UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Pós-graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Avaliação da expressão gênica e de polimorfismos da interleucina 6, do canal de potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5 e angiotensinogênio na incidência da fibrilação atrial pós-operatória em revascularização cirúrgica do miocárdio

Carla Prisinzano Pastorelli

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

SÃO PAULO

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Pós-graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Avaliação da expressão gênica e de polimorfismos da interleucina 6, do canal de potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5 e angiotensinogênio na incidência da fibrilação atrial pós-operatória em revascularização cirúrgica do miocárdio

Carla Prisinzano Pastorelli

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

SÃO PAULO

2009

Ficha Catalográfica

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

P293a Pastorelli, Carla Prisinzano
Avaliação da expressão gênica e de polimorfismos da interleucina 6, do canal de potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5 e angiotensinogênio na incidência da fibrilação atrial pós-operatória em revascularização cirúrgica do miocárdio / Carla Prisinzano Pastorelli. -- São Paulo, 2009.
113p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico molecular : Medicina 2. Expressão gênica
3. DNA : Polimorfismo genético 4. Fibrilação atrial : Medicina
I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756 CDD

Carla Prisinzano Pastorelli

Avaliação da expressão gênica e de polimorfismos da interleucina 6, do canal de potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5 e angiotensinogênio na incidência da fibrilação atrial pós-operatória em revascularização cirúrgica do miocárdio

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

Prof. Dr.
1º. examinador

Prof. Dr.
2º. examinador

São Paulo, setembro de 2009.

Eu Creio

Creio em mim mesmo.

Creio nos que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família.

Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu
me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos.

Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes à
devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não
acreditam no que eu acredito.

Creio que o triunfo é o resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte,
da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe.

Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar.

Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo.

Não caluniarei aqueles que não gosto.

Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem.

Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na
vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz.

Finalmente, perdoo os que me ofendem, porque compreendo que às vezes
ofendo os outros e necessito do perdão.

(Mahatma Gandhi)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adilson e Giuseppa, pelo amor incondicional e imensa dedicação. Obrigada por repreender, ensinar e principalmente amar...vocês são meus exemplos de vida.

Pai e Mãe, vocês são meus amigos, conselheiros, meu ombro amigo nos momentos de dúvidas e meus maiores incentivadores nos momentos de dificuldades. Vocês fazem parte dessa realização, pois vocês sempre acreditaram nos meus sonhos e me incentivaram para que eu os realizasse, sempre acrescentando conhecimentos e valores.

Pai, sempre vou me lembrar de sua frase desde o período escolar: “1% é inspiração e 99% é transpiração”, e aqui está o resultado de toda a minha transpiração! Sempre querendo que eu aproveite e lute ao máximo pelos desafios que a vida me apresenta. Aproveito a oportunidade para dizer o quanto amo você.

Mãe, obrigada por você existir em minha vida. Um exemplo, de mãe, mulher e profissional. Você é minha melhor conselheira e amiga, meu porto mais que seguro. Sempre com palavras incentivadoras, mesmo nos momentos difíceis, me dizia: “Vá em frente, você consegue!!”. Não tenho palavras para expressar o quanto te amo.

Ao meu irmão Giovanni, meu melhor amigo e confidente. Apesar da mesma carga genética, sempre mais sensato e ponderado do que eu. Você é meu orgulho...esse cara vai longe!!!! Obrigada por existir na minha vida e partilhar momentos inesquecíveis!!! Te amo!!!

Dedico este trabalho a vocês!

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Profa. Tit. Ana Campa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

Ao meu orientador Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata pelo apoio e incentivo na realização deste projeto. Agradeço pela grande contribuição científica.

Aos médicos, Camilo Abdulmassih Neto, Paulo Chaccur, Paulo Paredes Paulista, Paulo Henrique Dagola Paulista, Renato Arnoni Tambellini, Antônio Flávio Sanches Almeida e Mario Issa pela colaboração na obtenção de uma parte das amostras utilizadas neste estudo. Em especial ao Prof. Dr. Jarbas Jakson Dinkhuysen por viabilizar minhas coletas no centro cirúrgico e pela imensa contribuição científica nesta pesquisa.

Aos residentes e funcionários do Centro Cirúrgico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, por me receberem de “portas abertas”. Em especial a Maria das Dores Correia da Silva.

Aos médicos da Seção de Eletrofisiologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em especial aos Drs. Dalmo Antônio Ribeiro Moreira, Luiz Roberto de Moraes e Ricardo Garber Habib, pelo incentivo e enorme apoio científico.

Ao médico. Dr. Marcelo Ferraz Sampaio do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelo apoio incondicional a esta pesquisa. Obrigada pela colaboração e empenho para viabilizar este estudo.

Aos médicos e funcionários da Unidade de Terapia Intensiva do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia pela obtenção de parte das amostras utilizadas neste estudo.

Aos pacientes, que generosamente contribuíram para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, Adilson e Giuseppa, por serem extremamente presentes e tão importantes na minha vida. Meus maiores incentivadores, provedores e fãs...obrigada.

Ao meu irmão, Giovanni, um amigo de todas as horas. Obrigada por aguentar a minha choradeira e partilhar os momentos de alegria.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Por me ensinarem a trabalhar em equipe, a dividir frustrações de experimentos e pelas palavras amigas.

Aos médicos, Prof. Dr. Jarbas Jakson Dinkhuysen, Prof. Dr. Dalmo Antônio Ribeiro Moreira e Dr. Marcelo Ferraz Sampaio pelo apoio científico para que este estudo se concretizasse.

Ao Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, meu orientador, por ter proporcionado à realização desta tese de mestrado em seu excelente laboratório e pelo apoio.

À Profa. Rosário Dominguez Crespo Hirata pela ajuda e conselhos na busca de soluções das imensas dúvidas metodológicas do meu projeto.

À Cristina Moreno Fajardo, técnica do Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao Diagnóstico, por sempre tentar organizar o laboratório e disponibilizar meus materiais para a realização dos meus experimentos.

A *expert* dos números, Roberta de Souza do Laboratório de Epidemiologia e Estatística do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelo incentivo e ensinamentos de estatística.

