi de 46 (41,8%), 52 (47,3%) e 12 (10,9%), respectivamente. As diferenças entre as freqüências genotípicas nestes dois grupos não foram significativas ($\chi^2 = 2,17$; $p = 0,338$). Não houve diferença estatística de sexo e nem de idade entre os três genótipos ($p < 0,05$). A análise entre os grupos de DAC sem IAM e DAC com IAM mostraram que o risco (OR) de apresentar infarto para os indivíduos portadores dos genótipos TT em relação ao MM foi baixo (OR = 1,93; IC-95% = 0,62 – 5,97),

do MT em relação ao MM foi baixo (OR = 0,90; IC-95% = 0,50 – 1,63) e do alelo T (TT+MM) em relação ao MM foi baixo também (OR 0,95; IC-95% = 0,54 – 1,67).

Tabela 3. Fatores de risco coronarianos nos indivíduos controles estratificados pelos genótipos do angiotensinogênio.

Variáveis	TT n = 10 (%)	MT n = 51 (%)	MM n = 43 (%)	p
História Familiar de DAC	02 (20,0)	17 (33,3)	14 (32,6)	0,701
Hipertensão Arterial	08 (80,0)	34 (66,7)	28 (65,1)	0,659
Fumantes	01 (10,0)	15 (29,4)	10 (23,3)	0,407
Diabetes melito	01 (10,0)	07 (13,7)	05 (11,6)	0,924
IMC > 25 kg/m ²	04 (40,0)	34 (66,7)	19 (44,2)	0,057
Sedentarismo	05 (50,0)	29 (56,9)	26 (60,5)	0,822
Colesterol (mg/dL)				
Total > 200	02 (20,0)	22 (43,1)	17 (39,5)	0,392
HDL < 35	05 (50,0)	03 (05,9)	07 (16,3)	0,109
LDL > 159	05 (50,0)	30 (58,8)	27 (62,8)	0,749
Triglicérides > 200mg/dL	02 (20,0)	07 (13,7)	06 (14)	0,869

Tabela 4. Análise do chi-quadrado, *Odds Ratio* e intervalos de confiança para a frequência alélica do grupo com DAC em relação aos controles e os grupos de DAC com infarto em relação à DAC sem infarto.

DAC versus Controles						
Genótipo	DAC n = 201 (%)	Controle n = 104 (%)	χ^2	p	Odds Ratio	IC (95%)
TT	17 (08,4)	10 (09,6)	0,123	0,939	0,8807	0,3714 – 2,0887
MT	101 (50,2)	51 (49,0)			1,0260	0,6229 – 1,6898
MM	83 (41,2)	43 (41,2)				
TT+MT	118 (58,8)	61 (58,6)			1,0022	0,6196 – 1,6209
DAC com Infarto versus DAC sem Infarto						
Genótipo	Com Infarto n=110 (%)	Sem Infarto n=91 (%)	χ^2	p	Odds Ratio	IC (95%)
TT	12 (10,9)	05 (05,4)	2,171	0,338	1,9304	0,6239 – 5,9730
MT	52 (47,2)	49 (53,8)			0,9093	0,5055 – 1,6356
MM	46 (41,8)	37 (40,6)				
TT+MT	64 (58,1)	54 (59,3)			0,9533	0,5422 – 1,6762

Odds Ratio calculado entre os genótipos TT, MT e TT+MT em relação aos MM.

Análise da severidade da doença arterial coronária em relação aos genótipos

A severidade da DAC em relação aos genótipos do angiotensinogênio avaliada com os critérios de número de vasos acometidos (uniarterial ou multiarterial), característica morfológica da placa aterosclerótica (A, B1, B2, C) e o escore de risco coronário apresentados na Tabela 5, demonstrou não haver diferença estatística entre os genótipos. Esta mesma análise realizada entre os grupos com IAM e sem IAM também não mostrou diferença estatística.

Tabela 5. Análise da severidade da doença arterial coronariana entre os pacientes com doença arterial coronariana e os genótipos do angiotensinogênio.

Variáveis*	TT n = 17 (%)	MT n = 101 (%)	MM n = 83 (%)
Número de vasos lesados			
Uniarterial	5 (29,4)	33 (32,7)	25 (30,1)
Multiarterial	12 (70,6)	68 (67,3)	58 (69,9)
Morfologia da placa			
A	1 (10,0)	1 (10,0)	0
B1	1 (10,0)	15 (27,3)	13 (28,3)
B2	1 (10,0)	14 (25,5)	5 (10,9)
C	7 (70,0)	25 (45,5)	28 (60,9)
Escore de risco			
2	5 (29,4)	27 (26,7)	21 (25,3)
4	3 (17,6)	30 (29,7)	31 (37,3)
6	7 (41,2)	30 (29,7)	31 (37,3)
8	2 (11,8)	11 (10,9)	7 (8,4)
10	0	3 (3,0)	2 (2,4)

* As variáveis não foram significativamente diferentes entre os genótipos de acordo com o teste do chi-quadrado de Pearson.

Discussão

Os principais fatores de risco para DAC comprovados pela literatura¹⁴ foram avaliados nos casos e nos controles. Diversas publicações relatam que o hábito do tabagismo duplica o risco de DAC¹⁵⁻¹⁷; neste estudo ele estava presente em 41,8% dos pacientes e 25% dos controles mostrando, aqui, ser um importante fator de risco. Pacientes com antecedentes familiares de coronariopatia em primeiro grau tem risco maior de desenvolver infarto¹⁸, porém, neste estudo ele não foi importante, uma vez que a proporção foi de 41,3% nos pacientes e de 31,7% nos controles. A hipertensão arterial sistêmica está bem estabelecida como um fator de risco para a doença isquêmica do coração¹⁹ e, neste estudo, esteve presente em 80,6% dos pacientes e 67,3% dos controles ($p = 0,004$). Um importante ensaio clínico demonstrou uma ampla comprovação dos níveis altos de colesterol total e do colesterol LDL como fator de risco coronariano²⁰, este achado também teve alta significância neste estudo ($p < 0,0001$) o que não foi observado com os níveis de triglicérides ($p = 0,169$). Os exercícios físicos têm efeito protetor contra a cardiopatia isquêmica²¹ embora, neste estudo o sedentarismo não tenha mostrado diferença entre os grupos. A prevalência de obesidade tem aumentado em todos os países do mundo, especialmente nos Estados Unidos da América, onde duplicou a proporção de adultos obesos^{22,23} com descrições de sua associação com a cardiopatia isquêmica, o que não foi confirmado neste estudo. O diabetes melito é considerado um fator de risco maior para a doença arterial coronariana²⁴ e ficou evidente neste estudo esta associação pois estava presente aproximadamente duas vezes mais nos pacientes que nos controles.

Está demonstrado que os fatores de risco coronarianos clássicos podem explicar apenas cerca de 50% da etiopatogenia da aterosclerose coronária, portanto, é imperativa a pesquisa de outros fatores envolvidos nessa enfermidade. Os fatores genéticos podem vir a ser um poderoso fator de risco coronariano e explicar os outros 50%. As recentes pesquisas moleculares têm dado um grande avanço neste caminho. Os genes que codificam para as proteínas do sistema renina-angiotensina foram propostos como candidatos e potenciais participantes da gênese da aterosclerose coronariana^{25, 26}.

Observou-se neste estudo que, quando os pacientes com doença arterial coronariana foram estratificados pelos genótipos TT, MT e MM do AGT em relação aos fatores de risco coronarianos clássicos, nenhum deles teve significância estatística. O mesmo fato foi constatado nos controles.

Verificou-se que a distribuição dos genótipos do angiotensinogênio não teve diferença significativa entre os grupos de pacientes com DAC e os controles ($\chi^2 = 0,123$; $p = 0,939$); o risco relativo de desenvolver a DAC analisado pelas comparações dos genótipos TT em relação ao MM (OR = 0,88; IC-95% = 0,37 – 2,08), dos genótipos MT em relação aos MM (OR = 1,02; IC-95% = 0,62 – 1,68) e do alelo T (TT+MT) em relação ao MM (OR = 1,00; IC-95% = 0,61 – 1,62) não foi diferente entre eles, uma vez que os intervalos de confiança (95%) dos pacientes com DAC em relação aos controles incluem o valor um, podendo-se afirmar que estes riscos não foram estatisticamente diferentes de um.

Existe uma controvérsia da associação do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio com a doença isquêmica do coração²⁷. Jeunemaitre et al²⁸ publicaram que o genótipo TT duplica o risco de infarto do miocárdio. Outros autores demonstraram ser negativa esta associação²⁹. Katsuya et al³⁰, descreveram também, uma forte evidência da associação do gene da variante M235T do angiotensinogênio com o risco de doença arterial coronariana e, especificamente, de infarto agudo do miocárdio. Quando foi realizada a análise do grupo de pacientes com DAC infartados em relação aos não infartados os resultados corroboraram o que foi observado na análise anterior; a constatação de que os riscos de apresentar infarto do miocárdio para os indivíduos portadores dos genótipos TT em relação aos MM, dos genótipos MT em relação aos MM e do alelo T (TT+MT) em relação aos MM não foram estatisticamente, diferentes de um.

Os resultados desta pesquisa indicam não haver associação significativa entre a severidade da doença arterial coronariana e os genótipos do AGT, em concordância com as conclusões do estudo CORGENE²⁸.

Estudo recente, publicado por Sethi et al³¹, com mais de 2800 pacientes demonstrou não haver associação dos genótipos da variante M235T do gene do AGT com a DAC e o IM. Resultados similares foram encontrados no presente estudo onde, os dados obtidos demonstram que este polimorfismo gênico não é

um fator preditivo independente para o desenvolvimento da DAC e IAM. Outros autores demonstraram ser negativa esta associação²⁹. Os resultados indicam a possibilidade de haver outros componentes, além deste polimorfismo e dos fatores de risco coronariano clássicos, participando da gênese da DAC e do IAM. Assim pode, também, estar ocorrendo uma interação entre vários fatores de risco ambientais e genéticos, dificultando a análise e a compreensão dos resultados.

As abordagens genéticas para doenças multigênicas e multifatoriais complexas têm limitações como tamanho da amostra, etnia, viés de publicação de resultados positivos, grupo controle, definição acurada dos fenótipos e ausência de estudos sobre interação gênica e interação ambiental.

O presente estudo demonstrou que, na população estudada e nas condições clínicas estabelecidas, não há associação entre o polimorfismo M235T do gene do AGT e a DAC, com sua severidade e tão pouco com a presença ou não do IAM.

Referências bibliográficas

1. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828.
2. Akira Hata. Role of angiotensinogen in the genetics of essential hypertension. *Life Sciences* 1995; 57: 2385-95.
3. Carluccio M, Soccio M, De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 476-88.
4. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsov YV et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-80.
5. Kamitani A, Hiromi R, Higaki J, Mikami H, Miki T, Ogihara T. Significance of the angiotensinogen gene polymorphism as a risk factor for myocardial infarction in the Japanese. *Hypertension*. 1994; 24: 381.
6. Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohn BO, Maier V, Zotz R, Matheis G, Wolf A, Wieland H, Gross W, Galton DJ, Marz W. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J* 1999; 137: 698-705.
7. WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature). Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. *Circulation* 1979; 59: 607-9.
8. Harris PJ, Harrell FE Jr, Lee KL, Behar VS, Rosati RA. Survival in medically treated coronary artery disease. *Circulation* 1979; 60: 1259-69.
9. Ellis SG, Vandormael MG, Cowley MJ, et al - Coronary morphologic and clinical determinants of procedural outcome with angioplasty for multivessel coronary disease: implications for patient selection. *Circulation* 1990; 82:1193-1202.
10. Califf RM, Phillips HR, Hindman MC, et al. Prognostic value of a coronary artery jeopardy score. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 1055-63.
11. Sambrook J, Fritsch EF, Manitis, T. Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 1989: 237p.

12. Russ A P, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated met235-to-thr allele of the human angiotensinogen gene. *Human Molec Genet* 1993; 2: 609-610.
13. Statsoft, INC (1999). *Statística for Windows*.
14. 27th Bethesda Conference-Matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 957-1047.
15. Jee SH, Suh I, Kim IS Appel LJ. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease in men with low levels of serum cholesterol: the Korea Medical Insurance Corporation Study. *JAMA* 1999; 282: 2149-55.
16. Steenland K, Thum M, Lally C, et al. Environmental tobacco smoke and coronary heart disease in the American Cancer Society CPS-II cohort. *Circulation* 1996; 94: 622-8.
17. Law MR, Morris JK, Wlad NJ. Environmental tobacco exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *Br Med J* 1997; 315: 973-80.
18. Shimoda M, Sugayama S, Kim C, Ebaid M. Orientação familiar preventiva: aspectos genéticos das doenças cardiovasculares e perspectivas futuras. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1996; 6: 623-22.
19. Mion Jr D, Nobre F. *Risco cardiovascular global*. 1^a ed. São Paulo, Lemos Editorial; 1999: 185p.
20. Gould AI, Rossouw JE, Santanelo NC, Heyse JF, Furberg ED. Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation* 1998; 97: 946-52.
21. Paffenbarger RS, Hade RT, Wing AI et al. The association of changes in physical activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 1993; 328: 538-45.
22. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med*; 1999; 341: 427-34.
23. Fregal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Metab Disord* 1998; 22: 39-47.

24. Fein F, Scheuer J. Heart disease in diabetes mellitus: theory and practice. In Rifkin H, Port D (Eds). *Diabetes Mellitus*. New York: Elsevier, 1997; 812-23.
25. Nishiuma S et al. Effect of the angiotensinogen gene Met235Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factors in two Japanese populations. *Hypertens* 1995; 13: 717-722.
26. Ishigami T, Umemura S, Iwamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nyuui N, Kimura K, Miyazak N, Ishii M. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* 1995; 91: 951-4.
27. Wang JG, Staessen JA. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol* 2000; 410: 289-302.
28. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillanneuf MT, Courbon D, Dumont C, Darmon O, Guize L, Guernonprez JL, Diebold B, Ducimetiere P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997; 99: 66-73.
29. Ko YI, Ko YS, Wang SM, Chu PH, Teng MS, Cheng NJ, Chen WJ, Hsu TS, Kuo CT, Chiang CW, Lee YS. Angiotensinogen and angiotensin-I converting enzyme gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease in Chinese. *Hum Genet* 1997; 100: 210-4.
30. Katsuya T, Koike G, Yee TW et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-3.
31. Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Gronholt ML, Steffensen R, Schnor P, Nordestgaard BG. Angiotensinogen mutations and risk for ischemic heart disease, myocardial infarction and ischemic cerebrovascular disease. Six case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Ann Intern Med* 2001; 134: 941-54.

Capítulo II

Análise do polimorfismo no intron 16 do gene da enzima conversora de angiotensina na doença arterial coronariana

Resumo

Objetivo – Investigar a associação do polimorfismo I/D no intron 16 do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) com a doença arterial coronariana (DAC) e o infarto agudo do miocárdio (IAM).

Métodos – Trezentos e cinco indivíduos foram admitidos de forma consecutiva e alocados em dois grupos: o primeiro, com 201 pacientes com DAC significativa comprovada pela angiografia coronária (lesão obstrutiva > 50%) sendo, 110 com IAM e 91 sem IAM; o segundo, 104 indivíduos controles com artérias coronárias angiograficamente normais. O polimorfismo I/D do gene da ECA foi analisado através da reação em cadeia da polimerase no DNA dos leucócitos do sangue periférico.

Resultados – Dentre os fatores de risco coronarianos clássicos somente o tabagismo, o diabetes melito, os níveis elevados de colesterol total e LDL e a hipertensão arterial sistêmica predominaram no grupo com DAC ($p < 0,05$). A distribuição dos genótipos no grupo com DAC foi de 32,8% no DD, 48,8% no ID e 18,4% no II. No grupo controle foi de 49,0%, 31,7% e 19,2%, respectivamente. Houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,009$), porém sem aumento de risco de DAC (DD vs II, OR = 0,69 e IC-95% de 0,36 a 1,34; ID vs II, OR = 1,60 e IC-95% de 0,81 a 3,14). Na comparação entre os pacientes com IAM e os controles foi observado padrão similar, também estatisticamente significativa ($p = 0,011$), porém sem aumentar a chance de apresentar infarto.

Conclusão – Os resultados deste estudo demonstram não haver evidência de associação do polimorfismo I/D do gene da ECA com a DAC e o IAM.

Analysis of intron 16 polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in the coronary artery disease

Abstract

Objective – To investigate the association between the intron 16 polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and coronary artery disease (CAD) and acute myocardial infarction (AMI).

Methods – Three hundred and five patients were assigned in order to study them consecutively and was allocated into two groups: the first one consisted of 201 patients with significant CAD proved by the coronary angiography (obstructive lesion > 50%). Within this group, 110 patients had AIM and 91 patients did not. The second one had 104 individuals with angiographically normal coronary arteries (control group). The ACE I/D polymorphism was analysed through PCR in DNA from peripheral blood leukocytes.

Results – Among classical cardiovascular risk factors, only the smoking habits, the diabetes mellitus, the high levels of total cholesterol, the LDL cholesterol and the systemic arterial hypertension have predominated in the CAD group ($p < 0.05$). The genotypic frequencies in the CAD group was 32.8%, 48.8% and 18.4%, for the DD, ID and II, respectively. The control group presented the following frequencies: 49.0%, 31.7% and 19.2%, respectively. There was a statistical difference between the two groups ($p = 0.009$); however, it has not increased the risk of CAD (DD vs II, OR = 0.69 and CI-95% = 0.36 – 1.34; ID vs II, OR = 1.60 and CI-95% = 0.81 – 3.14). Comparing both, the AMI patients and controls, a significant result was also observed ($p = 0.011$), without a significant risk of infarction, as well.

