UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

POLIMORFISMOS DOS GENES LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA E NFκB PODEM ESTAR ASSOCIADOS COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

DÉBORA CAVICHIOLI

Dissertação para obtenção do grau
de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata

SÃO PAULO

- 2012 –

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

POLIMORFISMOS DOS GENES LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA E NFκB PODEM ESTAR ASSOCIADOS COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

DÉBORA CAVICHIOLI

Dissertação para obtenção do grau
de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata

SÃO PAULO

- 2012 –

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cavichioli, Débora
C382p Polimorfismos dos genes light, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFκB podem estar associados com doença arterial coronariana / Débora Cavichioli. -- São Paulo, 2012.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Hirata, Mário Hiroyuki

1. Inflamação : Medicina 2. DNA : Polimorfismo genético 3. Arteriosclerose I. T. II. Hirata, Mário Hiroyuki, orientador.

616.0473 CDD

Débora Cavichioli

Polimorfismos dos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFκB podem estar associados com doença arterial coronariana

Comissão Julgadora
da
dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Marlene, pela dedicação, confiança, por guiarem meu caminho e me apoiarem sempre.

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, orientador e amigo, por todos os ensinamentos, paciência, puxões de orelha, conselhos, preocupação, apoio e confiança.

Profª. Tit. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo incentivo, apoio e sugestões no desenvolvimento deste projeto e demais atividades acadêmicas.

Cristina Moreno Fajardo, técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, sempre prestativa e paciente com todos os alunos do laboratório.

Aécio Assunção Braga pelas longas horas no Pronto Socorro em busca de pacientes e pelas infinitas extrações de RNA, quantificações e PCRs.

Aos alunos de aprimoramento e iniciação científica Lúcia Marie Simão, Matheus Costa Almeida, Beatriz C. Lucas e Jessica Cassilla pela ajuda com coletas, extrações, quantificações e experimentos.

Dra Vivian N. Silbiger e Dr. André D. Luchessi pelo apoio, confiança, ajuda e conselhos.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em nome de sua diretora, Dra. Amanda G.M.R. Souza, pelo acesso ao hospital e confiança.

Aos médicos e colaboradores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Dr. Fausto Feres, Dr. Ari Timerman, Dr. Marcelo Chiara Bertolami, Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, Dra. Elizabete Silva Santos, Dr. Luiz Minuzzo, Dr. Marcos Paulo Pereira, Dr. Rui Fernando Ramos, Dra. Lara Reinel de Castro e Dr. Bruno Sampaio Saba pela dedicação na seleção de pacientes e cuidados a eles prestados.

As amigas Paula Helena Lima, Adriana Regina Garófalo e Hui Tzu Lin Wang pelo apoio, dedicação, conselhos e ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos indivíduos que concordaram em participar deste estudo o meu muito obrigado! Sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

Aos meus pais, Antonio José Cavichioli e Marlene Carvalho Cavichioli por todo apoio e confiança depositados. Agradeço sempre por vocês terem me guiado e por acreditarem nos meus sonhos. Agradeço a dedicação, amor, carinho e paciência nesses anos de crescimento pessoal e profissional.

A Deus por me proteger e dar saúde para batalhar por mais essa conquista e por colocar no meu caminho pessoas que me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxilio concedido para realização deste projeto.

RESUMO

Cavichioli, D. *Polimorfismos dos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA, NFκB podem estar associados com doença arterial coronariana.*

INTRODUÇÃO: A síndrome coronariana aguda (SCA) constitui uma síndrome clínica geralmente causada por doença arterial coronariana (DAC) aterosclerótica e está associada ao infarto agudo do miocárdio (IAM) que pode muitas vezes levar a óbito. Aterosclerose é uma doença progressiva, sistêmica e de inicio precoce caracterizada pelo acúmulo de lipides e elementos fibrosos nas grandes artérias e recentemente foi considerada como uma afecção de origem inflamatória.

OBJETIVO: Avaliar a frequência genotípica de *E-SELECTINA, MMP9, LIGHT, LTα, VCAM1, ICAM1, LGALS2* e *NFκB* em pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM), angina instável (AI) e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo. Assim como analisar a associação dos polimorfismos com a concentração sérica das formas solúveis das proteínas com a expressão gênica em leucócitos do sangue periférico, procurando estabelecer modelo de analise menos invasiva da aterosclerose.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: O estudo foi realizado em um grupo de pacientes recrutados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) com infarto agudo do miocárdio, angina instável e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo. Foram incluídos no estudo 93 indivíduos sendo 47 com IAM com e sem supra ST compondo o grupo IAM e 46 com AI ou que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo compondo o grupo SIAM, de ambos os sexos com idades entre 45 e 90 anos. Foi realizado o estudo dos polimorfismos dos genes *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *MMP9* (rs17576), *LTα* (rs909253 e rs1041981), *LGALS2* (rs7291467), *VCAM1* (rs3176878), *ICAM1* (rs281432), *E-SELECTINA* (rs5368) e *NFκB* (rs17032705) por pirosequenciamento, a análise da expressão dos genes *LIGHT*, *MMP9, LTα, VCAM1*, *ICAM1* e *NFκB* por PCR em tempo real e a dosagem das

formas solúveis de *VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA* e *MMP9* utilizando o sistema LUMINEX.

RESULTADOS: A frequência alélica e genotípica dos polimorfismos estudados (LIGHT [rs344560 e rs2291668], *MMP9 [*rs17576)] *LTα [*rs909253 e rs1041981], *LGALS2* [rs7291467], *VCAM1* [rs3176878], *ICAM1* [rs281432], *E-SELECTINA* [rs5368] e *NFκB* [rs17032705]) não apresentou relação com doença arterial coronariana. Foi encontrada associação da expressão de LTα com síndrome coronariana aguda (p<0,05) e relação de alguns dos polimorfismos estudados (6+3279C>T de LGALS2, 8+10029G>A de NFκB, 332-3499C>G de ICAM1, Lys178Glu de LIGHT e Asp693Asp de VCAM1) com alterações na expressão gênica, formas solúveis e parâmetros bioquímicos.

CONCLUSÕES: Não houve associação dos polimorfismos estudados com síndrome coronariana aguda assim como não houve associação das formas solúveis. Em relação á expressão gênica, foi encontrada associação da expressão de LTα com síndrome coronariana aguda (p<0,05) e alguns dos polimorfismos estudados (6+3279C>T de LGALS2, 8+10029G>A de NFκB, 332-3499C>G de ICAM1, Lys178Glu de LIGHT e Asp693Asp de VCAM1) ocasionaram alterações da expressão gênica, formas solúveis e parâmetros bioquímicos.

Palavras chave: síndrome coronariana aguda, aterosclerose, polimorfismos, citocinas, expressão gênica, resposta inflamatória.

ABSTRACT

Cavichioli, D. *LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA, NFκB polymorphisms may be associated with coronary artery disease.*

BACKGROUND: Acute coronary syndrome (ACS) is a clinical syndrome usually caused by atherosclerotic coronary artery disease (CAD) and is associates with acute myocardial infarction (AMI) and sometimes can take to death. Atherosclerosis is a progressive disease characterized by the accumulation of lipides and fibrous elements in arteries and recently was considered a disease of inflammatory origin.

OBJECTIVE: Evaluated the genotypic frequency of *E-SELECTIN, MMP9, LIGHT, LTα, VCAM1, ICAM1, LGALS2 e NFκB* in patients with acute myocardial infarction, unstable angina and individuals who were submitted to coronary angiography and had absence of significant atheromathous process. As well as analyze the polymorphism association with serum concentration of protein soluble forms with gene expression in peripheral blood leukocytes trying to establish a model less invasive to analyze atherosclerosis

MATERIALS AND METHODS: Study in a group of patients recruited in Dante Pazzanese of Cardiology Institute with acute myocardial infarction, unstable angina and in individuals who showed no significant atheromatous process. The study included 93 patients (47 with acute myocardial infarction and 46 with unstable angina or individuals who showed no significant atheromatous process) of both sexes with ages between 45 and 90 years. The genes polymorphisms study was by pyrosequencing, the gene expression was by PCR real time and soluble forms was dosage by LUMINEX.

RESULTS: The allelic and genotypic polymorphisms frequency studied (LIGHT [rs344560 e rs2291668], *MMP9 [*rs17576)] *LTα [*rs909253 e rs1041981], *LGALS2* [rs7291467], *VCAM1* [rs3176878], *ICAM1* [rs281432], *E-SELECTINA* [rs5368] e *NFκB* [rs17032705]) don't presented relation with coronary arterial disease. Was found association with LTα gene expression and coronary acute syndrome (p<0,05) and relation of some polymorphism studied (6+3279C>T de LGALS2, 8+10029G>A de NFκB, 332-3499C>G de ICAM1, Lys178Glu de LIGHT

e Asp693Asp de VCAM1) with changes in gene expression, serum soluble forms and biochemical parameters.

CONCLUSION: Do not have association between polymorphisms studied and serum soluble forms with acute coronary syndrome. Was found association with LTα gene expression and coronary acute syndrome ($p<0,05$) and relation of some polymorphism studied (6+3279C>T de LGALS2, 8+10029G>A de NFκB, 332-3499C>G de ICAM1, Lys178Glu de LIGHT e Asp693Asp de VCAM1) with changes in gene expression, serum soluble forms and biochemical parameters.

Key words: acute coronary syndrome, atherosclerosis, polymorphisms, cytokines, gene expression, inflammation.

INDICE DE TABELAS

PÁGINA

TABELA 1 - Biomarcadores para o diagnóstico de lesão miocárdica..... 20

TABELA 2 - Iniciadores utilizados nos ensaio de pirosequenciamento..... 30

TABELA 3 - Condições de amplificação pela PCR para pirosequenciamento..... 32

TABELA 4 - Número de catálogo dos ensaios utilizados na PCR em tempo real..... 34

TABELA 5 - Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios de PCR em tempo real.... 35

TABELA 6 - Características biodemográficas dos indivíduos do grupo IAM e SIAM..... 39

TABELA 7 - Perfil lipídico, bioquímico e hematológico dos indivíduos do grupo IAM e SIAM..... 41

TABELA 8 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... 42

TABELA 9 - Distribuição da frequência alélica e genotípica dos SNPs..... 43

TABELA 10 - Blocos haplotípicos e frequência de associação dos genes LIGHT e LTα entre os grupos IAM e SIAM..... 46

TABELA 11 - Expressão de mRNA em células do sangue periférico dos grupos IAM e SIAM... 46

TABELA 12 - Dosagem das formas solúveis no soro dos grupos IAM e SIAM..... 49

INDICE DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1 - Esquema da implicação clínica da classificação das SCA..... 18

FIGURA 2 - Modelo esquemático da formação da placa de ateroma..... 19

FIGURA 3 - Fotografia do gel de agarose a 1% do produto da PCR com gradiente de temperatura de hibridização (TH) do gene LGALS2..... 32

FIGURA 4 - Blocos haplotípicos dos genes LIGHT (A) e LTα (B)..... 45

FIGURA 5 - Representação gráfica da expressão do mRNA dos genes LIGHT, LTα, ICAM1, VCAM1, LGALS2 e NFκB em células do sangue periférico dos grupos IAM e SIAM 48

FIGURA 6 - Representação gráfica da expressão do mRNA do gene MMP9 em células do sangue periférico dos grupos IAM e SIAM..... 49

FIGURA 7 - Representação gráfica das dosagens das formas solúveis no soro de MMP9, ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA dos grupos IAM e SIAM..... 50

FIGURA 8 - Representação gráfica da variação dos valores séricos de colesterol total em relação ao genótipo para o polimorfismo Thr60Asn (A) e -9-198A>G (B) de LTα e de ureia para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA (C) do grupo IAM..... 53

FIGURA 9 - Representação gráfica da variação dos valores séricos de AST em relação ao genótipo para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 (A), de ureia para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA (B), de colesterol total (C), LDL-c (D) e Apo B (E) para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 e de LDL-c para o polimorfismo 111+36C>T de LIGHT (F) do grupo SIAM..... 54

FIGURA 10 - Representação gráfica da variação da expressão gênica de ICAM em relação ao genótipo para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 (A), de NFκB para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB (B), de LGALS2 (C) e LTα (D) para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 e da variação das formas solúveis no soro de ICAM1 em relação ao genótipo para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 (E) e de E-SELECTINA para o polimorfismo Lys178Glu de LIGHT (F) para o grupo IAM..... 57

FIGURA 11 - Representação gráfica da variação da forma solúvel no soro de VCAM1 em relação ao genótipo para o polimorfismo Asp693Asp de VCAM1 do grupo IAM..... **58**

FIGURA 12 - Representação gráfica da variação da forma solúvel no soro de MMP9 em relação ao genótipo para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 do grupo SIAM..... **58**

LISTA DE ABREVIATURAS

aa - aminoácidos

AI – Angina Instável

ALT - Alanina Aminotransferase

Apo A - Apolipoproteína A

Apo B - Apolipoproteína B

AST - Aspartato Aminotransferase

B2M – Beta 2-microglobulina

BCRE - Bloqueio Completo de Ramo Esquerdo

CCS - Canadian Cardiovascular Society

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar

CKMB - Fração MB da creatinofosfoquinase

CML - Células Musculares Lisas

C_T – Ciclo da linha de corte

DAC - Doença Arterial Coronariana

DATASUS - Banco de dados do Sistema Único de Saúde

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfato

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

FCF - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FAM – Frequência do Alelo Menor

GAPDH – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

gl – grau de liberdade

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HMBS – Hidroximetilbilane sintase

HPRT1 – Hipoxantina Fosforibosiltransferase 1

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

ICAM - Molécula de Adesão Intercelular

IDPC - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

IMC – Índice de Massa Corporal

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LGALS2 - Galectina 2

LIGHT – Ver TNFSF14

LTα - Linfotoxina alfa

MMP9 - Metaloproteinase 9

MMPs - Metaloproteinases

mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro

NFκB - Fator Nuclear Kappa B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCRus - Proteína C Reativa ultra-sensível

RNA - Ácido Ribonucléico

SCA - Síndrome Coronariana Aguda

SDHA – Complexo da succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp)

SNPs - Polimorfismos de um único nucleotídeo

SUS – Sistema Único de Saúde

TNFSF14 - Fator de Necrose Tumoral 14

TSH - Hormônio tiroestimulante

T_4 livre – Fração livre da tiroxina

T_m – Temperatura de Melting

UBC – Ubiquitina C

USP - Universidade de São Paulo

UTR – Região não traduzida

VCAM1 - Molécula de Adesão do sistema vascular

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

X^2 – Chi-quadrado

SUMÁRIO

PÁGINA

1 INTRODUÇÃO 18

2 OBJETIVOS 25

2.1 OBJETIVOS GERAIS..... 25

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 25

3 MATERIAIS E MÉTODOS 26

3.1 CASUÍSTICA..... 26

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS..... 29

3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS..... 29

3.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS..... 30

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA..... 33

3.6 ANÁLISE DAS CITOCINAS..... 36

3.7 CONTROLE DE QUALIDADE DAS REAÇÕES..... 36

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS..... 36

4 RESULTADOS..... 38

4.1 CASUÍSTICA..... 38

4.2 GENOTIPAGEM..... 41

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA..... 46

4.4 ANÁLISE DAS CITOCINAS SOLÚVEIS NO SORO..... 49

4.5 ASSOCIAÇÃO DOS EFEITOS DOS POLIMORFISMOS NO PARAMETROS BIOQUIMICOS E SÓCIO DEMOGRÁFICOS..... 50

4.6 EFEITO DOS POLIMORFISMOS NA EXPRESSÃO GÊNICA E DOSAGEM DAS FORMAS SOLÚVEIS NO SORO..... 55

5 DISCUSSÃO..... 59

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO..... 70

7 CONCLUSÃO..... 71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 72

APÊNDICES..... 81

ANEXOS..... 86

1. INTRODUÇÃO

A síndrome coronariana aguda (SCA) constitui uma síndrome clínica geralmente causada por doença arterial coronariana (DAC) aterosclerótica e está associada ao infarto agudo do miocárdio (IAM) com alta morbidade e mortalidade (Erlichmann e Carvalho, 2007). A SCA é atualmente dividida entre aquelas que, além da apresentação clínica ao eletrocardiograma inicial há supradesnível persistente do segmento ST (SCA com supra ST) ou ausência de supradesnível persistente do segmento ST (SCA sem supra ST). No caso da SCA sem supra ST, o eletrocardiograma inicial pode revelar infradesnível do segmento ST, só alterações de repolarização (onda T) ou ser normal. Estas alterações refletem a gravidade da isquemia miocárdica subjacente que está associada ou não á necrose miocárdica, sendo chamada de IAM sem supra de ST ou Angina Instável (AI). Já a SCA com supra de ST é sempre um IAM, pois quase sempre está associada á necrose miocárdica (Erlichmann e Carvalho, 2007)

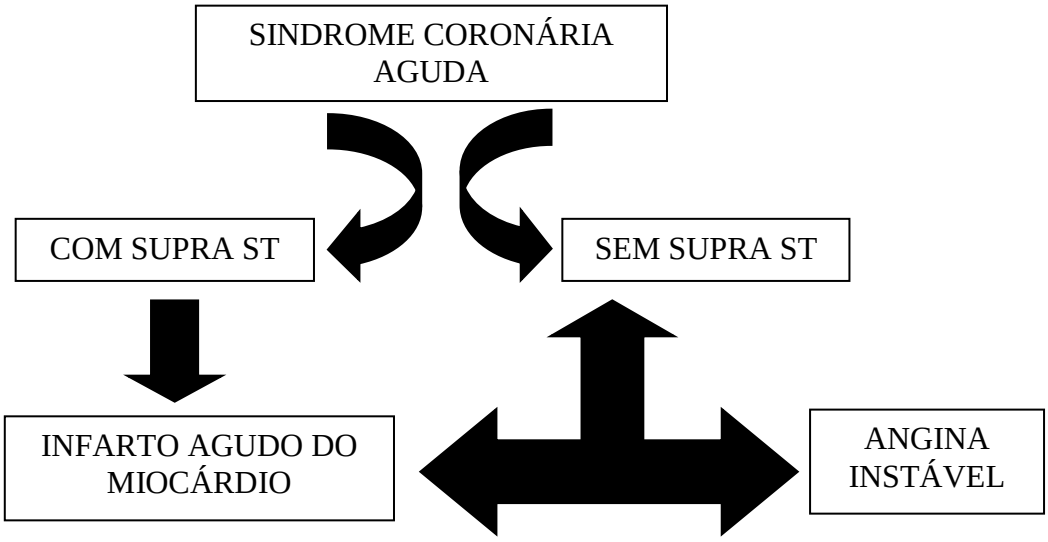


Figura 1 – Esquema da implicação clínica da classificação das SCA
Adaptado de (Erlichmann e Carvalho, 2007)

Aterosclerose é uma doença progressiva, sistêmica e de inicio precoce caracterizada pelo acúmulo de lipides e elementos fibrosos nas grandes artérias (Libby, 2002; Sampaio, 2005). Atualmente, entende-se o processo aterosclerótico não apenas como decorrência do acúmulo de lipides nas paredes dos vasos, mas também como consequência da disfunção endotelial e da ativação do sistema inflamatório (Libby, Okamoto *et al.*, 2010).

Células do sistema imunológico dominam as lesões ateroscleróticas recentes e suas moléculas efetoras aceleram a progressão da lesão (Hansson,

2005) devido à entrada de lipides e células inflamatórias na parede arterial levando a formação de um núcleo rico em gordura. Posteriormente, a secreção de citocinas e fatores de crescimento induzem á migração intimal e proliferação das células musculares lisas (CML) que participam decisivamente na formação da placa. Se as condições inflamatórias persistirem, o núcleo lipídico pode aumentar e a placa fica susceptível a ruptura (Libby, 2002; Sampaio, 2005).

Dois tipos de placas são importantes na determinação do risco de desencadeamento de isquemia aguda. As placas estáveis que apresentam escasso conteúdo lipídico, baixa atividade inflamatória e cápsula fibrosa espessa; e as placas vulneráveis, susceptíveis a trombose ou com alta probabilidade de progressão para oclusão da luz arterial (Sousa, Knobel *et al.*, 2007).