RESUMO

PASTORELLI, Carla Prisinzano. **Avaliação da expressão gênica e de polimorfismos da interleucina 6, do canal de potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5 e angiotensinogênio na incidência da fibrilação atrial pós-operatória em revascularização cirúrgica do miocárdio.** 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Estima-se que mais de 800.000 cirurgias cardíacas de revascularização do miocárdio por ano são realizadas no mundo. Nesta intervenção terapêutica uma das complicações mais comuns é a fibrilação atrial, que esta intimamente relacionada com aumento de risco de morbidade e mortalidade pós-operatória. Os fatores determinantes desta manifestação podem ser pré, intra e pós-operatórios que possivelmente se relaciona com as proteínas pró-inflamatórias, canais iônicos e sistema renina-angiotensina. Portanto, os polimorfismos nos genes que codificam essas proteínas podem ter importante papel no desenvolvimento da FAPo. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a associação entre os polimorfismos dos genes *IL6* (G-174C), *KCNE5* (C97T) e *AGT* (A-217G) e a incidência da FAPo e seus efeitos na expressão de RNAm, em apêndice atrial direito e em sangue periférico. Para o estudo foram selecionados 76 indivíduos portadores de insuficiência coronariana obstrutiva com indicação de intervenção cirúrgica de revascularização do miocárdio. Desses, 16 com FAPo, 52 sem FAPo e 8 pacientes foram excluídos por motivo de óbito. Amostras de sangue periférico foram obtidas para análise de parâmetros bioquímicos e para extração de DNA genômico e RNA total, antes e 48 horas após a cirurgia cardíaca. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes da *IL-6*, *KCNE5* e do *AGT* foram detectados pela PCR-RFLP e confirmados por sequenciamento de DNA. A expressão de RNAm em leucócitos totais de sangue periférico e de tecido foi analisada pela PCR em tempo real, utilizando o gene *GAPDH* como referência endógena. A frequência do alelo -174G foi de 75 % no GFA e 69,2% no GC e não foi associada ao desenvolvimento de FAPo. A frequência do alelo 97T foi de 0% no GFA e 10,8% no GC e não foi associada a menor incidência de FAPo. A frequência do alelo -217A foi de 12,5% no GFA e 15,9% no GC e também não foi associado ao desenvolvimento de FAPo. A expressão de RNAm da *IL-6* em LTSP foi reduzida do pré para o pós-operatório de cirurgia de RM em ambos os grupos e não houve correlação entre a expressão de RNAm da *IL-6* em LTSP e apêndice auricular direito. A expressão de RNAm do *KCNE5* em LTSP foi reduzida do pré para o pós-operatório de cirurgia de RM, exceto em indivíduos do gênero masculino do GC, sugerindo a influência do gênero na expressão desse gene. Não houve correlação entre a expressão de RNAm do *KCNE5* em LTSP e apêndice auricular direito. Não se detectou expressão de RNAm do *AGT* em LTSP e sua expressão em apêndice auricular direito foi extremamente baixa, portanto não está associada ao desenvolvimento de FAPo.

Palavras-chave: polimorfismos, *IL-6*, *KCNE5*, *AGT*, expressão gênica, fibrilação atrial pós-operatória.

ABSTRACT

PASTORELLI, Carla Prisinzano. **Evaluation of gene expression and polymorphisms of interleukin 6, the potassium channel voltage-dependent subunit subfamily E 5 and angiotensinogen in the incidence of atrial fibrillation post-surgical myocardial revascularization.** 2009. 113 f. Dissertation (Master Degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

It is estimated that more than 800,000 heart surgery coronary artery bypass grafting are performed annually in the world. This therapeutic intervention of the most common complication was atrial fibrillation, which is closely related to increased risk of morbidity and postoperative mortality. The determining factors of this event can be pre, intra and postoperative possibly relates to the pro-inflammatory proteins, ion channels and renin-angiotensin system. Therefore, polymorphisms in the genes encoding these proteins may play an important role in the development of PoAF. The objective of this study was to evaluate the association between polymorphisms of IL6 gene (G-174C), KCNE5 (C97T) and AGT (A-217G) and the incidence of PoAF and its effects on mRNA expression in right atrial appendage and peripheral blood. For the study we selected 76 individuals with obstructive coronary artery disease with indication for surgical myocardial revascularization. Of these, 16 with PoAF, 52 without PoAF and 8 patients were excluded because of death. Blood samples were obtained for biochemical analysis and extraction of genomic DNA and total RNA before and 48 hours after cardiac surgery. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL-6, KCNE5 and AGT were detected by PCR-RFLP and confirmed by DNA sequencing. mRNA expression in total leukocytes in peripheral blood and tissue were analyzed by real-time PCR, using GAPDH gene as endogenous reference. The frequency of-174G allele was 75% in the GFA and 69.2% in GC and was not associated with the development of FAPO. The 97T allele frequency was 0% in GFA and 10.8% in GC and was not associated with a lower incidence of PoAF. The frequency of allele-217A was 12.5% in the GFA and 15.9% in GC and was not associated with the development of PoAF. The mRNA expression of IL-6 on LTSP was reduced from preoperative to the postoperative period of CABG in both groups and no correlation between mRNA expression of IL-6 on LTSP and right atrial appendage. The mRNA expression of KCNE5 LTSP was reduced in the pre and postoperative CABG, except among males in the CG, suggesting the influence of gender on expression of this gene. There was no correlation between the expression of mRNA KCNE5 in LTSP and right auricular appendage. There was no mRNA expression of AGT in LTSP and its expression in right atrial appendage was extremely low, so it is associated with the development of PoFA.

Keywords: polymorphisms, IL-6, KCNE5, AGT, gene expression, post-operative atrial fibrillation.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACE	Enzima conversora da angiotensina
AGT	Angiotensinogênio
AVC	Acidente vascular cerebral
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEC	Circulação extracorpórea
CK	Creatinoquinase
CKMB	Isoenzima MB da creatino quinase
Ct	Ciclo na PCR que o sinal de amplificação é superior ao limiar de detecção
CT	Colesterol total
DEPEC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracetato
ETE	Ecocardiograma transesofágico
ETT	Ecocardiograma transtorácico
FA	Fibrilação atrial
FAPo	Fibrilação atrial pós-operatória
G	Guanina
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GC	Grupo controle
GFA	Grupo com fibrilação atrial pós-operatória
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
K	Potássio

KCNE	Canal de Potássio voltagem-dependente subfamília E
KCNE5	Canal de Potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5
KCNQ1	Canal de potássio voltagem-dependente subfamília KQT subunidade 1
LDL-c	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LTSP	Leucócitos totais de sangue periférico
LTSP	Leucócitos totais do sangue periférico
Na	Sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCRus	Proteína C reativa ultra-sensível
RAS	Sistema renina angiotensina
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RIN	Número de integridade do RNA
RM	Revascularização do miocárdio
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	transcriptase reversa e reação em cadeia pela polimerase
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
T	Timina
T4 livre	Tetraiodotironina livre
TBE	Tris - borato - EDTA
TE	Tris-EDTA
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio tireoestimulante
U	Uracila
USP	Universidade de São Paulo
VLDL-c	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade
Δ Ct	Cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do <i>GAPDH</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
1.1. Fisiopatologia da fibrilação atrial pós-operatória – aspectos eletrofisiológicos.....	19
1.2. Fisiopatologia da fibrilação atrial pós-operatória – aspectos genéticos ...	21
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Casuística	27
3.2. Amostras biológicas de sangue periférico	28
3.3. Amostras biológicas de apêndice auricular direito.....	28
3.4. Determinações Laboratoriais	30
3.5. Extração e análise do DNA genômico	30
3.5. Extração e análise de RNA total.....	31
3.6. Reação em cadeia pela polimerase	33
3.7. Polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição.....	37
3.8. Ensaios de sequenciamento de DNA	40
3.9. Análise da expressão de RNAm pela RT-PCR em tempo real.....	43
3.11. Análise estatística dos resultados.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4. 1. Resultados do grupo com FAPo e do grupo sem FAPo	48
4.1.1. Dados dos pacientes.....	48
4.1.2. Análise dos polimorfismos genéticos	51
4.1.3. Resultados de expressão gênica em leucócitos totais de sangue periférico	69
4.1.4. Resultados de expressão gênica em apêndice auricular direito	78
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÕES.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR	34
TABELA 2. POLIMORFISMOS ESTUDADOS, ENZIMAS DE RESTRIÇÃO USADAS NA RFLP E FRAGMENTOS GERADOS PELA RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA.	37
TABELA 3. FRAGMENTOS DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO DOS SNPS -174 G/C (<i>IL-6</i>), 97 C/T (<i>KCNE5</i>) E -217 A/G (<i>AGT</i>).	40
TABELA 4. INICIADORES PCR EM TEMPO REAL.....	43
TABELA 5. VALORES DE INCLINAÇÃO DA CURVA E EFICIÊNCIA DOS ENSAIOS DE RT-PCR EM TEMPO REAL.	45
TABELA 6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NO GRUPO DE ESTUDO (GFA) E NO GRUPO CONTROLE (GC).....	48
TABELA 7. DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E FREQUÊNCIA RELATIVA DE ALELOS DO SNP -174 G/C <i>IL-6</i>	51
TABELA 8. DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E FREQUÊNCIA RELATIVA DE ALELOS DO SNP 97 C/T <i>KCNE5</i>	52
TABELA 9. DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E FREQUÊNCIA RELATIVA DE ALELOS DO SNP -217 A/G <i>AGT</i>	53
TABELA 10. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS SEM FAPO (GC) E COM FAPO (GFA), NO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE RM, NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>IL-6</i> -174 G/C.	41
TABELA 11. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO GRUPO SEM FAPO (GC) E COM FAPO (GFA), NO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE RM, NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>AGT</i> -217 A/G.....	47
TABELA 12. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM INDIVÍDUOS DO SEXO FEMININO E MASCULINO GRUPO CONTROLE GC (SEM FAPO) E DO GRUPO DE ESTUDO GFA (COM FAPO) NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO 97 C/T DO GENE <i>KCNE</i>	68
TABELA 13. VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>IL-6</i> , NO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE RM, EM LTSP DE INDIVÍDUOS DO GFA E GC.....	71