Conclusion – The results from this study demonstrate that there is no association between the ACE I/D polymorphism with the CAD and the AMI.

Introdução

Estudos recentes têm demonstrado importantes progressos nos conhecimentos fisiopatológicos e terapêuticos da doença arterial coronariana (DAC) e suas conseqüências, o infarto agudo do miocárdio (IAM), a angina de peito instável, a insuficiência cardíaca e a morte súbita, porém, mantém-se como a principal causa de morbidade e mortalidade nos países ocidentais. Constitue um paradigma de doença complexa e multifatorial sendo resultado da interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais.

Observando-se o decréscimo de IAM em pacientes com cardiopatia isquêmica e/ou disfunção ventricular esquerda que tomavam inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA)¹ houve grande interesse em desvendar o elo entre o sistema renina-angiotensina (SRA) e a aterogênese. O mecanismo pelo qual a ativação do SRA poderia causar IAM não está bem estabelecido, entretanto evidências tanto em animais quanto em seres humanos, sugerem que o aumento local ou sistêmico da angiotensina II (AII) pode ser fundamental no desenvolvimento da DAC². A confirmação de que estes achados pudessem realmente ser representativo de um fator de risco importante para a cardiopatia isquêmica veio com a descrição do polimorfismo do gene da ECA, que identificou a deleção de um alelo com uma prevalência aumentada em portadores de cardiopatia isquêmica^{3, 4, 5}.

A ECA ou convertase, ou kininase II é uma peptidyl-dipeptidase que hidrolisa na circulação um decapeptídeo inativo, a angiotensina I, e a converte num octapeptídeo, a angiotensina II, um potente agente vasopressor que apresenta propriedades mitógenas⁶⁻¹⁰. O gene da ECA está localizado no cromossomo 17. É caracterizado por polimorfismo, inserção/deleção, baseado na presença (inserção-I) ou ausência (deleção-D) de um fragmento de 287 pares de bases dentro do intron 16 do gene, identificado pela hibridação com uma sonda de cDNA. Nos três genótipos resultantes, homozigoto II, o heterozigoto ID e o homozigoto DD, observou-se que o genótipo DD estava associado ao dobro do nível da atividade sérica da ECA em relação ao II e níveis intermediários, comparado aos heterozigotos ID (II: 299 µg/L, ID: 393 µg/L e DD: 494 µg/L)¹¹.

Vários estudos comprovaram a associação entre IAM e a presença do alelo D do gene da ECA¹²⁻²¹, porém outros questionaram a veracidade desses fatos²²⁻²⁴. Estas conclusões contraditórias originaram dúvidas sobre a real importância do polimorfismo do gene da ECA na patogênese do IAM²⁵⁻²⁸. Uma das limitações de alguns estudos^{3,18,23} foi a seleção dos pacientes com vários meses ou anos após o IM e de outros, a não comprovação angiográfica da etiologia aterosclerótica do IM, que poderia influenciar nos resultados da correlação gene da ECA - níveis plasmáticos de ECA - DAC - IAM.

O objetivo do presente estudo é investigar se o polimorfismo I/D do gene da ECA está associado com a doença arterial coronariana em pacientes infartados e não infartados comprovados angiograficamente e se representa um fator de risco independente para essa enfermidade.

Métodos

Realizou-se um estudo de corte transversal com trezentos e cinco indivíduos de raça branca que foram recrutados, prospectivamente, de forma consecutiva entre os admitidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e no Instituto do Coração do Triângulo alocados em dois grupos, o primeiro, de 201 pacientes com DAC, sendo 91 com o diagnóstico de IAM de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde²⁹ comprovados pela angiografia e ventriculografia³⁰ e 110 pacientes com DAC não infartados, recrutados entre os indivíduos com diagnóstico de doença isquêmica do coração, comprovados angiograficamente. O segundo grupo, de controles, constituiu-se de 104 indivíduos com diagnósticos de doença cardíaca valvular, dor torácica atípica e doadores para transplante renal, com angiografia coronária normal. Os pacientes infartados foram submetidos à cinecoronariografia em até duas semanas após o IAM; os não infartados e o grupo controle, logo após a realização do diagnóstico clínico. Com o intuito de avaliar a aterosclerose coronariana e a sua extensão foram analisados os seguintes aspectos: 1) lesão coronariana obstrutiva maior que 50%; 2) áreas segmentares de hipocontratilidade na ventriculografia esquerda. Os parâmetros da cineangiocardiorrafia foram avaliados por três hemodinamicistas independentes.

Foram excluídos os indivíduos com infarto do miocárdio prévio, os já submetidos a revascularização miocárdica ou angioplastia percutânea transluminal coronária e os portadores de doenças sistêmicas e malignas.

Os fatores de risco cardiovascular que estão classicamente estabelecidos foram documentados tais como: história familiar de DAC na primeira geração, hipertensão arterial sistêmica (HAS), o hábito do tabagismo, níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL, níveis baixos de colesterol HDL, níveis elevados de triglicérides, diabetes melito (DM) e a obesidade, avaliada pelo índice de massa corpórea ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$)³¹.

Determinação do genótipo da enzima conversora da angiotensina

O DNA foi extraído dos leucócitos de uma amostra de sangue periférico e os genótipos foram determinados com a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando a região I/D do gene da ECA^{32,33}. Foram realizadas duas repetições em todos os casos. Testes para excluir contaminação consistiram da casualização das amostras em cada repetição, manipulação individual de cada amostra e procedimentos em ambientes separados (extração, preparo da reação e amplificação).

Extração do DNA, amplificação e detecção do gene da ECA

As amostras de sangue colhidas dos pacientes foram conservadas a 4 °C por, no máximo, uma semana antes da extração dos ácidos nucleicos. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com os procedimentos para microextração de Sambrook et al³⁴. A camada de leucócitos foi separada por centrifugação e as células foram lavadas em solução tampão (100 mM Tris-HCl; 500 mM de KCl e 15 mM de MgCl_2), submetidas à digestão por proteinase K (100 g/mL). As proteínas e debris celulares foram precipitadas por centrifugação. O DNA, em solução no sobrenadante, foi precipitado por isopropanol e ressuspenso em solução tampão. A reação em cadeia da polimerase foi realizada no equipamento *MJ Research* (PTC-100-60). O par de *primers* (iniciadores da reação) foi o mesmo descrito por Rigat et al¹¹. A reação consistiu

de 50 ng de DNA, 1U de *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase, 8 pmol de cada primer, 2 mM de $MgCl_2$ e 100 μM de dNTPs. Procedeu-se a 38 ciclos nas seguintes temperaturas e tempos: 94 °C/1min; 60 °C/30s e 72 °C/1min. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz ultravioleta na presença de brometo de etídeo. Os produtos analisados apresentaram três conformações: homozigoto normal (I/I: molécula de DNA com 517 pares de bases), heterozigoto (I/D: moléculas de DNA com 517 e 230 pares de bases) e homozigoto alterado (D/D: molécula de DNA com 230 pares de bases). Os genótipos foram determinados pelo examinador, sem o conhecimento se a amostra pertencia a pacientes com DAC ou controles (teste cego).

Todos os procedimentos, riscos e benefícios potenciais foram informados aos pacientes por meio de formulário próprio para seu consentimento formal.

O protocolo foi submetido à apreciação e liberação pelo conselho de ética da Universidade Federal de Uberlândia.

Análise estatística

O programa Statistica 5.5 *Statsoft, Inc.*³⁵ foi utilizado para fazer as análises. Para indicar o nível de significância estatística foi considerado o erro α menor que 5% ($p < 0,05$). O teste do χ^2 de Pearson foi utilizado para analisar as diferenças das freqüências dos genótipos entre casos e controles e entre fatores de risco coronarianos convencionais com os genótipos. As variáveis foram transformadas em numéricas, atribuindo-se o valor 0 para ausência e 1 para a presença. As variáveis contínuas foram expressas como média - desvio padrão e as diferenças entre os grupos foram comparados usando o teste t de Student.

O risco relativo foi avaliado pelo cálculo da razão de chances (*Odds Ratio* – OR) e seus intervalos de confiança (IC)³⁶. As diferenças entre as freqüências de pacientes, quanto aos fatores de risco convencionais, em relação às classes genotípicas foram avaliadas via modelos lineares generalizados tendo a distribuição da variável resposta binomial, adotando como função de ligação a função logística.

Resultados

O polimorfismo determinado em cada loco representa um sistema dialélico. A consistência das distribuições genotípicas observadas com suas expectativas sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada em cada amostra. A população estudada ($n = 305$) apresentou o valor de 3,45 no teste do qui-quadrado com valor de $p = 0,1779$ mostrando que está em equilíbrio.

Genotipagem

A determinação dos genótipos do gene da ECA realizada pela PCR mostrou três padrões de produtos nos pacientes e controles: o homozigoto II (molécula de DNA com 517 pares de bases), o heterozigoto ID (moléculas de DNA com 517 e 230 pares de bases) e o homozigoto mutante DD (moléculas de DNA com 230 pares de bases), Figura 1.

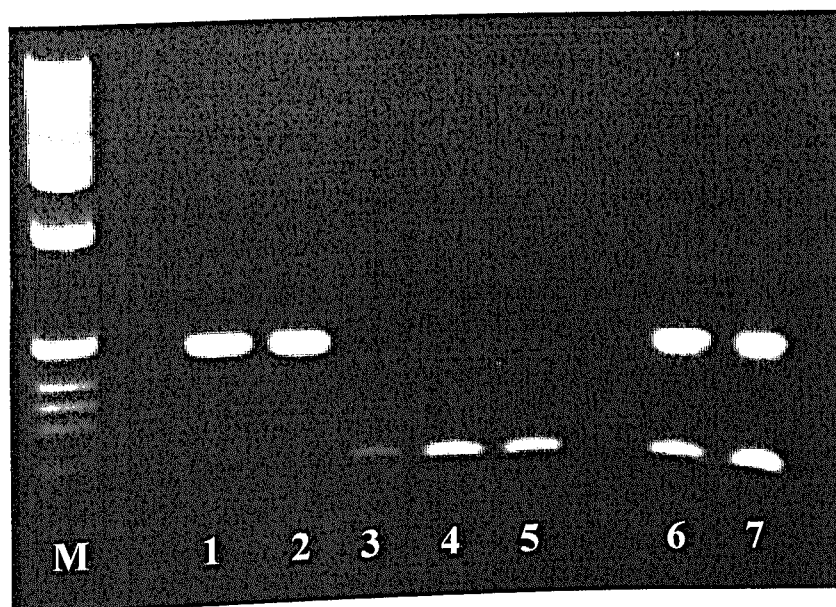


Figura 1. Produtos amplificados do gene da enzima conversora da angiotensina. M – marcador de 100 pb; 1 e 2 – homozigotos normais (II); 3, 4 e 5 – homozigotos para a deleção (DD) e 6 e 7 – heterozigotos (ID).

Análise entre os grupos com doença arterial coronariana e controles

Dos 305 indivíduos incluídos no estudo o grupo com DAC correspondeu a 201 pacientes com média de idade de $61,5 \pm 10,85$ anos e o grupo controle, a 104 indivíduos com média de idade de $56,69 \pm 11,52$ anos, sendo a diferença entre estes estatisticamente significativas ($p < 0,05$). O sexo masculino predominou no grupo com DAC (55,7%) e o feminino nos controle (57,6%). Dentre os fatores de risco coronariano clássicos, a história familiar de coronariopatia, a obesidade, o sedentarismo, os baixos níveis de colesterol HDL e os níveis altos de triglicérides, não mostraram diferença significativa entre os grupos. O hábito de fumar, o diagnóstico de diabetes melito, os níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e a hipertensão arterial sistêmica predominaram no grupo com doença arterial coronariana, sendo estatisticamente superiores aos controles, (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores de risco coronariano nos pacientes com doença arterial coronariana e nos controles.

Variáveis	DAC n = 201 (%)	Controles n = 104 (%)	p
História Familiar de DAC	83 (41,3%)	33 (31,7%)	0,103
Hipertensão Arterial	162 (80,6%)	70 (67,3%)	0,010
Fumantes	84 (41,8%)	26 (25,0%)	0,004
Diabetes melito	47 (23,4%)	13 (12,5%)	0,023
IMC > 25kg/m ²	109 (54,2%)	57 (54,8%)	0,923
Sedentarismo	128 (63,7%)	60 (57,7%)	0,308
Colesterol (mg/dL)			
Total > 200	139 (69,2%)	41 (39,4%)	0,0001
HDL < 35	26 (12,9%)	15 (4,4%)	0,718
LDL > 159	176 (87,6%)	62 (59,6%)	0,0001
Triglicérides > 200 mg/dL	42 (20,9%)	15 (14,4%)	0,169

Quando foram analisados os indivíduos controles estratificados pelos genótipos da ECA observou-se que a média de idade foi semelhante $57,2 \pm 11,9$ anos e que não havia diferença estatística significativa em nenhum dos fatores de risco coronariano clássicos (Tabela 2). Esta mesma análise nos pacientes portadores de DAC mostrou que estas variáveis também não foram estatisticamente diferentes entre os três genótipos da ECA (Tabela 3).

A distribuição dos genótipos nos 201 pacientes com DAC foi de 32,84% no DD, 48,76% no ID e 18,40% no II e nos 104 indivíduos controles foi de 49,04% no DD, 31,73% no ID e 19,23% no II ($\chi^2 = 9,341$; $p = 0,009$). O risco relativo (OR) de desenvolver DAC na comparação dos genótipos DD vs II foi 0,69 (IC-95% = 0,36 – 1,34), dos genótipos ID vs II foi 1,60 (IC-95% = 0,81 – 3,14) e do alelo D (DD+ID) vs II foi 1,05 (IC-95% = 0,57 – 1,93), Tabela 4.

Tabela 2. Fatores de risco coronariano nos indivíduos controles estratificados pelos genótipos da enzima conversora da angiotensina I.

Variáveis	DD n = 51 (%)	ID n = 33 (%)	II n = 20 (%)	p
História Familiar DAC	15 (29,4)	13 (39,4)	5 (25,0)	0,487
Hipertensão Arterial	34 (66,7)	23 (69,7)	13 (65,0)	0,931
Fumantes	08 (15,7)	12 (36,4)	06 (30,0)	0,086
Diabetes melito	08 (15,7)	05 (15,2)	0 (0,0)	0,170
IMC > 25 kg/m ²	28 (54,9)	18 (54,5)	11 (55,0)	0,999
Sedentarismo	27 (52,9)	22 (66,7)	11 (55,0)	0,445
Colesterol (mg/dL)				
Total > 200	25 (49,0)	10 (30,3)	06 (30,0)	0,145
HDL < 35	05 (9,8)	06 (18,2)	04 (20,0)	0,414
LDL > 159	33 (64,7)	19 (57,6)	10 (50,0)	0,503
Triglicérides > 200mg/dL	11 (21,6)	03 (9,1)	01 (5,0)	0,116

Tabela 3. Fatores de risco coronariano nos pacientes com DAC estratificados pelos genótipos da enzima conversora da angiotensina I.

Variáveis	DD	ID	II	p
	n = 66 (%)	n = 98 (%)	n = 37 (%)	
História Familiar DAC	34 (51,5%)	35 (35,7%)	14 (37,8%)	0,117
Hipertensão Arterial	57 (86,4%)	76 (77,6%)	29 (78,4%)	0,350
Fumantes	27 (40,9%)	40 (40,8%)	17 (45,9%)	0,851
Diabetes melito	17 (25,8%)	20 (20,4%)	10 (27,0%)	0,617
IMC > 25 kg/m ²	41 (62,1%)	49 (50,0%)	19 (51,4%)	0,289
Sedentarismo	47 (71,2%)	59 (60,2%)	22 (59,5%)	0,299
Colesterol (mg/dL)				
Total > 200	48 (72,7%)	67 (68,4%)	24 (64,9%)	0,690
HDL < 35	4 (6,1%)	15 (15,3%)	7 (18,9%)	0,109
LDL > 159	63 (95,5%)	83 (84,7%)	30 (81,1%)	0,051
Triglicérides > 200mg/dL	15 (22,7%)	21 (21,4%)	6 (16,2%)	0,726

Análise dos pacientes com infarto agudo do miocárdio estratificados pelos genótipos

Nos pacientes com IAM a média de idade foi igual ($62,4 \pm 11,27$ anos) e não houve diferença entre os sexos ($p = 0,659$). Os fatores de risco coronariano clássicos não se mostraram estatisticamente diferentes entre os três genótipos (Tabela 5). A freqüência dos genótipos nos pacientes com IAM foi de 32,7% do DD, de 51,8% do ID e 15,5% do II; nos controles foi de 49,0%, 31,7% e 19,2%, respectivamente ($\chi^2 = 9,06$; $p = 0,011$). O risco relativo de apresentar IAM foi avaliado nas comparações dos genótipos DD com II (OR = 0,83; IC-95% = 0,38 - 1,80), ID com II (OR = 2,03; IC-95% = 0,93 - 4,41) e do alelo D (DD+ID) com o II (OR = 0,87; IC-95% = 0,41 - 1,83), Figura 2.

Tabela 4. Análise do chi-quadrado para a frequência alélica entre os grupos DAC vs controles e infarto vs controles, seus Odds Ratio e intervalos de confiança.

DAC versus Controles						
Genótipo	DAC n=201 (%)	Controle n=104 (%)	χ^2	p	Odds Ratio	IC (95%)
DD	66 (32,8)	51 (49,0)			0,69	0,3632 – 1,3471
ID	98 (48,8)	33 (31,7)			1,60	0,8198 – 3,1432
II	37 (18,4)	20 (19,2)	9,341	0,009		
DD+ID	164 (81,5)	84 (80,7)			1,05	0,5768 – 1,9311

Infarto versus Controles						
Genótipo	Infarto n=110 (%)	Controle n=104 (%)	χ^2	p	Odds Ratio	IC (95%)
DD	36 (32,7)	51 (49,0)			0,8304	0,3827 – 1,8019
ID	57 (51,8)	33 (31,7)			2,0321	0,9354 – 4,4144
II	17 (15,5)	20 (19,2)	9,068	0,011		
DD+ID	93 (84,5)	84 (80,7)			0,8782	0,4198 – 1,8370

Odds Ratio: medida do risco relativo entre os indivíduos portadores dos genótipos DD, ID e do alelo D (genótipos DD+ID) em relação aos indivíduos com genótipos II.