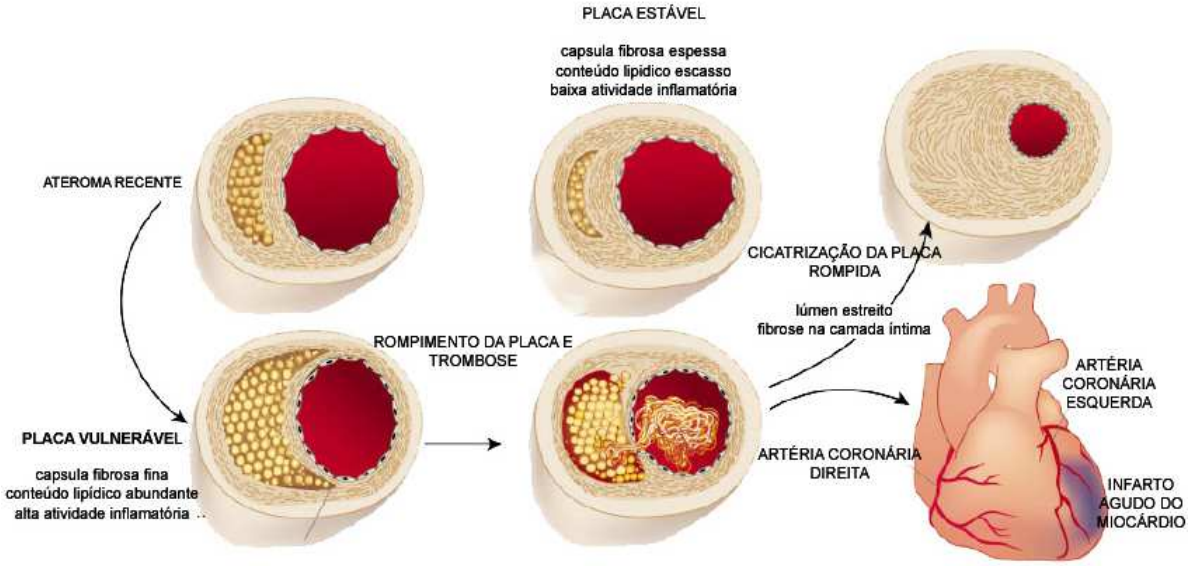


Figura 2 – Modelo esquemático da formação da placa de ateroma.
Adaptado de (Libby, 2002)

Alguns fatores de risco para aterosclerose como, por exemplo, hipertensão, diabetes mellitus, tabagismo, obesidade, idade e sexo já estão bem definidos (Jan, Meng *et al.*, 2010).

A taxa de mortalidade cardiovascular vem aumentando nos últimos anos e, de acordo com os dados do Sistema Único de Saúde (SUS) as mortes por IAM aumentaram 34% nos últimos 25 anos sendo que no ano de 2007 ocorreram cerca de 70 mil mortes por IAM no Brasil (Datasus). O estudo realizado no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) mostrou que a mortalidade hospitalar de pacientes com IAM é de 4,8% e, no ano de 2003, foram atendidos 832 pacientes sendo, 78 com diagnóstico de SCA com supra ST e 754 com diagnóstico de AI e/ou SCA sem supra ST (Dos Santos, Minuzzo *et al.*, 2006).

Atualmente, para diagnóstico, estratificação de risco e tratamento de pacientes com síndromes isquêmicas são utilizados os seguintes biomarcadores (Singh, Martinezclark *et al.*, 2010): CKMB (fração MB da creatinofosfoquinase) massa, troponinas cardíacas e mioglobina.

Tabela 1 – Biomarcadores para o diagnóstico de lesão miocárdica

Biomarcador	Inicio dos sintomas	Pico	Normalização
CKMB massa•	3-6 horas	16-24 horas	48-72 horas
Troponinas cardíacas°	4-8 horas	36-72 horas	5-14 dias
Mioglobina♦	1-2 horas	6-9 horas	12-24 horas

•Sensibilidade diagnóstica de 80% após 6 horas de evolução; °Mesma sensibilidade diagnóstica de CKMM, ♦ Excelente para afastar o diagnóstico de IAM devido ao valor preditivo negativo que varia entre 83%-98% (Piegas, 2009).

Apesar da alta sensibilidade diagnóstica dos biomarcadores atuais, existe a necessidade de buscar marcadores complementares aos já existentes com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade no diagnostico da SCA.

Citocinas e moléculas de adesão têm sido analisadas como possíveis marcadores do processo aterosclerótico e correlacionadas com o aumento do risco para doença cardiovascular por apresentarem concentrações elevadas na corrente sanguínea de pacientes com síndromes isquêmicas (Filho, Filho *et al.*, 2005). A interação entre as citocinas inflamatórias e as células endotelais é um passo crítico na aterogênese levando á disfunção endotelial e inflamação promovendo o recrutamento adicional de células inflamatórias na parede do vaso (Sandberg, Halvorsen *et al.*, 2009).

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo sugeriram uma forte participação de genes relacionados com resposta inflamatória indicando alguns como possíveis biomarcadores para o diagnóstico de SCA (Silbiger, 2010).

TNFSF14 (fator de necrose tumoral 14) também conhecido como LIGHT, é uma proteína transmembrana tipo II de 240 aminoácidos (aa), (Del Rio, Lucas *et al.*, 2010) expresso por células T ativas e células dendríticas imaturas, induz apoptose (Hoffmann, 2008), está envolvido com a resposta imune inata e adaptativa, sobrevivência e proliferação celular. Recentemente, foi associado com aterosclerose por induzir parcialmente a atividade de metaloproteinases em macrófagos e inflamação nas células endoteliais promovendo a degradação da

matriz, o acúmulo de lipídeos, formação de trombo e inflamação. Além disso, existem relatos de que LIGHT promove o aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão como VCAM1 (molécula de adesão do sistema vascular) e E-SELECTINA (Sandberg, Halvorsen *et al.*, 2009).

A forma solúvel de LIGHT ativa as células endotelais e causa mudanças pró-trombóticas e inflamatórias e leva a um aumento da adesão de plaquetas ao endotélio. Pacientes com SCA com supra ST e AI possuem concentrações plasmáticas de LIGHT elevadas em comparação com pacientes normais (Liu, Fang *et al.*, 2008).

Até o momento, não existem estudos correlacionando polimorfismos de LIGHT com DAC.

A família das metaloproteinases (MMPs) é composta por 20 enzimas divididas em 4 subgrupos: colagenases, estromelisinas, gelatinases e as metaloproteinases de membrana (Rowsell, Hawtin *et al.*, 2002). As MMPs estão presentes em diversos processos patológicos como inflamação, metástase tumoral, doenças respiratórias, lesão miocárdica, aneurisma vascular e remodelamento (Blankenberg, Rupprecht *et al.*, 2003).

A MMP9 (metaloproteinase 9), também conhecida como gelatinase B ou 92kD colagenase tipo IV, é uma das MMPs altamente expressas em regiões vulneráveis a formação de placas ateroscleróticas e, por esta razão, sugere-se que esteja envolvida com processos de remodelamento associados com aterogênese e ruptura da placa (Rowsell, Hawtin *et al.*, 2002; Blankenberg, Rupprecht *et al.*, 2003).

Diversos estudos genéticos observaram que alterações funcionais no gene da MMP9 estão relacionadas com a presença e severidade da doença cardiovascular. Uma troca de aminoácidos pode afetar a capacidade da proteína de se ligar ao seu substrato e levar a consequências na remodelação vascular e desestabilização da placa (Blankenberg, Rupprecht *et al.*, 2003).

Pouco se sabe sobre a significância clinica dos níveis de MMP9 circulante, porém, foi observado que pacientes com doença coronária, diabetes, dislipidemias e fumantes possuem níveis plasmáticos de MMP9 elevados enquanto que pacientes hipertensos possuem níveis mais baixos (Sundstrom, Evans *et al.*, 2004).

Sendo assim, a MMP9 poderia ser utilizada como um biomarcador circulante refletindo um estado pró-inflamatório ou como agente causador da desestabilização da placa (Blankenberg, Rupprecht *et al.*, 2003).

A linfotoxina alfa (LTα), também conhecida como fator de necrose tumoral beta (TNFB), é uma citocina pró-inflamatória, produzida nos estágios recentes da inflamação, que induz a adesão de moléculas e citocinas ao endotélio vascular (Tanaka e Ozaki, 2006; Li, Xu *et al.*, 2010; Liu, Sheng *et al.*, 2011).

A galectina 2 (LGALS2) está envolvida no trafico intracelular, modula a secreção de citocinas e adesão celular, codifica uma proteína envolvida na cascata da LTα e é expressa juntamente com a LTα na placa aterosclerótica (Mangino, Braund *et al.*, 2007; Li, Xu *et al.*, 2010).

Polimorfismos no gene da LTα aumentam a expressão e os níveis plasmáticos de várias citocinas em pacientes com DAC, como VCAM1 e E-SELECTINA, que também estão envolvidas no processo aterosclerótico, mostrando que têm um papel direto na progressão da doença (Liu, Sheng *et al.*, 2011).

Polimorfismos no gene da LGALS2 afetam a transcrição e causam alterações nas concentrações plasmáticas de LTα afetando o grau de inflamação (Tanaka e Ozaki, 2006; Mangino, Braund *et al.*, 2007).

Estudos mostram resultados inconclusivos ao verificar a associação dos polimorfismos de LTα e LGALS2 com DAC. Na população americana LGALS2 foi associada com DAC em mulheres e na população britânica não teve associação já na população chinesa foi visto que polimorfismos no gene da LTα aumentam o risco de IAM (Asselbergs, Pai *et al.*, 2007; Mangino, Braund *et al.*, 2007; Gao, Zhang *et al.*, 2010). Esses resultados ainda são controversos já que houve influência de diversos fatores como, por exemplo, o número amostral, seleção dos grupos para o estudo e sabe-se que diferentes etnias têm respostas genéticas diferentes sendo assim, mais estudos são necessários para confirmar, ou não, essa associação.

Até o momento, não foi realizado nenhum estudo de associação destes genes na população brasileira.

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) é uma glipoproteína de superfície de 95kD (Jiang, Klein *et al.*, 2002) que, juntamente com VCAM1 é expressa por leucócitos e plaquetas, são responsáveis pela adesão e migração

de leucócitos ao endotélio e, raramente, são expressas em artérias coronárias normais (Lu, Sheng *et al.*, 2010).

E-SELECTINA é uma glicoproteína de superfície de 11kD (Wang, Liu *et al.*, 2010), é responsável pela adesão de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio (Macias, Villaescusa *et al.*, 2003). Geralmente não é possível detecta-la quando não há ativação de células endoteliais mas, quando há estímulos pro inflamatórios, é rapidamente sintetizada em resposta a diversas citocinas (Wang, Liu *et al.*, 2010).

As concentrações da forma solúvel de VCAM1 em pacientes com SCA é maior que a de pacientes com AI ou controles (Derhaschnig e Jilma, 2009) e, foi observado que a concentração da forma solúvel de ICAM1 aumenta anos antes de ocorrer o primeiro IAM (Jiang, Klein *et al.*, 2002).

As concentrações de ICAM1 e E-SELECTINA na circulação periférica encontram-se elevadas em pacientes com IAM. Os picos de E-SELECTINA ocorrem de 4 a 6 horas após o inicio do evento e voltam aos valores basais em até 24 horas o que a torna um possível biomarcador se utilizada juntamente com os já existentes (Macias, Villaescusa *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por Filho e colaboradores observou que as dosagens de ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA no sangue periférico refletem diretamente os níveis dessas moléculas na circulação coronariana legitimando o uso de amostras periféricas para monitoramento e estratificação do risco em DAC (Filho, Filho *et al.*, 2005).

O fator nuclear kappa B (NFκB) regula genes envolvidos na resposta imune e inflamatória (Collins, Read *et al.*, 1995), desencadeia a transcrição de genes resultando na liberação e ativação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (ex. ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA) (Collins e Cybulsky, 2001; Pare, Ridker *et al.*, 2011), está envolvido em diversos processos como apoptose, diferenciação e proliferação celular, apresenta expressão e atividade aumentadas em regiões propensas a desenvolver placas ateroscleróticas (Orr, Sanders *et al.*, 2005) porém, é pouco expresso em vasos saudáveis (Collins e Cybulsky, 2001).

NFκB pode ser a chave tanto para a resposta inicial a lesão quanto para as etapas subsequentes durante a progressão da aterosclerose (Collins e Cybulsky, 2001).

Pouco se sabe sobre o efeito de polimorfismos no gene NFκB em DAC.

Na tentativa de contribuir para o conhecimento de alguns mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença cardiovascular, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência genotípica de *E-SELECTINA* (rs5368), *MMP9* (rs17576), *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *LTα* (rs909253 e rs1041981), *VCAM1* (rs3176878), *ICAM1* (rs281432), *LGALS2* (rs7291467) e *NFκB* (rs17032705) em pacientes com IAM, AI e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo. Assim como analisar a associação dos polimorfismos com a concentração sérica das formas solúveis das proteínas com a expressão gênica em leucócitos do sangue periférico, procurando estabelecer um modelo menos invasivo de analise da aterosclerose.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a frequência genotípica de *E-SELECTINA* (rs5368), *MMP9* (rs17576), *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *LTα* (rs909253 e rs1041981), *VCAM1* (rs3176878), *ICAM1* (rs281432), *LGALS2* (rs7291467) e *NFκB* (rs17032705) em pacientes com IAM, AI e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo. Assim como analisar a associação dos polimorfismos com a concentração sérica das formas solúveis das proteínas com a expressão gênica em leucócitos do sangue periférico, procurando estabelecer um modelo menos invasivo de analise da aterosclerose.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos dos genes *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *MMP9* (rs17576), *LTα* (rs909253 e rs1041981), *LGALS2* (rs7291467), *VCAM1* (rs3176878), *ICAM1* (rs281432), *E-SELECTINA* (rs5368) e *NFκB* (rs17032705) em pacientes com IAM, AI e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo.

2.2.2. Avaliar o efeito dos polimorfismos dos genes *LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1 e NFκB* sobre a expressão do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) em células mononucleares periféricas de pacientes com IAM, AI e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo.

2.2.3. Associar as variações das concentrações séricas solúveis de *MMP9, VCAM1, ICAM1 e E-SELECTINA* com os polimorfismos dos mesmos em pacientes com IAM, AI e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

O estudo foi desenvolvido no Pronto Socorro, Hemodinâmica e Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo (IDPC) e Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnostico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC e da FCF-USP, conforme expresso pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo A). Os indivíduos foram informados, pelo investigador principal ou membro da equipe colaboradora designada por ele, sobre os objetivos da pesquisa desenvolvida neste trabalho. Somente participaram do estudo aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

3.1.1. CARACTERÍSTICAS DO GRUPO COM INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

Foram incluídos no estudo, **47** indivíduos de ambos os sexos com idades entre 45 e 90 anos com infarto agudo do miocárdio com e sem supra ST que faziam parte da rotina do Pronto Socorro do IDPC.

Todos os indivíduos incluídos neste grupo foram abordados um dia após a internação devido ao grande fluxo de pacientes no Pronto Socorro do IDPC. Para minimizar as diferenças dos resultados, todas as coletas foram realizadas no período da manhã seguinte a internação. Consequentemente, todos estavam sob uso de medicação tais como: ácido acetil salicílico, clopidogrel, atenolol ou carvedilol ou metoprolol, clexane ou heparina não fracionada, captopril ou enalapril ou losartan, sinvastatina, nitroglicerina ou propatilnitrato ou mononitrato de isossorbida.

O diagnóstico de IAM foi estabelecido quando houve aumento e/ou diminuição gradual característicos da troponina e da fração MB da creatinofosfoquinase (CKMB), com pelo menos 1 dos seguintes critérios: a) sintomas isquêmicos; b) alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia (elevação e/ou depressão do segmento ST ou BCRE (bloqueio completo de ramo esquerdo) novo; c) desenvolvimento de ondas Q patológicas no eletrocardiograma; ou d) evidência, em exames de imagem, de perda de

viabilidade miocárdica ou contratilidade segmentar anormal (Thygesen, Alpert *et al.*, 2007; Anderson, Adams *et al.*, 2008).

3.1.2. CARACTERÍSTICAS DO GRUPO SEM INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (SIAM)

Foram incluídos no estudo, **44** indivíduos com idades entre 45 e 90 anos, de ambos os sexos que foram submetidos a cineangiocoronariografia, por apresentarem sintomas clínicos indicativos de doença coronariana, na Hemodinâmica do IDPC e indivíduos com AI. Como angina instável admite-se uma variedade de apresentações clínicas que tradicionalmente podem ser distinguidas da seguinte forma: a) angina prolongada em repouso (> 20 minutos), b) novo episódio anginoso severo (classe III pela classificação da *Canadian Cardiovascular Society* – CCS), c) recente instabilização de angina prévia com características de classe III pela CCS (angina em crescendo) e d) angina pós-infarto do miocárdio. As alterações eletrocardiográficas que tiveram relevância no diagnóstico de Angina Instável foram: a) infra-desnível de segmento ST < 0,5mm (< 0,05 mV) e b) inversão de onda T < 2 mm (< 0,2mV) (Anderson, Adams *et al.*, 2008). O critério de seleção para os indivíduos que foram submetidos a cineangiocoronariografia foi a ausência de lesão ateromatosa significativa.

Os indivíduos com AI foram abordados um dia após a internação devido ao grande fluxo de pacientes no Pronto Socorro do IDPC. Para minimizar as diferenças dos resultados, todas as coletas foram realizadas no período da manhã seguinte a internação. Consequentemente, todos estavam sob uso de medicação tais como: ácido acetil salicílico, clopidogrel, atenolol ou carvedilol ou metoprolol, clexane ou heparina não fracionada, captopril ou enalapril ou losartan, sinvastatina, nitroglicerina ou propatilnitrato ou mononitrato de isossorbida.

Já os indivíduos que foram submetidos a angiocoronariografia foram orientados a permanecer 12 horas de jejum.

3.1.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram quaisquer das seguintes condições: (a) neoplasias; (b) doença autoimune; (c) distúrbio endócrino (d) com história de abuso de álcool ou drogas e (e) mulheres grávidas ou amamentando.

Para avaliação destas condições, aplicou-se um questionário aos indivíduos (Apêndice B) e, foram realizados os seguintes testes de triagem: glicemia, colesterol total e frações (HDL – lipoproteína de alta densidade, LDL – lipoproteína de baixa densidade e VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade), triacilglicerol, apolipoproteína A e B (Apo A e Apo B), ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransaminase), ALT (alanina aminotransaminase), PCRus (proteína C reativa ultra-sensível), T_4 livre (fração livre da tiroxina), TSH (*thyroid-stimulating hormone* – hormônio estimulante da tireoide) e hemograma completo.

3.1.4. VARIÁVEIS ANALISADAS

Os seguintes fatores de risco para doença arterial coronariana foram avaliados em todos os grupos:

1. **Hipertensão Arterial:** Conforme a *V Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial*, foram considerados hipertensos pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva ou que apresentaram pressão arterial ≥140x90mmHg (Júnior, 2006);
2. **Diabetes Mellitus:** Foram considerados diabéticos pacientes em uso de hipoglicemiantes orais, recebendo terapia com insulina ou que apresentaram glicose plasmática em jejum ≥126mg/dL ou glicemia de 2 horas ≥200mg/dL ((Who), 2006);
3. **Tabagismo:** Foram considerados tabagistas fumantes ativos, ou seja, com consumo mínimo de 1 (um) cigarro por dia, pelo menos por um ano ou que fumou no ano anterior á inclusão na pesquisa. Não fumante aquele que nunca fumou ou que parou de fumar a mais de um ano (Silva, Sousa *et al.*, 1998);
4. **Obesidade:** O critério de obesidade foi baseado na *Classificação Internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS)* de acordo com o cálculo do índice de massa corporal (IMC). O índice foi calculado dividindo o peso, em quilogramas, pelo quadrado da altura, em metros. Foram considerados obesos os indivíduos que apresentaram IMC ≥30Kg/m^2 ((Who)),
5. **Sedentarismo:** Foram considerados sedentários indivíduos que não praticavam atividade física regularmente.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através do prontuário ou por anamnese e, no dia da consulta, foi verificada a pressão arterial, altura e peso.

3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os indivíduos dos dois grupos foram submetidos a uma única coleta de sangue na qual foram realizados os seguintes exames laboratoriais: glicemia, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), triacilglicerol, apolipoproteína A e B, ureia, creatinina, AST, ALT, PCRus, T_4 livre, TSH e hemograma completo. Nessa coleta foram obtidos aproximadamente 40mL de sangue utilizando o sistema de coleta a vácuo Vacutainer® (BD, Nova Jersey, EUA) sendo:

a. Quatro tubos (4mL) com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para: extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico para detecção dos polimorfismos; extração de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) para análise da expressão gênica e hemograma completo;
b. Quatro tubos (5mL) com ativador de coágulo e gel separador e um tubo (4mL) com anticoagulante Heparina para: dosagens bioquímicas, atividades enzimáticas no soro e armazenamento do soro e plasma, para dosagens de proteínas e marcadores inflamatórios (mantidos a -20ºC)

3.3. DETERMINAÇÕES BIOQUIMICAS

Os exames laboratoriais foram realizados em colaboração com o Laboratório de Análises Clínicas do IDPC. Para realização da analise da série vermelha, branca e de plaquetas foi utilizado método citoquimico/isovolumétrico ou de impedância automatizados *ABX Pentra 120* (ABX, Kyoto, Japão) e *ABX Pentra 80* (ABX, Kyoto, Japão).

Para análise de AST, ALT, CK e CKMB (atividade), glicemia, ureia, creatinina, sódio, potássio, colesterol total, HDL e triacilglicerol foram utilizados os métodos colorimétricos e enzimáticos automatizados *Dimension® RXL* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA) e *XPAND* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA). O VLDL e LDL foram calculados, segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (Friedewa.Wt, Fredrick.Ds *et al.*, 1972).

Para análise do TSH e T_4 livre foi utilizado o método de quimiluminescência automatizada IMMULITE® (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA).