TABELA 14. INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO -174 G/C NA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>IL-6</i> EM LTSP EM INDIVÍDUOS DO GFA, ANTES E APÓS A CIRURGIA DE RM.....	73
TABELA 15. INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO -174 G/C NA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>IL-6</i> EM LTSP EM INDIVÍDUOS DO GC, ANTES E APÓS A CIRURGIA DE RM.....	73
TABELA 16. VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>KCNE5</i> , NO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE RM, EM LTSP DE INDIVÍDUOS DO GFA E GC.....	74
TABELA 17. INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO 97 C/T NA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>KCNE5</i> EM LTSP EM INDIVÍDUOS DO GFA, ANTES E APÓS A CIRURGIA DE RM.	76
TABELA 18. INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO 97 C/T NA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>KCNE5</i> EM LTSP EM INDIVÍDUOS DO GC DO SEXO MASCULINO, ANTES E APÓS A CIRURGIA DE RM.....	76
TABELA 19. INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO 97 C/T NA EXPRESSÃO DE MRNA DO GENE <i>KCNE5</i> EM LTSP EM INDIVÍDUOS DO GC DO SEXO FEMININO, ANTES E APÓS A CIRURGIA DE RM.....	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. APÊNDICE AURICULAR DIREITO	28
FIGURA 2. FRAGMENTOS DE TECIDO DO APÊNDICE AURICULAR DIREITO	29
FIGURA 3. ELETROFORESE CAPILAR DE RNA TOTAL DE SANGUE PERIFÉRICO	32
FIGURA 4. ELETROFORESE CAPILAR DE RNA TOTAL DE TECIDO	32
FIGURA 5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DOS PRODUTOS DE PCR DO POLIMORFISMO -174 G/C DO GENE DA <i>IL-6</i>	35
FIGURA 6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DOS PRODUTOS DE PCR DO POLIMORFISMO 97 C/T DO GENE <i>KCNE5</i>	36
FIGURA 7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DOS PRODUTOS DA PCR DO POLIMORFISMO -217 A/G DO GENE <i>AGT</i>	36
FIGURA 8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8% DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO DO SNP -174 G/C DO GENE <i>IL-6</i>	38
FIGURA 9. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8% DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO DO SNP 97 C/T DO GENE <i>KCNE5</i>	39
FIGURA 10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 8% DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO DO SNP -217 A/G DO GENE <i>AGT</i>	39
FIGURA 11. ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DE DNA	42
FIGURA 12. ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DE DNA	42
FIGURA 13. CURVA-PADRÃO DO GENE DA <i>IL-6</i>	45
FIGURAS 14 E 15: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GFA E DO GC	50
FIGURAS 16 E 17: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E <i>IL-6</i> EM INDIVÍDUOS DO GFA E DO GC	50
FIGURAS 18 E 19: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GFA PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>IL-6</i> -174 G/C	54
FIGURAS 20 E 21: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E <i>IL-6</i> EM INDIVÍDUOS DO GFA PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>IL-6</i> -174 G/C	55
FIGURAS 22 E 23: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>IL-6</i> -174 G/C	56
FIGURAS 24 E 25: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E <i>IL-6</i> EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>IL-6</i> -174 G/C	56
FIGURAS 26 E 27: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GFA PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>AGT</i> -217 A/G	58
FIGURAS 28 E 29: BOXES PLOT DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E <i>IL-6</i> EM INDIVÍDUOS DO GFA PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>AGT</i> -217 A/G	59
FIGURAS 30 E 31: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP <i>AGT</i> -217 A/G	60

FIGURAS 32 E 33: BOXES PLOTS DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PCRUS E IL-6 EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP AGT -217 A/G	60
FIGURAS 34 E 35: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GFA PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS E ALELOS DO SNP KCNE5 97 C/T	63
FIGURAS 36 E 37: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E IL-6 EM INDIVÍDUOS DO GFA PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS E ALELOS DO SNP KCNE5 97 C/T	63
FIGURAS 38 E 39: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES ALELOS DO SNP KCNE5 97 C/T (GÊNERO MASCULINO)	64
FIGURAS 40 E 41: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E IL-6 EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES ALELOS DO SNP KCNE5 97 C/T (GÊNERO MASCULINO)	65
FIGURAS 42 E 43: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CK E CKMB EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP KCNE5 97 C/T (GÊNERO FEMININO)	66
FIGURAS 44 E 45: BOXES PLOTS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCRUS E IL-6 EM INDIVÍDUOS DO GC PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP KCNE5 97 C/T (GÊNERO FEMININO)	67
FIGURA 46: BOXES PLOTS DOS VALORES DE EXPRESSÃO NORMALIZADA DOS GENES IL-6 E KCNE5 EM LTSP	69
FIGURA 47: EXPRESSÃO DO GENE AGT EM TECIDO ADIPOSEO	70
FIGURA 48: SCATTERS DOTS PLOTS DA VARIAÇÃO DE EXPRESSÃO NORMALIZADA DE RNAM DO GENE IL-6	72
FIGURA 49: SCATTERS DOTS PLOTS DA VARIAÇÃO DE EXPRESSÃO NORMALIZADA DE RNAM DO GENE KCNE5	75
FIGURAS 50, 51, 52 E 53: ANÁLISES DE CORRELAÇÕES ENTRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE IL-6 E A EXPRESSÃO DE RNAM IL-6 EM LTSP	78
FIGURA 54: BOXES PLOTS DOS VALORES DE EXPRESSÃO NORMALIZADA DOS GENES IL-6 E KCNE5 EM TECIDO DE APÊNDICE ATRIAL DIREITO	79
FIGURAS 55, 56, 57 E 58: ANÁLISES DE CORRELAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE RNAM NORMALIZADA IL-6 EM LTSP E A EXPRESSÃO DE RNAM IL-6 EM TECIDO (AURICULETA)	80
FIGURAS 59, 60, 61 E 62: ANÁLISES DE CORRELAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE RNAM NORMALIZADA KCNE5 EM LTSP E A EXPRESSÃO DE RNAM KCNE5 EM TECIDO (AURICULETA)	81

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Fisiopatologia da fibrilação atrial pós-operatória – aspectos eletrofisiológicos

A condução elétrica atrial é influenciada por sistema simpático e parassimpático, que pode diminuir ou mesmo bloquear o ritmo e a condução elétrica enquanto que a estimulação simpática causa aumento da atividade geral do coração. O nódulo átrio-ventricular, localizado na parede septal do átrio direito, conduz os impulsos elétricos para os ventrículos mantendo a frequência cardíaca (ANDREWS *et al.*, 2006).