Tabela 5. Fatores de risco coronariano nos pacientes portadores de infarto agudo do miocárdio estratificados pelos genótipos da enzima conversora da angiotensina I.

Variáveis	DD n = 36 (%)	ID n = 57 (%)	II n = 17 (%)	p
História Familiar de DAC	20 (55,6%)	23 (40,4%)	8 (47,1%)	0,358
Hipertensão Arterial	32 (89,9%)	46 (80,7%)	14 (82,4%)	0,576
Fumantes	19 (52,8%)	26 (45,6%)	7 (41,2%)	0,686
Diabetes melito	7 (19,4%)	14 (24,6%)	6 (35,3%)	0,457
IMC > 25 kg/m ²	21 (58,3%)	22 (38,6%)	10 (58,8%)	0,113
Sedentarismo	27 (75,0%)	35 (61,4%)	9 (52,9%)	0,227
Colesterol (mg/dL)				
Total > 200	25 (69,4%)	41 (71,9%)	12 (70,6%)	0,967
HDL < 35	2 (5,6%)	10 (17,5%)	5 (29,4%)	0,066
LDL > 159	33 (91,7%)	47 (82,5%)	13 (76,5%)	0,296
Triglicérides > 200mg/dL	9 (25,0%)	16 (28,1%)	3 (17,6%)	0,685

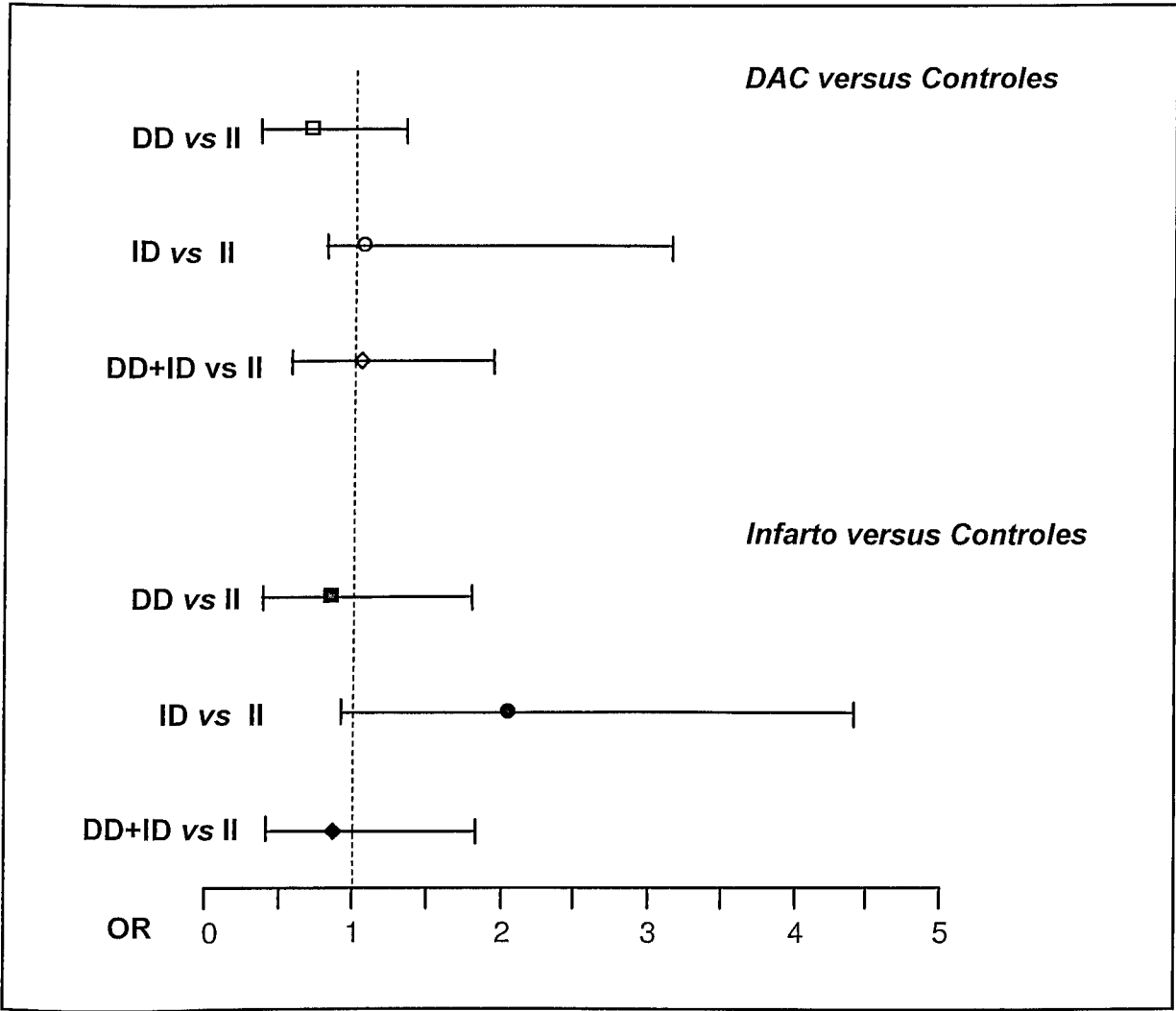


Figura 2. Estimativa do risco de apresentar DAC associado ao polimorfismo I/D da ECA entre os grupos DAC vs controles e, de ter infarto, entre os grupos infarto vs controles. Odds Ratio dos genótipos DD vs II, ID vs II e DD+ID vs II.

Discussão

No presente estudo na comparação entre os grupos de pacientes com DAC em relação aos indivíduos controles observou-se que, dentre os fatores de risco coronariano clássicos a hipertensão arterial sistêmica, a obesidade, o tabagismo, o diabetes melito e os níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL apresentaram diferença estatisticamente significativa, estando presentes de maneira relevante nos pacientes com DAC. Este fato poderia explicar, parcialmente, o acometimento desses pacientes pela DAC como está comprovado na literatura³⁷. Na análise desses fatores de risco no grupo controle e no grupo de pacientes portadores de DAC em relação aos genótipos da ECA constatou-se não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de DAC e controles para nenhum destes fatores; estes dados podem indicar que os fatores de risco coronariano não estão associados com o polimorfismo I/D do gene da ECA.

As bases das associações genéticas com enfermidades complexas têm sido descritas por diversos autores, entre outros por Risch³⁸. Junto aos problemas derivados do tamanho da amostra e da diversidade étnica, acrescenta-se o das metanálises que podem apresentar um viés de interpretação, pois, infelizmente, existe uma certa tendência a publicar aqueles trabalhos nos quais foi demonstrada uma associação positiva, fato este que dificulta a análise dos estudos de associação^{39,40}.

Na descrição da associação do alelo D do gene da ECA com níveis plasmáticos e celulares elevados de angiotensina II foi proposto que esta levaria a um aumento crônico da expressão desta enzima por modular os seus níveis e também os de bradicinina em locais específicos, afetando a homeostasia cardiovascular e, possivelmente, implicando no aumento do risco de DAC e IM. Desde o relato inicial de Cambien⁴, vários autores descreveram suas experiências com o polimorfismo do gene da ECA como fator de risco coronário. Alguns estudos de grande envergadura como o *Physician's Health Study*, com 3500 médicos²⁴ e o estudo ISIS-3⁴¹, com 11000 pacientes, negam qualquer relação deste polimorfismo com o infarto do miocárdio. Em duas grandes metanálises publicadas, uma conclui positivamente³⁹ e outra, mais recente, com mais de

32000 indivíduos de raça branca, também encontrou aumento significativo de risco nos portadores do genótipo homozigoto DD⁴². Os trabalhos foram similares quanto à técnica de genotipagem, porém, diferentes quanto à seleção dos pacientes, inclusive alguns com grupos étnicos bem diversos e outros foram controversos quanto aos resultados.

No presente estudo, observou-se uma diferença significativa entre os grupos de pacientes com DAC e os controles ($\chi^2 = 9,341$; $p = 0,009$), que é caracterizada por uma inversão nas frequências dos genótipos DD e ID. No grupo controle, o genótipo DD foi mais freqüente que o ID e o II, ocorrendo o inverso nos portadores de DAC, ou seja, a freqüência do genótipo ID foi maior que o DD e o II. Este fato sugere uma associação do heterozigoto (ID) com a presença de DAC; contudo, o risco relativo (OR) dos pacientes com esse genótipo em relação aos homozigotos (II) não foi estatisticamente diferente de 1, o mesmo ocorrendo com os pacientes DD. Portanto, embora existam diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos a chance de desenvolver DAC não foi estatisticamente significativa quando foram comparados os genótipos DD com II (OR = 0,69; IC-95% = 0,36 - 1,34), ID com II (OR = 1,60; IC-95% = 0,81 - 3,14) e do alelo D (DD+ID) com II (OR = 1,05; IC-95% = 0,57 - 1,93).

Na análise do grupo de pacientes com IAM em relação aos controles foram constatados que a freqüência dos genótipos DD, ID e II mostrou padrão de comportamento similar à comparação de DAC *versus* controles, também com significância estatística ($\chi^2 = 9,068$; $p = 0,011$) porém, sem aumentar a chance de apresentar infarto que foi constatado nas comparações dos genótipos DD com II (OR = 0,83; IC-95% = 0,38 - 1,80), ID com II (OR = 2,03; IC-95% = 0,93 - 4,41) e do alelo D (DD+ID) com o II (OR = 0,87; IC-95% = 0,41 - 1,83). Esta variação polimórfica observada pode indicar um efeito específico do genótipo em relação à doença arterial coronariana devido a problemas estruturais da enzima conversora de angiotensina, conforme estabelecido pelo seu polimorfismo. Diferentemente do descrito por Cambien et al⁴ que concluíram que os portadores do genótipo DD teriam uma maior predisposição à DAC e ao IAM que os homozigotos II, os dados do presente estudo indicam associação do genótipo ID com a DAC, mas, não predisposição, que poderia ser devido a problemas relacionados ao tamanho da amostra.

Uma das limitações deste estudo foi a dificuldade de se obter o grupo controle ideal (indivíduos idosos sem evidências clínicas e angiográficas de DAC). Observou-se que o grupo controle não se caracterizou perfeitamente como tal, pois os indivíduos poderiam apresentar alterações ateroscleróticas confinadas à parede arterial, como ocorre nos estágios iniciais da DAC (estrias gordurosas) ou o crescimento de lesões iniciais que não afetam a geometria da luz vascular e, devido à limitação da resolução da angiografia, haveria a possibilidade de que algumas artérias coronárias angiograficamente “normais” apresentassem alterações não detectáveis pelos métodos diagnósticos atuais como demonstrou Freudenberg e Lichtlen⁴³.

É atribuído um efeito aterogênico da angiotensina II por sua ação mitógena sobre a proliferação do endotélio, apesar de várias provas experimentais e clínicas convincentes a favor do papel causal do polimorfismo I/D do gene da ECA sobre a DAC e o IAM este, e outros estudos demonstraram que o genótipo DD e o alelo D desse gene não se comportaram como preditores independentes de aterosclerose coronariana e IAM, de forma que, 10 anos depois da descrição inicial⁴, a associação definitiva entre o polimorfismo I/D do gene da ECA e a enfermidade coronariana ainda permanece obscura.

Referências bibliográficas

1. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-77.
2. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II: evidence of potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic activity. *Circulation* 1993; 87: 1969-73.
3. Cambien F, Gelas FA, Herbeth B et al. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: The Nancy Study. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 774-780.
4. Cambien F, Poirier O, Lecerf L et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-3.
5. Tiret L, Kee F, Poirier O et al. Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 1993; 341: 991-2.
6. Skeggs, LT, Kahn JR, Shumway NP. Preparation and function of the angiotensin-converting enzyme in hypertension. *J Exp Med* 1956; 103: 295-299.
7. Yang Hyt, Erdos EG. A dipeptide carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta* 1970; 214: 374-376.
8. Ehlers MRW, Riordan JF - Angiotensin converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989; 28: 5311-8.
9. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1991; 88: 4651-5.
10. Palmer RM, Ferige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.

11. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin-converting enzyme gene (DCP 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1433.
12. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE et al. A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease: the ECTIM study. *Arterioscler Tromb* 1992; 12: 701-07.
13. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344: 910-4.
14. Evans AE, Poirier O, Kee F et al. Polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. *Q J M* 1994; 87: 211-4.
15. Ruiz J, Blanche H, Cohen N et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3662-5.
16. Nakai K, Itoh C, Miura Y et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentrations and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199-202.
17. Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ, Frangos E, Clark AJL, Caulfield M. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caterphilly Heart Study. *Circulation* 1995; 91: 270-4.
18. Ludwig E, Corneli PS, Anderson JL, Marshall, HW, Lalouel JM, Ward RH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation* 1995; 91: 2120-4.
19. Badenhop RF, Wang XL, Wilcken DEL. Angiotensin-converting enzyme genotype in children and coronary events in their grandparents. *Circulation* 1995; 91: 1655-8.
20. Beohar N, Damaraju S, Prather A, et al. Angiotensin-I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. *J Investig Med* 1995; 43: 275-80.

21. Danser AHJ, Maarten ADH, Schalekamp MD et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. *Circulation* 1995; 92: 1387-8
22. Kreutz T, Lindpaintner K, Pfeffer MA et al. Angiotensin-converting enzyme genotype and risk for coronary heart disease. *Circulation* 1993; 88(suppl): I-510.
23. Bohn M, Berge Ke, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and parental history of myocardial infarction. *Clin Genet* 1993; 44: 298-301.
24. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 706-11.
25. Gardemann A, Weib T, Schwartz O et al. Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients. *Circulation* 1995; 92: 2796-99.
26. Mitch WE. Is the inherited ACE genotype a trump or a joker? *J Clin Invest* 1995; 96: 2100-1.
27. Singer D, Missouris C, Jeffery S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. What to do about all the confusion? *Circulation* 1996; 94: 236-9.
28. Teo KK. Angiotensin-converting enzyme genotypes and disease. *B M J* 1995; 311: 763-4.
29. WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature). Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. *Circulation* 1979; 59: 607-9.
30. Ryan TJ et al. Management of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1328-428.
31. Bray GA. Pathophysiology of obesity. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 2540-5.
32. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *CSH Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-273.

33. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols - a guide to methods and applications. Academic Press, Inc, USA 1990; 482 p.
34. Sambrook J, Fritsch EF, Manitis, T. Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 1989: 237p.
35. Statsoft, INC (1999). Statística for Windows.
36. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. New York, John Wiley & Sons, 1989, 307p.
37. Mion, JD, Nobre, F. Risco cardiovascular global. São Paulo: Lemos Editorial, 1999, 1ª ed. 185p.
38. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science 1996; 273: 1516-1517.
39. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. Circulation 1996; 94: 708-12.
40. Schunkert, H et al. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. J Mol Med 1997; 75: 867-875.
41. Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Young-man L, et al. Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5,000 cases and 6,000 controls. International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaboration. Lancet 2000; 355: 434-42.
42. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analysis of small and large studies in Whites. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 484-92.
43. Freudenberg H, Lichtlen PR. Limitations of intravital coronary angiography. A comparison with postmortem results in 87 cases. Circulation 1981 63/64 (suppl IV): 238 (abstr).

Capítulo III

O polimorfismo A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II no infarto agudo do miocárdio

Resumo

Objetivo – Avaliar a associação do polimorfismo A1166C do gene do receptor AT1 da angiotensina II (AT1R) com o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a severidade da doença arterial coronariana (DAC).

Métodos – Estudo prospectivo, transversal de 110 pacientes com IAM submetidos à angiografia coronária com lesão significativa ($> 50\%$) avaliada por três critérios de severidade: número de vasos lesados, morfologia da placa aterosclerótica e escore de risco coronário. Cento e quatro indivíduos controles sem lesões coronarianas. O polimorfismo A1166C do gene do AT1R foi determinado pela reação em cadeia da polimerase no DNA dos leucócitos do sangue periférico. Os fatores de risco coronariano clássicos foram analisados em todos os indivíduos.

Resultado – Na estratificação dos genótipos em relação aos fatores de risco apenas o tabagismo teve predominância nos heterozigotos AC ($p = 0,02$). A frequência dos genótipos nos pacientes infartados foi de AA = 54,5%; AC = 35,5% e CC = 10%, sendo similar e não significativa em relação aos controles ($p = 0,83$). Não houve aumento do risco de IAM nas comparações dos genótipos CC vs AA ($OR = 1,35$; $IC-95\% = 0,50 - 3,59$), AC vs AA ($OR = 1,03$; $IC-95\% = 0,58 - 1,84$) e AA+AC vs AA ($OR = 1,33$; $IC-95\% = 0,51 - 3,45$). Nenhum dos critérios de severidade teve associação significativa com os genótipos.

Conclusão – Os resultados deste estudo indicam não haver associação do polimorfismo A1166C do AT1R com o IAM e nem com a severidade da DAC.

The A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene in the acute myocardial infarction

Abstract

Objective – To evaluate the association of A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene (AT1R) in the acute myocardial infarction (AMI); as well as in the severity of the coronary artery disease (CAD).

Methods – The transversable prospective study among 110 AMI patients were undergone to coronary angiography with significant lesion ($> 50\%$) evaluated through three severity criteria, such as: the number of diseased vessels, the atherosclerotic plaque morphology and the jeopardy score. One hundred and four individuals with normal coronary artery were the control group. The A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene was determined by PCR-RFLP in DNA from peripheral blood leukocytes. The classical coronary risk factors were analyzed in all individuals.