Para dosagens da PCRus, apo A e apo B foi utilizado o método de imunoensaio-turbidimétrico automatizado, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912 (Myco instrumentation, Renton, WA).

3.4. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

3.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico dos **91** indivíduos incluídos no estudo foi obtido a partir do sangue total periférico, colhido com EDTA. O material foi extraído no equipamento *QIAcube*® (QIAGEN, GmbH, Alemanha) utilizando o *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. A quantificação e análise do grau de pureza (relação A_{260}/A_{280}) do DNA extraído foi realizada no *NanoDrop*® *ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, EUA). Foram utilizadas somente preparações de DNA que obtiveram relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 (Sambrook e Russel, 2001).

3.4.2. DETERMINAÇÃO DOS SNPS (PIROSEQUENCIAMENTO)

A escolha dos SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) a serem determinados pelo sistema *PyroMarq Q24* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) foi realizada utilizando o banco de dados públicos dbSNP (http//:www.ncbi.nlm.nih.gov). Os critérios como frequência do alelo menor (FAM) superior a 0,05% para SNPs presentes em regiões codificantes e superior 0,1% para SNPs presentes em regiões regulatórias como promotoras, 3'UTR (*untranslated region* – região não traduzida), 5'UTR e *splicing* foram utilizados como argumento de busca. Os iniciadores para a PCR (reação em cadeia da polimerase) e reação de pirosequenciamento foram construídos utilizando o programa *PyroMark Assay Desing 2.0* (QIAGEN, GmbH, Alemanha). Para cada SNP, foram construídos três iniciadores, sendo que um deles é obrigatoriamente marcado com biotina totalizando 30 oligonucleotídeos. As sequencias dos iniciadores e os polimorfismos estudados encontram-se na **tabela 2.**

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nos ensaio de pirosequenciamento.

Gene	SNP	Sequencias dos Iniciadores	Tamanho do produto de PCR
LIGHT (rs344560)	A>G	5'TTGGTCAGCCAGCAGTCA3' Biotina-5'CATCACGCAGTCGAACCA3' 5'CCTGGAGGCTGGGGA3'	151pb

LIGHT (rs2291668)	C>T	5'GGGTGGGTCTGGGTCTCTT3' Biotina-5'GGGTGACCATCTCTCCTAGACG3' 5'CTGTTGCTGATGGGG3'	102pb
LTα (rs909253)	C>T	Biotina-5' AAGGGGACAAGATGCAGTCA3' 5' GCTTCGTGCTTTGGACTACC3' 5'CTCTGTTTCTGCCATG3'	276pb
LTα (rs1041981)	A>C	Biotina-5'ATGCATCTTGCCCACAGC3' 5'AGGTGGATGTTTACCAATGAGG3' 5'GAGCAGCAGGTTTGAG3'	60pb
MMP9 (rs17576)	A>G	Biotina-5'TCTCCCCCTTTCCCACATC3' 5'GCAGGGTTTCCCATCAGC3' 5'TCAGCATTGCCGTCC3'	73pb
E-SELECTINA (rs5368)	C>T	5'GCTGTGAGGAGGGATTTGAATT3' Biotina-5'CTTTGGGGCAATCTAGGTTCAG3' 5'GAGGAGGGATTTGAATTA3'	166pb
NFκB (rs17032705)	A>G	5'GGCAACAAAGCAAGACTGTCTC3' Biotina-5'CAGTGCTGCCAGTGTTCTATTTC3' 5'GGTGAACACGTTTAACCTA3'	200pb
LGALS2 (rs7291467)	A>G	Biotina-5'GCCACACAGACACTCACAGACGT3' 5'AGGGAGCCATCTCCTGATGC3' 5'CCTGATGCTTGGTGTTA3'	74pb
VCAM1 (rs3176878)	C>T	5'CCATTTTGTTATTTTCCAGGAAGA3' Biotina-5'TGGCAGGTATTATTAAGGAGGATG3' 5'GGAAGAGAAAACAACAAA3'	97pb
ICAM1 (rs281432)	C>G	5'GTGGAGGAGCTGGGACTTTC3' Biotina-5'TTCCAGTAAATCCAGCCTTCAGC3' 5'GGAGTCATGGAGGGT3'	99pb

O protocolo inicial de otimização da PCR foi correspondente a *Pyromark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate,* 200ηM de cada iniciador, 10ηg de DNA em uma reação com volume final de 25µl.

Para determinar a temperatura de hibridização dos iniciadores foi realizado um gradiente de temperatura onde, varia-se a temperatura de desnaturação (T_m). E, para escolha da melhor temperatura de hibridização, foi realizada uma corrida eletroforética dos produtos da PCR em gel de agarose 1%.

A **figura 3** representa um exemplo de um experimento avaliando o gradiente de temperatura para amplificação do gene LGALS2 na otimização para o pirosequenciamento. A seta indica o fragmento que apresentou uma melhor amplificação, que se traduziu em um fragmento único, sem o aparecimento de

bandas inespecíficas acima ou abaixo e de intensidade forte e homogênea que foi a coluna 5. Neste caso, a melhor temperatura de hibridização foi de 66ºC.

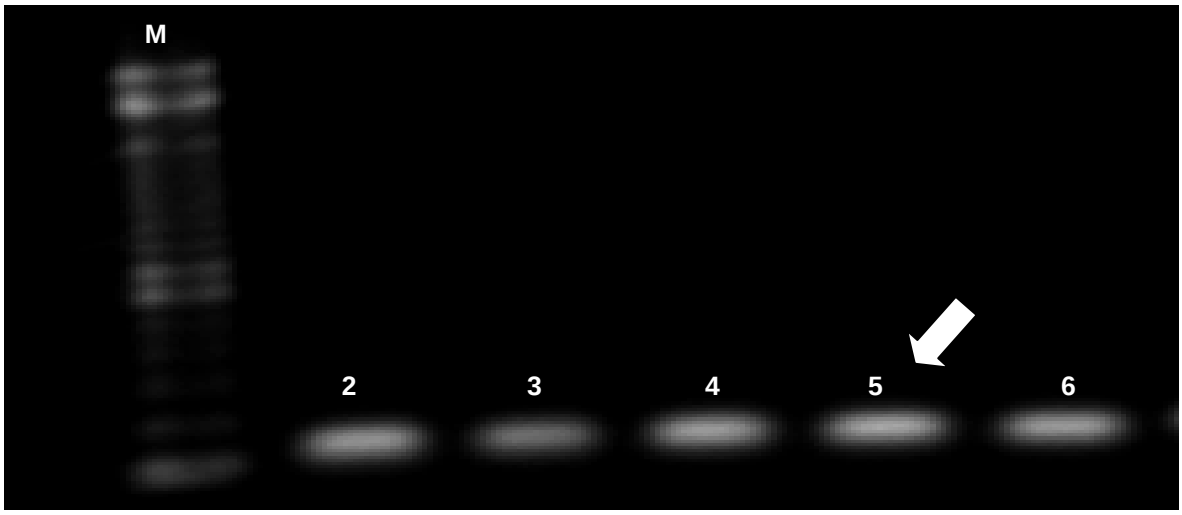


Figura 3 – Fotografia do gel de agarose a 1% do produto da PCR com gradiente de temperatura de hibridização (TH) do gene LGALS2. **M**: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pares de bases (pb). **2**: produto da PCR com TH 60ºC. **3:** produto da PCR com TH 62ºC. **4:** produto da PCR com TH 64ºC. **5:** produto da PCR com TH 66ºC. **6:** produto da PCR com TH 68ºC

A **tabela 3** resume as condições otimizadas e amplificação pela PCR para os polimorfismos estudados.

Tabela 3 – Condições de amplificação pela PCR para os polimorfismos dos genes LIGHT, LTA, MMP9, E-SELECTINA, NFKB, LGALS2, VCAM1 e ICAM1.

Polimorfismo	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Ciclos
LIGHT A>G	94ºC/30seg	60ºC/30seg	72ºC/30seg	45
LIGHT C>T	94ºC/30seg	61ºC/30seg	72ºC/30seg	45
LTα C>T	94ºC/30seg	61ºC/30seg	72ºC/30seg	45
LTα A>C	94ºC/30seg	61ºC/30seg	72ºC/30seg	45
MMP9 A>G	94ºC/30seg	61ºC/30seg	72ºC/30seg	45
E-SELECTINA C>T	94ºC/30seg	61ºC/30seg	72ºC/30seg	45
NFκB A>G	94ºC/30seg	61ºC/30seg	72ºC/30seg	45
LGALS2 A>G	94ºC/30seg	66ºC/30seg	72ºC/30seg	45
VCAM1 C>T	94ºC/30seg	60ºC/30seg	72ºC/30seg	45
ICAM1 C>G	94ºC/30seg	62ºC/30seg	72ºC/30seg	45

O protocolo para reação de pirosequenciamento consiste em purificação dos produtos da PCR, isolamento da fita (do produto da PCR) sintetizada com o iniciador marcado com a biotina, mistura através do sistema á vácuo dos produtos

purificados com os reagentes de pirosequenciamento (álcool 70%, solução de desnaturação e tampão de lavagem), adição dos nucleotídeos de acordo com a ordem de dispensação criada pelo programa *PyroMark Assay Desing 2.0* e, captura do sinal fluorescente pelo sistema a cada adição de nucleotídeos.

3.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.5.1. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA (ácido ribonucleico) de leucócitos totais dos **91** indivíduos incluídos no estudo foi extraído no equipamento *QIAcube®* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) utilizando o *QIAamp® RNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha), imediatamente após a colheita de sangue periférico, seguindo as orientações do fabricante. A quantificação e análise do grau de pureza (relação A_{260}/A_{280}) do RNA obtido foi realizada no *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, EUA). Foram utilizadas somente preparações de RNA que apresentaram valores da relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 (Sambrook e Russel, 2001)**.**

3.5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO mRNA PELA RT SEGUIDA DA PCR EM TEMPO REAL

A quantificação da expressão do mRNA dos genes LIGHT, LTα, MMP9, NFκB, LGALS2, ICAM1 e VCAM1 foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida de PCR (RT-qPCR) em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Life Technologies, Forest City, USA).

A primeira etapa consiste da síntese de cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) a partir de 200ηg de RNA, na presença de 200ηg de iniciadores aleatórios (*random primers*), DTT 20mM (Life Technologies, Forest City, USA), 200µM dNTP (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), 10.000U de transcriptase reversa (SuperScript™ II RT RNase H^-) e tampão RT (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375mM, $MgCl_2$ 15mM) (Life Technologies, Forest City, USA). A mistura foi incubada por 10 min a 25ºC, seguida de 50 min a 42ºC e 15 min a 70ºC. O cDNA obtido foi armazenado a -20ºC até a realização da qPCR.

Na segunda etapa, o cDNA de cada gene foi amplificado pela PCR em tempo real, utilizando-se iniciadores e sondas de detecção marcadas com FAM adquiridos no formato "*TaqMan® Gene Expression Assay*" (Life Technologies, Forest City, USA) que contém os iniciadores e a sonda de cada gene prontos para

serem utilizados e identificados pelos números de catálogo de acordo com a **tabela 4.**

Tabela 4 - Número de catálogo dos ensaios utilizados (iniciadores + sondas).

Gene	Número de Catalogo
LIGHT	Hs00542477_m1
MMP9	Hs00957562_m1
LTα	Hs00608020_g1
NFκB	Hs00231653_m1
ICAM1	Hs00164932_m1
VCAM1	Hs00174239_m1
LGALS2	Hs00197810_m1
GAPDH	Hs00266705_g1

Os demais reagentes da PCR foram: solução denominada *Master Mix* ($MgCl_2$ 25mM, dNTPs 10mM, AmpErase^R UNG 30U, enzima AmpliTaq Gold 150U e tampão da reação) (Life Technologies, Forest City, USA). Para uso, essa solução foi diluída 2 vezes. O volume final foi de 10µl por reação e os ensaios foram realizados em duplicata.

O programa da PCR em tempo real foi constituído de: (1) um ciclo de 2 min a 50ºC (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 min a 95ºC (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15s a 95ºC (desnaturação) e 1 min a 60ºC (hibridização e extensão).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas *TaqMan* foram detectados pelo equipamento *ABI Prism 7500 FAST* (Life Technologies, Forest City, USA). Os dados foram analisados utilizando o programa *System SDS Software* (Life Technologies, Forest City, USA) que geram curvas semi-logaritímicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de florescência é significativo, denominado ciclo *treshold* (C_t) (Bustin e Mueller, 2005). Para cada amostra de cDNA, o C_t de cada gene foi registrado e comparado com o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que foi utilizado como controle endógeno.

A escolha do controle endógeno foi feita avaliando 6 genes diferentes (GAPDH, B2M (beta 2-microglobulina), HPRT1 (hipoxantina fosforobosiltransferase 1), SDHA [complexo da succinato desidrogenase,

subunidade A, flavoproteína (Fp)]; UBC (ubiquina C) e HMBS (hidroximetilbilane sintase)) em uma amostragem de cDNAs que incluíram pacientes randomizados entre caso e controle. Após a PCR em tempo real, os dados foram analisados no programa *geNorm* (Primer Design Ltd.). O gene com menor variação entre as amostras foi o GAPDH.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade, foram utilizadas diluições seriadas (1:4, 1:16; 1:64 e 1:256) de cDNA e os respectivos C_t foram plotados em gráficos que permitem verificar a relação entre essas duas variáveis (C_t x log da diluição de cDNA).

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $\mathbf{E= 10^{-1/\alpha}-1 \times 100}$, onde α é a inclinação da curva. Segundo Livak e Schmittgen (2001), para a PCR em tempo real, ter alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (do inglês *slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Quando esses critérios não são atendidos, é preciso verificar as concentrações de iniciadores e sondas de outras curvas-padrão (Livak e Schmittgen, 2001).

Na **tabela 5,** estão apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios.

Tabela 5 - Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios de RT-PCR em tempo real.

Gene	Inclinação da Curva	Eficiência
LIGHT	-3.39	97%
MMP9	-3.32	100%
LTA	-3.32	100%
NFkB	-3.31	100%
ICAM1	-3.10	109%
VCAM1	-3.12	109%
LGALS2	-3.40	97%
GAPDH	-3.36	98%

Os valores de C_t obtidos nos ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação á do GAPDH

(controle endógeno). Essa relação é denominada Delta C_t (ΔC_t) e será calculada pela fórmula:

$$\Delta C_t = (C_{t\ gene\ alvo} - C_{t\ controle\ endógeno})$$

Os dados de ΔC_t foram transformados em escala logarítima ($2^{-\Delta Ct}$) para a análise dos dados.

3.6. ANÁLISE DAS CITOCINAS

3.6.1. DOSAGEM DAS CITOCINAS PELO SISTEMA LUMINEX

As amostras de soro dos **91** indivíduos incluídos no estudo foram obtidas a partir do sangue total periférico colhido em tubo com ativador de coágulo e gel separador. As amostras foram estocadas á temperatura ambiente por 30 minutos para coagular e, em seguida, foram centrifugadas a 1000xg por 10 minutos a 25ºC e o soro foi estocado a -20ºC.

A dosagem de MMP9, sICAM1, sVCAM1 e sE-SELECTINA foram dosadas utilizando o *MILLIPLEX ™ Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1 kit* (Millipore, Missouri, USA) no equipamento LUMINEX® 200™ System (Luminex Corporation, Austin, USA).

3.7. CONTROLE DE QUALIDADE DAS REAÇÕES

As amplificações realizadas pela PCR foram monitorizadas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual foram adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto, a amostra de DNA ou cDNA) em cada conjunto de reações. Os ensaios de PCR em tempo real e LUMINEX foram feitos em duplicata.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram analisados através do software SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Os dados referentes ao estudo do equilíbrio de ligação, D', os valores da frequência alélica bem como o teste de qui-quadrado (χ^2) e p valor, para essas variáveis, foram obtidos através do programa Haploview 4.2 (Broad Institute, Cambridge, USA).

Para comparar as frequências das variáveis qualitativas foi realizado o teste de qui-quadrado (χ^2).

Antes de efetuar os testes de comparações das variáveis quantitativas, avaliou-se se os dados seguiam uma distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para dados paramétricos foi utilizado o teste t de Student ou ANOVA. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*

O teste Tukey foi utilizado para as comparações múltiplas nos teste de ANOVA, considerando 95% de intervalo de confiança.

4. RESULTADOS

4.1. CASUÍSTICA

4.1.1. GRUPO COM INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

Inicialmente foram selecionados 52 pacientes com infarto agudo do miocárdio, 2 destes não preencheram os critérios de inclusão. Não foi possível obtenção da amostra biológica em 2 pacientes devido a uso de contraste e 1 apresentou alterações hormonais (T_4 livre e/ou TSH aumentados). Sendo assim, o grupo IAM foi composto por 47 indivíduos.

4.1.2. GRUPO SEM INFARTO AGUDO DO MIOCARDIO (SIAM)

Inicialmente foram selecionados 48 pacientes sem infarto agudo do miocárdio, 2 destes apresentaram alterações hormonais (T_4 livre e/ou TSH aumentados). Sendo assim, o grupo SIAM foi composto por 46 indivíduos.

4.1.3. DADOS BIODEMOGRÁFICOS

Na **tabela 6** estão representadas as características biodemográficas dos indivíduos do grupo IAM e SIAM. Foram incluídos no estudo **93** indivíduos, sendo 47 IAM e 46 SIAM, de ambos os sexos com idades entre 45 e 90 anos.

Houve uma maior frequência de homens caucasianos nos dois grupos o que indica que diferentes etnias e o sexo podem influenciar no desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica ($p>0,05$).

A média de idade foi maior no grupo IAM do que no SIAM não apresentando dados estatísticamente significativos.

Os indivíduos de ambos os grupos apresentaram fatores de risco clássicos (hipertensão, obesidade, diabetes mellitus, tabagismo, sedentarismo e consumo de álcool) para o desenvolvimento de doença aterosclerótica.

O número de obesos em ambos os grupos foi relativamente pequeno não apresentando dados estatisticamente significativos. Apesar do pequeno número de obesos, vale ressaltar que muitos dos indivíduos estavam com sobrepeso (IMC 25 a 29kg/m^2) e o aumento do IMC é um fator de risco independente para IAM.

O grupo IAM foi composto por 46 indivíduos hipertensos e 1 normotenso totalizando os 47 indivíduos deste grupo enquanto que o grupo SIAM foi composto por 36 hipertensos e 10 normotensos. Apesar de não ter apresentado

dados estatisticamente significativos (p>0,05), a hipertensão é um fator de risco independente para doença cardiovascular.

A maioria dos indivíduos não eram diabéticos porém o grupo IAM foi composto por mais diabéticos que o SIAM confirmando o papel da diabetes na progressão e desenvolvimento da doença aterosclerótica.

Apesar do pequeno número de fumantes, vale ressaltar que muitos dos indivíduos eram ex-fumantes o que pode justificar o desenvolvimento da doença.

A prática de atividade física no grupo IAM foi maior que no grupo SIAM porém não apresentou valores estatisticamente significativos (p>0,05). Apesar da maioria dos indivíduos serem sedentários, o número de obesos é pequeno.

O consumo de álcool foi mínimo nos dois grupos e, a maioria consumidora encontra-se no grupo IAM.

Tabela 6 - Características biodemográficas dos indivíduos do grupo IAM (infarto agudo do miocárdio) e SIAM (sem infarto do agudo do miocárdio).

Parâmetros	IAM (47)	SIAM (46)	*p*
Genero Masculino	53% (33)	47% (29)	0,463
Caucasianos	55% (41)	45% (34)	0,235
Idade (anos)	64±11	61±10	0,142
Obesidade (IMC >30kg/m^2)	42% (10)	58% (14)	0,539
Hipertensão	31% (46)	54% (36)	0,825
Diabetes	62% (16)	39% (10)	0,208
Tabagistas	52% (11)	48% (10)	0,536
Sedentarismo	44% (25)	56% (32)	0,512
Consumo de álcool	58% (11)	42% (8)	0,290

Nota: número de indivíduos entre parênteses. As variáveis contínuas são apresentadas como média ± desvio padrão, comparadas por teste t. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (χ^2). IAM: infarto agudo do miocárdio; SIAM: sem infarto agudo do miocárdio; IMC: índice de massa corpórea. * valores estatisticamente significativos. Os indivíduos com pressão arterial igual ou superior a 140x90mmHg e/ou que fazem uso de medicação anti-hipertensiva, foram considerados hipertensos (Júnior, 2006). Indivíduos que fazem uso de hipoglicemiantes orais ou que recebem terapia com insulina ou que apresentaram valores de glicose plasmática de jejum igual ou superior a 126mg/dL foram considerados diabéticos ((Who), 2006). Os indivíduos tabagistas ativos ou que fumaram no ano anterior a inclusão na pesquisa foram considerados tabagistas (Silva, Sousa *et al.*, 1998).

Na **tabela 7** está representado o perfil lipídico, bioquímico e hematológico dos indivíduos do grupo IAM e SIAM. Foram incluídos no estudo **93** indivíduos, sendo 47 IAM e 46 SIAM, de ambos os sexos com idades entre 45 e 90 anos.

Os valores glicêmicos foram maiores no grupo IAM quando comparados com o SIAM não apresentando valores estatisticamente significativos.