A fibrilação atrial (FA) é caracterizada por batimentos rápidos e ativação irregular no átrio produzindo ondas fibrilatórias e resposta ventricular irregular (FALK *et al.*, 2001). A alteração da condução elétrica atrial pode ocorrer devido a doenças adquiridas tais como doenças isquêmicas, fibrose e hipertrofia ou, ainda, em associação a cirurgia cardíaca, doença valvar, insuficiência cardíaca e predisposição genética (ROBERTS, R., 2006).

Atualmente a FA é classificada em inicial e crônica (JAHANGIRI *et al.*, 2006). A FA inicial, a primeira detecção, pode ser sintomática ou não, esporádica com mínimo incômodo até incapacitação, podendo evoluir para complicações mais relevantes, como insuficiência cardíaca, choque cardiogênico e complicações tromboembólicas (HOUGUE *et al.*, 2005). Já a FA crônica, pode ser subdividida em paroxística, com duração de sete dias; persistente, com episódio superior a sete dias; e permanente quando não ocorre a reversão para o ritmo sinusal (WYNDHAM C. R., 2000).

O diagnóstico da FA e sua possível causa são realizados por avaliação clínica, com alterações detectadas no eletrocardiograma (ECG) de repouso, radiografia do tórax e ecocardiograma transtorácico (ETT). Em situações específicas é realizada investigação complementar utilizando-se o holter de 24 horas, ecocardiograma transesofágico (ETE), eletrocardiograma de alta resolução e estudo eletrofisiológico (ANDREWS *et al.*, 2006).

Os fatores de risco de FAPo clínica são: hipertensão, diabetes, insuficiência cardíaca congestiva, doença valvular, infarto agudo do miocárdio e hipertireoidismo (ANDREWS *et al.*, 2006), assim como a idade avançada onde são observadas alterações estruturais, tais como a presença e aumento de fibrose e dilatação atrial

(RIBEIRO *et al.*, 2001). Similarmente pode ocorrer na hipertensão onde estas alterações estruturais determinam dispersão do período refratário atrial e têm importante papel na origem das arritmias (ARANKI *et al.*, 1996).

Os mecanismos da fibrilação atrial são complexos e existem várias teorias, algumas bem atuais, relativas ao início e manutenção dessa doença. Dentre essas teorias podemos destacar as múltiplas reentradas de ondas, onde múltiplas frentes de ondas se propagam através do átrio de modo caótico, se colidindo constantemente, reiniciando e regenerando. Uma massa crítica de tecido atrial é necessária para múltiplas frentes de onda simultâneas que perpetuam o ritmo (KRUMMEN *et al.*, 2009). Outra teoria são os disparos rápidos de focos isolados, geralmente dentro das veias pulmonares, se propagando em torno do tecido atrial. O ritmo, então é mantido por múltiplas ondas de reentrada mesmo após o cessar o automatismo (WIJFFELS *et al.*, 1995). Entretanto, esses mecanismos promovem a vulnerabilidade atrial, o remodelamento elétrico e mecânico (MANNING *et al.*, 1994).

No pós-operatório de cirurgias cardíacas há aumento do tônus simpático em resultado a alterações dos fluídos, pressão arterial, dores e inotropia. Consequentemente, há encurtamento do período refratário atrial e aumento do automatismo de focos ectópicos, ambos predispondo ao início da fibrilação atrial pós cirúrgica, porém os estudos demonstrando ativação simpática antes do episódio de fibrilação atrial são discordantes (LELORIER *et al.*, 2002).

Em cirurgias cardíacas, o desenvolvimento da FAPo é composto de vários fatores adicionais, tais como doença cardíaca pré-existente, incisões atriais que geram substrato para a arritmia, isquemia atrial, cardioplegia inadequada e danos ao nó sinusal durante a canulação para instalação da circulação extracorpórea (LELORIER *et al.*, 2002).

As arritmias atriais são comuns no pós-operatório de cirurgias cardíacas, acometendo de 10% a 65% dos pacientes após diferentes tipos de procedimentos cirúrgicos (MAISEL *et al.*, 2001). São as causas mais comuns de complicação pós-operatória, afetando aproximadamente 35% dos pacientes (FOX *et al.*, 2004).

Em estudo realizado em 2004 no Brasil, por Silva e colaboradores, revelou que a incidência de FAPo em cirurgia cardíaca foi de 28,5% (SILVA *et al.*, 2004). Entretanto, a real incidência de FAPo no Brasil ainda não é conhecida; estima-se que seja mais freqüente em homens do que em mulheres, na proporção de 2:1 (VALDERRAMA *et al.*, 2005).

1.2. Fisiopatologia da fibrilação atrial pós-operatória – aspectos genéticos

A associação entre componentes estruturais e componentes iônicos é essencial para a propagação do impulso eletromecânico pelas células miocárdicas. Quando fatores de doenças estruturais cardíacas, fatores genéticos e fatores iatrogênicos modificam essa associação, podem alterar a atividade elétrica no coração, acarretando efeitos nos átrios ou ventrículos, como na FAPo (BRUGADA, R., 2005).

A fisiopatologia da FAPo pode estar relacionada a disfunções dos canais iônicos, denominadas canalopatias, que promovem a condução de íons por gradiente eletroquímico. Estes canais iônicos são uma grande família de genes que codificam mais de 400 proteínas. Dentre estes podemos destacar os de sódio presentes nos neurônios, músculos cardíacos e esqueléticos, de cálcio que existem em pelo menos cinco tipos na membrana plasmática (L, T, N, P e Q) e os canais de potássio que promovem correntes de hiperpolarização nas células (CATTERALL et al., 1993).

O canal de potássio voltagem-dependente consiste de um agregado de quatro domínios protéicos semelhantes, que existem como subunidades independentes, subunidade alfa (α) e subunidade beta (β) (ROBERTS R., 2006). A subunidade α e β contém um terminal amino ou carboxila citoplasmática. O componente principal é a subunidade α que é codificada pelo gene *KCNQ1* responsável pela ativação do potencial elétrico cardíaco (CHEN et al., 2003). Cada domínio contém seis hélices transmembrânicas (α -hélices) que se estendem por toda a membrana (S1 a S6). Os quatro domínios dispõem-se de modo simétrico em torno de um poro aquoso central (o canal iônico). Cada subunidade contém um domínio S4 (sensor de voltagem) e domínio S5-P-S6 que contribui com o poro central (ROBERTS R., 2006).