Results – Analysis of the genotypic stratification within risk factors have found that only the smoking habit was predominant in the AC heterozygote ($p=0.02$). Genotypic frequencies in the infarcted patients was AA = 54.5%; AC = 35.5% and CC = 10.0%. Similar frequencies were found in the control group ($p=0.83$). There was no increased risk of AMI in all comparisons: CC vs AA (OR = 1.35; IC-95% = 0.50 – 3.59), AC vs AA (OR = 1.03; IC-95%: 0.58 – 1.84) and AA+AC vs AA (OR = 1.33; IC-95% = 0.51 – 3.45). None of the severity criteria have had meaningful association with genotypes.

Conclusion – This study results demonstrate there are no association between the A1166C polymorphism of the AT1R gene and the AMI as well as the CAD severity.

Introdução

O sistema renina-angiotensina (SRA) compreende uma cascata de reações enzimáticas resultando na formação da angiotensina II a partir do substrato angiotensinogênio. É o maior regulador da cascata hormonal que envolve o volume sanguíneo, o equilíbrio eletrolítico, a pressão arterial e a função endotelial. Na via clássica, o angiotensinogênio é clivado pela enzima renina gerando angiotensina I (AI) que, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) originando a angiotensina II (AII) que é o maior efector molecular do SRA e pode apresentar ações tanto como hormônio sistêmico quanto como um fator gerado localmente (parácrina, autócrina).

Os efeitos fisiológicos da angiotensina II são mediados por uma via final comum ligando-se a receptores específicos localizados na membrana celular^{1,2}. Duas isoformas de receptores endoteliais para a angiotensina II são conhecidas até o momento: AT1 e AT2. A maioria dos seus efeitos fisiológicos é mediada pela ativação de receptores do subtipo AT1 enquanto poucos efeitos, geralmente opostos àqueles desencadeados pela ativação de AT1, têm sido atribuídos à ativação de receptores AT2. Os receptores pertencem à super família de receptores acoplados a proteínas G e, no caso dos receptores AT1 (AT1R), o acoplamento ocorre via proteínas Gq. Conseqüentemente, a estimulação de receptores AT1 ativa a fosfolipase C, aumenta os níveis de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3), eleva a concentração de Ca^{+2} intracelular e promove ativação de várias quinases modulando as funções celulares^{3,4}. A angiotensina II também estimula o crescimento celular através de fosforilação de tirosina quinase e conseqüente ativação de proteínas envolvidas na transcrição do DNA.

Entre as ações da angiotensina II destaca-se a contração e proliferação de células do músculo liso vascular, aumento da contratilidade e indução de hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona e liberação de vasopressina, ativação do sistema nervoso simpático, inibição da liberação de renina, entre outras. A angiotensina II atua como mitógeno em células de músculo liso vascular através da ativação de várias vias de sinalização, incluindo fosfolipase C, fosfolipase A₂ e fosfolipase D, bem como pela ativação de um grande número de quinases: tirosinaquinases, proteínas quinases ativadas por

mitógenos (MAPKs), quinase c-src, Janus e receptores com atividade de tirosina quinase. Ela também estimula fatores de transcrição como a proteína ativadora-1, ativadores de transdução de sinal e transcrição (STATs) e o fator nuclear kappa B (NFkB)^{5,6}.

Vários estudos demonstram que os efeitos proliferativos da angiotensina II são mediados pela ativação de receptores AT1 e que a ativação de receptores AT2 contribui para a inibição do crescimento celular e estimulação de apoptose, sendo um mecanismo contra-regulatório da ativação de AT1⁷. Mais recentemente, foi reportado num estudo em pacientes com infarto do miocárdio (IM), que os níveis circulantes de angiotensina II estavam aumentados e que a administração dos antagonistas AT1R apresentava importante implicação farmaco-terapêutica⁸.

Evidências crescentes mostram a importância da participação do sistema renina-angiotensina no processo de proliferação endotelial e aterosclerose coronária. A ação do receptor AT1 sugere a sua participação na gênese da aterosclerose coronária e do IM.

Com a clonagem do cDNA do receptor AT1 foi identificado um polimorfismo na região 3', não traduzida (A1166C) e correspondente a uma transversoão A→C na posição do nucleotídeo 1166 da seqüência do mRNA, resultando em dois genótipos homozigotos (CC e AA) e o heterozigoto AC⁹. Os homozigotos CC parecem estar associados com uma maior incidência de infarto do miocárdio¹⁰.

O presente estudo tem por objetivo avaliar a associação do polimorfismo A1166C do gene do AT1R com o infarto agudo do miocárdio (IAM) e com a severidade da DAC.

Métodos

Estudo prospectivo de delineamento transversal com processo de amostragem consecutiva realizada nos serviços de hemodinâmica do Instituto do Coração do Triângulo e do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e análises moleculares no Instituto de Genética (UFU). Cento e dez pacientes elegíveis foram incluídos no estudo com o diagnóstico de IAM com base em dados clínicos, eletrocardiográficos e enzimáticos¹¹, comprovados pela angiografia coronária. Os controles corresponderam a 104 indivíduos com doença cardíaca valvular, dor torácica atípica e doadores para transplante renal que não apresentaram lesões nas artérias coronárias e no músculo cardíaco na cineangiocardiografia. Todos os indivíduos foram submetidos a avaliação dos fatores de risco coronariano clássicos como antecedente familiar em primeiro grau de coronariopatia, níveis de colesterol (HDL, LDL) e triglicérides, antecedentes de tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes melito (DM), sedentarismo, obesidade (índice de massa corpórea – IMC > 25 kg/m²). A cineangiocardiografia foi utilizada para comprovação e avaliação da extensão da DAC elegendo-se para o estudo pacientes com lesão obstrutiva maior que 50%.

A severidade da DAC foi avaliada com os seguintes critérios: número de vasos acometidos (uniarterial ou multiarterial)¹²; característica morfológica da placa aterosclerótica (A, B1, B2, C) conforme descrito por Ellis et al¹³; escore de risco coronário que é um método simples para estimar a quantidade de músculo cardíaco em risco baseado na localização proximal, média, distal e grau de estenose da lesão obstrutiva sendo que os escores mais elevados estão associados com uma baixa fração de ejeção do ventrículo esquerdo propiciando uma maior informação prognóstica segundo Califf et al¹⁴.

Foram excluídos os pacientes com doença maligna sistêmica, enfermidade crônica terminal, antecedentes de infarto do miocárdio prévio, cirurgia de revascularização miocárdica e angioplastia coronária.

O protocolo de pesquisa foi avaliado e liberado pelo conselho de ética da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os pacientes foram informados dos riscos e benefícios potenciais da pesquisa e assinaram o termo de consentimento.

Análise do polimorfismo A1166C do gene do receptor AT1 da angiotensina II

A análise do polimorfismo do gene do AT1R foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR). As extrações de DNA foram feitas segundo o método de isolamento de DNA de Sambrook et al¹⁵. A coleta de sangue periférico foi feita em tubo *vacutainer* de 5 mL com EDTA, armazenado a 4 °C, centrifugado para separação da camada de leucócitos. Uma alíquota de 500 µL da camada de leucócitos foi transferida para um *eppendorf* de 1,5 mL e acrescentou-se 1,0 mL de tampão de lise de hemácias (TLH) [NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 1mM] em cada amostra, misturando por inversão durante 30 segundos. Esta mistura foi centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos para peletizar os núcleos. Descartou-se o sobrenadante, repetindo-se o passo por 2 a 3 vezes, até que o pelete adquirisse uma coloração creme claro. Foram adicionados 150 µL do tampão de lise do núcleo (TLN) [Tris - HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, NaCl 400 mM] e ressuspendeu-se o pelete. Adicionaram-se, então, 5 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% gelado e 2,5 µL de proteinase K (20 mg/mL) à solução e as amostras foram incubadas por 6 horas à 60 °C e, após isso, 100 µL de NaCl saturado foram adicionados às amostras que foram colocadas em gelo por 10 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante e adicionaram-se 800 µL de etanol absoluto gelado, misturando-se por inversão até que ocorresse a precipitação. Girou-se o tubo em seu eixo no sentido horizontal, para prender o DNA à parede do tubo, descartando-se o sobrenadante. O pelete foi lavado em 1,0 mL de etanol 70%. Descartou-se o sobrenadante. O pelete foi lavado em volume variável de TE [TRIS - HCl álcool e os peletes foram ressuspendidos em volume variável de TE [TRIS - HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4)] de acordo com o tamanho dos mesmos. A seguir foi feito o cálculo da concentração de DNA por espectrofotômetro a 260 nm. Cada reação consistiu 100 ng de DNA genômico, 25 pmol de *primer*, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,5 mmol/L de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume de reação de 30 µL. A PCR utilizou o programa: 30 ciclos a 93 °C por 1,5 min, 58 °C por 2 min e 72 °C por 2 min. Um fragmento do gene do AT1R contendo 856 pb, localizado na região 3' não traduzida, foi amplificado pelo par de *primers*:

5'-AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT-3'

5'-GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG-3'

Esta região abriga a variante 1166, caracterizada pela transverso Adenina→Citosina (A→C) no nucleotídeo que ocupa essa posição.

Cada reação de PCR foi feita com: 100 ng de DNA genômico, tampão da Taq-DNA polimerase, 10 pmoles de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U da enzima Taq-DNA polimerase. O programa utilizado para amplificação do fragmento consistiu de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida por 34 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por um minuto e extensão a 72 °C por 35 segundos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Dez microlitros do produto amplificado foram digeridos com três unidades da enzima de restrição Dde I durante 5 h a 37 °C de acordo com as instruções do fabricante (*Life Technologies*). Esta enzima reconhece o seguinte sítio de restrição:

5'- C ↓ TNAG -3'

3'- GANT ↑ C -5'

No fragmento em estudo do gene AT1R ocorre um sítio de restrição no alelo mutante, pois a substituição de um A por C, cria outro sítio de reconhecimento da enzima Dde I. Assim, o alelo A do gene do AT1R possui um sítio de restrição para a enzima gerando dois fragmentos de 600 e 256 pb e o alelo C, mutante, possui a enzima gerando dois fragmentos de 600, 146 e 110 pb cada. O produto de dois sítios produzindo três fragmentos de 600, 146 e 110 pb cada. O produto de restrição foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo após eletroforese. Indivíduos homozigotos para o alelo A apresentam duas bandas de 600 e 256 pb, os homozigotos para o alelo C apresentam três bandas de 600, 146 e 110 pb e os heterozigotos A/C possuem quatro bandas de 600, 256, 146 e 110 pb¹⁰.

Análise estatística

O programa Statistica 5.5 *Statsoft, Inc.*¹⁶ foi utilizado para fazer as análises. Para indicar o nível de significância estatística foi considerado o erro α menor que 5% ($p < 0,05$). O teste do qui-quadrado de Pearson foi utilizado para analisar as diferenças das frequências dos genótipos entre casos e controles e entre fatores de risco coronarianos convencionais com os genótipos. As variáveis foram transformadas em numéricas atribuindo-se o valor zero 0 ausência e 1 para a presença. As variáveis contínuas foram expressas como média - desvio padrão e as diferenças entre os grupos foram comparadas usando o teste t de Student.

O risco relativo foi avaliado pelo cálculo da razão de chances (*Odds Ratio* – OR) e seus intervalos de confiança (IC). As diferenças entre as frequências de pacientes, quanto aos fatores de risco convencionais, em relação às classes genotípicas foram avaliadas via modelos lineares generalizados, tendo a distribuição da variável resposta binomial, adotando como função de ligação à função logística¹⁷.

Resultados

Características da população

Cento e dez pacientes com diagnóstico de IAM e aterosclerose coronariana significativa (lesão obstrutiva >50%) comprovada pela angiografia foram estudados, sendo 70 (66,6%) do sexo masculino e 40 (36,4%) do feminino. Cento e quatro indivíduos foram controles, com artérias coronárias angiograficamente normais, sendo 60 (57,7%) do sexo feminino e 44 (42,3%) masculino, sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa ($p = 0,02$). A média de idade dos pacientes ($61,82 \pm 10,81$ anos) foi significativamente diferente dos controles ($56,69 \pm 11,52$ anos). Foi significativamente alta a prevalência do tabagismo, do antecedente familiar de coronariopatia, da hipertensão arterial sistêmica, do diabetes melito, dos níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides nos pacientes com IAM em relação aos controles, apenas a obesidade (avaliada pelo IMC), o sedentarismo e o colesterol HDL não apresentaram significância estatística entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores de risco: pacientes com infarto agudo do miocárdio e nos controles.

Variáveis	Infarto N = 110 (%)	Controles n = 104 (%)	p
História Familiar de DAC	51 (46,4%)	33 (31,7%)	0,028
Hipertensão Arterial	92 (83,6%)	70 (67,3%)	0,005
Fumantes	52 (47,3%)	26 (25,0%)	0,001
Diabetes melito	27 (24,5%)	13 (12,5%)	0,024
IMC > 25kg/m ²	53 (48,2%)	57 (54,8%)	0,332
Sedentarismo	71 (64,5%)	60 (57,7%)	0,304
Colesterol (mg/dl)			
Total > 200	78 (70,9%)	41 (39,4%)	0,0001
HDL < 35	17 (15,5%)	15 (14,4%)	0,833
LDL > 159	93 (84,5%)	62 (59,6%)	0,0001
Triglicérides > 200 mg/dl	28 (25,5%)	15 (14,4%)	0,044

Genotipagem

A análise da genotipagem dos pacientes e controles para o polimorfismo A1166C do gene do AT1R, por restrição enzimática com a enzima *Dde* I resultou em um padrão de bandas diferenciado para os genótipos AA, AC e CC. Isso ocorre devido à modificação no fragmento amplificado de 856 pb, quando se verifica a substituição de um A (adenina) por um C (citosina) que cria um novo sítio de restrição para essa enzima. Portanto, foi verificado em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, o seguinte padrão de bandas: homozigoto AA: bandas de 600 e 256 pb, heterozigoto AC: bandas de 600, 256, 146 e 110 pb e o homozigoto mutante CC: bandas de 600, 146 e 110 pb (Figura 1).

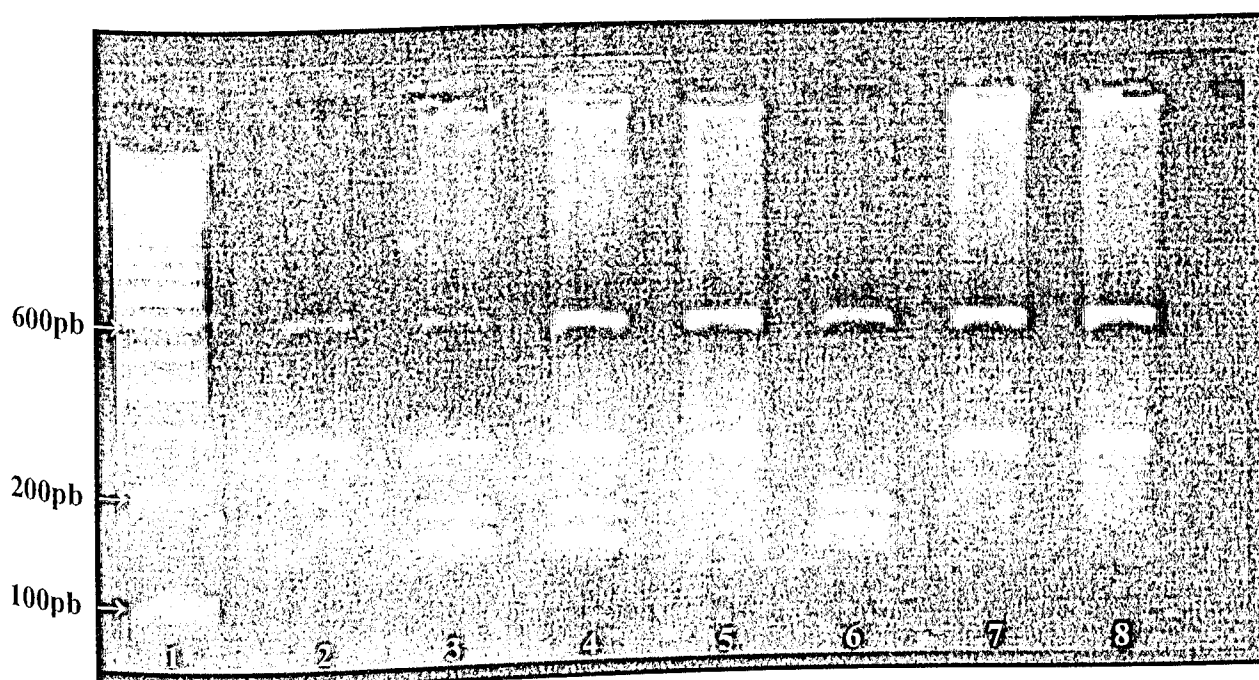


Figura 1. Produtos de restrição enzimática do fragmento do gene AT1R com a enzima *Dde* I.

Coluna 1: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Colunas 2, 5, 7 e 8: Fragmentos de 600 e 256 pb representando o genótipo de indivíduos AA.

Colunas 3 e 4: Fragmentos de 600, 256, 146 e 110 pb representando o genótipo AC.

Coluna 6: Fragmentos de 600, 146 e 110 pb representando o genótipo CC.