Apesar do colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, triacilglicerol e Apo B não terem apresentado diferenças estatisticamente significativas dos valores séricos

entre os grupos (p>0,05), são considerados fatores de risco para DAC. Tem-se que levar em consideração que os indivíduos faziam uso de hipolipemiantes.

As concentrações séricas de Apo A do grupo IAM foi de 126mg/dL e do grupo SIAM foi de 142mg/dL e após a transformação dos valores apresentaram valores aproximados porém foram estatisticamente significativos. Acredita-se que os grupos apresentaram esse perfil devido ao uso de hipolipemiantes.

Os demais exames de triagem como: ALT, AST, ureia, creatinina, PCRus, leucócitos e plaquetas não apresentaram diferença estatística entre os grupos (p>0,05). Esperava-se que as concentrações séricas das enzimas hepáticas ALT e AST fossem mais altas no grupo IAM já que estas se encontram elevadas no infarto. Acredita-se que esse perfil deve-se a administração de medicamentos no PS do IDPC. Para excluir a presença de doença hepática, foi realizada a razão AST/ALT e, todos apresentaram valores dentro dos padrões de referência normal (<2,0).

As concentrações séricas de ureia e creatinina foram maiores no grupo IAM quando comparado com o grupo SIAM não apresentando valores significativos. Apesar aumento da concentração sérica de ambas as enzimas, todos os indivíduos apresentaram valores dentro dos padrões de referência normal para pacientes com SCA.

Tabela 7 - Perfil lipídico, bioquímico e hematológico dos indivíduos do grupo IAM (infarto agudo do miocárdio) e SIAM (sem infarto do agudo do miocárdio).

Parâmetros	IAM (47)	SIAM (46)	*p*
Perfil Lipídico e Bioquímico			
Glicemia (mmol/L)	6,3±2,0	6,1±2,4	0,432
Colesterol Total (mmol/L)	5,0±2,0	5,0±1,4	0,721
HDL – C (mmol/L)	1,1±0,3	1,2±0,3	0,142
LDL – C (mmol/L)	2,8±1,4	3,0±1,2	0,448
VLDL – C (mmol/L)	1,0±1,0	1,0±0,7	0,777
Triacilglicerol (mmol/L)	2,3±2,3	2,0±1,5	0,806
Apo A (g/L)	1,3±0,2	1,4±0,3	**0,002**
Apo B (g/L)	1,0±0,4	1,0±0,3	0,538
AST (µKat/L)	0,5±0,3	0,5±0,3	0,139
ALT (µKat/L)	0,7±0,5	0,7±0,4	0,560
Ureia (mmol/L)	7,1±3,0	6,5±2,0	0,551
Creatinina (µmol/L)	104±30	95±33	0,083
PCRus (mg/L)	9,6±19,8	3,8±4,0	0,948
Perfil Hematológico			
Leucócitos (10^3/mL)	7,7±2,0	7,3±2,1	0,323
Plaquetas (10^3/µL)	242±68	225±63	0,223

Nota: número de indivíduos entre parênteses. As variáveis contínuas são apresentadas como média ± desvio padrão, comparadas por teste t ou por testes não paramétricos de *Mann-Whitney*. IAM: infarto agudo do miocárdio; SIAM: sem infarto agudo do miocárdio; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; APO A: apolipoproteína A; APO B: apolipoproteína B. T4 livre: fração livre da tiroxina; TSH: hormônio estimulante da tireoide; AST: aspartato aminotransaminase; ALT: alanina aminotransaminase.

4.2. GENOTIPAGEM

Foi realizada a genotipagem de 83 indivíduos. Algumas das amostras de DNA obtidas apresentaram valores da relação A_{260}/A_{280} <1,8 ou >2,0 e por isso não foram utilizadas na técnica de genotipagem.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg está representado na **tabela 8**.

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos Lys178Glu e 111+36C>T de LIGHT, Gln279Arg de MMP9, -9-198A>G e Thr60Asn de LTα, 6+3279C>T de LGALS2, Asp693Asp de VCAM1, 332-3499C>G de ICAM1, Hys468Tyr de E-SELECTINA e 8+10029G>A de NFκB encontram – se na **tabela 9**.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg caracteriza que os resultados mostraram validade amostral.

As distribuições foram similares para os polimorfismos Lys178Glu e 111+36C>T de LIGHT, Gln279Arg de MMP9, -9-198A>G e Thr60Asn de LTα,

6+3279C>T de LGALS2, Asp693Asp de VCAM1, 332-3499C>G de ICAM1, Hys468Tyr de E-SELECTINA e 8+10029G>A de NFκB (p>0,05) portanto os polimorfismos selecionados apresentaram ausência de associação com SCA na população deste estudo.

Os dados referentes ao estudo do equilíbrio de ligação estão representados na **tabela 10** e **figura 3**. Através do programa Haploview 4.2 (Broad Institute, Cambridge, USA) foi feita a análise dos polimorfismos Lys178Glu e 111+36C>T de LIGHT e -9-198A>G e Thr60Asn de LTα e, foi possível observar que os polimorfismos de LIGHT estão em equilíbrio de ligação, ou seja, o genótipo do cromossomo em um loco é independente de seu genótipo em outro sendo assim, não houve relação do haplótipo avaliado. Enquanto que os polimorfismos de LTα estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, existe uma associação não aleatória entre o genótipo do cromossomo em um loco e seu genótipo em outro.

Tabela 8 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados.

	GRUPOS	
	IAM	**SIAM**
LIGHT Lys178Glu	p>0,05	p>0,05
LIGHT 111+36 C>T	p>0,05	p>0,05
LTA -9-198 A>G	p>0,05	p>0,05
LTA Thr60Asn	p>0,05	p>0,05
MMP9 Gln279Arg	p>0,05	p>0,05
E-SELECTINA Hys468Tyr	p>0,05	p>0,05
NFκB 8+10029 G>A	p>0,05	p>0,05
LGALS2 6+3279 C>T	p>0,05	p>0,05
VCAM1 Asp693Asp	p>0,05	p>0,05
ICAM 332-499 C>G	p>0,05	p>0,05

NOTA: Dados analisados no programa HAPLOVIEW.

Tabela 9 - Distribuição da frequência alélica e genotípica dos SNPs Lys178Glu, 111+36C>T do gene LIGHT; Gln279Arg, do gene MMP9; -9-198A>G, Thr60Asn do gene LTA; 26+3279C>T do gene LGA; Asp693Asp do gene VCAM; 332-3499C>G do gene ICAM, Hys468Tyr do gene E-SELECTINA; e 8+10029G>A do gene NFKB.

Polimorfismos	**Genótipos**		**Alelos**	
LIGHT Lys178Glu	***GG***	***AG + AA***	***G***	***A***
IAM (37)	45% (34)	43% (3)	94% (85)	6% (5)
SIAM (46)	55% (41)	57% (4)	96% (71)	4% (3)
	χ^2=0,016 (1gl, *p*=0,900)		χ^2=0,197 (1gl, *p=0,657)*	
LIGHT 111+36 C>T	***CC***	***CT + TT***	***C***	***T***
IAM (37)	45% (25)	44% (12)	84% (77)	16% (15)
SIAM (45)	55% (31)	56% (15)	82% (61)	18% (13)
	χ^2=0,000 (1gl, *p*=0,986)		χ^2=0,047 (1gl, *p=0,829)*	
LTA -9-198 A>G	***TT***	***TC + CC***	***T***	***C***
IAM (37)	35% (13)	52% (24)	74% (68)	26% (24)
SIAM (46)	65% (24)	48% (22)	62% (46)	38% (28)
	χ^2=2,410 (1gl, *p*=0,121)		χ^2=2,63 (1gl, *p=0,104)*	
LTA Thr60Asn	***CC***	***CA + AA***	***C***	***A***
IAM (37)	34% (13)	53% (24)	75% (69)	25% (23)
SIAM (46)	66% (25)	47% (21)	62% (46)	38% (28)
	χ^2=3,049 (1gl, *p*=0,081)		χ^2=3,176 (1gl, *p=0,075)*	

MMP9 Gln279Arg	***AA***	***GA + GG***	***A***	***G***
IAM (37)	40% (19)	50% (18)	77% (71)	23% (21)
SIAM (46)	60% (28)	50% (18)	68% (50)	32% (24)
	χ^2=0,756 (1gl, *p*=0,384)		χ^2= 1,915 (1gl, *p=0,166)*	

E-SELECTINA Hys468Tyr	***CC***	***CT+ TT***	***C***	***T***
IAM (37)	45% (28)	43% (9)	83% (76)	17% (16)
SIAM (46)	55% (34)	57% (12)	85% (63)	15% (11)
	χ^2=0,034 (1gl, *p*=0,854)		χ^2=0,194 (1gl, *p=0,661)*	

NFκB 8+10029 G>A	***GG***	***AG + AA***	***G***	***A***
IAM (37)	35% (11)	50% (26)	64% (59)	36% (33)
SIAM (46)	65% (20)	50% (26)	57% (42)	43% (32)
	χ^2= 1,656 (1gl, *p*=0,198)		χ^2= 0,936 (1gl, *p*=0,333)	

LGALS2 6+3279 C>T	***GG***	***GA + AA***	***G***	***A***
IAM (37)	36% (9)	50% (28)	57% (50)	43% (38)
SIAM (44)	64% (16)	50% (28)	53% (39)	47% (35)
	χ^2= 1,365 (1gl, *p*=0,243)		χ^2=0,275 (1gl, *p*=0,6)	

VCAM1 Asp693Asp	*CC*	*CT + TT*	*C*	*T*
IAM (37)	44% (30)	50% (7)	92% (83)	8% (7)
SIAM (45)	56% (38)	50% (7)	89% (66)	11% (8)
	χ^2=0,162 (1gl, *p*=0,687)		χ^2=0,45 (1gl, *p*=0,503)	

ICAM 332-499 C>G	*GG*	*CG + CC*	*G*	*C*
IAM (37)	33% (8)	49% (29)	% (50)	% (42)
SIAM (46)	67% (16)	51% (30)	% (35)	% (39)
	χ^2=1,728 (1gl, *p*=0,189)		χ^2= 0,816 (1gl, *p*=0,366)	

Nota: número de indivíduos entre parênteses. IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; SIAM: Sem Infarto Agudo do Miocárdio; χ^2: qui-quadrado; gl: grau de liberdade. * valores estatisticamente significativos.

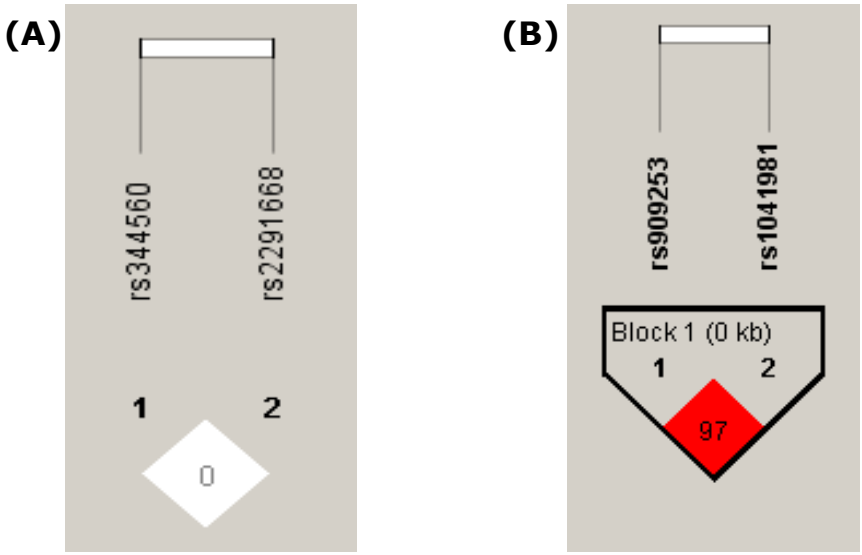


Figura 4 - Blocos haplotípicos dos genes LIGHT (A) e LTα (B). Número dentro do losango representa o valor de r².

Tabela 10 - Blocos haplotípicos dos genes LIGHT e LTα e frequência de associação entre os grupos IAM e SIAM.

Gene	SNPs	Posição cromossômica	D'	R^2	Haplótipos	Freqüência (IAM)	Freqüência (SIAM)	P
LIGHT*	rs344560	6665020	0,055	0,001	-	-	-	-
	rs2291668	6669934			-	-	-	-
LTα	rs909253	31540313	1,0	0,972	TC	74%	62%	0,105
	rs1041981	31540784			CA	26%	38%	0,075

*Os SNPs estudados do gene LIGHT não formaram blocos haplotípicos.

4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Foi realizada a análise da expressão dos genes LIGHT, LTα, MMP9, ICAM1, VCAM1, LGALS2 e NFκB em **88** indivíduos sendo 46 IAM e 42 SIAM. Algumas das amostras de mRNA obtidas apresentaram valores da relação A_{260}/A_{280} <1,8 ou >2,0 e por isso não foram utilizadas no estudo da expressão gênica.

Na **tabela 11** e **figuras 5 e 6** estão representadas as médias e medianas da expressão do mRNA dos genes acima citados nos grupos IAM e SIAM.

Não houve diferença estatística na expressão gênica para LIGHT, MMP9, ICAM1, VCAM1, LGALS2 e NFκB (p>0,05) entre o grupo de IAM e controle mas foi significativa para LTα (p<0,05).

Tabela 11 - Expressão de mRNA dos genes LIGHT, LTα, MMP9, ICAM1, VCAM1, LGALS2 e NFκB em células do sangue periférico dos grupos IAM (infarto agudo do miocárdio) e SIAM (sem infarto do agudo do miocárdio).

	GRUPOS		
	IAM (46)	SIAM (42)	p
LIGHT	0,0174±0,0161	11,0446±71,4197	0,095
LTα	0,0023±0,0024	0,4624±2,9781	**0,019***
MMP9	1,8392±10,6089	76,2988±492,4370	0,116
ICAM1	0,0320±0,0961	0,0186±0,0132	0,904
VCAM1	0,0006±0,0023	0,0587±0,3411	0,761

LGALS2	0,1376±0,2765	38,6744±240,8590	0,449
NFκB	0,0701±0,0704	14,7511±92,8334	0,130

Nota: número de indivíduos entre parênteses. IAM: infarto agudo do miocárdio; SIAM: sem infarto agudo do miocárdio. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± desvio padrão e foram comparadas por testes não paramétricos de *Mann-Whitney.*

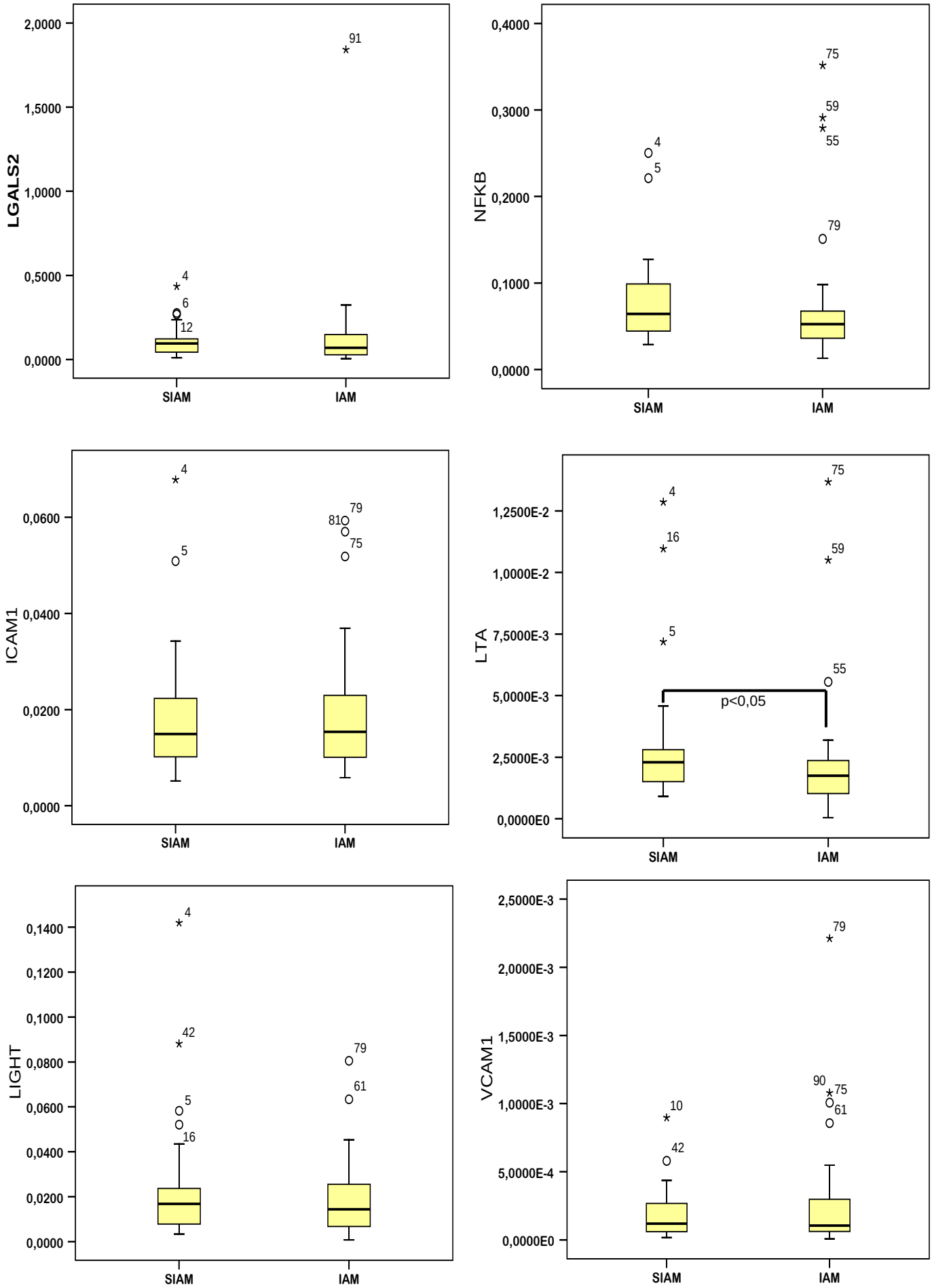


Figura 5 – Representação gráfica da expressão do mRNA dos genes LIGHT, LTα, ICAM1, VCAM1, LGALS2 e NFκB em células do sangue periférico dos grupos IAM (infarto agudo do miocárdio) e SIAM (sem infarto do agudo do miocárdio). NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

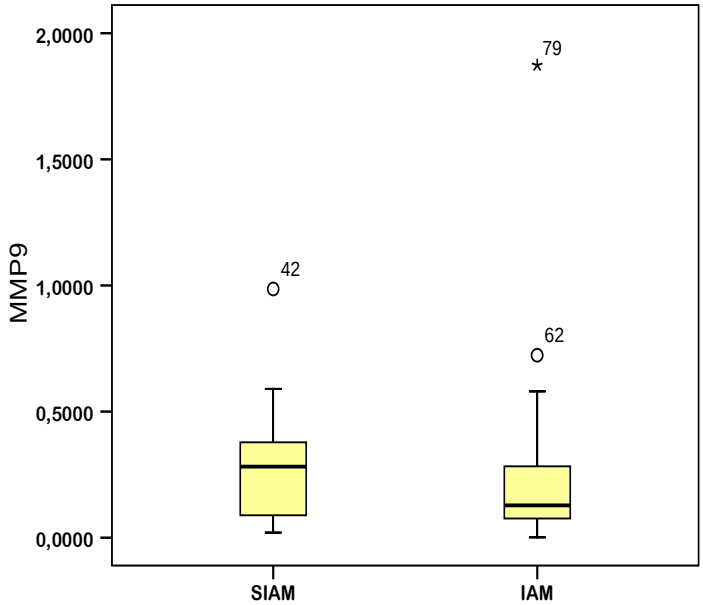


Figura 6 – Representação gráfica da expressão do mRNA do gene MMP9 em células do sangue periférico dos grupos IAM e SIAM. NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

4.4. ANALISE DAS CITOCINAS SOLÚVEIS NO SORO

Foi realizada a dosagem das formas solúveis no soro de MMP9, ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA em **75** indivíduos sendo 34 IAM e 41 SIAM. Algumas amostras de soro apresentaram hemólise e/ou formação de fibrina e, segundo o fabricante do kit utilizado, esses dois fatores podem causar interferências nos resultados portanto, tais amostras, não foram utilizadas.

Na **tabela 12** e **figura 7** estão representadas as médias e medianas da dosagem das citocinas acima citadas nos grupos IAM e SIAM.

Não houve diferença estatística para nenhuma das formas solúveis estudadas (MMP9, ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA) ($p>0,05$).

É possível observar que os valores da forma solúvel de MMP9 são maiores no grupo IAM enquanto que as demais formas solúveis estudadas estão maiores no grupo SIAM, mas estatisticamente não significante.

Tabela 12 – Dosagem das formas solúveis no soro de MMP9, ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA dos grupos IAM (infarto agudo do miocárdio) e SIAM (sem infarto do agudo do miocárdio).