Adicionalmente a subunidade α existe a subunidade β (auxiliar), tal como a família KCNE, que têm função moduladora do canal (LUNDQUIST et al., 2005). A família KCNE (*KCNE1* ao *KCNE5*) é um grupo homólogo de reguladores de voltagem dos canais de potássio e estão envolvidas nas arritmias cardíacas, inclusive na FA (ABBOTT et al., 2001). A subunidade α se combina com outras cinco subunidades (complexos KCNQ1-KCNE1, KCNQ1-KCNE2, KCNQ1-KCNE3, KCNQ1-KCNE4 e KCNQ1-KCNE5) para formar o canal de potássio (BARHANIN J. et al., 1996).

O canal apresenta pelo menos três fases: fase de fechamento, quando o poro não conduz íons; fase de abertura, quando o poro conduz aproximadamente 10^7 íons por segundo; e fase inativa, quando o poro não pôde ser aberto ou fechado (ROBERTS R., 2006). O fechamento e abertura do poro dependem das mudanças no potencial de membrana. Os mecanismos moleculares pelos quais ocorrem abertura e fechamento dos poros e a seleção do íon específico ainda necessitam ser elucidados. Contudo, a análise de mutações e polimorfismos auxilia na identificação das bases moleculares das funções dos poros (ROBERTS R., 2006).

O sistema renina-angiotensina (RAS) está envolvido em várias doenças cardiovasculares, incluindo fibrose do miocárdio e doença cardíaca hipertrófica e hipertensiva. Li e colaboradores demonstraram que a ativação do RAS no átrio de humanos está relacionada ao desenvolvimento de FA (GOETTE et al., 2000; LI et al., 2001).

O RAS é um importante modulador de fibrose e remodelamento miocárdico e está evidenciado na FAPo devido ao aumento da expressão atrial da enzima conversora de angiotensina (ACE) e por promover efeitos benéficos com terapias inibidoras da ACE, reduzindo a ocorrência de FAPo associada a infarto agudo do miocárdio e disfunção ventricular esquerda (MATHEW et al., 2004). Terapia pré-operatória com inibidores da ACE em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca diminui o risco de FAPo enquanto que a retirada desta terapia aumenta o risco (PODGOREANU et al., 2005).

A angiotensina II é a desencadeadora da via de proteína quinase na transmissão de sinal mitogenético (GOETTE et al., 2000; LI et al., 2001), que é responsável pela proliferação dos fibroblastos e hipertrofia dos cardiomiócitos (KOMURO et al., 2000). Esse mecanismo foi comprovado pela inibição de angiotensina II endógena que impede o encurtamento do período refratário relativo durante a batida rápida atrial em cães (NAKASHIMA et al., 2000). Portanto, a angiotensina II atua no mecanismo de remodelamento estrutural e elétrico atrial na FA. (MADRID et al., 2002).

Além disso, o RAS tem função regulatória da pressão arterial e a angiotensina II é um dos mais potentes agentes vasopressores (CORVOL et al., 1995; CORVOL et al., 1997). A angiotensina II é produzida a partir de uma molécula precursora denominada angiotensinogênio (AGT), primariamente sintetizada no fígado e tecido adiposo, e em menores quantidades nos rins, cérebro, coração,

glândula adrenal e parede vascular (JAIN et al., 2002). A elevação da concentração plasmática de AGT está associada com a hipertensão e demonstram associação com o gene do AGT, hipertensão arterial (KUMAR et al., 2005) e FA, uma vez que a hipertensão é um fator de risco no desenvolvimento da FAPo.

A ocorrência de FAPo também pode estar associada com processos inflamatórios que promovem remodelamento, alterações estruturais e eletrofisiológicas no átrio (AVILES et al., 2003). Em biópsias de pacientes com FA e em modelos de FA em cães foram observados infiltrados inflamatórios, necrose de miócitos e fibrose (NAKAMURA et al., 2003). Foi também observado o aumento da concentração plasmática de marcadores inflamatórios, tais como a proteína C reativa, microalbuminúria (ASSELBERGS et al., 2003), interleucina-6 (IL-6) (BURZOTTA et al., 2001), peptídeo natriurético tipo B (WAZNI et al., 2004) e fator α de necrose tumoral (TNF- α), em pacientes com FA. Portanto, moléculas pró-inflamatórias parecem estar envolvidas na etiologia da FAPo (FOX et al., 2004).

A IL-6 é uma citocina proinflamatória produzida por várias células incluindo leucócitos, adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e miócitos (WOLFORD *et al.*, 2003). Esta citocina regula a produção de moléculas de adesão e induz a secreção da proteína de quimiotaxia do monócito, um importante mediador na liberação de outras citocinas tais como o TNF- α e interleucina-1 β , que consequentemente intensificam a reação inflamatória (BENNERMO et al., 2004).

Além de alterações em proteínas de fase aguda, tais como inibidores de proteinases e da coagulação e proteínas de transporte (em destaque a proteína C reativa). A resposta inflamatória pode ser caracterizada por alterações hematopoiéticas, tais como anemia, trombocitose e leucocitose (ENGELMANN et al., 2005). Lamm e colaboradores demonstraram aumento significativo de leucócitos em pacientes que desenvolveram FAPo (LAMM *et al.*, 2006).

A forma familiar da FA foi descrita pela primeira vez em 1943. Entretanto somente em 1997 Brugada e colaboradores identificaram o primeiro locus da forma familiar, como padrão de herança autossômica dominante, localizado no cromossomo 10q22-24, em três diferentes famílias da Espanha, porém o gene não foi identificado (BRUGADA et al., 1997). No Estudo Framingham dos 2.243 indivíduos analisados, 681 tinham pelo menos um parente com FA, sugerindo que 30% dos indivíduos com FA tinham história familiar da doença (FOX et al., 2004).

Em estudo de associação realizado na China, a FA isolada foi herdada em quatro gerações como um padrão autossômico dominante. A mutação S140G do gene *KCNQ1* foi associada com canalopatias e FA. Estudos eletrofisiológicos revelaram o ganho de função na corrente elétrica do canal de potássio voltagem-dependente quando o canal mutado é expresso. Este ganho de função explica a diminuição de duração do potencial de ação e do período refratário favorecendo o desenvolvimento da FA (CHEN et al., 2003).

Brundel e colaboradores demonstraram a redução da expressão de RNAm de canais de potássio (*Kv4.3*, *Kir3.4* e *Kir6.2*) no apêndice atrial direito de pacientes com FA persistente e paroxística (BRUNDEL et al., 2001).

As mutações P448R, H562P e R27C no *KCNQ1* causam perda de função do gene fazendo com que portadores apresentem prolongamento do segmento QT no eletrocardiograma (Síndrome congênita de longo QT1) e alterações cardíacas (WANG et al.; 1999; TINEL et al.; 2000).

Recentemente, demonstrou-se a associação entre *KCNE2* e FA uma vez que as mesmas mutações foram demonstradas em duas famílias com FA (YANG et al., 2004). De acordo com estudo publicado por Hofman e colaboradores, alterações na corrente dos canais de potássio podem causar FA devido a alterações no gene *KCNE5* (HOFMAN et al., 2004).

Os genes *KCNE* são expressos no coração, porém existe variação nos níveis de cada subunidade (ABBOTT et al., 2001). O gene *KCNE5* está localizado no cromossomo X e pode explicar as diferenças relacionadas entre os sexos no desenvolvimento da FAPo. Ao contrário do que se esperava o polimorfismo 97 C/T do gene *KCNE5* pode estar associado com um efeito protetor contra o desencadeamento de episódios de FA provavelmente por função anormal ou disponibilidade de produto do gene *KCNE5* (RAVN et al., 2005).