Análise dos fatores de risco coronariano dos infartados e controles em relação ao polimorfismo A1166C do gene do AT1R

Quando a população dos pacientes infartados e dos indivíduos controles foi estratificada pelos genótipos do AT1R observou-se que não houve predominância de sexo entre os genótipos no grupo controle ($p = 0,212$) e nem nos pacientes ($p = 0,739$); a média de idade foi semelhante nos dois grupos ($56,3 \pm 12,9$ anos). Quando foram analisados os fatores de risco coronariano clássicos nos indivíduos controles estratificados pelos genótipos do AT1R constatou-se não haver diferença estatística significativa em nenhum deles (Tabela 2). Esta mesma análise nos pacientes com IAM identificou que apenas o tabagismo mostrou prevalência diferente entre eles, sendo maior nos genótipos AC e AA. (Tabela 3).

Tabela 2. Fatores de risco coronariano nos controles estratificados pelos genótipos do receptor AT1 da angiotensina II.

Variáveis	CC n = 08 (%)	AC n = 37 (%)	AA n = 59 (%)	p
História Familiar DAC	03 (37,5)	12 (32,4)	18 (30,5)	0,918
Hipertensão Arterial	06 (75,0)	24 (64,9)	40 (67,8)	0,851
Fumantes	02 (25,0)	07 (18,9)	17 (28,8)	0,552
Diabetes melito	01 (12,5)	04 (10,8)	08 (13,6)	0,924
IMC > 25 kg/m ²	04 (50,0)	21 (56,8)	32 (54,2)	0,933
Sedentarismo	08 (100,0)	20 (54,1)	32 (54,2)	0,052
Colesterol (mg/dL)				
Total > 200	05 (62,5)	16 (43,2)	20 (33,9)	0,251
HDL < 35	02 (25,0)	05 (13,5)	08 (13,6)	0,675
LDL > 159	06 (75,0)	24 (64,9)	32 (54,2)	0,383
Triglicérides > 200mg /dL	01 (12,5)	06 (16,2)	08 (13,6)	0,925

Tabela 3. Fatores de risco coronariano nos pacientes com infarto agudo do miocárdio estratificados pelos genótipos do receptor AT1 da angiotensina II.

Variáveis	CC	AC	AA	p
	n = 11 (%)	n = 39 (%)	n = 60 (%)	
História Familiar de DAC	6 (54,5%)	16 (41%)	29 (48,3%)	0,658
Hipertensão Arterial	7 (63,6%)	34 (87,2%)	51 (85,0%)	0,161
Fumantes	3 (27,3%)	25 (64,1%)	24 (40,0%)	0,024
Diabetes melito	1 (9,1%)	13 (33,3%)	13 (21,7%)	0,191
IMC > 25 kg/m ²	7 (63,6%)	16 (41,0%)	30 (50,0%)	0,381
Sedentarismo	8 (72,7%)	24 (61,5%)	39 (65,0%)	0,786
Colesterol (mg/dl)				
Total > 200	7 (63,6%)	29 (74,4%)	42 (70,0%)	0,767
HDL < 35	3 (27,3%)	9 (23,1%)	5 (8,3%)	0,073
LDL > 159	8 (72,7%)	32 (82,1%)	53 (88,3%)	0,364
Triglicérides > 200mg /dl	5 (45,5%)	7 (17,9%)	16 (26,7%)	0,172

Análise da associação do polimorfismo A1166C com o infarto agudo do miocárdio

A tabela 4 mostra a distribuição dos genótipos do polimorfismo A1166C do AT1R nos pacientes com IAM e nos controle. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($\chi^2 = 0,367$; $p = 0,832$), inclusive quando se avalia a presença do alelo A (AA+AC) observou-se que a sua freqüência não foi estatisticamente diferente entre os grupos. O risco relativo de apresentar IAM foi analisado pelas comparações dos genótipos e teve os seguintes resultados: CC vs AA (OR = 1,35; IC-95% = 0,5079 - 3,5992), AC vs AA (OR = 1,03; IC-95% = 0,5828 - 1,8433) e AC+AA vs CC (OR = 0,90; IC-95% = 0,3640 – 2,2255).

Tabela 4. Distribuição e análise estatística da associação dos genótipos do receptor AT1 da angiotensina II entre os pacientes com infarto agudo do miocárdio e os controles.

Genótipo	Infarto n = 110 (%)	Controles n = 104 (%)	χ^2	p	Odds Ratio	IC (95%)
CC	11 (10,0)	08 (07,7)			1,3521	0,5079 – 3,5992
AC	39 (35,5)	37 (35,6)			1,0365	0,5828 – 1,8433
AA	60 (54,5)	59 (56,7)	0,367	0,832		
AA+AC	99 (90,0)	96 (92,3)			1,3333	0,5141 – 3,4581

Odds Ratio: medida do risco relativo de DAC entre os indivíduos portadores dos genótipos CC em relação ao AA, AC com AA e do alelo A (genótipos AA+AC) em relação aos indivíduos com genótipos AA.

Análise da severidade da doença arterial coronária em relação ao polimorfismo A1166C do AT1R

A severidade da DAC foi avaliada com os seguintes critérios: número de vasos acometidos (uniarterial ou multiarterial), característica morfológica da placa aterosclerótica (A, B1, B2, C) e o escore de risco coronário e não foi observada diferença estatística entre os genótipos do AT1R. Os dados observados na Tabela 5 demonstram que nas comparações dos genótipos CC vs AC vs AA não houve diferença entre os grupos ($p < 0,05$), este fato também foi observado nas comparações CC vs AC e CC vs AA.

Tabela 5. Análise estatística da severidade da doença arterial coronariana em relação aos genótipos do receptor AT1 da angiotensina II.

Variáveis*	CC n = 11 (%)	AC n = 39 (%)	AA n = 60 (%)
Número de vasos lesados			
Uniarterial	2 (18,2)	11 (28,2)	13 (21,7)
Multiarterial	9 (81,8)	28 (71,8)	47 (78,3)
Morfologia da placa			
A	0	1 (2,7)	1 (1,7)
B1	1 (10,0)	7 (18,9)	19 (32,8)
B2	2 (20,0)	7 (18,9)	11 (19,0)
C	7 (70,0)	22 (59,5)	27 (46,6)
Escore de risco			
2	2 (18,2)	9 (23,1)	12 (20,0)
4	2 (18,2)	10 (25,6)	14 (23,3)
6	4 (36,4)	14 (35,9)	26 (43,3)
8	3 (27,3)	6 (15,4)	5 (8,3)
10	0	0	3 (5,0)

* Critérios de severidade sem diferença estatística entre os genótipos do polimorfismo A1166C do AT1R.

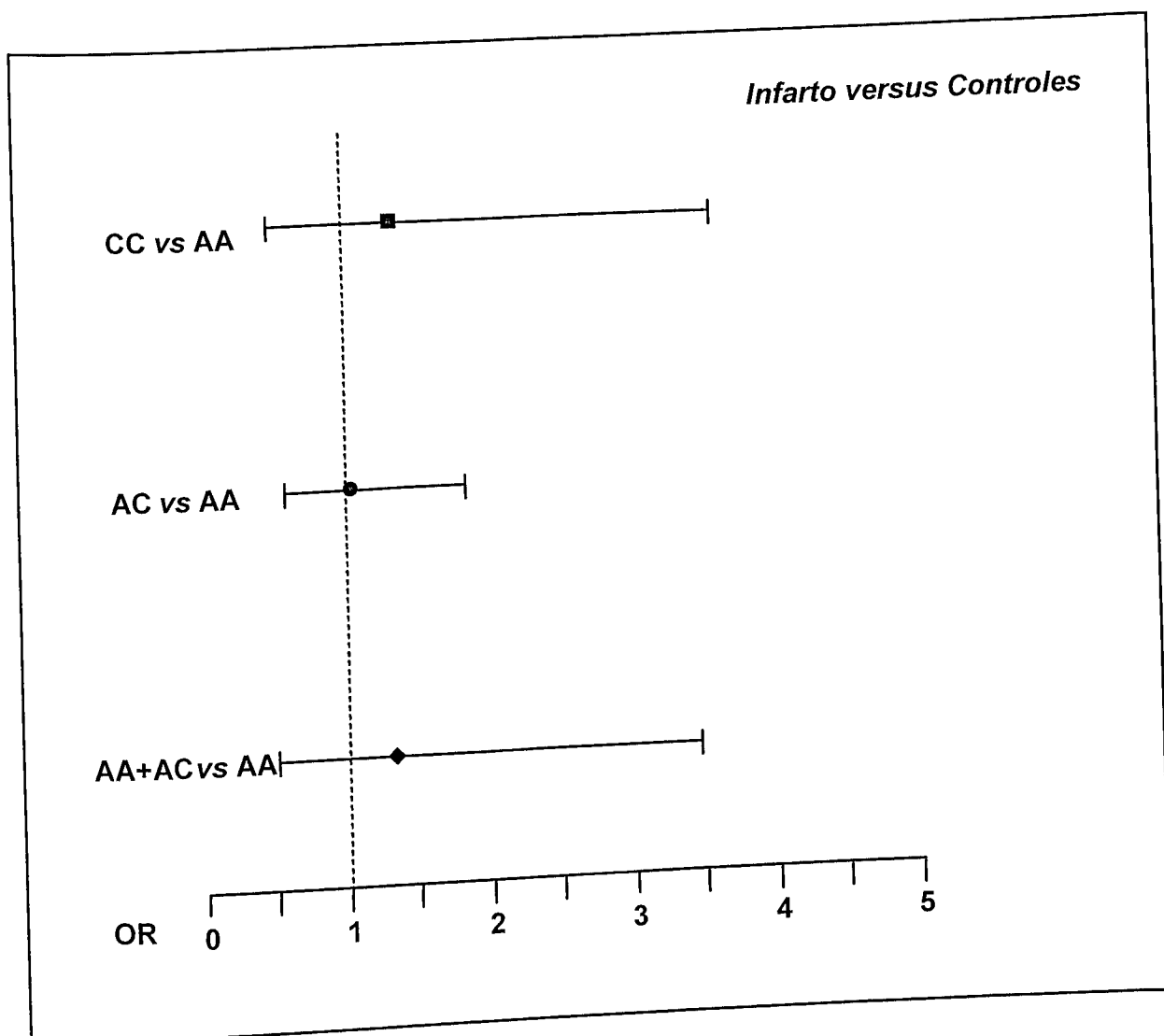


Figura 2. Estimativa do risco de apresentar infarto agudo do miocárdio associado ao polimorfismo A1166C do gene do AT1R. *Odds Ratio* de acordo com as comparações dos genótipos CC vs AA, AC vs AA e AA+AC vs AA.

Discussão

A aterosclerose, processo básico da DAC e a sua manifestação maior, o infarto do miocárdio tornou-se a principal causa de óbitos nos Estados Unidos da América. É geralmente desencadeado por instabilização da placa aterosclerótica, obstrução abrupta da artéria coronária pela formação de um trombo local¹⁸. A participação do componente genético herdado, representado pelo histórico familiar de coronariopatia como já descrito na literatura¹⁹, ficou comprovada nesse estudo pela maior prevalência no grupo de infartados ($p = 0,028$). O tabagismo, a hipertensão arterial sistêmica e a hipercolesterolemia (total e LDL) são os principais fatores de risco e contribuem em graus aproximadamente iguais para a doença isquêmica do coração^{20, 21}; estes fatos foram confirmados nesta pesquisa com elevada significância estatística ($p = 0,001$; $p = 0,005$ e $p = 0,0001$, respectivamente). A hipertrigliceridemia é a alteração lipídica mais comumente associada ao diabetes melito^{22,23}. Esta relação foi constatada neste estudo onde a proporção de diabéticos nos pacientes correspondeu a quase o dobro dos controles. A obesidade e o sedentarismo, diferentemente do descrito na literatura^{24,25}, não foram fatores de risco importantes nessa população.

Os estudos de associação entre o infarto do miocárdio e variações polimórficas de genes candidatos ou de marcadores (seqüência de DNA não codificantes) são empregados para demonstrar o papel de fatores genéticos na etiologia desta doença multifatorial. Como, a angiotensina II é o agente fundamental na seqüência de reações que culminam nas suas ações fisiológicas e patológicas, o seu principal receptor, o AT1R, torna-se elemento importante nos estudos que avaliam o papel do SRA no IAM.

Este estudo mostrou não existir predominância de nenhum dos fatores de risco coronariano clássicos entre os genótipos do AT1R nos controles, exceto para o sedentarismo ($p = 0,05$). No grupo de infartados apenas o tabagismo teve diferença estatística significativa, sendo maior no genótipo AC, indicando a possibilidade da interação com um fator ambiental de alta prevalência com o genótipo²⁶. Como os demais fatores de risco coronariano tiveram distribuição similar entre os genótipos nos controles e infartados é provável que os genótipos

do AT1R não estejam associados com estes fatores, no sentido de desenvolver infarto do miocárdio.

Neste estudo a homozigose para o alelo A do polimorfismo A1166C no loco do receptor AT1 foi mais freqüente tanto nos controles quanto nos infartados. No grupo controle, a seguinte distribuição foi encontrada: AA = 56,7%; AC = 35,6%; CC = 7,7% e, na combinação dos genótipos AA/AC de 92,3%. Nos infartados foi AA = 54,5%; AC = 35,5%, CC = 10,0% e, na combinação dos genótipos AA/AC de 90,0%. Os resultados indicaram não haver significância estatística entre os grupos ($p = 0,83$) e que não aumentava a chance de desenvolver IAM observado nas comparações dos genótipos CC/AA (OR = 1,35; IC-95% = 0,50 – 3,59), AC/AA (OR = 1,03; IC-95% = 0,58 – 1,84) e AA+AC/AA (OR = 1,33; IC-95% = 0,51 – 3,45). Numa pesquisa entre a associação de infarto do miocárdio e o AT1R, Berge et al²⁷ encontraram as seguintes freqüências dos genótipos nos controles: AA = 52,1%; AC = 42,7%; CC = 5,2% e na combinação dos genótipos AA+AC = 94,8%; nos pacientes com infarto o genótipo AA correspondeu a 49,3%, o AC a 41,3% e o CC a 9,4% e na combinação dos genótipos AA+AC a 90%. Desta forma, o presente trabalho corrobora estes resultados e demonstrou, também, não haver associação deste polimorfismo com o IAM.

Entretanto, Canavy et al²⁸, dentre outros autores, demonstraram uma associação positiva do polimorfismo AA1166C com uma prevalência alta do alelo C em pacientes com infarto do miocárdio^{10,29}. Duncan et al³⁰, numa recente revisão da literatura de estudos de associação do gene do AT1 centralizados em metas clínicas, descrevem as controvérsias relacionadas a este gene com o infarto do miocárdio.

No presente estudo foi demonstrado não haver associação do polimorfismo A1166C do gene do AT1R com a severidade do acometimento das lesões coronárias quando foram comparados os genótipos CC vs AC vs AA, CC vs AC e AC vs AA; resultados semelhantes permitiram a outros autores chegarem à mesma conclusão³¹.

Ao se analisar o polimorfismo A1166C do gene do AT1R à luz dos resultados deste estudo, se conclui que não há associação dele com o infarto agudo do miocárdio e nem com a severidade da DAC. Os desfechos das principais publicações sobre estes fatos ainda não estão absolutamente

determinados, provavelmente, devido à maneira como as análises são realizadas ou às limitações do conjunto de dados obtidos. Vários outros polimorfismos genéticos, particularmente os relacionados ao SRA, estão em andamento e poderão estabelecer, definitivamente, o papel causal destes genes.

Referências bibliográficas

1. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Ver* 2000; 52: 415-72.
2. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herbin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JÁ, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 205-51.
3. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 196-203.
4. Paxton WC, Ruglissi, Horulst C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II at 1 receptor. *Am J Physiol* 1993; 264: 989-95.
5. Krieger EM, Santos RAS. Angiotensinas: Aspectos fisiológicos. *Hipertensão* 1998; 1: 7-10.
6. Wood AJJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *Drug Therapy* 1996; 334: 1649-54.
7. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂ receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-7.
8. Zhu Y Z, Zhu Y C, Li J, Schafer H, Schmidt W, Yao T, Unger T. Effects of losartan on hemodynamic parameters and angiotensin receptor m RNA levels of heart alter myocardial infarction. *JRAAS* 2000; 1: 257-62.
9. Bonnardeaux A, Daves E, Jeunemaitre X, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-9.
10. Tiret L, Bonnadeaux A, Poirier O, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type receptor gene polymorphism on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344: 910-4.
11. WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical

- nomenclature). Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. *Circulation* 1979; 59: 607-9.
12. Harris PJ, Harrell FE Jr, Lee KL, Behar VS, Rosati RA. Survival in medically treated coronary artery disease. *Circulation* 1979; 60: 1259-69.
 13. Ellis SG, Vandormael MG, Cowley MJ, et al - Coronary morphologic and clinical determinants of procedural outcome with angioplasty for multivessel coronary disease: implications for patient selection. *Circulation* 1990; 82: 1193-202.
 14. Califf RM, Phillips HR, Hindman MC, et al. Prognostic value of a coronary artery jeopardy score. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 1055-63.
 15. Sambrook J, Fritsch EF, Manitis, T. *Molecular cloning*. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 1989: 237p.
 16. *Statística 5.5* Statsoft, INC (1999). *Statística for Windows*.
 17. Hosmer, D. W.; Limeshow, S. *Applied Logistic Regression*. New York, John Wiley & Sons, 1989, 307p.
 18. Anderson VH, King III SB, Modern approaches to the diagnosis of coronary artery disease. *Am. Heart Journal* 1992; 123: 1312-22.
 19. Marmot MG, Syme SL, Kagan A et al. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: Prevalence of coronary and hypertensive heart disease and associated risk factors. *Am J Epidemiol* 1975; 102: 514.
 20. Sherman CB. Health effects of cigarette smoking. *Clin Chest Med*, 1991; 4: 643-58.
 21. Mc Bride PE. The health consequences of smoking: cardiovascular diseases. *Med Clin North Am*, 1992; 76: 333-54.
 22. Laker MF, Winocour PF. Plasma lipids and lipoproteins in *diabetes mellitus*. *Diabetes Annu* 1991; 6: 431-56.
 23. Steiner G. The dyslipoproteinemias of diabetes. *Atherosclerosis* 1994; 110 (Suppl): 527-33.
 24. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PT, Castell WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants of the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983; 67: 968-77.