	GRUPOS		
	IAM (34)	**SIAM (41)**	**p**
MMP9 (ng/mL)	2026±2121	1868±1565	0,965
ICAM1 (ng/mL)	357±138	411±221	0,220

VCAM1 (ng/mL)	2380±699	2554±1201	0,457
E-SELECTINA (ng/mL)	110±84	118±98	0,704

Nota: número de indivíduos entre parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± desvio padrão e, comparadas por teste t ou por testes não paramétricos de *Mann-Whitney.* IAM: infarto agudo do miocárdio; SIAM: sem infarto agudo do miocárdio.

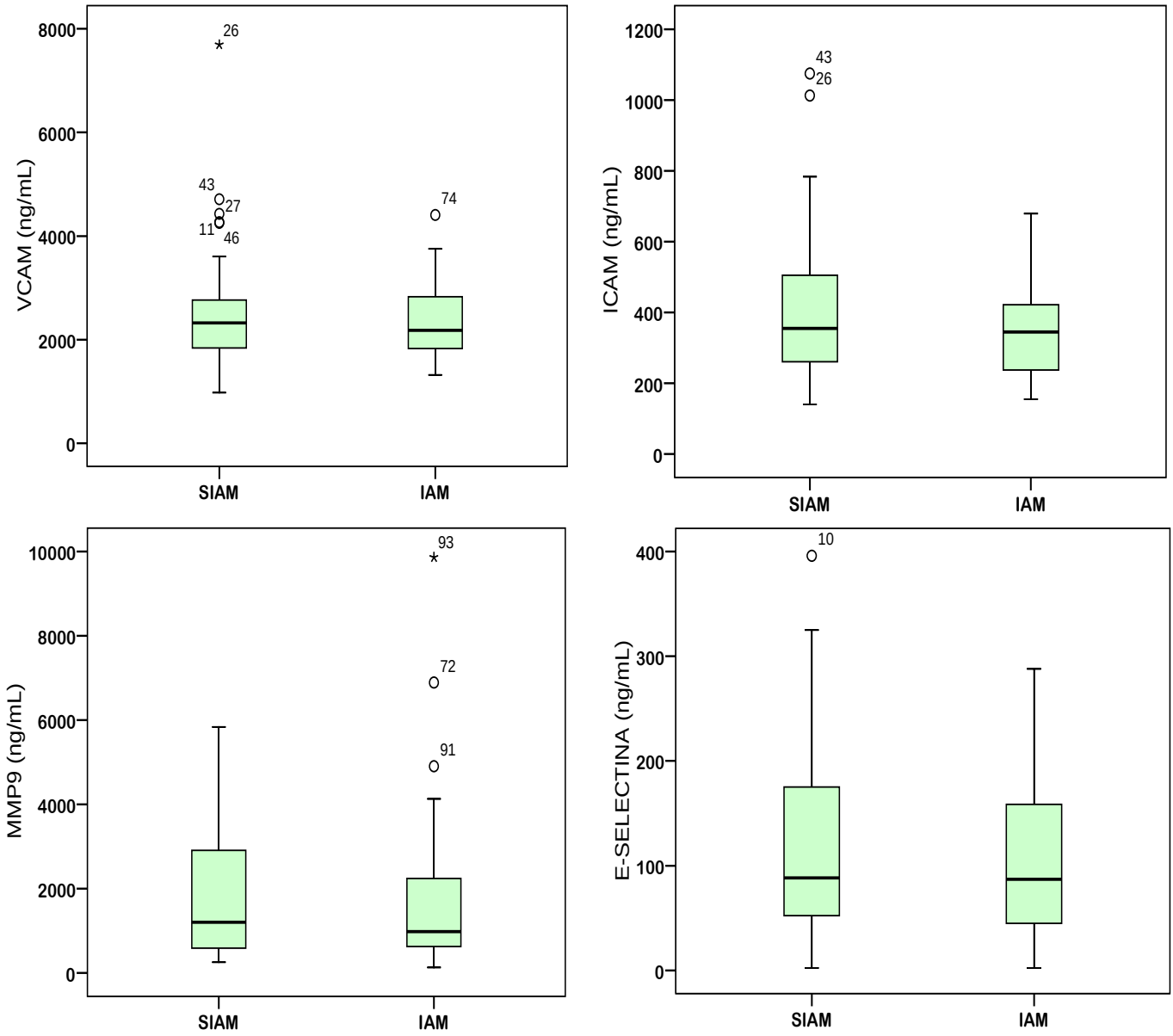


Figura 7 – Representação gráfica das dosagens das formas solúveis no soro de MMP9, ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA dos grupos IAM (infarto agudo do miocárdio) e SIAM (sem infarto do agudo do miocárdio). NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

4.5 ASSOCIAÇÃO DOS EFEITO DOS POLIMORFISMOS NOS PARAMETROS BIOQUÍMICOS E SÓCIO DEMOGRÁFICOS

Foi realizado o estudo de associação dos genótipos com os parâmetros sócio demográficos e parâmetros bioquímicos para os polimorfismos Lys178Glu e 111+36C>T de LIGHT, Gln279Arg de MMP9, -9-198A>G e Thr60Asn de LTα,

6+3279C>T de LGALS2, Asp693Asp de VCAM1, 332-3499C>G de ICAM1, Hys468Tyr de E-SELECTINA e 8+10029G>A de NFκB no grupo IAM e SIAM.

As distribuições para hipertensão, diabetes, consumo de álcool e sedentarismo foram similares para todos os polimorfismos estudados nos dois grupos.

Foi possível observar que 57% dos obesos do grupo IAM são portadores do genótipo GG e 67% dos não obesos são portadores do genótipo AG, ambos para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB ($p<0,05$) enquanto que 57% dos obesos do grupo SIAM são portadores do genótipo GG e 52% dos não obesos são portadores do genótipo CG, ambos para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 ($p<0,05$). As distribuições para obesidade foram similares para os demais polimorfismos estudados nos dois grupos.

Ao associar os genótipos em indivíduos tabagistas observou-se que 60% dos fumantes do grupo IAM são portadores do genótipo GG e, 60% dos não fumantes são portadores do genótipo GA ($p<0,05$) enquanto que 80% dos fumantes do grupo SIAM são portadores do genótipo GA e 41% dos não fumantes são portadores do genótipo GG ambos para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2. As distribuições para tabagismo foram similares para os demais polimorfismos estudados nos dois grupos.

Na **figura 8** está representada a variação dos níveis séricos, do grupo IAM, de colesterol total em relação aos genótipos dos polimorfismos Thr60Asn e -9-198A>G de LTα e de ureia para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA. É possível observar que, as concentrações séricas de colesterol total são maiores para indivíduos portadores do genótipo AA para o polimorfismo Thr60Asn e do genótipo CC para o polimorfismo -9-198A>G ambos de LTα em relação aos demais genótipos. Os indivíduos portadores do genótipo CC para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA possuem concentrações séricas de ureia maiores quando comparado com os demais genótipos.

Na **figura 9** está representada a variação dos níveis séricos, do grupo SIAM, de AST em relação ao genótipo do polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1, de ureia para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA, de colesterol total, LDL-c e Apo B para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 e de LDL-c para o polimorfismo 111+36C>T de LIGHT.

É possível observar que os portadores do genótipo CC para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 possuem concentrações séricas de AST maiores quando comparadas com os demais genótipos.

Os portadores do genótipo CC para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA possuem concentrações séricas de ureia maiores que os demais genótipos.

As concentrações séricas de colesterol total, LDL-c e Apo B são maiores nos indivíduos portadores do genótipo CC para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 quando comparadas com os demais genótipos.

Os valores séricos de LDL-c são maiores nos indivíduos portadores do genótipo CC para o polimorfismo 111+36C>T de LIGHT quando comparados com os demais genótipos.

Não houve diferença estatística para os outros polimorfismos estudados em nenhum dos dois grupos.

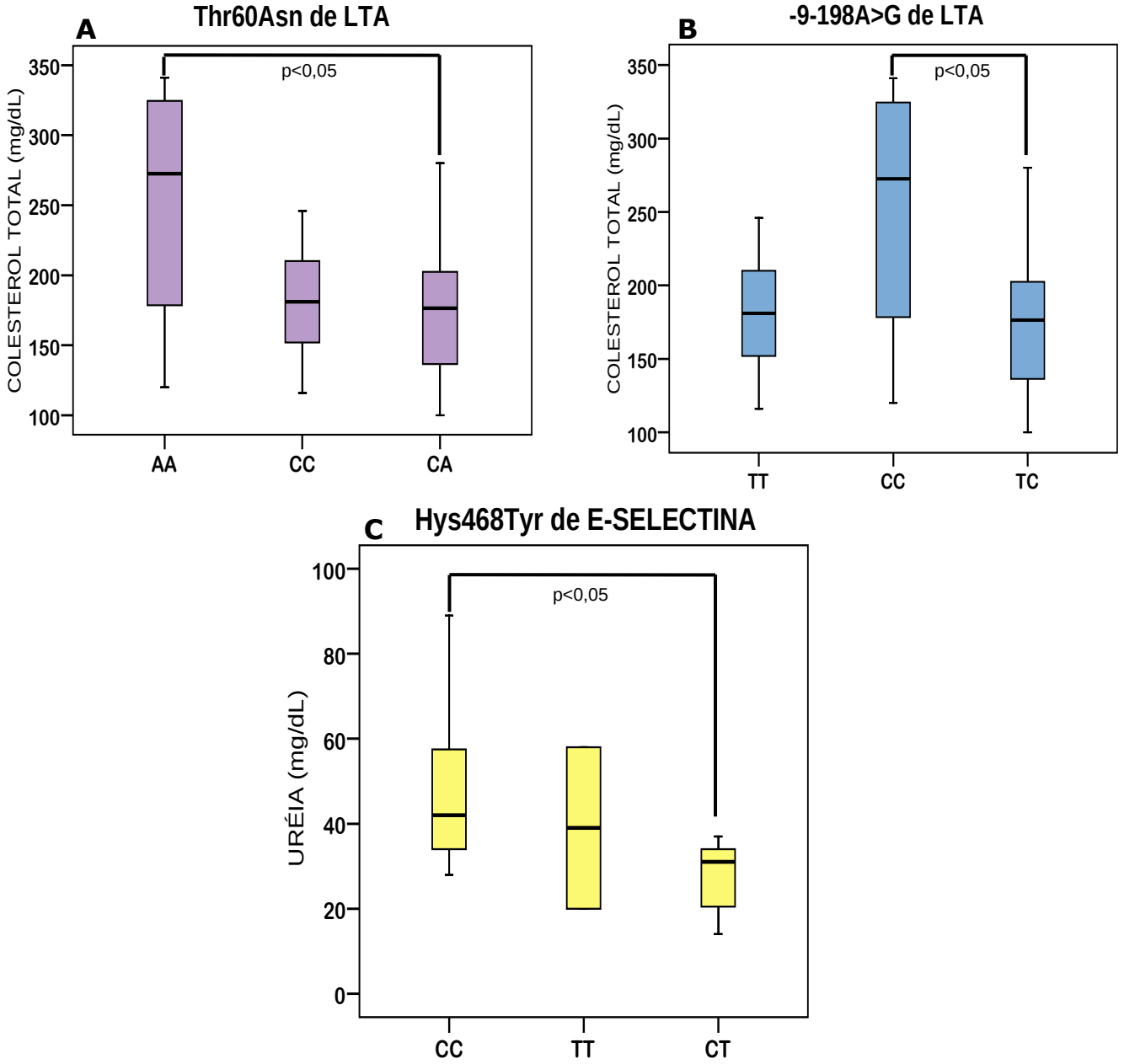


Figura 8 – Representação gráfica da variação dos valores séricos de colesterol total em relação ao genótipo para o polimorfismo Thr60Asn (A) e -9-198A>G (B) de LTα e de ureia para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA (C) do grupo IAM.

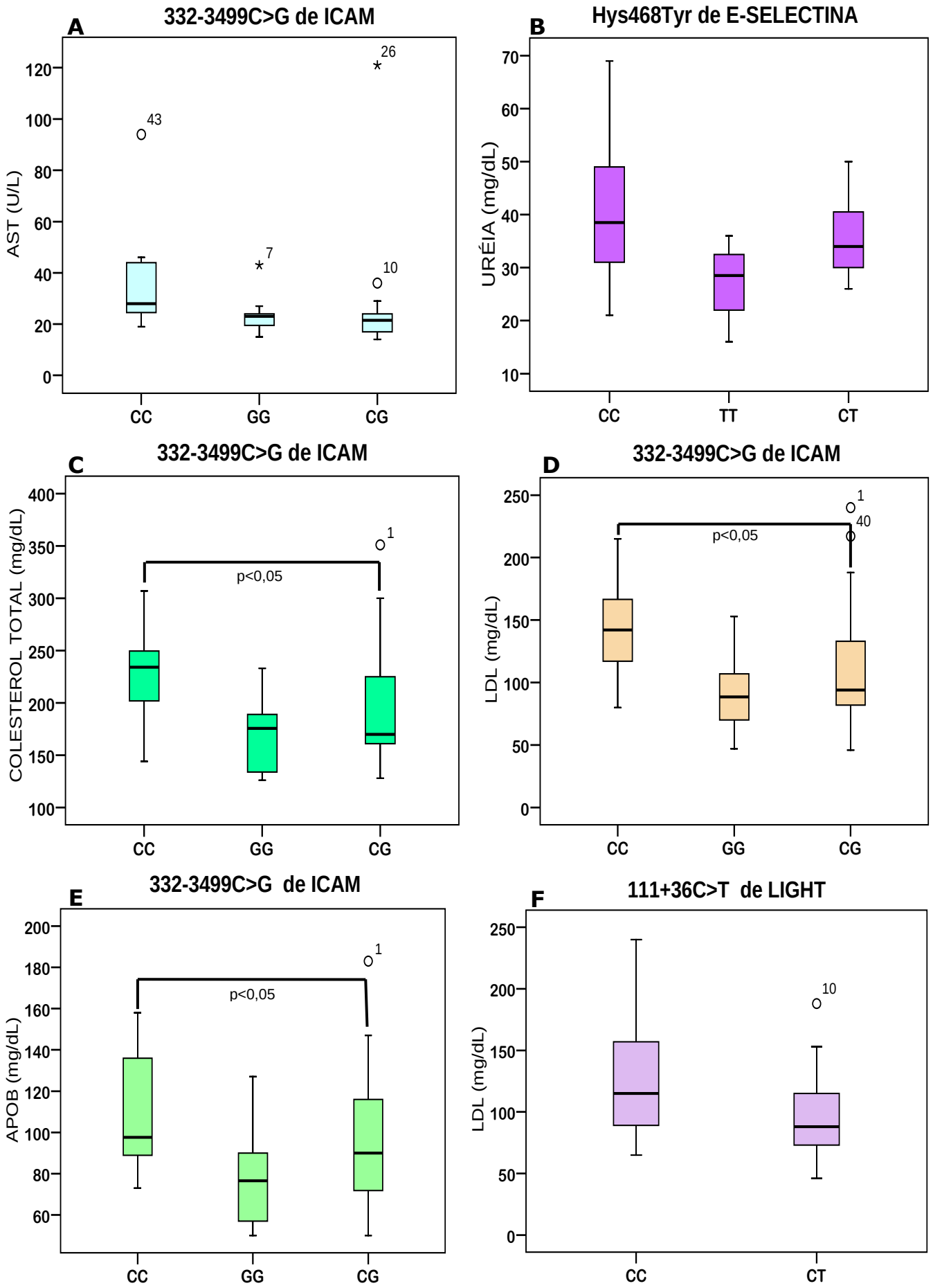


Figura 9 - Representação gráfica da variação dos valores séricos de AST em relação ao genótipo para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 (A), de ureia para o polimorfismo Hys468Tyr de E-SELECTINA (B), de colesterol total (C), LDL-c (D) e Apo B (E) para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 e de LDL-c para o polimorfismo 111+36C>T de LIGHT (F) do grupo SIAM. NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

4.6 EFEITO DOS POLIMORFISMOS NA EXPRESSÃO GÊNICA E DOSAGEM DAS FORMAS SOLÚVEIS NO SORO

Foi realizado o estudo de associação dos genótipos dos polimorfismos Lys178Glu e 111+36C>T de LIGHT, Gln279Arg de MMP9, -9-198A>G e Thr60Asn de LTα, 6+3279C>T de LGALS2, Asp693Asp de VCAM1, 332-3499C>G de ICAM1, Hys468Tyr de E-SELECTINA e 8+10029G>A de NFκB com a expressão gênica de LIGHT, MMP9, ICAM, VCAM, NFκB, LTα, LGALS2 e dosagem das formas solúveis no soro de MMP9, VCAM, ICAM e E-SELECTINA nos indivíduos dos grupos IAM e SIAM.

Os indivíduos do grupo SIAM portadores do genótipo GA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 apresentaram aumento da expressão de LGALS2 e NFκB quando comparados com os demais genótipos ($p<0,05$). Já os indivíduos, do mesmo grupo, portadores do genótipo AG para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB apresentaram aumento da expressão de LGALS2, NFκB e MMP9 quando comparado com os demais genótipos ($p<0,05$).

Houve um aumento da forma solúvel de MMP9 nos indivíduos do grupo SIAM portadores do genótipo GA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 quando comparado com os demais genótipos.

Na **figura 10** está representada a variação da expressão gênica de ICAM, NFκB, LGALS2 e LTα em relação aos genótipos dos polimorfismos 6+3279C>T de LGALS2, 8+10029G>A de NFκB e 332-3499C>G de ICAM1 e da variação das formas solúveis no soro de ICAM e E-SELECTINA em relação aos genótipos dos polimorfismos 332-3499C>G de ICAM1 e Lys178Glu de LIGHT nos indivíduos do grupo IAM.

Na **figura 11** está representada a variação da forma solúvel no soro de VCAM em relação ao genótipo para o polimorfismo Asp693Asp de VCAM1 nos indivíduos do grupo IAM e na **figura 12** está representada a variação da forma solúvel no soro de MMP9 em relação ao genótipo para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 nos indivíduos do grupo SIAM.

Indivíduos do grupo IAM, portadores do genótipo AA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2, apresentaram aumento da expressão de ICAM quando comparados com os demais genótipos. Já os indivíduos portadores do genótipo

AA para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB apresentaram aumento da expressão de NFκB quando comparados com os demais genótipos.

Os indivíduos do grupo IAM, portadores do genótipo CC apresentaram aumento da expressão de LGALS2 e os portadores do genótipo CG apresentaram aumento da expressão de LTα ambos para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1.

Houve um aumento da concentração da forma solúvel no soro de ICAM nos indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo GG para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 e de LTα para os portadores do genótipo GG para o polimorfismo Lys178Glu de LIGHT em relação aos demais genótipos.

A concentração da forma solúvel de VCAM1 estava aumentada em indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo CT para o polimorfismo Asp693Asp de VCAM1 em relação aos demais genótipos.