Polimorfismos de genes envolvidos no RAS, tais como do *ACE* (Indel), do *AGT* (G-217A, A-20C, G-6A, M235T e T174M) e do receptor tipo 1 de angiotensina II (*AT1R*) têm sido associados com doenças cardiovasculares e FA (JAIN et al., 2002).

Tsai e colaboradores demonstraram que os alelos G-6, G-217 e M235 e os haplótipos correspondentes do gene *AGT* podem ser associados ao desenvolvimento da FA estrutural não familiar devido ao aumento da atividade de transcrição do gene *AGT* (TSAI et al., 2004). Esse aumento da transcrição pode

causar aumento tecidual de angiotensina II no átrio devido ao aumento da pressão atrial, com consequentemente ativação da atividade mitogênica via proteína quinase, causando diminuição do período refratário e desenvolvimento da FA.

O estudo da expressão gênica pela PCR em tempo real do RAS em tecido humano foi realizado por Paul e colaboradores, os resultados demonstraram que todos os componentes do RAS estavam altamente expressos em amostras de tecido renal, glândula adrenal, placenta e veia safena (PAUL et al., 1993).

Com relação aos genes envolvidos no processo inflamatório, observou-se que o polimorfismo G-174C, localizado na região promotora do gene *IL6* foi associado com várias doenças tais como aterosclerose, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, síndrome de Alzheimer, câncer, osteoporose e artrite crônica juvenil (FISHMAN et al., 1998; BENNERMO et al., 2004).

Gaudino e colaboradores demonstraram a relação entre o SNP *IL6* 174G>C e as concentrações plasmáticas de IL-6, antes e após a cirurgia cardíaca de revascularização do miocárdio (FOX et al, 2004). O genótipo GG foi preditor da FA pós-operatória, modulando a resposta inflamatória em cirurgias de R. M. (GAUDINO et al, 2003). A expressão do RNAm do gene *IL6* no átrio direito de pacientes com FA crônica foi significativamente maior que no grupo sem FA (OKHI et al., 2005).

Observa-se a possibilidade muito interessante de aplicação do estudo dos polimorfismos genéticos como marcadores de prognóstico nas manifestações clínicas, o que ultimamente vem se confirmando com a inserção da farmacogenômica na rotina médica. Por isso, acreditamos que estudos que visem investigar o papel de polimorfismos dos genes *KCNE5*, *AGT* e *IL6* e sua relação com a expressão de RNAm em tecido auricular poderão contribuir sugerindo alguns mecanismos moleculares e fisiopatológicos da FAPo. A expressão gênica destes marcadores em sangue periférico nos possibilitará propor um modelo de acompanhamento clínico laboratorial pouco invasivo e praticável na rotina médica.

2. OBJETIVOS

2.1. Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes *IL6* (G-174C), *KCNE5* (C97T) e *AGT* (A-217G) em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio.

2.2. Avaliar a associação entre os polimorfismos dos genes *IL6* (G-174C), *KCNE5* (C97T) e *AGT* (A-217G) na incidência da fibrilação atrial pós-cirúrgica.

2.3. Avaliar a relação entre os polimorfismos dos genes *IL6* (G-174C), *KCNE5* (C97T) e *AGT* (A-217G) com a expressão de RNAm em sangue periférico antes e 48 horas após a cirurgia, em pacientes com e sem fibrilação atrial pós-operatória.

2.4. Avaliar a correlação entre a expressão de RNAm de LTSP dos genes *IL-6*, *KCNE5* e *AGT* e a expressão de RNAm em fragmento de apêndice atrial direito, em pacientes com e sem fibrilação atrial pós-operatória.

2.5. Avaliar a relação entre a expressão de RNAm em sangue periférico, antes e 48 horas após a cirurgia de revascularização do miocárdio, em pacientes com e sem fibrilação atrial pós-operatória, procurando um modelo de seguimento clínico laboratorial viável na rotina médica

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram selecionados para o estudo indivíduos portadores de insuficiência coronariana obstrutiva com indicação de intervenção cirúrgica de revascularização do miocárdio, totalizando 76 pacientes, de ambos os sexos, com idades entre 40 a 86 anos. Desses indivíduos, 16 (21%) desenvolveram FAPo e foram incluídos no grupo de estudo (GFA), 52 (68%) não desenvolveram FAPo e foram incluídos no grupo controle (GC) e 8 (11%) foram excluídos do estudo devido ao por motivo de óbito.

Os indivíduos foram informados na Enfermaria Pré-operatório do IDPC, sobre o protocolo de estudo, que foi previamente aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia) e somente participaram do estudo os que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo D). Neste momento foram também obtidos e registrados os dados clínicos através de um questionário (Anexo E).

Com bases nas recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000), indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ foram classificados como obesos, e os que apresentaram pressão sistólica /diastólica acima de 140/90 mmHg ou estavam sob tratamento anti-hipertensivo foram considerados hipertensos (CHALMERS et al., 1999). É importante ressaltar que para a realização de todas as análises estatísticas os indivíduos pardos foram incluídos no grupo de indivíduos negros.

Os critérios de inclusão no estudo foram: portadores de insuficiência coronariana obstrutiva e com indicação de intervenção cirúrgica de revascularização do miocárdio, de acordo com os critérios do *American College of Cardiology* (FRAKER et al., 2007).

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentarem quaisquer das seguintes condições: história prévia de acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica, hepática, respiratória, doenças hemorrágicas, inflamatórias crônicas, uso de anticoagulantes orais, neoplasias, história prévia de FA, valvulopatias, miocardiopatia (incluindo Doença de Chagas), doença cardíaca congênita, uso de drogas (GAUDINO et al., 2003) e distúrbios endócrinos (YANG et al., 2004).

3.2. Amostras biológicas de sangue periférico

Foram obtidas amostras de sangue periférico por punção da veia antecubital, utilizando sistema de coleta á vácuo descartável, na sala operatória das cirurgias no Centro Cirúrgico do IDPC e após 48 horas de pós-operatório, na Unidade de Terapia Intensiva. Foram obtidos 10,5 mL de sangue em tubo EDTA K2 para extração de DNA e RNA; 10 mL em tubo sem anticoagulante, para dosagens bioquímicas, hormonais e enzimáticas no soro; 3,5 mL em tubo com EDTA K2 para a análise hematológica e por último, para a análise de fibrinogênio, foram coletados 4,5 mL em tubo com anticoagulante citrato de sódio.

3.3. Amostras biológicas de apêndice auricular direito

O procedimento cirúrgico foi realizado de maneira habitual, para todos os casos operados. A cirurgia foi feita mediante esternotomia mediana, com utilização de bisturi elétrico; abertura do pericárdio com incisão em “T” invertido. Procedido, então, o preparo dos enxertos a serem utilizados no procedimento cirúrgico. A escolha dos mesmos ficou a critério do cirurgião, tendo sido utilizado tanto uma artéria torácica interna, quanto duas, associado ao emprego da veia safena magna.

O procedimento cirúrgico deu-se com auxílio de circulação extracorpórea (CEC) em todos os casos. Utilizou-se 4,5 mg/Kg de heparina antes da instalação da circulação extracorpórea. O oxigenador de membrana escolhido para o procedimento foi o oxigenador Vital® (Nipro, São Paulo, Brasil); o preenchimento do mesmo foi feito com solução fisiológica.