25. Paffenbarger RS, Hade RT, Wing AI et al. The association of changes in physical activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 1993; 328: 538-45.
26. Milei J & Grana DR. Mortality and morbidity from smoking-induced cardiovascular diseases: the necessity of the cardiologist's involvement and commitment. *Int J Cardiol*, 1998, 67: 95-109.
27. Berge KE, Bakken A, Bohn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism at the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet* 1997; 52: 77-82.
28. Canavy I, Henry M, Morange PE, Tired L, Poirier O, Ebagosti A, Bory M, Juhan-Vague I. Genetic polymorphism and coronary artery disease in the south of France. *Thromb Haemost* 2000; 2: 212-6.
29. Anvari A, Turel Z, Schmidt A, Yilmaz N, Mayer G, Huber K, Schuster E, Gottsauner-Wolf M. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphism in coronary disease and malignant ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 879-83.
30. Duncan JA, Scholey JW, Miller JA. Angiotensin II type 1-receptor gene polymorphisms in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 111-6.
31. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillemin MT, Courbon D, Dumont C, Darmon O, Guize L, Guernonprez JL, Diebold B, Ducimetiere P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997; 99: 66-73.

Capítulo IV

Interação entre os polimorfismos gênicos do sistema renina-angiotensina no infarto agudo do miocárdio

Resumo

Objetivo – Analisar a interação entre os polimorfismos M235T do gene do angiotensinogênio (AGT), I/D do gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e A1166C do gene do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R) e o infarto agudo do miocárdio (IAM).

Métodos – Foram admitidos 214 indivíduos de forma prospectiva e consecutiva. Cento e dez pacientes com IAM com lesão coronária significativa (> 50%) na angiografia e 104 controles com angiografia coronária normal. Os polimorfismos M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AT1R foram analisados pela reação em cadeia da polimerase no DNA dos leucócitos. Os fatores de risco coronarianos clássicos foram analisados em todos os indivíduos.

Resultados – A análise de regressão logística múltipla entre os fatores de risco coronariano clássicos e os polimorfismos M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AT1R demonstrou que o tabagismo, a história familiar, a hipertensão arterial e o colesterol total estiveram associados ao risco de IAM. As frequências dos genótipos M235T do AGT foram semelhantes entre os pacientes infartados e controles; a chance de desenvolver IAM não foi diferente entre eles. Não houve associação dos genótipos da ECA com o risco relativo de desenvolver IAM, como também nos genótipos do AT1R. A combinação dos duplos homozigotos (MMII) dos genes do AGT e da ECA apresentou um menor risco de ter IAM (OR = 0,34) e as combinações genóticas que incluem no mínimo um alelo desfavorável (T ou D), a chance de apresentar IAM foi 2,92 vezes maior em relação aos MMII. Resultados semelhantes foram encontrados nas associações dos genes da AGT – AT1R com os duplos homozigotos (MMAA) com um menor risco (OR = 0,38) e as demais combinações de alelos desfavoráveis com chances 2,63 vezes maior em relação aos MMAA. Na associação ECA – AT1R o risco dos duplos homozigotos (IIAA) também foi menor (OR = 0,37) e as demais combinações de

alelos desfavoráveis apresentou chances 2,68 vezes maior em relação aos IIAA. Não houve interação positiva quando foram associados os genótipos dos três genes.

Conclusão – Há um maior risco de IAM quando houver associação gene a gene de alelos desfavoráveis e um menor risco na associação de duplos homozigotos favoráveis dos polimorfismos M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AGT.

Interaction between gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in the myocardial infarction

Abstract

Objective – To analyse the interactions among polymorphisms of the M235T angiotensinogen gene (AGT), the I/D of the angiotensin I - converting enzyme gene (ACE), the A1166C of the angiotensinogen gene AT1 receptor and the acute myocardial infarction (AMI).

Methods – Biological samples were collected from 214 individuals assigned prospectively and consecutively: 110 AMI patients with significant angiographic coronary lesion (>50%) and 104 controls with normal coronary artery angiography were. The polymorphisms of the M235T AGT gene, the I/D of the ACE gene and the A1166C of the AT1R gene were analyzed by PCR in DNA from peripheral blood leukocytes. The classical coronary risk factors were analyzed in all individuals.

Results – The multiple logistic regression analysis among classical coronary risk factors and the polymorphisms M235T of the AGT, the I/D of ACE and A1166C of AT1R have demonstrated that the tabagism, the family history, the arterial hypertension and the total cholesterol have interacted themselves in order to develop the AMI. The M235T AGT genotypic frequencies were similar to each other between infarcted patients and controls; the risk of developing AMI was not significant. The ACE genotypes had no association with the relative risk of developing AMI as well as the AT1R genotypes. Double homozygote combinations of the AGT and ACE genes (MMII) has presented less AMI risk (OR = 0.34) and the genotypic combinations that include at least one unfavourable allele (T or D), the risk of presenting AMI was 2.92 time higher than MMII. Similar results were found for the AGT – AT1R genes associations with double homozygotes (MMAA) with a reduced risk (OR = 0.38) and all the other unfavourable alleles combinations (T or C) presented a risk of 2.63 times greater than MMAA. In the ACE – AT1R association the risk of double homozygotes (IIAA) was also lower (OR = 0.37) and all the other unfavourable alleles combinations (D or C) have

presented a risk 2.68 times higher than IIAA genotypes. There was not any positive interaction among the three genes and the AMI risk.

Conclusion – *There is higher risk of AMI whenever there is unfavourable alleles in gene-to-gene associations, with a reduced risk for the double favourable homozygotes of the polymorphisms M235T of AGT, I/D of ACE and A1166C of AT1R .*

Introdução

Um interesse crescente pelo estudo da associação entre a aterosclerose coronária, infarto agudo do miocárdio (IAM) e diversos polimorfismos vêm sendo observados nos últimos anos. Dado que os fatores de risco coronariano clássicos explicam somente a metade dos casos da doença isquêmica do coração, buscam-se novos fatores etiológicos no âmbito da genética molecular. Os polimorfismos são mutações do DNA que apenas alteram a função da proteína codificada, porém, são freqüentes e podem representar um importante fator de risco genético quando o organismo está exposto a determinados fatores ambientais (estresse, tabagismo, obesidade, dentre outros).

Um polimorfismo é caracterizado pela presença dentro de um loco genético de variantes alélicas que podem ser detectadas pela análise do DNA (polimorfismo genético) ou pelo produto protéico (polimorfismo fenotípico). A biologia molecular tem facilitado a detecção de numerosos polimorfismos que podem ter efeito patogênico; contudo, doenças complexas, como a aterosclerose, que é uma enfermidade poligênica e multifatorial, podem conter diversas associações entre inúmeros polimorfismos gênicos e o ambiente, dificultando ou mascarando o efeito isolado de um único gene. Estes mecanismos moleculares subjacentes de associação entre um genótipo e um fenótipo estão sendo mais bem investigados, tanto em termos clínicos como experimentais e poderão ter uma grande relevância na causalidade e possíveis intervenções preventivas ou terapêuticas.

Evidências em animais e seres humanos sugerem que o aumento local ou sistêmico da angiotensina II pode ser fundamental na etiopatogenia da aterosclerose coronária e, conseqüentemente das diversas síndromes coronarianas. Pelo menos três polimorfismos do sistema renina-angiotensina (SRA) são considerados importantes elementos na cadeia de desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC): o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (AGT), o polimorfismo inserção/deleção (I/D) do gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e o polimorfismo A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R).

O AGT é uma glicoproteína extracelular sintetizada e liberada pelos hepatócitos, adipócitos e astrócitos em forma constitutiva, não induzida. A produção plasmática de angiotensina II é muito sensível a pequenas mudanças na concentração de AGT e os seus níveis correlacionam-se inversamente aos níveis circulante e tissular da renina. Um polimorfismo no exon 2 deste gene, pela substituição de metionina por treonina na posição 235 da proteína codificada (M235T) produz títulos mais elevados de AGT. Alguns autores descreveram uma associação controversa desse gene com a enfermidade coronariana^{1,2}. Jeunemaitre et al³ concluiu que o genótipo 235TT duplica o risco de infarto do miocárdio, mas o *Copenhagen City Heart Study* com mais de 2800 pacientes⁴, mostrou não haver esta associação.

A ECA ou kininase II é uma peptidyl-dipeptidase que hidrolisa a angiotensina I na circulação e a converte num potente peptídeo vasopressor a angiotensina II, cujas ações compreendem a estimulação de várias citocinas com a migração de células para o interior do endotélio, transformação dos miócitos em células espumosas, resposta inflamatória dentro da parede vascular e conseqüente desenvolvimento da placa aterosclerótica. Está implicada na disfunção endotelial e liberação de substâncias como endotelina e norepinefrina levando a vasoconstrição local e predisposição à ruptura da placa. Estimula a liberação do inibidor do ativador do plasminogênio que predispõe à trombose completa, pela inibição da fibrinólise intrínseca. Deste modo, a atividade da ECA poderia de alguma maneira determinar os valores circulantes e tissulares da angiotensina II. O mais proeminente polimorfismo no gene da ECA está localizado no cromossomo 17, é definido pela presença (inserção; I) ou ausência (deleção; D) de 287 pares de bases sequência repetida *Alu*, inseridos no intron 16 do seu gene, resultando em três genótipos: DD e II homozigotos e ID heterozigoto⁵. O genótipo DD está associado com o dobro do nível da atividade sérica da ECA do que o genótipo II e a níveis intermediários nos heterozigotos^{6,7}.

Em humanos, este polimorfismo poderia ser um marcador de uma seqüência de eventos, ainda não identificada, que modula a expressão do gene da ECA, de forma que o alelo D estaria associado com uma maior atividade da ECA no plasma, linfócitos, tecido cardíaco e, provavelmente com uma maior

incidência de enfermidade coronariana⁸. Vários estudos foram realizados para analisar estes aspectos, porém com resultados controversos⁹⁻¹².

Através do AT1R é produzida a maioria dos efeitos da angiotensina II como vasoconstricção, síntese de aldosterona, crescimento e hipertrofia celular¹³. Estes receptores estão presentes nas células musculares lisas vasculares, miócitos, células mesangiais do túbulo proximal renal e da zona glomerular das glândulas supra-renais. O polimorfismo A1166C do AT1R localiza-se na região 3' não traduzível do mRNA e corresponde a uma substituição da adenina por citosina. Foi descrita uma associação do alelo C com a enfermidade coronariana em diferentes estudos, porém sem evidências positivas definitivas¹⁴⁻¹⁵.

As recentes descrições de variantes genéticas do SRA representam um grande avanço no conhecimento da etiopatogenia da doença arterial coronariana identificando polimorfismos genéticos que possivelmente estão envolvidos na gênese da aterosclerose. Várias pesquisas sugeriram que estas alterações genéticas prognosticam a ocorrência do infarto do miocárdio, contudo não são consensuais.

A meta principal deste estudo foi avaliar o efeito de interação entre os polimorfismos dos genes do sistema renina-angiotensina, o M235T do AGT, o I/D da ECA e o A1166C do AT1R no desenvolvimento do IAM. Adicionalmente, foram avaliadas as suas relações com os fatores de risco coronariano tradicionais.

Métodos

População do estudo

Estudo de delineamento transversal com amostragem consecutiva de pacientes admitidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e no Instituto do Coração do Triângulo Mineiro no período de janeiro de 2000 a setembro de 2002 que cumpriram os seguintes requisitos: idade maior que 18 anos, raça branca, ausência de enfermidades crônicas, doenças sistêmicas, cirurgia de revascularização do miocárdio, angioplastia coronariana e infarto do miocárdio prévio.

Os 110 pacientes foram selecionados consecutivamente após apresentar o seu primeiro evento coronário (IAM), diagnosticado por métodos clínicos, eletrocardiográficos e enzimáticos de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde¹⁶. Todos tiveram confirmação da etiologia aterosclerótica pela angiografia coronária (lesão obstrutiva > 50%) e comprometimento da função ventricular pela ventriculografia. Os 104 controles foram selecionados consecutivamente em indivíduos com diagnósticos de doença cardíaca valvular, dor torácica atípica e doadores para transplante renal, com angiografia coronária normal. Os pacientes infartados foram submetidos à cinecoronariografia em até duas semanas após o IAM; o grupo controle, logo após a realização do diagnóstico clínico.

Em todos os indivíduos foram avaliados os fatores de risco coronário clássicos: hipertensão arterial sistêmica (HAS), sedentarismo, tabagismo, obesidade (avaliada pelo índice de massa corpórea maior que 25 Kg/m^2 – IMC), diabetes melito, níveis de colesterol total maior que 200 mg/dL, colesterol LDL maior que 159 mg/dL, colesterol HDL menor que 35 mg/dL e triglicérides maior que 200 mg/dL.

Todos os procedimentos, riscos e benefícios potenciais foram informados aos pacientes por meio de formulário próprio para seu consentimento formal. O protocolo foi submetido à apreciação e liberação pelo conselho de ética da Universidade Federal de Uberlândia.

Extração do DNA

As extrações de DNA foram feitas segundo o método de Sambrook et al¹⁷. A coleta de sangue periférico foi feita em tubo vacutainer de 5 mL com EDTA, armazenado a 4 °C, foi centrifugado para separação da camada de leucócitos. Uma alíquota de 500 µL da camada de leucócitos foi transferida para um *ependorf* de 1,5 mL e acrescentou-se 1,0 mL de tampão de lise de hemácias (TLH) [NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 1 mM] em cada amostra, misturando por inversão durante 30 segundos. Esta mistura foi centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos para peletizar os núcleos. Descartou-se o sobrenadante, repetindo-se o passo por 2 a 3 vezes, até que o pelete adquirisse uma coloração creme claro. Foram adicionados 150 µL do Tampão de Lise do Núcleo (TLN) [Tris - HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, NaCl 400 mM] e ressuspendeu-se o pelete. Adicionaram-se, então, 5 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% gelado e 2,5 µL de proteinase K (20 mg/mL) à solução e as amostras foram incubadas por 6 horas à 60 °C. Depois, 100 µL de NaCl saturado foram adicionados às amostras que foram colocadas em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante e adicionaram-se 800 µL de etanol absoluto não congelado, misturando-se por inversão até que ocorresse a precipitação. Girou-se o tubo em seu eixo no sentido horizontal, para prender o DNA à parede do tubo, descartando-se o sobrenadante. O pelete foi lavado em 1,0 mL de etanol 70%. Descartou-se o álcool e os peletes foram ressuspensos em volume variável de TE [TRIS -HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4)] de acordo com o tamanho dos mesmos. A concentração de DNA foi obtida por espectrofotômetro a 260 nm.

Gene do angiotensinogênio

A análise do polimorfismo do gene do AGT foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR). O fragmento do gene do AGT com 165 pb, contido no exon 2, códon 235 foi amplificado por meio da PCR, segundo Russ et al¹⁸ com os seguintes *primers*:

1-5'-GGA AGG ACA AGA ACT GCA CCT C-3'

2-5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'

As reações foram feitas nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico, 10 pmoles de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 U de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume final de 30 μ L. A PCR foi feita em termociclador *MJ. Research, Inc.* utilizando-se o seguinte programa: 90 °C por 3 min, 10 ciclos de 94 °C por 1 min, 68 °C 1 min, 72 °C 1 min; seguidos por 30 ciclos de 90 °C 30 s, 68 °C 1 min, 72 °C 30 s e uma extensão final de 72 °C por 10 min. O produto amplificado de 165 pb foi visualizado em gel de agarose 2% corado com 3 μ L de brometo de etídeo (10 mg/mL). Dez microlitros do produto de PCR foram digeridos com a enzima Tth 111-1 (*New England Biolabs*) segundo as especificações do fabricante. As reações foram incubadas por 4 h a 37 °C. Essa enzima de restrição reconhece o seguinte sítio:

5'-GACN ↓ NNGTC-3'

3'-CTGNN ↑ NCAG-5'

A variante M235T apresenta ou não sítio de restrição para a enzima; na presença de C (citossina) na posição 704, códon 235, o produto amplificado é clivado, resultando em dois fragmentos de 141 pb e 24 pb, que correspondem ao alelo T235 e na presença de T (timina) na mesma posição o fragmento não sofre clivagem, resultando em um fragmento de 165 pb que corresponde ao alelo M235. Indivíduos homozigotos para o alelo T235 (T235T) apresentam dois fragmentos de 141 pb e 24 bp, os heterozigotos (M235T) têm três fragmentos de 165 bp, 141 bp e 24 bp e os homozigotos para o alelo M235 (M235M) apresentam apenas um fragmento de 165 bp. O produto da restrição foi visualizado em gel de agarose 2,5% corado por brometo de etídeo, após eletroforese a 100 volts por 1 hora.

Gene da enzima conversora de angiotensina

Os genótipos foram determinados pela técnica da PCR, realizada no equipamento *MJ. Research, Inc.* (PTC-100-60), amplificando a região I/D do gene da ECA²⁵. O par de *primers* foi o mesmo descrito por Rigat et al⁵. A reação consistiu de 50 ng de DNA, 1 U de *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase, 8

pmol de cada primer, 2 mM de $MgCl_2$ e 100 μM de dNTPs. Procedeu-se a 38 ciclos nas seguintes temperaturas e tempos: 94 °C/1min, 60 °C/30 s e 72 °C/1 min. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese de agarose a 1% e visualizados em luz ultravioleta na presença de brometo de etídeo. Os produtos analisados esperados tiveram três conformações: homozigoto normal (II: molécula de DNA com 517 pares de bases), heterozigoto (ID: moléculas de DNA com 517 e 230 pares de bases) e homozigoto alterado (DD: molécula de DNA com 230 pares de bases).