Não houve diferença estatística para os demais polimorfismos estudados

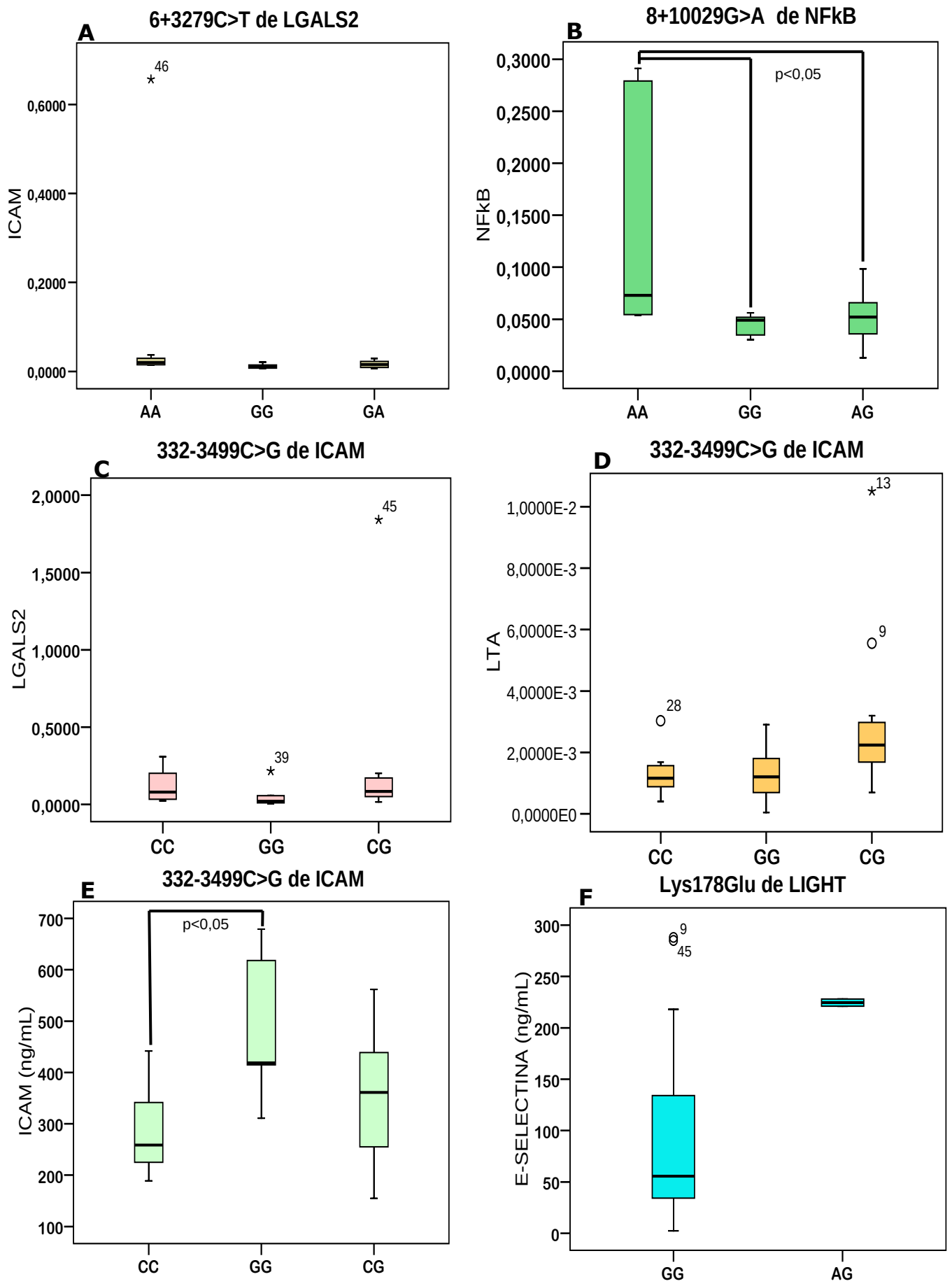


Figura 10 – Representação gráfica da variação da expressão gênica de ICAM em relação ao genótipo para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 (A), de NFκB para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB (B), de LGALS2 (C) e LTα (D) para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 e da variação das formas solúveis no soro de ICAM1 em relação ao genótipo para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 (E) e de E-SELECTINA para o polimorfismo Lys178Glu de LIGHT (F) para o grupo IAM. NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

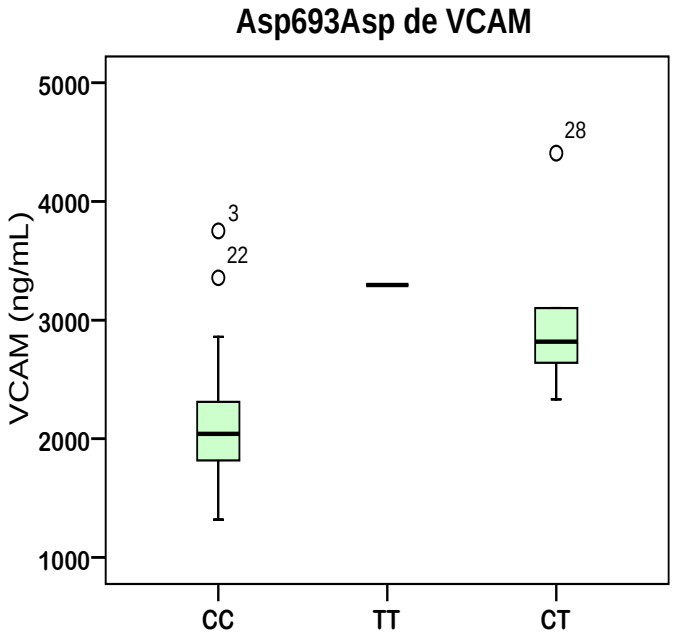


Figura 11 – Representação gráfica da variação da forma solúvel no soro de VCAM1 em relação ao genótipo para o polimorfismo Asp693Asp de VCAM1 do grupo IAM. NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

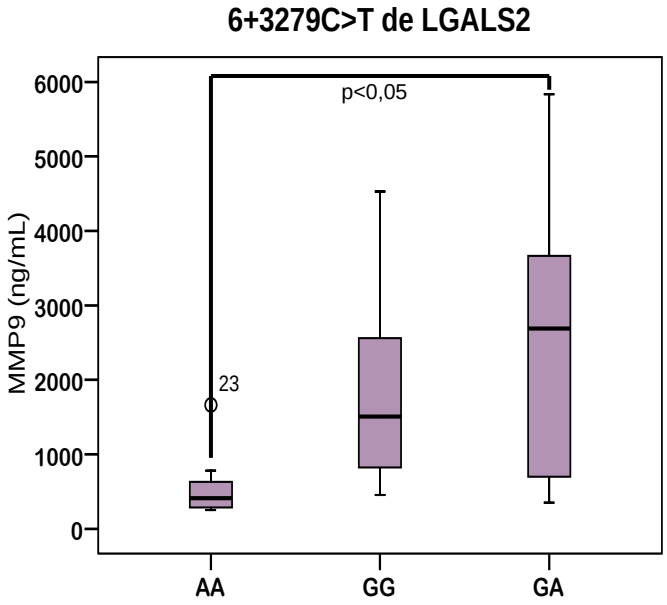


Figura 12 – Representação gráfica da variação da forma solúvel no soro de MMP9 em relação ao genótipo para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 do grupo SIAM. NOTA: * valores fora do intervalo inter-quartis; º valores extremos.

5 DISCUSSÃO

A busca por biomarcadores potencialmente úteis no diagnóstico precoce da SCA, bem como a compreensão dos mecanismos envolvidos na desestabilização da placa aterosclerótica e a resposta do organismo frente à lesão endotelial e do miocárdio são grandes desafios nas pesquisas em cardiologia (Silbiger, 2010).

Na tentativa de contribuir para o conhecimento de alguns mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença cardiovascular, este trabalho teve como objetivo avaliar os polimorfismos dos genes *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *MMP9* (rs17576), *LTα* (rs909253 e rs1041981), *LGALS2* (rs7291467), *VCAM1* (rs3176878), *ICAM1* (rs281432), *E-SELECTINA* (rs5368) e *NFκB* (rs17032705) juntamente com as formas solúveis no soro e expressão gênica dos mesmos em pacientes com infarto agudo do miocárdio, angina instável e indivíduos que foram submetidos á angiocoronariografia e que apresentaram ausência de processo ateromatoso significativo.

O número de total de indivíduos incluídos no estudo é pequeno porque se trata de um estudo clínico e depende do indivíduo apresentar determinada característica e aceitar participar do estudo com isso, houve uma dificuldade na seleção de voluntários para compor ambos os grupos.

Os indivíduos se auto declararam brancos, pardos, negros ou amarelos e houve uma maior prevalência de brancos nos dois grupos. O grupo étnico é um fator que proporciona diferentes taxas de risco de eventos cardiovasculares (Avezum, Piegas *et al.*, 2005).

O grupo IAM foi composto, em sua maioria, por homens e a média de idade deste grupo foi maior que a do grupo SIAM mostrando que doenças cardiovasculares ocorrem com maior frequencia em idade mais avançada e que indivíduos do sexo masculino tem maior probabilidade de desenvolver SCA (Nishiyama, Watanabe *et al.*, 2010).

Os indivíduos de ambos os grupos apresentaram fatores de risco clássicos (hipertensão, diabetes mellitus, obesidade, tabagismo, sedentarismo e consumo de álcool) para o desenvolvimento de doença aterosclerótica. A associação destes fatores aumenta consideravelmente o risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

A importância do tabagismo vem sendo demonstrada ao longo dos anos por uma série de evidências (Avezum, Piegas *et al.*, 2005) e, apesar do pequeno número de fumantes em ambos os grupos, vale ressaltar que o grupo de não fumantes é composto também por ex-fumantes. O risco de desenvolver doença cardiovascular em indivíduos que pararam de fumar a 2 anos ou menos, é semelhante ao de um fumante ou seja, muitos dos indivíduos não fumantes podem ter desenvolvido a doença por se encaixarem neste perfil (Merry, Boer *et al.*, 2011).

O consumo regular de álcool diminui o risco de desenvolver IAM e AI (Merry, Boer *et al.*, 2011). Por outro lado, o consumo excessivo do álcool é considerado fator de risco para o desenvolvimento de IAM, principalmente pela associação com aumento da pressão arterial (Lucas, Brown *et al.*, 2005; Kahkonen, Zvartau *et al.*, 2011). O consumo de álcool foi mínimo nos dois grupos.

A obesidade está associada com hipertrofia miocárdica (Avezum, Piegas *et al.*, 2005) e com aumento do risco de desenvolver SCA e o aumento do IMC é considerado um fator de risco independente para IAM (Kadakia, Fox *et al.*, 2011). Os indivíduos que compuseram os dois grupos, em sua maioria, não eram obesos (IMC>30kg/m^2) porém alguns estavam com sobrepeso (IMC 25 a 29kg/m^2) o que pode justificar o desenvolvimento da doença.

Na população geral, a pressão arterial aumenta progressivamente com a idade em homens e mulheres. A relação entre hipertensão e IAM pode ser explicada por dois fatores: (1) fatores de risco comuns entre as duas doenças como, por exemplo, polimorfismos no gene da ECA (enzima conversora de angiotensina) e no sistema renina-angiotensina-aldosterona responsáveis tanto pelo IAM quanto pela hipertensão e resistência a insulina. A hiperinsulinemia contribui para o desenvolvimento da aterosclerose e hipertensão e, (2) hipertensão associada com aterosclerose (Picariello, Lazzeri *et al.*, 2011).

O grupo IAM foi composto por 46 indivíduos hipertensos e 1 normotenso, totalizando os 47 indivíduos incluídos neste grupo. Esses dados confirmam o papel da hipertensão no desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica já que o aumento da pressão arterial leva ao desenvolvimento de placas vulneráveis a ruptura resultando em trombose e oclusão do vaso (Rembek, Goch *et al.*, 2010). Há uma maior prevalência de hipertensão em pacientes que tiveram IAM sem supra ST do que os que tiveram IAM com supra ST devido ao fato de

que geralmente esses indivíduos são mais velhos e apresentam outras comorbidades associadas (Picariello, Lazzeri *et al.*, 2011).

O número de diabéticos foi pequeno mas, a importância do diabetes no desenvolvimento do IAM, não pode ser descartada. O grupo IAM foi composto por mais diabéticos que o grupo SIAM. O risco de o indivíduo diabético desenvolver IAM é duas vezes maior que um não diabético e, esse risco aumenta em cerca de 3 vezes em mulheres (Avezum, Piegas *et al.*, 2005). A diabetes é uma desordem multissistêmica que engloba uma série de problemas como resistência a insulina, obesidade, dislipidemia, hipertensão, alterações na coagulação e progressão da aterosclerose (Khamaisi, Wainstein *et al.*, 2003).

O sedentarismo foi maior nos indivíduos do grupo SIAM do que no grupo IAM e, apesar da pouca atividade física o número de obesos é pequeno. Existe grande potencial para redução do risco para doença cardiovascular naqueles inicialmente sedentários e que se tornaram moderadamente ativos. Entretanto aqueles que permanecem sedentários apresentam risco mais alto para DAC como foi observado neste estudo.

A diabetes, hipertensão, tabagismo, consumo de álcool e obesidade são fatores de risco independentes para ocorrência de IAM.

Os valores glicêmicos foram semelhantes nos dois grupos sendo que o grupo IAM apresentou um leve aumento quando comparado com o SIAM. A hiperglicemia em pacientes com IAM é uma situação frequente e é responsável por complicações hospitalares em pacientes com ou sem diabetes (Góis, 2008; Ishihara, Kojima *et al.*, 2009). O risco de complicações hospitalares de pacientes não diabéticos ocorre com valores glicêmicos acima de 110mg/dL e em diabéticos acima de 180mg/dL (Góis, 2008; Ishihara, Kojima *et al.*, 2009). A hiperglicemia aumenta a mortalidade nos pacientes com SCA porque ocorre uma diminuição da circulação aumentando a área do infarto, aumento de ácidos graxos livres induzindo arritmias cardíacas, disfunção microvascular, estado pró-trombótico, inflamação vascular e disfunção endotelial (Góis, 2008).

O colesterol está presente nas células espumosas e na matriz extracelular das placas e, por ser susceptível á oxidação, torna-se mais aterogênico (Sacks, 2006). A concentração sérica do colesterol foi semelhante nos dois grupos não apresentando valores significativos.

Assim como o colesterol, a VLDL-c (composta por LDL pequenas e densas) e LDL-c não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, o que pode ser explicado pelo uso de hipolipemiantes. A LDL-c é uma das principais lipoproteínas aterogênicas (Imano, Noda *et al.*, 2011). Níveis de LDL-c elevados contribuem para a instabilidade da placa já, níveis mais baixos, causam efeito contrário (National Cholesterol Education Program (Ncep) Expert Panel on Detection, 2002).

Apolipoproteínas realizam o transporte de lipídeos e são consideradas uma medida direta de partículas pró-aterogênicas (Chien, Hsu *et al.*, 2007). A Apo B também não apresentou diferença estatística entre os grupos porém está fortemente associada com DAC porque cada molécula de Apo B reflete o número total de quilomicrons, VLDL-c e LDL-c circulantes (Chien, Hsu *et al.*, 2007).

As concentrações séricas do HDL-c e Apo A foram discretamente maiores no grupo SIAM quando comparado com o grupo IAM confirmando seu papel protetor. As propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do HDL-c inibem a aterogênese (National Cholesterol Education Program (Ncep) Expert Panel on Detection, 2002). O HDL-c também é produzido para diminuir os efeitos prejudiciais do LDL-c (Sacks, 2006). Níveis baixos de HDL-c podem induzir a aterosclerose, pois podem estar associados com aumento do triacilglicerol e do LDL-c dentre outros fatores considerados de risco para DAC.

Valores séricos de triacilglicerol elevados estão associados com fatores de risco para DAC como obesidade, sedentarismo, tabagismo, abuso de álcool, resistência á insulina, diabetes, valores baixos de HDL e aumento de LDL (National Cholesterol Education Program (Ncep) Expert Panel on Detection, 2002; Sacks, 2006). O triacilglicerol apresentou concentrações séricas semelhantes nos dois grupos o que também pode ser justificado pelo uso de hipolipemiantes. Vale ressaltar que boa parte dos indivíduos com IAM apresentaram fatores de risco associados com elevação do triacilglicerol.

Diferente do esperado, os valores séricos de ALT e AST foram semelhantes nos dois grupos. Para excluir a presença de doença hepática, foi realizada a razão AST/ALT e, todos apresentaram valores dentro dos padrões de referência normal (<2,0). Apesar deste perfil, existe uma associação entre atividade sérica dessas enzimas com a presença e gravidade da DAC (Masoudkabir, Karbalai *et al.*, 2011). Alterações nos valores séricos de ALT estão

associadas com disfunção endotelial e aterosclerose e de AST com a gravidade da doença (Masoudkabir, Karbalai *et al.*, 2011). A associação entre AST e ALT elevadas e DAC pode ser explicada pela relação dessas enzimas com a pressão arterial, dislipidemia e glicemia (Masoudkabir, Karbalai *et al.*, 2011).

Observa-se que o grupo IAM apresentou maiores concentrações de PCRus que o grupo SIAM caracterizando um perfil inflamatório mais acentuado, o que vem de acordo com a teoria de que o infarto agudo do miocárdio é uma doença inflamatória (Sabatine, Morrow *et al.*, 2007; Libby, Okamoto *et al.*, 2010; Hwang, Ha *et al.*, 2011). Nos pacientes com infarto agudo do miocárdio, concentrações mais elevadas de PCRus correlacionaram-se com maior extensão da área de necrose miocárdica (Pietila, Harmoinen *et al.*, 1993). A PCRus pode refletir a atividade de citocinas pró inflamatórias circulantes (Kettunen, Eklund *et al.*, 2011).

Assim como as enzimas hepáticas, a concentração sérica de ureia e creatinina foi não foi significativa entre os grupos. O grupo IAM apresentou valores, de ambas as enzimas, maiores que o grupo SIAM. Apesar do aumento da atividade sérica de ambas as enzimas, todos os indivíduos apresentaram valores dentro dos padrões de referência normal para pacientes com SCA. Esse perfil ocorre devido a presença de lesão miocárdica, o que eleva as concentrações séricas de creatinina e a hipertensão, diabetes e o IAM elevam a concentração de ureia.

Plaquetas são células anucleadas derivadas de megacariócitos e desempenham um papel significativo na resposta imune inata e adaptativa e nos eventos tromboembólicos gerados por lesões ateroscleróticas (Lindemann, Kraemer *et al.*, 2007; Filep, 2009; Romaniuk, Negrotto *et al.*, 2011). A adesão plaquetária á superfície endotelial ativa o recrutamento de monócitos no local da inflamação iniciando o processo aterosclerótico (Lindemann, Kraemer *et al.*, 2007). Houve um maior número de plaquetas em pacientes do grupo IAM em comparação com o grupo SIAM porém não houve diferença estatística. O número de plaquetas aumentado exerce um papel importante na patogênese das síndromes coronarianas agudas. A ruptura da placa aterosclerótica com exposição de componentes trombogênicos facilita a ativação e depósito de plaquetas no local, atuando como elemento fundamental na formação do trombo arterial responsável pela oclusão parcial ou total da coronária (Neto, 2011).

Houve um leve aumento no número de leucócitos no grupo IAM em relação ao grupo SIAM porém não houve diferença estatística entre os grupos. A associação do aumento do número de células do sangue periférico envolvidas na inflamação, como leucócitos, linfócitos e monócitos em indivíduos que tiveram IAM pode ser explicada pela capacidade que as citocinas e proteínas de fase aguda têm de ativar a diferenciação celular na medula óssea das células precursoras de leucócitos (Akatsu, Nakamura *et al.*, 2003; Boudjeltia, Brohee *et al.*, 2008; Sezer e Umman, 2008).

Acredita-se que os resultados encontrados para valores séricos de colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, triacilglicerol, Apo A e Apo B foram consequência do uso de hipolipemiantes pelos indivíduos dos dois grupos e, que os perfis hematológico e inflamatório não apresentaram diferenças devido ao uso de antiplaquetários e anti-inflamatórios pelos indivíduos do grupo IAM. Os medicamentos administrados são de uso padrão pelos médicos do pronto socorro do IDPC para indivíduos com SCA e, foram citados no item 3.1.1.

Os polimorfismos estudados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos não podendo ser associados com SCA na população selecionada neste estudo.

Ao realizar os cálculos da razão de chances (*odds ratio [OR]*) para o desenvolvimento de IAM em relação aos alelos dos polimorfismos estudados observou-se que para os polimorfismos Lys178Glu (alelo A OR=1,39 e alelo G OR=0,72) e 111+36C>T (alelo T OR=0,91 e alelo C OR=1,09) de LIGHT, -9-198A>G (alelo C OR=0,58 e alelo T OR=1,72) e Thr60Asn (alelo A OR=0,55 e alelo C OR=1,83) de LTα, Gln279Arg (alelo G OR= 0,61 e alelo A OR=1,62) de MMP9, 8+10029G>A (alelo A OR=0,73 e alelo G OR= 1,36) de NFκB, 6+3279C>T (alelo A OR=0,85 e alelo G OR= 1,18) de LGALS2 e Asp693Asp (alelo T OR= 0,70 e alelo C OR=1,44) de VCAM1 a distribuição dos alelos que oferecem um maior risco para IAM estavam de acordo com o calculo do OR, ou seja, os indivíduos do grupo IAM apresentaram maior frequência dos alelos considerados de risco quando comparado com o grupo SIAM.

Diferente destes, os polimorfismos Hys468Tyr (alelo T OR=1,20 e alelo C OR=0,83) de E-SELECTINA e 332-3499C>G (alelo C OR=0,75 e alelo G OR=1,33) de ICAM1 apresentaram maiores frequências para os alelos que oferecem menores riscos para IAM de acordo com o OR. Isso mostra que, nesta

população, os alelos considerados de menor risco na verdade aumentam o risco de IAM.

Ao associar os genótipos dos polimorfismos estudados com parâmetros bioquímicos foi possível observar a relação de alguns genótipos com o aumento dos níveis séricos de colesterol total, LDL-c Apo B, ureia e AST. O aumento dos lipides ocasionado por polimorfismos pode acelerar o desenvolvimento e progressão da aterosclerose já que são peças chave na resposta inflamatória e, o aumento de AST, por estar relacionado com a gravidade da doença pode piorar o quadro clínico do indivíduo.

A interação entre citocinas inflamatórias e células endoteliais é um passo crítico na aterogênese levando a disfunção endotelial e inflamação no local da lesão aterosclerótica promovendo o recrutamento de células inflamatórias adicionais na parede do vaso tornando a placa instável (Kim, Kang *et al.*, 2008; Sandberg, Halvorsen *et al.*, 2009).

LIGHT promove a aterogenese através da indução da atividade das metaloproteinases em macrófagos, expressão de moléculas de adesão, inflamação nas células endoteliais e formação de células espumosas através do acúmulo de LDL oxidada no local da lesão tornando a placa instável e, foi descoberto que LIGHT também regula a homeostase lipídica (Kim, Kang *et al.*, 2008; Sandberg, Halvorsen *et al.*, 2009). Estudos observaram que indivíduos com angina instável possuem níveis plasmáticos de LIGHT elevados e que este medeia á adesão de plaquetas nas células endoteliais induzindo atividade pró-inflamatória e pró-trombótica (Scholz, Sandberg *et al.*, 2005; Celik, Langer *et al.*, 2007).