Para instalação da circulação extracorpórea utilizou-se a canulação da aorta ascendente, e para drenagem venosa (via apêndice auricular de átrio direito) uma ou duas cavas, a critério do cirurgião, como demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1. Apêndice auricular direito indicada pela seta.

O fluxo arterial empregado durante CEC foi mantido entre 40 – 60 ml/kg/min. A proteção miocárdica feita com clampeamento intermitente da aorta (pinçamento anóxico), com clampeamentos não superiores a 15 minutos e intervalo de 2 minutos entre os clampeamentos.

O controle do tempo de coagulação ativada em intervalos de 60 minutos durante a CEC, mantendo níveis acima de 900 segundos, com neutralização da heparinização com Sulfato de Protamina, na dose de 4 UI/ 100 UI de heparina. Neste momento foi realizada a colheita do fragmento de auriculeta (fragmentos de 30 a 120 mg) pelo cirurgião da equipe, sem qualquer prejuízo a curto e a longo prazo ao paciente, tendo em vista que este local da canulação foi suturado sem a menor possibilidade de sangramento ou dano. O material foi lavado em TE (pH =7,4) como demonstrado na **Figura 2**, e conservado em *RNA later* (AMBION Inc., Austin, Texas, USA) por 24 horas e após esse período o tecido foi armazenado a -80°C.

Figura 2. Fragmentos de tecido do apêndice auricular direito coletado previamente ao procedimento de canulação arterial.

Posteriormente o RNA total do tecido foi obtido a partir da lise da suspensão de células contendo entre 1 e 5×10^6 células/ml, utilizando-se 1 ml do reagente TRIZOL[®] (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA) pelo método descrito por Chomczynski & Sacchi (Chomczynski, 1993) e armazenado a -80°C para posterior análise.

3.4. Determinações Laboratoriais

As concentrações séricas de colesterol total e frações foram determinadas por métodos enzimáticos colorimétricos (SCHUMACHER *et al.*, 1993; SUGIUCHI *et al.*, 1995).

As atividades de CK e CKMB foram determinadas por métodos enzimáticos colorimétricos (HORDER *et al.*, 1991) em analisador automático Dimension RXL[®] (Dade Behring, Newark, USA).

As determinações de T4 livre e TSH foram realizadas por imunoensaio competitivo, método imunométrico (HAY *et al.*, 1991) e quimioluminescência, respectivamente, automatizada pelo Immulite[®] DPC MedLab (Immulite MedLab, 2001).

As concentrações de uréia, creatinina e PCR ultra sensível foram determinadas segundo TALKE *et al.*, 1965 e TIETZ *et al.*, 1994, pelo analisador automático Dimension RXL[®] (Dade Behring, Newark, USA).

O hemograma foi realizado por métodos de impedanciometria e citometria de fluxo, automatizados (ABX Pentra 80, Horiba, Japão).

3.5. Extração e análise do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir dos leucócitos do sangue total periférico, colhido com EDTA, usando o procedimento desenvolvido por Salazar *et al.*, 1998. A quantificação do DNA obtido foi realizada por espectrofotometria a 260nm utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop[®] (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA) e a sua pureza determinada pela relação A260/A280 (SAMBROOK; Russel, 2001). A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5X (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0), em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). A separação eletroforética foi realizada por 30 minutos a 100 V e 60 mA, utilizando-se a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, SP). Como referência foi utilizado marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). As bandas foram visualizadas sob a luz ultravioleta (UV) após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e fotodocumentadas por sistema de captura de

imagem *Chemilmager*[™] 4.400 (v 5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

3.5. Extração e análise de RNA total

O RNA total foi obtido a partir de leucócitos totais do sangue periférico total, colhido com EDTA, usando o *QIAamp RNA blood Mini Kit* (Quiagen, Incorporated, Chatsworth, CA) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida o RNA foi armazenado a -80° C.

O fragmento de tecido de apêndice auricular direito (máximo 30 mg) foi processado em *RNA later* e o RNA total foi obtido a partir da lise da suspensão de células contendo entre 1 e 5×10^6 células/ml, utilizando-se 1 ml do reagente TRIZOL[®] (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA) pelo método descrito por Chomczynski & Sacchi (Chomczynski, 1993). As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos, seguidas de adição de 0,2 ml de clorofórmio, homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C, com formação de duas fases. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanolol gelado, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). Em seguida, o RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µl de água estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Aldrich, MO, EUA), incubado por 10 minutos a 56°C, e armazenado a -80°C para posterior análise.

O rendimento e a integridade do RNA total (de sangue periférico e de apêndice atrial direito) foram avaliados por eletroforese capilar pelo equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies Inc., Deutschland GmbH, Alemanha). As amostras de RNA foram quantificadas e avaliadas com o auxílio de um marcador de peso e massa molecular e a área sobre a curva do marcador molecular foi comparada com a soma da área de pico da amostra. Para as amostras de RNA, a fração ribossomal foi determinada, indicando sua integridade. O número de integridade do RNA (RIN) foi utilizado para estimar sua integridade baseado na migração eletroforética da amostra, incluindo a presença ou ausência de produtos degradados. É importante, ressaltar que amostras com valores de RIN maior ou igual a 8 são consideradas com integridade ótima. Na **Figura 3 e 4** estão ilustrados as integridades (RIN) e quantificações das amostras de RNA total de sangue periférico e tecido.

Figura 3. Eletroforese capilar de RNA total de sangue periférico (amostra número 10). RNA concentration: concentração do RNA; RIN: número de integridade do RNA (ideal $\geq 8,0$).

Figura 4. Eletroforese capilar de RNA total de tecido - apêndice atrial direito (amostra número 10). RNA concentration: concentração do RNA; RIN: número de integridade do RNA (ideal $\geq 8,0$).

Para a síntese do cDNA (do RNA de sangue periférico e tecido) foi utilizada a enzima *transcriptase reversa Improm II™* (Promega Corporation, Madison, EUA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante e que consiste em duas etapas distintas. Na primeira, o mRNA é hibridado aos iniciadores aleatórios e na segunda etapa, ocorre à reação de transcriptase reversa, dessa forma o cDNA, assim produzido, foram armazenados a -20° C.

3.6. Reação em cadeia pela polimerase

Foram estudados os polimorfismos -174 G/C do gene *IL-6*, 97 C/T do gene *KCNE5* e -217 A/G do gene *AGT*. Essas regiões polimórficas foram amplificadas por reação em cadeia pela polimerase (PCR) e os produtos gerados utilizados em ensaios de polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento de DNA.

As seqüências dos iniciadores da PCR foram escolhidas com o auxílio do programa *Primer Premier 5®* (Premier Biosoft International, EUA) com base nas seqüências disponíveis no banco de dados NCBI (Números de acesso: NM000600, NM012282 e NM000029).

As condições da PCR foram otimizadas utilizando-se como base as descritas anteriormente (Ellinor *et al.*, 2006), utilizando-se o termociclador *Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos gerados foram digeridos com enzimas de restrição: N1aIII, Hae III e MspI (TAVARES *et al.*, 2003) seguindo as recomendações dos fabricantes.

Todas as reações de sequenciamento do DNA dos genes *IL-6*, *AGT* e *KCNE5* foram realizadas com as mesmas seqüências de iniciadores utilizadas na PCR. Na **Tabela 1**, estão descritos os iniciadores utilizados na PCR-RFLP e sequenciamento de DNA.