Gene do receptor 1 da angiotensina II

A determinação dos genótipos do gene do AT1R foi realizada seguindo o protocolo descrito por Nakauchi¹⁹. Um fragmento do gene do AT1R contendo 856 pb, localizado na região 3' não traduzida, foi amplificado pelo par de *primers*:

5'-AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT-3'

5'-GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG-3'

Esta região abriga a variante 1166, caracterizada pela transversão Adenina→Citosina (A→C) no nucleotídeo que ocupa essa posição. Dez microlitros do produto amplificado foram digeridos com três unidades da enzima de restrição Dde I durante 5 h a 37 °C de acordo com as instruções do fabricante (*Life Technologies*). Esta enzima reconhece o seguinte sítio de restrição:

5'- C ↓ TNAG -3'

3'- GANT ↑ C -5'

No fragmento em estudo do gene do AT1R ocorre o aparecimento de um sítio de restrição no alelo mutante, pois a substituição de um A por C, cria outro sítio de reconhecimento da enzima Dde I. Assim, o alelo A possui um sítio de restrição para a enzima gerando dois fragmentos de 600 e 256 pb e o alelo C, mutante, possui dois sítios produzindo três fragmentos de 600, 146 e 110 pb cada. Indivíduos homozigotos para o alelo A apresentam duas bandas de 600 e 256 pb, os homozigotos para o alelo C apresentam três bandas de 600, 146 e 110 pb e os heterozigotos AC possuem quatro bandas de 600, 256, 146 e 110 pb¹⁰. Os *amplicons* foram detectados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e fotografado em sistema de vídeodocumentação.

Análise estatística

Todas as variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão. Na comparação das médias entre dois grupos foi aplicado o teste de t de Student para amostras independentes e as diferenças na distribuição dos genótipos e outros fatores de risco coronário entre os pacientes e o grupo controle foram avaliadas via teste de χ^2 . O equilíbrio de Hardy-Weinberg para as freqüências dos genótipos do AGT, da ECA e do AT1R foi analisado pelo χ^2 . Foi calculado o risco relativo (*Odds Ratio* - OR) e os intervalos de confiança (IC) de 95% para estimar os riscos relativos de enfermidade coronariana associada com os polimorfismos M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AT1R. As variáveis independentes com capacidade preditora de enfermidade coronária foram determinadas mediante análise de regressão logística com procedimentos de *stepwise*. Foi utilizado o programa Statistica 5.5 Statsoft, Inc.²⁰.

Resultados

População

Analisando-se as características dos 110 pacientes com IAM e DAC comprovada angiograficamente (lesão obstrutiva > 50%), verificou-se que os homens estavam presentes em proporção maior que as mulheres (66,6 *versus* 36,4%) e nos 104 indivíduos controles observou-se o inverso, com as mulheres predominando sobre os homens (57,7 *versus* 42,3%); com diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,02$).

Análise dos fatores de risco coronariano nos infartados e controles

Observou-se uma prevalência elevada do antecedente familiar de coronariopatia, do tabagismo, do diabetes melito, da hipertensão arterial sistêmica, dos níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides nos pacientes com infarto do miocárdio em relação aos controles. Apenas a obesidade (avaliada pelo IMC), o sedentarismo e o colesterol HDL não apresentaram significância estatística entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores de risco coronariano nos infartados e controles.

Variáveis	Infarto n = 110 (%)	Controles n = 104 (%)	p
História Familiar de DAC	51 (46,4%)	33 (31,7%)	0,028
Hipertensão Arterial	92 (83,6%)	70 (67,3%)	0,005
Fumantes	52 (47,3%)	26 (25,0%)	0,001
Diabetes melito	27 (24,5%)	13 (12,5%)	0,024
IMC > 25kg/m ²	53 (48,2%)	57 (54,8%)	0,332
Sedentarismo	71 (64,5%)	60 (57,7%)	0,304
Colesterol (mg/dL)			
Total > 200	78 (70,9%)	41 (39,4%)	0,0001
HDL < 35	17 (15,5%)	15 (14,4%)	0,833
LDL > 159	93 (84,5%)	62 (59,6%)	0,0001
Triglicérides > 200 mg/dL	28 (25,5%)	15 (14,4%)	0,044

Análise dos fatores de risco em relação aos polimorfismos M235T do gene do AGT, I/D do gene da ECA e A1166C do AT1R

No grupo de infartados nenhum dos fatores de risco clássicos em qualquer dos genes teve significância estatística, exceto o tabagismo que teve maior prevalência nos genótipos AC e AA do gene do AT1R. Nos controles, nesta mesma análise, foi observada uma distribuição similar de todas as covariáveis categóricas nos três polimorfismos estudados.

Distribuição dos genótipos dos polimorfismos dos genes do AGT, ECA e AT1R dos pacientes com infarto em relação aos controles

A frequência dos genótipos do polimorfismo M235T do AGT foi de 10,9% no TT, 47,3% no MT e 41,8% no MM; os controles tiveram distribuição similar de 9,6%; 49,0%; 41,2%; respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos ($\chi^2 = 0,2430$; $p = 0,8857$).

A distribuição das frequências dos genótipos polimorfismo I/D da ECA no grupo de infartados foi de 32,7% no DD, 51,8% no ID e 15,5% no II; nos controles foi de 49,0%; 31,7% e 19,2%; respectivamente. Houve uma significativa diferença entre os dois grupos ($\chi^2 = 9,68$; $p = 0,011$).

A análise da frequência dos genótipos do polimorfismo A1166C do AT1R mostrou no grupo de infartados 10% do genótipo CC, 35,5% do AC e 54,5% do AA; nos controles foi de 7,7%; 35,6% e 56,7%; respectivamente. A distribuição foi similar nos dois grupos ($\chi^2 = 0,367$; $p = 0,832$). A Tabela 2 apresenta os dados dos três polimorfismos.

Tabela 2. Distribuição dos genótipos do angiotensinogênio (AGT), da enzima conversora de angiotensina (ECA) e do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R).

Polimorfismos	Infarto n (%)	Controles n (%)	χ^2	p
Genótipo: AGT				
TT	12 (10,90)	10 (09,62)		
MT	52 (47,27)	51 (49,04)		
MM	46 (41,81)	43 (41,35)		
Total	110	104	0,2430	0,8857
Genótipo: ECA				
DD	36 (32,7)	51 (49,0)		
ID	57 (51,8)	33 (31,7)		
II	17 (15,5)	20 (19,2)		
Total	110	104	9,068	0,011
Genótipo: AT1R				
CC	11 (10,0)	8 (7,7)		
AC	39 (35,5)	37 (35,6)		
AA	60 (54,5)	59 (56,7)		
Total	110	104	0,367	0,832

Análise do risco de apresentar infarto agudo do miocárdio nos genótipos do AGT, ECA e AT1R

Os riscos relativos de IAM entre os genótipos TT vs MM e MT vs MM não foram significativos (OR = 1,12; IC-95% = 0,43 – 2,86 e OR = 0,95; IC-95% = 0,54 – 1,68; respectivamente).

O risco relativo de IAM não foi significativo quando foram testados os genótipos DD vs II (OR = 0,83; IC-95% = 0,38 - 1,80) e ID vs II (OR = 2,03; IC-95% = 0,93 – 4,41).

O risco relativo de apresentar IAM analisado pelas comparações dos genótipos CC vs AA (OR = 1,35; IC-95% = 0,50 - 3,59) e AC vs AA (OR = 1,03; IC

= 0,58 - 1,84) não foi diferente entre os grupos. Os riscos relativos aos três polimorfismos estão representados na Figura 1.

Análise da interação gênica

Na análise de regressão logística múltipla realizada com o modelo no qual incluíram-se os fatores de risco coronariano tradicionais (sedentarismo, tabagismo, história familiar de coronariopatia, diabetes melito, obesidade, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicérides), os genótipos do AGT (TT, MT, MM), da ECA (DD, ID, II) e do receptor AT1 (CC, AC, AA) constatou-se que apenas o tabagismo, a história familiar de coronariopatia, a hipertensão arterial sistêmica e os níveis elevados de colesterol total apresentaram associação significativa com o infarto, sendo os riscos relativos (*Odds Ratio*) destes fatores 1,23; 1,21; 1,14 e 1,35; respectivamente. Na presença dos fatores de risco clássicos supracitados, não houve evidência estatística que indicasse que algum dos genótipos aumentasse a possibilidade de desenvolver IAM, (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de regressão logística dos fatores de risco coronarianos clássicos e genótipos do angiotensinogênio, da enzima conversora de angiotensina e do receptor tipo 1 da angiotensina II dos infartados em relação aos controles.

Variáveis*	<i>Odds Ratio</i>	P	IC (95%)
Tabagismo	1,2314	0,0014	1,0856 – 1,4035
Hipertensão Arterial	1,2148	0,0083	1,0512 – 1,4029
História familiar de coronariopatia	1,1490	0,0309	1,0128 – 1,3034
Colesterol total	1,3539	0,00001	1,1966 – 1,5318

*Variáveis que tiveram significância estatística.

A interação dos polimorfismos dos genes do AGT, da ECA e AT1R no sentido de desenvolver o IAM foi analisada através das associações AGT – ECA, AGT – AT1R, ECA – AT1R e AGT – ECA – AT1R.

Quando eram avaliados os pacientes em relação à associação AGT – ECA nas combinações dos duplo homozigotos favoráveis (MMII) os pacientes apresentavam um menor risco de ter IAM ($OR = 0,34$; $IC-95\% = 0,12 - 0,92$); nas demais combinações que incluíam pelo menos um alelo desfavorável (T ou D), eles apresentavam em média 2,92 vezes mais chance de desenvolver o IAM em relação aos pacientes com genótipos MMII ($IC-95\% = 1,08 - 7,84$).

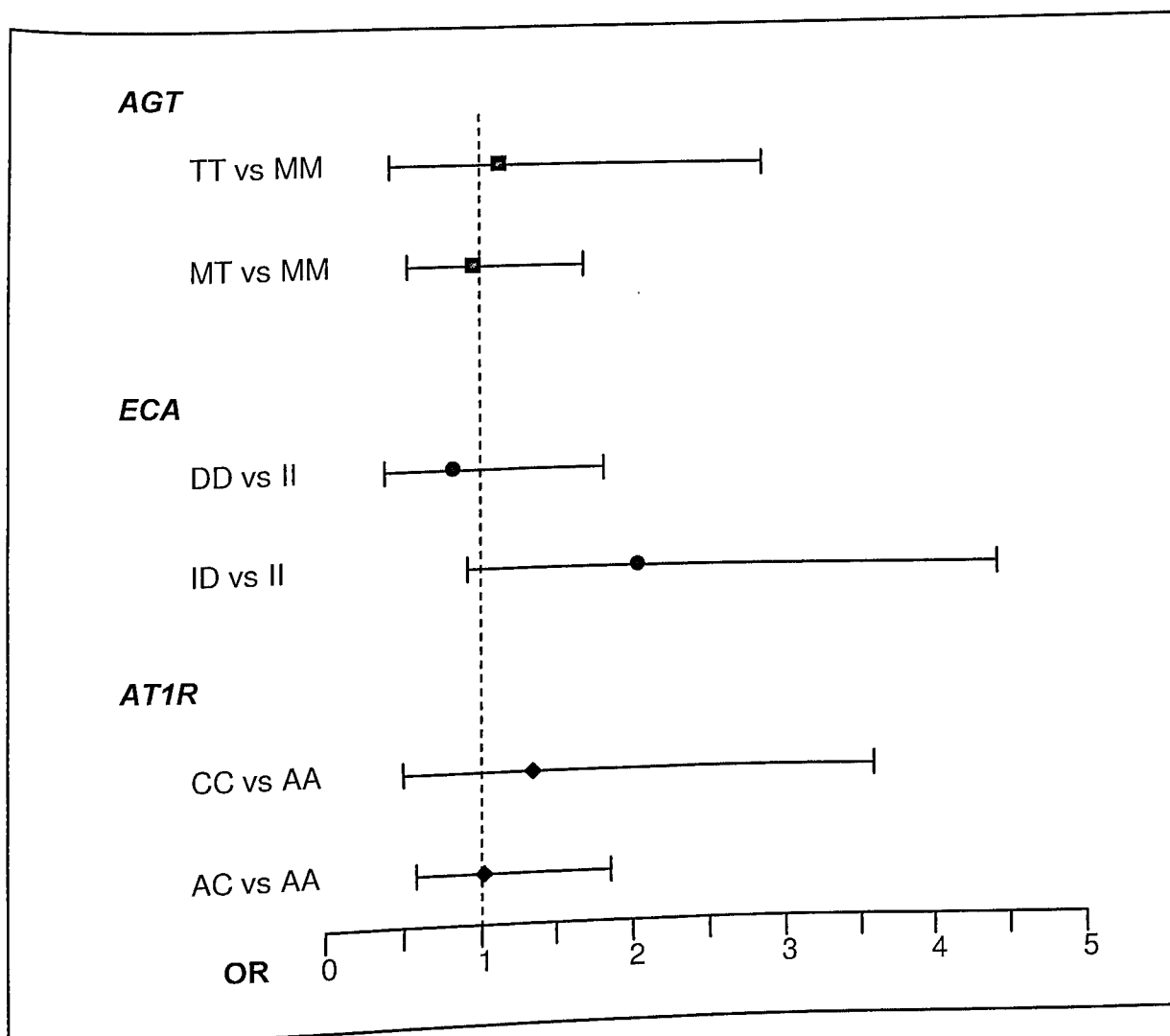


Figura 1. Estimativa do risco de apresentar infarto agudo do miocárdio associado aos polimorfismos dos genes M235T do angiotensinogênio (AGT), I/D da enzima conversora de angiotensina (ECA) e A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R).

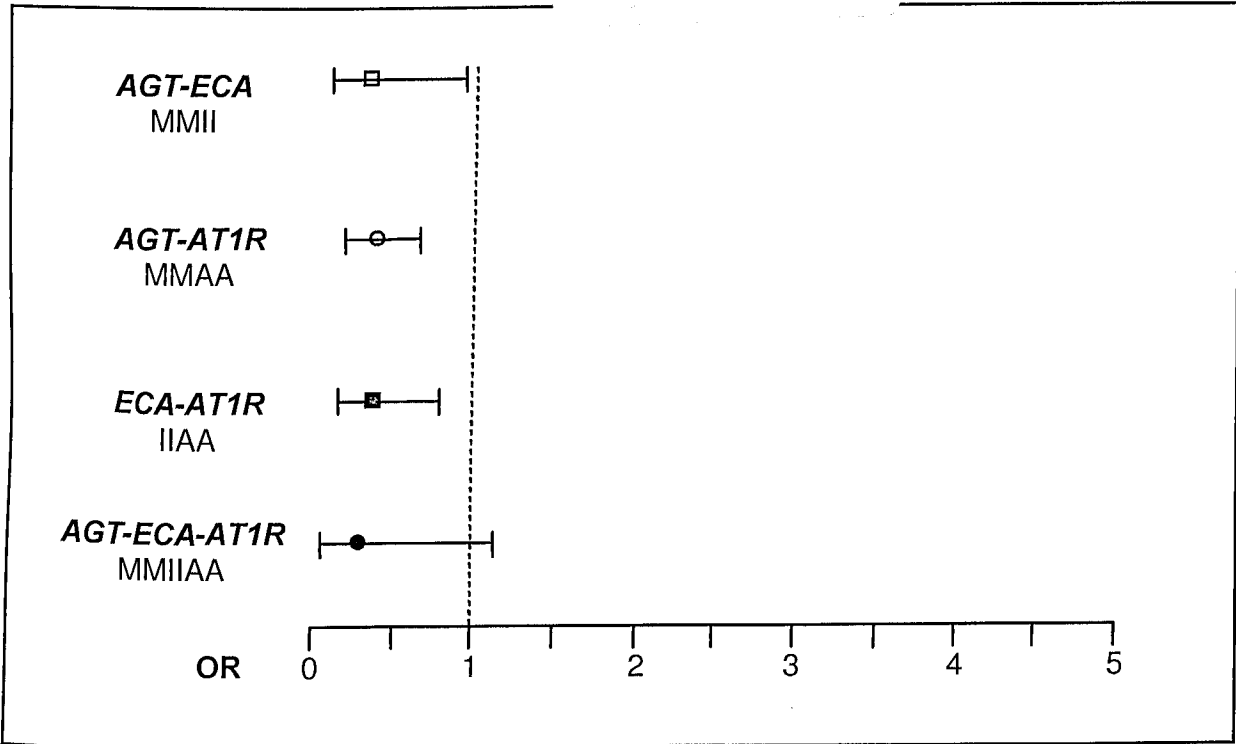


Figura 2. Estimativa do risco de apresentar infarto agudo do miocárdio associado aos genótipos duplo homozigotos favoráveis, gene a gene dos polimorfismos do AGT, da ECA e do AT1R.