Observou-se que as LDL-c encontram-se elevadas em indivíduos portadores do genótipo CC para o polimorfismo 111+36C>T de LIGHT mostrando seu papel na indução da resposta inflamatória através da atividade de LDL-c, indivíduos do grupo SIAM apresentaram aumento da expressão de LIGHT demonstrando seu papel na progressão da lesão aterosclerótica e portadores do genótipo AG para o polimorfismo Lys178Glu de LIGHT apresentaram aumento das formas solúveis de E-SELECTINA o que reflete a indução da expressão de moléculas de adesão por LIGHT durante a promoção da aterogenese.

LTα é uma citocina pró-inflamatória e está independentemente associada com IAM. LTα aumenta a expressão de várias citocinas como VCAM1 e E-

SELECTINA no endotélio vascular durante a resposta inflamatória e trombose. Ela é responsável pela adesão de monócitos nas células endoteliais, passo importante na progressão da doença aterosclerótica. (Li, Xu *et al.*, 2010; Liu, Sheng *et al.*, 2011). Estudos com ratos *knockout* para LTα observaram que ocorre uma diminuição do tamanho da lesão aterosclerótica nestes animais (Gao, Zhang *et al.*, 2010).

Neste estudo, os dois polimorfismos do gene da LTα apresentaram associação com o aumento do colesterol em indivíduos do grupo IAM, a expressão de LTα foi maior nos indivíduos do grupo SIAM apresentando diferenças estatísticas e demonstrando seu papel no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Houve um aumento da expressão de LTα em indivíduos do grupo IAM para os portadores do genótipo CG para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1 demonstrando relação com este gene. A expressão e/ou dosagem das formas solúveis de VCAM1 e E-SELECTINA não foram afetadas por polimorfismos da LTα.

A MMP9 é encontrada em pequenas quantidades no tecido aórtico normal, estando associada à inflamação crônica e a grandes quantidades de macrófagos (Thompson, Holmes *et al.*, 1995; Robertson, Grip *et al.*, 2007; Roggerio, 2008). Estudos recentes demonstraram associação da MMP9 no remodelamento cardíaco, instabilidade e ruptura da placa aterosclerótica (Sluijter, Pulskens *et al.*, 2006; Yan, Yan *et al.*, 2006).

Um estudo realizado pelo nosso grupo observou, em células do sangue periférico, que MMP9 apresentou expressão significativamente aumentada em pacientes com SCA em relação aos controles ($p<0,05$) (Silbiger, 2010). No presente estudo, houve um aumento da expressão de MMP9 no grupo SIAM quando comparado com o grupo IAM. A associação do gene da MMP9 com instabilidade da placa pode justificar o aumento da expressão neste grupo.

A concentração das formas solúveis no soro de MMP9, em pacientes do grupo SIAM com o genótipo GA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 estavam aumentadas quando comparadas com os demais genótipos e, a expressão de MMP9, neste mesmo grupo, estava aumentada em indivíduos portadores do genótipo AG para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB.

A adesão e migração de leucócitos para a camada íntima das artérias é, em parte, mediada pelas moléculas de adesão celular como resposta a diversas citocinas inflamatórias e é um passo importante na aterosclerose (Alwi, 2008).

ICAM1 é ativada por células endoteliais, leucócitos, fibroblastos e células musculares lisas, é expressa por células endoteliais, promove a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos e apresenta valores plasmáticos aumentados em pacientes com SCA (Alwi, 2008).

Neste estudo, ICAM1 apresentou um aumento da expressão nos pacientes com IAM, indivíduos do grupo IAM com genótipo AA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 apresentaram aumento da expressão de ICAM1 quando comparado com os demais genótipos, seus valores plasmáticos foram maiores no grupo SIAM e indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo GG para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM apresentaram aumento das formas solúveis deste gene.

VCAM1 é ativada por células endoteliais e células musculares lisas, se liga aos monócitos e linfócitos T ativados e, assim como ICAM1, seus valores plasmáticos são mais altos em indivíduos com SCA (Alwi, 2008).

VCAM1 apresentou aumento da expressão e das formas solúveis no soro nos indivíduos do grupo SIAM e indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo CT para o polimorfismo Asp693Asp de VCAM apresentaram aumento das formas solúveis deste gene.

E-SELECTINA é uma proteína expressa por células endoteliais e outros tipos celulares, promove a adesão célula-célula e está associada com disfunção endotelial e propensão ao IAM (Meredith, Plunkett *et al.*, 2005; Derhaschnig e Jilma, 2009).

Neste estudo a expressão de E-SELECTINA não foi realizada porque células mononucleares do sangue periférico não expressam este gene ou, se é expressa, as quantidades são tão pequenas que não são detectáveis. A forma solúvel de E-SELECTINA foi maior no grupo SIAM e indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo AG para o polimorfismo Lys178Glu de LIGHT apresentaram níveis elevados de E-SELECTINA no soro.

A LGALS2 modula a secreção de citocinas e adesão celular, codifica uma proteína envolvida na cascata da LTα e é expressa juntamente com a LTα na placa aterosclerótica (Mangino, Braund *et al.*, 2007; Li, Xu *et al.*, 2010).

Não foi encontrada nenhuma associação dos polimorfismos de LTα e LGALS2 no presente estudo. A expressão de LGALS2 foi maior nos indivíduos do grupo SIAM assim como a expressão de LTα. Indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo CC para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM apresentaram aumento da expressão de LGALS2 e indivíduos do grupo SIAM portadores do genótipo AG para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB e portadores do genótipo GA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 apresentaram aumento da expressão de LGALS2.

O NFκB regula genes envolvidos na resposta imune e inflamatória (Collins, Read *et al.*, 1995), desencadeia a transcrição de genes resultando na liberação e ativação de citocinas e moléculas de adesão (ex. ICAM1, VCAM1 e E-SELECTINA) (Collins e Cybulsky, 2001; Pare, Ridker *et al.*, 2011). A ativação da transcrição de NFκB está associada com o desenvolvimento de diversas doenças como asma, artrite, câncer, aterosclerose e diabetes (Santos, Resende *et al.*, 2010).

A expressão de NFκB estava aumentada nos indivíduos do grupo SIAM, indivíduos do grupo IAM portadores do genótipo AA para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB apresentaram aumento da expressão de NFκB e indivíduos do grupo SIAM portadores do genótipo GA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 e AG para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB apresentaram aumento da expressão de NFκB.

Após a seleção dos genes, foi realizado um estudo da relação destes com SCA e a relação entre os genes (Anexo B) através do software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (*Ingenuity® Systems*, Califórnia, EUA) que disponibiliza um vasto banco de dados de genes e proteínas que, de forma dinâmica, auxilia na visualização de suas associações gênicas e proteicas, com medicamentos, vias metabólicas, funções metabólicas e doenças já descritas na literatura científica e, foi observado que todos têm relação direta ou indireta entre si e, os achados neste estudo confirmam esta relação.

A maior associação entre os polimorfismos estudados com alterações da expressão gênica e dosagens das formas solúveis no soro ocorreu nos indivíduos do grupo IAM porém, o grupo SIAM apresentou maiores valores tanto para expressão gênica quanto para dosagens das formas solúveis mostrando que os

genes estudados bem como os polimorfismos têm relação com SCA apresentando maior atividade durante o desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica e após a ruptura da placa a atividade destes diminui consideravelmente podendo ajudar na recuperação do indivíduo.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo possui algumas limitações como número amostral pequeno o que pode ter diminuído a detecção de pequenas diferenças entre os grupos e o uso de medicamentos que podem interferir na expressão gênica e consequentemente nas concentrações das formas solúveis no plasma principalmente porque os genes estudados são inflamatórios e muitos dos medicamentos administrados em indivíduos com SCA possuem efeitos anti-inflamatórios e antitrombóticos.

7 CONCLUSÃO (alterada em 02/2012)

Não houve associação dos polimorfismos Lys178Glu e 111+36C>T de LIGHT, Gln279Arg de MMP9, -9-198A>G e Thr60Asn de LTα, 6+3279C>T de LGALS2, Asp693Asp de VCAM1, 332-3499C>G de ICAM1, Hys468Tyr de E-SELECTINA e 8+10029G>A de NFκB com síndrome coronariana aguda porém houve associação de alguns genótipos com alterações na expressão gênica, formas solúveis e parâmetros bioquímicos como o genótipo GA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 em relação a forma solúvel de MMP9, do genótipo AA para o polimorfismo 6+3279C>T de LGALS2 em relação á expressão de ICAM1, do genótipo AA para o polimorfismo 8+10029G>A de NFκB em relação á expressão de NFκB, do genótipo CC em relação a expressão de LGALS2, do genótipo CG em relação a expressão de LTα e do genótipo GG em relação a forma solúvel de ICAM1 ambos para o polimorfismo 332-3499C>G de ICAM1, do genótipo GG para o polimorfismo Lys178Glu de LIGHT em relação á forma solúvel de E-SELECTINA e do genótipo CT para o polimorfismo Asp693Asp de VCAM1 em relação a forma solúvel de VCAM1.

Foi encontrada associação da expressão de LTα com síndrome coronariana aguda porém o mesmo não ocorreu com os demais genes assim como com as formas solúveis no soro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(WHO), W. H. O. Global Database on Body Mass Index. Disponível em: < http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html >. Acesso em: 24 de maio.

_____. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consulation. Switzerland, 2006. Disponível em: < http://www.idf.org/webdata/docs/WHO_IDF_definition_diagnosis_of_diabetes.pdf >. Acesso em: 07 de maio.

AKATSU, T. et al. Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. Clinical Science, v. 105, n. 1, p. 39-44, Jul 2003. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184064200007 >.

ALWI, I. Serum adhesion molecule levels in acute coronary syndrome among indonesian patients. Acta Medica Indonesiana, v. 40, n. 3, p. 135-138, 2008.

ANDERSON, J. L.; ADAMS, C. D.; ANTMAN, E. A. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (writing committee to revise the 2002 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction) (vol 50, pg 1, 2007). Journal of the American College of Cardiology, v. 51, n. 9, p. 974-974, Mar 2008. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253649100019 >.

ASSELBERGS, F. W. et al. Effects of lymphotoxin-alpha gene and galectin-2 gene polymorphisms on inflammatory biomarkers, cellular adhesion molecules and risk of coronary heart disease. Clinical Science, v. 112, p. 291-298, 2007. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244811300003 >.

AVEZUM, Á.; PIEGAS, L. S.; PEREIRA, J. C. R. Fatores de Risco Associados com Infarto Agudo do Miocárdio na Região Metropolitana de São Paulo. Uma Região Desenvolvida em um País em Desenvolvimento. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 84, n. 3, p. 206 - 213, 2005.

BLANKENBERG, S. et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. Circulation, v. 107, n. 12, p. 1579-1585, Apr 1 2003. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181930500004 >.

BOUDJELTIA, K. Z. et al. Monocyte-platelet complexes on CD14/CD16 monocyte subsets: relationship with ApoA-I levels. A preliminary study. Cardiovascular Pathology, v. 17, n. 5, p. 285-288, Sep-Oct 2008. ISSN 1054-8807. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259390500001 >.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science, v. 109, n. 4, p. 365-379, Oct 2005. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232567400003 >.

CELIK, S. et al. Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. Thrombosis and Haemostasis, v. 98, p. 798-805, 2007. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250137300016 >.

CHIEN, K. L. et al. Apolipoprotein B and non-high density lipoprotein cholesterol and the risk of coronary heart disease in Chinese. Journal of Lipid Research, v. 48, n. 11, p. 2499-2505, Nov 2007. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250148500018 >.

COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? Journal of Clinical Investigation, v. 107, n. 3, p. 255-264, Feb 2001. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166840000003 >.

COLLINS, T. et al. TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF ENDOTHELIAL-CELL ADHESION MOLECULES - NF-KAPPA-B AND CYTOKINE-INDUCIBLE ENHANCERS. Faseb Journal, v. 9, n. 10, p. 899-909, Jul 1995. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RK89900011 >.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS). Disponível em: < http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php >. Acesso em: 13 de maio.

DEL RIO, M. L. et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. Journal of Leukocyte Biology, v. 87, n. 2, p. 223-235, 2010. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274208500006 >.

DERHASCHNIG, U.; JILMA, B. Assessment of platelets and the endothelium in patients presenting with acute coronary syndromes - is there a future? Thrombosis and Haemostasis, v. 102, n. 6, p. 1144-1148, Dec 2009. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272973700018 >.

DOS SANTOS, E. S. et al. Acute coronary syndrome registry at a cardiology emergency center. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 87, n. 5, p. 544-549, 2006.

ERLICHMANN, M. R.; CARVALHO, A. C. C. Diretrizes para a terapia farmacológica nas síndromes coronarianas agudas. In: FONSECA, F. A. H. (Ed.). Doenças Cardiovasculares - Terapêutica Clínica. São Paulo: Planmark, v.2, 2007. cap. 11,

FILEP, J. G. Platelets Affect the Structure and Function of C-Reactive Protein. Circulation Research, v. 105, n. 2, p. 109-111, Jul 17 2009. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268050900001 >.

FILHO, W. S. et al. Intracoronary Inflammatory Markers after Percutaneous Coronary Interventions. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 85, n. 3, p. 180-185, Sep 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2005001600006&lng=en&nrm=iso&tlng=en >.

FRIEDEWA.WT; FREDRICK.DS; LEVY, R. I. ESTIMATION OF CONCENTRATION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN PLASMA, WITHOUT USE OF PREPARATIVE ULTRACENTRIFUGE. Clinical Chemistry, v. 18, n. 6, p. 499-&, 1972. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1972M604800001 >.

GAO, H. X. et al. Association of LT-alpha Ala252Gly gene polymorphism and the genetic predisposition of coronary heart disease in Chinese. Molecular Biology Reports, v. 37, n. 1, p. 47-50, 2010. ISSN 0301-4851. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273319000008 >.

GÓIS, A. F. T. D. Glicemia no Prognóstico da Síndrome Coronariana Aguda. Arquivos Brasileiros Endrocrinologia e Metabologia, v. 52, n. 3, p. 429-430, 2008. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302008000300002 >.

HANSSON, G. K. Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. New England Journal of Medicine, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, Apr 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228515200010 >.

HOFFMANN, R. A wiki for the life sciences where authorship matters. Nature Genetics, v. 40, n. 9, p. 1047-1051, Sep 2008. ISSN 1061-4036. Disponível em: < http://www.wikigenes.org >.

HWANG, H. J. et al. Relation of inflammation and left atrial remodeling in atrial fibrillation occurring in early phase of acute myocardial infarction. International Journal of Cardiology, v. 146, n. 1, p. 28-31, Jan 7 2011. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285779700013 >.

IMANO, H. et al. Low-density lipoprotein cholesterol and risk of coronary heart disease among Japanese men and women: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). Preventive Medicine, v. 52, n. 5, p. 381-386, May 1 2011. ISSN 0091-7435. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290062000017 >.

ISHIHARA, M. et al. Comparison of Blood Glucose Values on Admission for Acute Myocardial Infarction in Patients With Versus Without Diabetes Mellitus. American Journal of Cardiology, v. 104, n. 6, p. 769-774, Sep 15 2009. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269981300005 >.

JAN, M. et al. Inflammatory and Autoimmune Reactions in Atherosclerosis and Vaccine Design Informatics. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010. ISSN 1110-7243. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277797100001 >.

JIANG, H. et al. C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. International Journal of Cardiology, v. 84, n. 2-3, p. 171-177, 2002. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177321600008 >.

JÚNIOR, D. M. IV Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2006.

KADAKIA, M. B. et al. Central obesity and cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome: observations from the MERLIN-TIMI 36 trial. Heart, v. 97, n. 21, p. 1782-1787, Nov 2011. ISSN 1355-6037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295612600013 >.

KAHKONEN, S. et al. Effects of alcohol withdrawal on cardiovascular system. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 35, n. 2, p. 550-553, Mar 2011. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289811200035 >.

KETTUNEN, T. et al. Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, v. 71, n. 5, p. 353-361, Sep 2011. ISSN 0036-5513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293743200001 >.

KHAMAISI, M. et al. Association of hyperglycemia and insulin with diabetic cardiovascular complications. Israel Medical Association Journal, v. 5, n. 2, p. 116-119, Feb 2003. ISSN 1565-1088. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182575200010 >.

KIM, W. J. et al. Comparative analysis of the expression patterns of various TNFSF/TNFRSF in atherosclerotic plaques. Immunological Investigations, v. 37, n. 4, p. 359-373, 2008. ISSN 0882-0139. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256312100006 >.

LI, W. et al. Lack of association between lymphotoxin-alpha, galectin-2 polymorphisms and coronary artery disease: A meta-analysis. Atherosclerosis, v. 208, n. 2, p. 433-436, Feb 2010. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273989200024 >.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179897300068 >.

LIBBY, P. et al. Inflammation in Atherosclerosis: Transition From Theory to Practice. Circulation Journal, v. 74, n. 2, p. 213-220, Feb 2010. ISSN 1346-9843. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274099300001 >.

LINDEMANN, S. et al. Platelets, inflammation and atherosclerosis. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 5, p. 203-211, Jul 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247890900029 >.

LIU, G. Z. et al. Enhanced plasma levels of LIGHT in patients with acute atherothrombotic stroke. Acta Neurologica Scandinavica, v. 118, n. 4, p. 256-259, 2008. ISSN 0001-6314. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258970000008 >.

LIU, Y. et al. Haplotype-Based Association of Four Lymphotoxin-Alpha Gene Polymorphisms with the Risk of Coronary Artery Disease in Han Chinese. Tohoku Journal of Experimental Medicine, v. 224, n. 2, p. 119-125, Jun 2011. ISSN 0040-8727. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291515800007 >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173949500003 >.

LU, H.-H. et al. Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis. Chinese Medical Journal, v. 123, n. 21, p. 3123-3126, Nov 5 2010. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284387200031 >.

LUCAS, D. L. et al. Alcohol and the cardiovascular system - Research challenges and opportunities. Journal of the American College of Cardiology, v. 45, n. 12, p. 1916-1924, Jun 2005. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229848500002 >.

MACIAS, C. et al. Endothelial adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and e-selectin in patients with acute coronary syndrome. Revista Espanola De Cardiologia, v. 56, n. 2, p. 137-144, 2003. ISSN 0300-8932. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181281100005 >.

MANGINO, M. et al. LGALS2 functional variant rs7291467 is not associated with susceptibility to myocardial infarction in Caucasians. Atherosclerosis, v. 194, n. 1, p. 112-115, Sep 2007. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250738300009 >.

MASOUDKABIR, F. et al. The Association of Liver Transaminase Activity With Presence and Severity of Premature Coronary Artery Disease. Angiology, v. 62, n. 8, p. 614-619, Nov 2011. ISSN 0003-3197. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295729600005 >.

MEREDITH, I. T. et al. Systemic inflammatory markers in acute coronary syndrome: association with cardiovascular risk factors and effect of early lipid lowering. Coronary Artery Disease, v. 16, n. 7, p. 415-422, Nov 2005. ISSN 0954-6928. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232945000001 >.

MERRY, A. H. H. et al. Smoking, alcohol consumption, physical activity, and family history and the risks of acute myocardial infarction and unstable angina

pectoris: a prospective cohort study. Bmc Cardiovascular Disorders, v. 11, Mar 2011. ISSN 1471-2261. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289344700001 >.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) EXPERT PANEL ON DETECTION, E., AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS (ADULT TREATMENT PANEL III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation, v. 106, n. 25, p. 3143-3421, 2002.

NETO, L. G. L. Participação da resposta inflamatória induzida por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* no infarto agudo do miocárdio. 2011. (Doutor). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

NISHIYAMA, S. et al. Trends in Coronary Risk Factors Among Patients with Acute Myocardial Infarction Over the Last Decade: The Yamagata AMI Registry. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, v. 17, n. 9, p. 989-998, 2010. ISSN 1340-3478. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282824600011 >.

ORR, A. W. et al. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappa B activation by flow: a potential role in atherosclerosis. Journal of Cell Biology, v. 169, p. 191-202, 2005. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228327500017 >.

PARE, G. et al. Genome-Wide Association Analysis of Soluble ICAM-1 Concentration Reveals Novel Associations at the NFKBIK, PNPLA3, RELA, and SH2B3 Loci. Plos Genetics, v. 7, n. 4, Apr 2011. ISSN 1553-7390. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289977000022 >.

PICARIELLO, C. et al. The Impact of Hypertension on Patients with Acute Coronary Syndromes. International Journal of Hypertension, v. 2011, n. 2011, p. 1-7, 2011.

PIEGAS, L. S. IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009.

PIETILA, K. et al. SERUM C-REACTIVE PROTEIN AND INFARCT SIZE IN MYOCARDIAL INFARCT PATIENTS WITH A CLOSED VERSUS AN OPEN INFARCT-RELATED CORONARY-ARTERY AFTER THROMBOLYTIC THERAPY. European Heart Journal, v. 14, n. 7, p. 915-919, Jul 1993. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LN93900009 >.

REMBEK, M.; GOCH, A.; GOCH, J. The clinical course of acute ST-elevation myocardial infarction in patients with hypertension. Kardiologia Polska, v. 68, n. 2, p. 157-163, Feb 2010. ISSN 0022-9032. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276571800008 >.