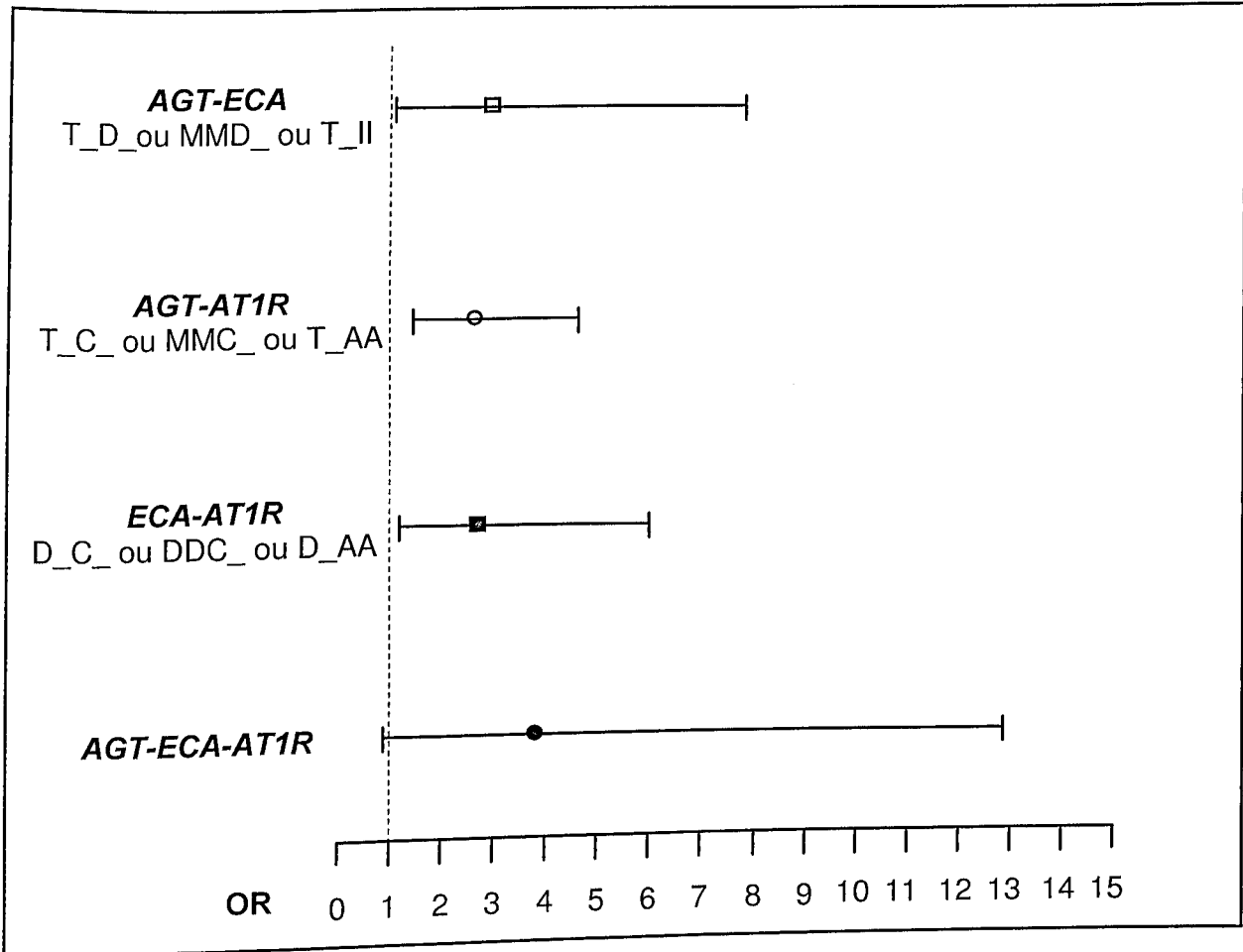


Figura 3. Estimativa do risco de apresentar infarto agudo do miocárdio associado aos alelos desfavoráveis, gene a gene dos polimorfismos do angiotensinogênio (AGT), da enzima conversora de angiotensina (ECA) e do receptor 1 da angiotensina II (AT1R).

Na associação AGT - AT1R a combinação dos genótipos favoráveis MMAA mostrou estar associada a um menor risco de IAM ($OR = 0,38$; $IC-95\% = 0,21 - 0,66$); nas demais combinações que incluíam pelo menos um alelo desfavorável (T ou C) os pacientes tinham chance 2,63 vezes maior em relação aos MMAA ($IC-95\% = 1,49 - 4,63$).

Na associação ECA - AT1R, os homozigotos IIAA apresentaram menor risco de ter IAM ($OR = 0,37$; $IC-95\% = 0,16 - 0,83$); da mesma forma, as demais combinações com pelo menos um alelo desfavorável (D ou C) a chance era 2,63 vezes maior de apresentar infarto que os pacientes com genótipos IIAA.

A associação dos genótipos dos três polimorfismos não aumentou a chance de desenvolver infarto ($OR = 3,78$; $IC-95\% = 0,88 - 12,85$). Os dados referentes às interações gene a gene e entre os três genes estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

As freqüências das combinações genótípicas foram realizadas através de regressão logística múltipla com procedimentos de *stepwise*. Os *Odds Ratio* foram calculados entre os genótipos favoráveis dos genes do AGT (MM), da ECA (II) e do AT1R (AA) em relação a todas outras possíveis combinações restantes.

Discussão

A DAC foi documentada em múmias egípcias há mais de 3500 anos²¹ sendo, por meio de sua manifestação mais importante, o infarto do miocárdio, a maior causa de morte em nosso meio²². Esta enfermidade tem etiologia multifatorial e é resultante da interação complexa de fatores genéticos e ambientais²³. Neste estudo constatou-se, conforme descrito na literatura²⁴, que os fatores de risco coronariano tradicionais apresentaram-se altamente prevalentes na população de infartados; especialmente o tabagismo, o diabetes melito, a hipertensão arterial sistêmica, os altos níveis de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides. Nesta população apenas a obesidade, o sedentarismo e os níveis baixos de colesterol HDL não tiveram predominância nos infartados, diferentemente dos relatos de literatura^{25,26}.

As mutações polimórficas têm a sua freqüência relativamente alta, por isso podem contribuir de forma relevante para os estudos que relacionam a

variabilidade genética com o infarto do miocárdio. Quando foi feita a análise univariada dos fatores de risco clássicos em relação aos genótipos do AGT, da ECA e do AT1R nos infartados e nos controles, nenhum deles teve significância, excetuando-se o tabagismo que foi mais prevalente nos indivíduos heterozigotos para o polimorfismo do AT1R no grupo de infartados. Estes achados corroboraram os descritos por Katsuya et al², que não encontraram diferenças significativas destes fatores em relação aos genótipos. A análise de regressão logística múltipla considerando os fatores de risco tradicionais e os genótipos dos polimorfismos M235T do AGT, o I/D da ECA e o A1166C do AT1R demonstrou que o tabagismo, a história familiar de coronariopatia, a hipertensão arterial sistêmica e os níveis elevados de colesterol total foram os fatores que mais contribuíram para o desenvolvimento do IAM, demonstrando a importância destes fatores, já consolidados na literatura²⁷.

No presente estudo, as freqüências dos genótipos da variante M235T do AGT foram bastante semelhantes entre os grupos de infartados e controle ($p = 0,88$) e o risco relativo de apresentar infarto não foi diferente entre os grupos, sendo comprovado pelas comparações TT vs MM, com intervalo de confiança (95%) de 0,43 a 2,86 e MT vs MM de 0,54 a 1,68. Esta constatação, a exemplo das descritas por outros autores, permitiu concluir que não há associação deste polimorfismo, isoladamente, com uma chance maior de desenvolver IAM².

Cambien et al²⁸, numa pesquisa do polimorfismo I/D do gene da ECA, em pacientes com infarto do miocárdio, demonstraram haver uma relevância maior na prevalência de infarto em indivíduos portadores do alelo D. Na presente investigação, embora tenha sido encontrada diferença significativa dos genótipos entre os grupos de infartados e controles, não houve um aumento da chance de desenvolver o infarto: DD vs II (OR = 0,83; IC-95% = 0,38 - 1,80) e ID vs II (OR = 2,03; IC-95% = 0,93 - 4,41); outros autores, como Keavney et al²⁹ e Agerholm-Larsen et al³⁰ tiveram resultados semelhantes aos aqui descritos.

A associação do polimorfismo A1166C do gene AT1R com o IAM foi descrita por diversos autores, dentre eles Hernandez et al³¹ que demonstraram não haver associação positiva. Os resultados deste estudo mostraram que a chance de desenvolver o infarto do miocárdio não foi aumentada na comparação entre os genótipos CC vs AA (OR = 1,35; IC-95% = 0,50 - 3,59) e nem AC vs AA

(OR = 1,03; IC-95% = 0,58 – 1,84) permitindo concluir que este polimorfismo não é um fator de risco independente para o desenvolvimento desta enfermidade.

Muitos polimorfismos gênicos podem afetar a expressão do gene tanto ao nível funcional quanto em quantidade de produtos produzidos. Contudo, o efeito de um único polimorfismo pode ser mascarado não só pelas diversas interações com os fatores ambientais, como também com outros fatores genéticos. No SRA, três importantes genes: AGT, ECA e AT1R, que fazem parte da mesma cascata metabólica podem estar interagindo entre si e, considerando os fatores de risco coronariano tradicionais, podem levar a uma maior predisposição à ocorrência do IAM. Neste sentido, alguns autores têm descrito uma interação sinérgica entre genes do SRA e o IAM; Ludwig et al³² e Fomicheva et al³³ encontraram esta interação entre os genes do AGT e o da ECA; Tired et al³⁴ e van Geel et al³⁵ entre os da ECA e do AT1R e Alvarez et al³⁶ entre os genes do AGT e do AT1R.

No presente estudo, encontrou-se uma interação sinérgica entre os genótipos MM do AGT e II da ECA, no sentido de que os indivíduos duplo homozigotos para estes locos (MMII) apresentaram um menor risco de ter o IAM que as outras combinações genotípicas destes genes (OR = 0,34); da mesma forma, este resultado indica que todas as combinações genotípicas que incluem, no mínimo um alelo desfavorável para qualquer um dos dois genes (T_D_ ou MMD_ ou T_II), a chance de ter o IAM é, em média 2,92 vezes maior em relação aos portadores dos genótipos MMII. Tal efeito também foi observado na associação dos genes do AGT e AT1R, onde as combinações genotípicas homozigóticas MMAA apresentaram um menor risco de IAM em relação às demais combinações (OR = 0,38); de igual maneira, todas as combinações genotípicas com, no mínimo um alelo desfavorável destes genes (T_C_ ou MMC_ ou T_AA) apresentam uma chance, em média 2,63 vezes maior de apresentar o infarto do que os genótipos MMAA. A combinação dos homozigotos IIAA da associação dos genes da ECA e do AT1R apresentou menor risco de ter o IAM em relação às demais combinações genotípicas destes polimorfismos (OR = 0,37); de igual forma, as outras combinações genotípicas que incluem pelo menos um alelo desfavorável (D_C_ ou DDC_ ou D_AA) apresentam uma chance, em média 2,68 vezes maior de apresentar o IAM do que os homozigotos IIAA.

Estes dados indicam que a ausência de alelos desfavoráveis nas interações gene a gene do SRA pode conferir um efeito protetor contra o IAM. Por outro lado, a presença de um único alelo desfavorável nestas interações favorece o desenvolvimento do IAM.

A associação simultânea dos três polimorfismos (M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AT1R) não aumentou a chance de desenvolver infarto, similarmente aos achados descritos por Fatini et al³⁷. Contudo, é provável que exista interação entre estes três polimorfismos gênicos do SRA e o infarto do miocárdio uma vez que, por pertencerem à mesma rota metabólica que culmina em efeitos fisiológicos e patológicos, particularmente a aterosclerose, eles podem estar contribuindo para o processo etiopatogênico.

É possível prever a ocorrência do infarto do miocárdio? Existe algum marcador molecular que possa indicar um indivíduo como candidato a desenvolvê-lo? Com base nos dados apresentados, que se referem a alguns genes do sistema renina-angiotensina com variabilidade associada à doença arterial coronariana, conclui-se que na população e nas condições estudadas podemos prever um maior risco do evento coronariano quando houver associação gene a gene com a presença de alelos desfavoráveis dos polimorfismos M235T do AGT, I/D da ECA e A1166C do AT1R. No futuro, variantes dos genes do SRA poderão vir fazer parte dos exames laboratoriais de rotina para nortear as estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença isquêmica do coração.

Referências bibliográficas

1. Rodriguez-Perez J, Rodríguez-Esparragón F, Hernández-Perera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A et al. Association of Angiotensinogen M235T and A (-6) G gene polymorphisms with coronary Heart Disease with independence of essential hypertension: The PROCAGENE Study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1536-42.
2. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-3.
3. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillemin MT, Courbon D, Dumont C, et al. Genetic polymorphisms of the rennin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997; 99: 66-73.
4. Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Gronholt ML, Steffensen R, Schnor P, Nordestgaard BG. Angiotensinogen mutations and risk for ischemic heart disease, myocardial infarction and ischemic cerebrovascular disease. Six case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Ann Intern Med* 2001; 134: 941-54.
5. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme gene enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.
6. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charrou A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-80.
7. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205.
8. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-4.

9. Tiret L, Kee F, Poireir O, Nicaud V, Lecerf L, Evans A et al. Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 1993; 341: 991-2.
10. Bohn M, Berge KE, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and parental history of myocardial infarction. *Clin Genet* 1993; 44: 298-301.
11. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 706-11.
12. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 708-12.
13. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Caarini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 196-203.
14. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-9.
15. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166 gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 1998; 19: 1657-65.
16. WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature). Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. *Circulation* 1979; 59: 607-9.
17. Sambrook J, Fritsch EF, Manitis, T. *Molecular cloning*. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 1989: 237p.

18. Russ A P, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated met235-to-thr allele of the human angiotensinogen gene. *Human Molec Genet* 1993; 2: 609-10.
19. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Arii K, Kumon Y et al. Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1-receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996; 125: 161-9.
20. Statsoft, INC (1999). *Statística for Windows*.
21. Ruffter MA. On arterial lesions found in egyptian mummies (1580 BC-525 AD). *J Path Bact* 1911; 15: 453-62.
22. Wilson PWF & Culleton BF. Epidemiology of cardiovascular disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, 1998; 32, Suppl 3, 56-65.
23. Vogel F, Motulsky AG. *Human genetics: problems and approaches*. 3rd ed Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 1997: 851.
24. Mion Jr D, Nobre F. *Risco cardiovascular global*. 1^a ed. São Paulo, Lemos Editorial; 1999: 185p.
25. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PT, Castell WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants of the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983; 67: 968-77.
26. Paffenbarger RS, Hade RT, Wing AI et al. The association of changes in physical activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 1993; 328: 538-45.
27. Mion Jr D, Nobre F. *Risco cardiovascular global*. 1^a ed. São Paulo, Lemos Editorial; 1999: 185p.
28. Cambien F, Poirer O, Lecert L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism and the angiotensin-converting enzyme gene is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359:641-4.
29. Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Young-man L, et al. Large-scale test of hypothesized associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5,000 cases and 6,000 controls. *International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaboration. Lancet* 2000; 355: 434-42.

30. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE en polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analysis of small and large studies in whites. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2000; 20: 484-92.
31. Hernández OH, Fernández-Aceituno AM, Esparragón FJR, Perera OH, Nuez FM, Espinosa AD, Pérez DF, Prieto AA, Pérez JCR. Relevância de los polimorfismos génicos del sistema renina-angiotensina en la enfermedad coronaria *Rev Esp Cardiol* 2002; 55: 92-9.
32. Ludwig EH, Borecki IB, Ellison RC, Folsom AR, Heiss G, Higgins M, Lalouel JM, Province MA, Rao DC. Associations between candidate loci angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen with coronary heart disease and myocardial infarction: the NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 3-12.
33. Fomicheva EV, Gukova SP, Larionova-Vasina VI, Kovalev YR, Schwartz EI. Gene-gene interaction in the RAS system in the predisposition to myocardial infarction in elder population o St. Petersburg (Russia). *Mol Genet Metab* 2000; 69: 76-80.
34. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344: 910-913.
35. van Geel PP, Pinto YM, Zwinderman AH, Henning RH, Van Boven AJ, Jukema JW, Bruschke AV, Kastelein JJ, Van Gilst WH. Increased risk for ischaemic events is related to combined RAS polymorphism. *Heart* 2001; 4: 458-62.
36. Álvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Álvarez V, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphism: association with early coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 1998; 54: 1843-9.
37. Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G, et al. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphism. *Eur Heart J* 2000; 21: 633-8.

ANEXOS

1.1 - Termo de consentimento informado

A Faculdade de Medicina e o Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia estão realizando um estudo genético relacionado a doenças cardiovasculares (infarto do miocárdio). Este estudo, coordenado pelos Profs. Messias Antônio de Araújo e Dr. Luiz Ricardo Goulart, visa o estudo do polimorfismo e expressão gênica de diversos genes envolvidos no desenvolvimento da doença aterosclerótica coronária.

Para esta investigação, é necessária a coleta de dois tubos de 5 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 de RNA e DNA. É importante enfatizar que os resultados obtidos terão apenas implicação diagnóstica e não terapêutica.

O paciente poderá pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, aqueles que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelo presente termo apresentado,

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

Médico Responsável _____

Local e Data: _____, _____ de _____ de 2001.

Testemunhas:

1. 2 - Definições de termos e medidas

Hipertensão arterial sistêmica	Pressão medida com o indivíduo sentado, e após descanso de cinco minutos, com PA sistólica maior que 140 mmHg e PA diastólica maior que 90 mmHg.
Diabetes melito	Indivíduos em tratamento com insulina ou hipoglicemiantes orais, ou nível de glicose em jejum de 140 mg/dL ou mais.
Tabagismo	Se o indivíduo é fumante (ou tenha deixado de fumar nos últimos 12 meses). A intensidade do hábito de fumar não foi considerada, e somente foram comparados fumantes ou não-fumantes.
Hipercolesterolemia*	Colesterol total em jejum de 12 horas maior que 200 mg/dL.
Baixos níveis de colesterol HDL *	Valores menores que 35 mg/dL.
Altos níveis de LDL*	Valores maiores que 159 mg/dL. São níveis limítrofes de 130-159 mg/dL.
Hipertrigliceridemia*	Triglicérides com valores acima de 200 mg/dL.
Obesidade*	Índice de massa corpórea maior que 25 kg/m ² .

*II Consenso brasileiro sobre dislipidemias: detecção, avaliação e tratamento. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 1996; 67: 1-16.