ROBERTSON, L. et al. Release of protein as well as activity of MMP-9 from unstable atherosclerotic plaques during percutaneous coronary intervention. Journal of Internal Medicine, v. 262, n. 6, p. 659-667, Dec 2007. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251027100007 >.

ROGGERIO, A. Expressão aumentada dos antígenos de MMP-9, PPARA, *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumonia*e em fragmentos ateroscleróticos de aorta com aneurisma. 2008. (Doutor). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ROMANIUK, M. A. et al. Identification of Galectins as Novel Regulators of Platelet Signaling and Function. Iubmb Life, v. 63, n. 7, p. 521-527, Jul 2011. ISSN 1521-6543. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292944000010 >.

ROWSELL, S. et al. Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. Journal of Molecular Biology, v. 319, n. 1, p. 173-181, May 24 2002. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000176042700014 >.

SABATINE, M. S. et al. Prognostic significance of the Centers for Disease Control/American Heart Association high-sensitivity C-reactive protein cut points for cardiovascular and other outcomes in patients with stable coronary artery disease. Circulation, v. 115, n. 12, p. 1528-1536, Mar 27 2007. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245211300005 >.

SACKS, F. M. The apolipoprotein story. Atherosclerosis Supplements, v. 7, n. 4, p. 23-27, Aug 2006. ISSN 1567-5688. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240389600005 >.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPAIO, M. F. Função endotelial em adultos jovens com infarto do miocárdio. Influências ambientais e genéticas. 2005. (Tese de doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANDBERG, W. J. et al. Inflammatory Interaction Between LIGHT and Proteinase-Activated Receptor-2 in Endothelial Cells Potential Role in Atherogenesis. Circulation Research, v. 104, n. 1, p. 60-U192, 2009. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262201800011 >.

SANTOS, D. G. B. et al. Factor (NF) kappa B polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure. Bmc Medical Genetics, v. 11, Jun 9 2010. ISSN 1471-2350. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279920600005 >.

SCHOLZ, H. et al. Enhanced plasma levels of LIGHT in unstable angina possible pathogenic role in foam cell formation and thrombosis. Circulation, v. 112, n. 14, p. 2121-2129, 2005. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232288700009 >.

SEZER, M.; UMMAN, S. Role of leucocytes in microvascular malperfusion in reperfused acute myocardial infarction. Anadolu Kardiyoloji Dergisi-the Anatolian Journal of Cardiology, v. 8, n. 1, p. 48-50, Feb 2008. ISSN 1302-8723. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254244400012 >.

SILBIGER, V. N. Transcriptoma e proteoma em sangue periférico na busca de novos marcadores de doenças cardiovasculares 2010. (Doutor). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, M. A. D. D.; SOUSA, A. G. M. R.; SCHARGODSK, H. Fatores de risco para infarto do miocárdio no Brasil. Estudo FRICAS. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 71, n. 5, p. 667 - 675, 1998.

SINGH, V. et al. Cardiac biomarkers - the old and the new: a review. Coronary Artery Disease, v. 21, n. 4, p. 244-256, 2010. ISSN 0954-6928. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279667900007 >.

SLUIJTER, J. P. G. et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions - A study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. Stroke, v. 37, n. 1, p. 235-239, Jan 2006. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234148500048 >.

SOUSA, J. M. A.; KNOBEL, M.; KNOBEL, E. Fisiopatologia das Síndromes Coronarianas Agudas. In: FONSECA, F. A. H. (Ed.). Doenças Cardiovasculares - Terapêutica Clínica. São Paulo: Planmark, v.2, 2007. cap. 11.1,

SUNDSTROM, J. et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures - The Framingham Heart Study. Circulation, v. 109, n. 23, p. 2850-2856, Jun 15 2004. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222024900006 >.

TANAKA, T.; OZAKI, K. Inflammation as a risk factor for myocardial infarction. Journal of Human Genetics, v. 51, n. 7, p. 595-604, 2006 2006. ISSN 1434-5161. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239168200003 >.

THOMPSON, R. W. et al. PRODUCTION AND LOCALIZATION OF 92-KILODALTON GELATINASE IN ABDOMINAL AORTIC-ANEURYSMS - AN ELASTOLYTIC METALLOPROTEINASE EXPRESSED BY ANEURYSM-INFILTRATING MACROPHAGES. Journal of Clinical Investigation, v. 96, n. 1, p. 318-326, Jul 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RH89400040 >.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D. Universal definition of myocardial infarction. Journal of the American College of Cardiology, v. 50, p. 2173-2195, 2007. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251281900015 >.

WANG, Z. G. et al. E-selectin gene polymorphisms are associated with essential hypertension: a case-control pilot study in a Chinese population. Bmc Medical

Genetics, v. 11, 2010. ISSN 1471-2350. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283195400001 >.

YAN, A. T. et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. Journal of Cardiac Failure, v. 12, n. 7, p. 514-519, Sep 2006. ISSN 1071-9164. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240708700004 >.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Polimorfismos dos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA E NFκB podem estar associados com doença arterial coronariana"

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

NOME DO VOLUNTÁRIO _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO _____/_____/_____

ENDEREÇO _____ Nº_____ APTO_____

BAIRRO_____ CIDADE _____

CEP _____ TELEFONES _____

Prezado(a) Voluntário(a),

Meu nome é Mario Hiroyuki Hirata, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e estou convidando você para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos do Setor de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e com a colaboração de outros pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e amostras de sangue que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico ou no Pronto Socorro do IDPC. O risco à saúde será mínimo e a coleta de sangue pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Nesta pesquisa, além dos exames de sangue (glicemia, colesterol total + frações, triglicérides, apolipoproteína A e B, hemograma completo, T_4, TSH, uréia, creatinina, ácido úrico,

AST, ALT e proteína C reativa), vamos fazer testes de DNA (testes genéticos) e associar com proteínas presentes sangue com a expressão gênica dos mesmos nas células do sangue para estudar algumas alterações que podem estar relacionadas com aterosclerose (placas de gordura no sangue). Para este procedimento, serão coletados aproximadamente 41ml de sangue

A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico (LBMAD) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a sua identificação. Se, futuramente, outro pesquisador for utilizar sua amostra, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, alguém entrará em contato com você para solicitar autorização.

Os resultados obtidos durante a pesquisa serão **confidenciais** e somente serão revelados a terceiros com sua autorização. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desta pesquisa forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo e, caso se interesse, você terá acesso aos resultados dos testes genéticos no final da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária portanto, não receberá qualquer pagamento por sua participação. Por quaisquer motivos, independente de seu consentimento, os membros da equipe podem encerrar sua participação no estudo devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outra complicação, devido ao cancelamento do estudo pela coordenação do mesmo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou por outras questões administrativas. Caso isso ocorra um dos pesquisadores entrará em contato e lhe explicará o motivo da exclusão.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Hospital Dante

Pazzanese não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do LBMAD da FCF/USP.

Não há beneficio direto aos participantes da pesquisa, porém os resultados deste estudo vão ajudar para uma melhor conduta terapêutica no caso de infarto agudo do miocárdio.

Em caso de dúvida ou desistência, você poderá entrar em contato com os pesquisadores: Débora Cavichioli (telefone: 6745-2794), Simone Sorkin Arazi (telefone: 5085-6086) ou Mário Hiroyuki Hirata (telefone: 3091-3660) a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20 ____.

_____
Assinatura do voluntário(a)

_____
Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? Sim ☐ Não ☐
Você quer saber os resultados dos testes genéticos? Sim ☐ Não ☐

****

Comitê de Ética do IDPC
Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera, CEP: 04012-180, São Paulo, SP
Telefones: 5085-4000

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária
CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: 3091-3677

APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

Data: ……/……/……

Nome: ……

Data de Nascimento: ……/……/…… Paciente nº: ……

Sexo: …… Registro nº: ……

Menopausa: Pré ( ) Pós ( ) **Raça:** Branca ( ) Parda ( ) Negra ( ) Amarela ( )

Cigarro: Nunca fumou ( ) Parou de fumar ( ) Fuma ( ) Nº de cigarros/dia: ……

Tempo: …… Tempo: ……

Consumo de bebida Alcoólica: Não ( ) Sim ( ) Até 7 doses/sem ( ) Mais de 7 doses/sem ( )

Possui: Diabetes ( ) Hipertensão ( )

Medicamento: …… Medicamento: ……

Hipercolesterolemia ( )

Medicamento: ……

Medidas: Peso ……Kg Altura …… Pressão arterial ……mmHg IMC ……

Profissão: …… **Há exigência de esforço físico?** Sim ( ) Não ( )

Pratica exercícios físicos? Não ( ) Sim ( ) Frequência: ……

Toma outros medicamentos além dos citados acima? Sim ( ) Não ( )

Qual(is)/Dosagem: ……

Histórico Familiar: Diabetes ( ) - **P**ai ( ) **M**ãe ( ) Irmãos ( ) Hipertensão ( ) - **P**( ) **M**( ) **I**( )

Hipercolesterolemia ( ) - **P**( ) **M**( ) **I**( ) Obesidade ( ) - **P**( ) **M**( ) I( ) DAC ( ) - **P**( ) **M**( ) I( )

Grupo: Estudo ( ) Controle ( )

ANEXOS

ANEXO A – CÓPIA DO AVAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCF-USP E DO IDPC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/159/2009
Protocolo CEP/FCF/532
CAAE: 0069.0.31.018-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	**Polimorfismos dos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-selectina e NFκB podem estar associados com doença arterial coronariana**
Pesquisador Responsável:	**Prof. Mário H. Hirata**
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Área Temática Especial:	Genética Humana
Patrocinadores:	Foi solicitado recurso a FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:
O processo de lesão endotelial causa aumento na expressão e produção de citocinas pré e pós-inflamatórias como linfotoxinas, moléculas de adesão vascular intercelular e endotelial, assim como as metaloproteinases que estão envolvidas na gênese da aterosclerose. O objetivo da presente pesquisa será um estudo caso-controle em um grupo de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM e outro grupo sem evidências de doença arterial coronariana (DAC) com a avaliação de alguns polimorfismos de base única (SNPs) dos genes LIGHT (rs344560 e rs2291668), MMP9 (rs17576), LTα (rs909253 e rs1041981), LGALS2 (rs7291467), VCAM1 (rs3176878), ICAM1 (rs281432), E-SELECTINA (rs5368) e NFκB (rs17032705) como fatores genéticos predisponentes da ocorrência de aterosclerose precoce. A expressão gênica e os polimorfismos serão realizados pela PCR em tempo real das células sanguíneas periféricas. Este estudo poderá propor algumas prováveis vias de ativação de sistemas inflamatórios que estão relacionados com o sistema LIGHT que podem estar associados com o aumento da susceptibilidade a aterosclerose precoce, pois pouco se tem descrito sobre seus efeitos in vivo.
Os objetivos do presente estudo são:
Objetivos Gerais: Estudar a expressão gênica em células mononucleares de sangue periférico e a influência dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) presentes nos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFκB em pacientes que sofreram IAM.
Objetivos Específicos: 1- Determinar a freqüência alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *MMP9* (rs17576), *LTα* (rs909253 e rs1041981), *LGALS2* (rs7291467), *VCAM1* (rs3176878), *ICAM1* (rs281432), *E-selectina* (rs5368) e *NFκB* (rs17032705) em pacientes que sofreram IAM e em pacientes sem evidências de doença arterial coronariana (controle); Relacionar a presença dos principais SNPs dos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFκB com alguns fatores de risco para o desenvolvimento de doença coronária; 2- Verificar a expressão dos genes LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFκB nas células periféricas de pacientes com IAM; 3- Associar as formas solúveis no plasma de LIGHT, MMP9, LTα, LGALS2, VCAM1, ICAM1 e E-SELECTINA com a expressão gênica e os polimorfismos nas células mononucleares do sangue periférico.
Tipo de estudo: caso-controle
Descrição da Casuística:

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 – Fax (11) 3091-3677- e-mail: cepfcf@usp.br

Serão selecionados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo (IDPC), por médicos do Pronto Socorro, 173 pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 40 e 70 anos, que apresentam infarto agudo do miocárdio (IAM) em até 48h (fase aguda). O diagnóstico de IAM será estabelecido somente quando os três critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1959 estiverem presentes simultaneamente: a) clínicos: relato de dor, de localização torácica anterior, em aperto, peso ou queimação, com duração superior a 20 minutos; b) eletrocardiográficos, supradesnivelamento do segmento ST ≥ 1mm a 0,02 segundos após o ponto J e que evolui para formação de onda Q (infarto Q) patológica (duração > 0,03s e amplitude > 3mm), ou infra desnivelamento do segmento ST e/ou alterações das ondas T que não evoluem para formação de ondas Q patológicas (infarto não Q). Estas alterações eletrocardiográficas devem estar presentes em pelo menos duas derivações contíguas do eletrocardiograma convencional, incluindo V7 e V8; c) critérios enzimáticos: valores elevados (pelo menos o dobro do valor de referência) da enzima creatinofosfoquinase fração miocárdica, CKMB. Esses pacientes serão reconvocados após 3 meses (fase crônica) para nova análise.

O grupo controle será composto por 519 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 40 e 70 anos, que não apresentem evidências de doença clínica atual ou histórico de DAC. Esta doença será afastada por um teste ergométrico considerado totalmente dentro da normalidade.

Os critérios de Exclusão do projeto são:

Serão excluídos do estudo os pacientes que apresentarem quaisquer das seguintes condições: artéria recanalizada com angioplastia e/ou *stent,* com doenças clinicamente relevantes (neoplasias, doenças neurológicas, insuficiência hepática ou renal crônica e distúrbio endócrino), com história de abuso de álcool ou droga; portador de doença auto-imune e com qualquer condição mental que torne o paciente incapaz de entender a natureza do estudo. Para a determinação dessas condições, além do questionário aplicado ao paciente, serão realizados os seguintes testes de triagem: glicemia, colesterol total + frações, triglicérides, apolipoproteína A e B (apo A e apo B), hemograma completo, T4, TSH, uréia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT e proteína C reativa (PCR) seguindo orientações do fabricante Dade Behring (Dimension RXL).

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 30/11/2009.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
  - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
  - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 30 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 – Fax (11) 3091-3677- e-mail: cepfcf@usp.br

DATA DA ENTRADA: 30 de setembro de 2009.

DATA DA 1ª AVALIAÇÃO: 06 de outubro de 2009.

DATA DA AVALIAÇÃO FINAL: 03 de novembro de 2009.

CAAE: 0069.0.131.000-09

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 3836

(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Investigador: Mario Hiroyuki Hirata

Nº de Sujeitos no Centro: 692

Nº de Sujeitos no Brasil: 692

Nº de Sujeitos Total: 692

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia – Diag.

Área Temática Especial: Genética Humana

Fase: Não se aplica

Duração do Estudo: 3 anos

Patrocinador: Não se aplica

Pesquisa Vinculada: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Grupo: II

Projeto de Pesquisa: "Polimorfismos dos genes LIGHT, MMP9, LTa, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFkB podem estar associados com doença arterial coronariana".

Considerações/Comentários: Este estudo tem como objetivo estudar a expressão gênica em células mononucleares de sangue periférico e a influência dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) presentes nos genes LIGHT, MMP9, LTa, LGALS2, VCAM1, ICAM1, E-SELECTINA e NFkB em pacientes que sofrem IAM.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que:

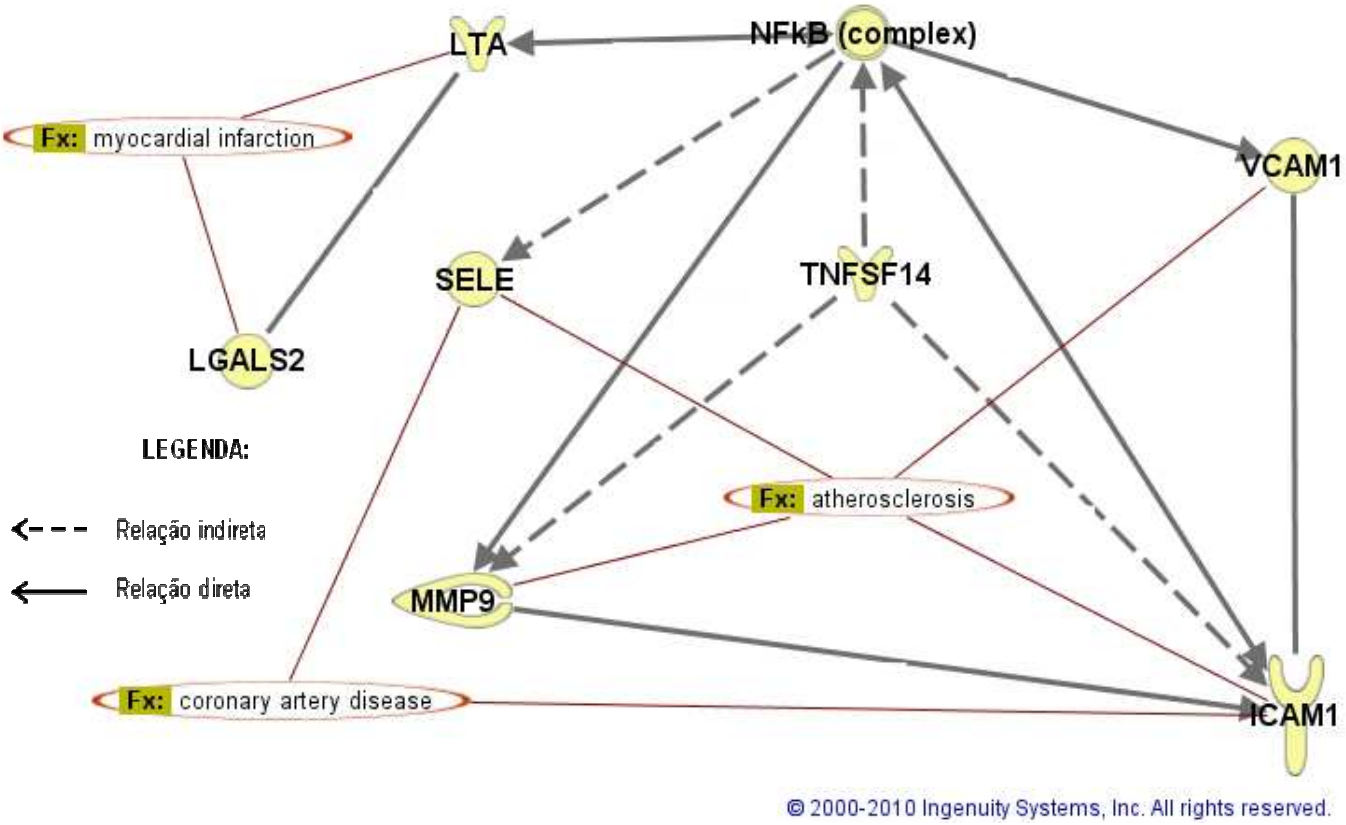
a. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido
b. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.
c. Elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parcial e final sobre a pesquisa.

Situação: Protocolo Avaliado Aprovado em Reunião Ordinária no dia 03 de novembro de 2009.

São Paulo, 03 de novembro de 2009.

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

ANEXO B – DESENHO GERADO PELO SOFTWARE INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS



ANEXO B – FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6710100/1 - Debora Cavichioli

Email:	decavi@usp.br
Data de Nascimento:	26/02/1987
Cédula de Identidade:	RG - 443155604 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	13/07/2009
Início da Contagem de Prazo:	13/07/2009
Data Limite:	13/01/2012
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 13/07/2009 a 30/11/2009 E.Mail: borelli@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 01/12/2009 até o presente. E.Mail: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 13/07/2009
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 25/08/2010
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 13/07/2009 Mudança de Regulamento em 06/08/2009 Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011
Impresso em: 03/01/12 09:25:12

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6710100/1 - Debora Cavichioli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	80	A	N	Concluída
FBC5764-4/3	Protídeos em Bioquímica Clínica	01/09/2009	28/09/2009	60	0	0	-	N	Turma cancelada
TIC5013-1/1	Genoma, Transcriptoma e Proteoma Aplicado a Cardiologia (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Universidade de São Paulo)	05/10/2009	25/10/2009	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5779-1/2	DNA Repetitivo e Doenças (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	07/10/2009	08/12/2009	45	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5761-5/3	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	02/03/2010	29/03/2010	60	4	100	A	N	Concluída
TIC5004-1/2	Dislipidemias e Prevenção Cardiovascular (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Universidade de São Paulo)	12/04/2010	23/05/2010	90	6	91	A	N	Concluída
FBC5708-4/1	Farmacogenômica Cardiovascular	05/05/2010	15/06/2010	90	6	100	A	N	Concluída
TIC5012-1/3	Bioestatística (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Universidade de São Paulo)	03/08/2010	15/10/2010	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-10/1	Tópicos em Análises Clínicas I	15/03/2011	27/06/2011	30	2	80	A	N	Concluída
TIC5002-1/3	Estudos Avançados em Síndromes Coronárias Agudas (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Universidade de São Paulo)	11/04/2011	01/05/2011	90	6	89	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011
Impresso em: 03/01/12 09:25:12