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Polimorfismos	Métodos	Seqüências dos iniciadores	Tamanho do fragmento
-174G/C (<i>IL-6</i>)	PCR- RFLP	5' AGCCTCAATGACGACCTAAGC3' 5' ACTGGAGATGTCTGAGGCTCATT3'	226 pb
97C/T (<i>KCNE5</i>)	PCR- RFLP	5' GTGTCACTCCCCGAAAGCCAT3' 5' CGACGACGCCTATCTCTACATCC3'	209 pb
-217A/G (<i>AGT</i>)	PCR- RFLP	5' TGCCTAAGCAAGACTCTCCCC3' 5' TCTGGCATCTGTCCTTCTGGC3'	310 pb

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov. Números de Acesso GenBank: NM 000600, NM 012282.2 e NM 000029.2

As PCR foram otimizadas a partir de um protocolo básico. Inicialmente, mantivemos constantes as concentrações dos componentes da reação e o número de ciclos (30 ciclos) e variou-se a temperatura de hibridização dos iniciadores.

Na composição dos reagentes da PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, iniciadores 10 µmoles/L (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), deoxinucleotídeos (dNTPs) 10 mmoles/L (GE HealthCare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, Brasil), DNA Taq polimerase 1 U e tampão de reação 10X (Tris-HCl a 75 mM (pH 9,0)), MgCl₂ a 2 mM, KCl a 50 mM, (NH₄)₂ SO₄ a 20 mM) em volume final com água MilliQ autoclavada para 25 µl.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE a 0,5X (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). A separação por eletroforese foi realizada em 30 minutos a 100 V e 60 mA, utilizando-se a fonte modelo *EPS 200* (GE Healthcare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, SP). Como referência foi utilizado marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Os fragmentos dos amplicons foram visualizados sob a luz UV após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e fotodocumentadas por sistema de captura de imagem *Chemilmager™ 4.400* (v 5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A PCR para o SNP -174 G/C (*IL-6*) foi realizada utilizando o termociclador da *Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 98°C por 3

minutos, seguida da etapa de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridização dos iniciadores de 56°C a 61° C por 1 minuto e polimerização a 72°C pelo mesmo tempo. Esta etapa foi realizada com 30 ciclos. Após a etapa de amplificação, há a etapa polimerização final, onde a temperatura se mantém em 72°C por 10 minutos. A seguir, a amostra é resfriada a 4°C até que finalizou o programa em uso. Conforme se observa na **Figura 5**, a temperatura de hibridização escolhida foi a de 60° C para evitar a formação de produtos inespecíficos.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do polimorfismo -174 G/C do gene da *IL-6*. Linha1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb. Linha 2: PCR sem DNA (controle de contaminação). Linhas 3 a 8: produtos de PCR de amostras de DNA testes amplificadas pela PCR na temperatura de hibridização de 60°C.

Para o SNP 97 C/T (*KCNE5*) a PCR foi realizada utilizando o termociclador *Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sob as condições de desnaturação inicial a 98°C por 3 minutos, seguida da etapa de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridização dos iniciadores de 58°C a 63° C por 1 minuto e 15 segundos polimerização a 72°C por 1 minuto, realizada com 35 ciclos. Após a etapa de amplificação, utilizou-se a polimerização final, onde a temperatura se mantém em 72°C por 10 minutos, a seguir, a amostra é resfriada a 4°C. Conforme se observa na **Figura 6**, a temperatura de hibridização escolhida foi a de 62° C para evitar a formação de produtos inespecíficos.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR do polimorfismo 97 C/T do gene *KCNE5*. Linha1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb. Linhas 2 a 14: produtos da PCR de amostras de DNA testes amplificadas pela PCR na temperatura de hibridização de 62° C.

Outro SNP estudado foi o -217 A/G (*AGT*), a PCR foi realizada utilizando o termociclador *Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sob as condições de desnaturação inicial a 98°C por 3 minutos, seguida da etapa de amplificação, desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridização dos iniciadores de 59°C a 64° C por 1 minuto e 15 segundos e polimerização a 72°C por 1 minuto. Esta etapa foi realizada com 35 ciclos. Após a etapa de amplificação utilizou-se a polimerização final, onde a temperatura se mantém em 72°C por 10 minutos. A seguir, a amostra é resfriada a 4°C. Conforme se observa na **Figura 7**, a temperatura de hibridização escolhida foi a de 62° C para evitar a formação de produtos inespecíficos.

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR do polimorfismo -217 A/G do gene *AGT*. Linha1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb. Linha 2: PCR sem DNA (controle de contaminação). Linha 3 a 13: produtos da PCR de amostras de DNA testes amplificadas pela PCR na temperatura de hibridização de 62° C.

3.7. Polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição

Os alelos dos SNPs -174G/C, 97 C/T e -217 A/G foram identificados pela PCR- RFLP, utilizando 5U das enzimas de restrição N1aIII, Hae III e MspI, respectivamente (New England BioLabs Inc.). A restrição enzimática foi realizada por 4 horas em banho de água (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37 °C em volume final de 10 µl.

Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida 8% em TBE 1X [Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini v16-2 (Biometra, Gottingen, Alemanha). A eletroforese foi realizada com a fonte modelo *EPS 200* (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a 120v , 50 mA, durante 2 horas. Marcadores de tamanho molecular de DNA de 50 pb e de 100 pb (invitrogen Corporation, Carisbad, CA, EUA) foram utilizados para monitorar o tamanho dos fragmentos gerados pela restrição enzimática. Os fragmentos foram visualizadas sob a luz UV após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e fotodocumentadas por sistema de captura de imagem *Chemilmager™ 4.400* (v 5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

Na **Tabela 2**, são descritos os polimorfismos, as enzimas de restrição usadas na RFLP e os fragmentos gerados na restrição enzimática dos produtos de PCR.

Tabela 2. Polimorfismos estudados, enzimas de restrição usadas na RFLP e fragmentos gerados pela restrição enzimática.

Polimorfismo	Enzima de restrição	Tamanho dos fragmentos
- 174 G/C	N1aIII	53 pb; 62 pb; 111 pb; 164 pb
97 C/T	Hae III	47 pb; 48 pb; 114 pb; 162 pb
-217 A/G	Msp I	40 pb; 43 pb; 99 pb; 128 pb; 227 pb

A digestão enzimática do produto da PCR do SNP -174 G/C com a enzima N1aIII gera fragmentos com tamanhos de 53, 62, 111 e 164 bp (**Figura 8**). O fragmento 62 pb é gerado pela presença do sítio constitutivo e é visualizado em todas as amostras.

Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídio dos produtos de restrição do SNP -174 G/C do gene *IL-6*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb. Linha 2, 7 a 10: genótipo GG. Linha 3: genótipo CC. Linha 4 a 6: genótipo GC. Linha 11: produto da PCR.

Para o SNP 97 C/T, a restrição enzimática com a enzima *HaeIII* gera fragmentos com tamanhos de 47, 48, 114 e 162 bp (**Figura 9**). O fragmento 47 é gerado pela presença do sítio constitutivo e é visualizado em todas as amostras. É importante ressaltar que este polimorfismo está localizado no cromossomo X, portanto indivíduos do sexo masculino possuem o alelo C ou T e indivíduos do sexo feminino apresentam os genótipos CC, CT ou TT.

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídio dos produtos de restrição do SNP 97 C/T do gene *KCNE5*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb. Linha 2: produto da PCR. Linha 3: genótipo CC. Linha 4: alelo C. Linha 5: genótipo CT. Linha 6: alelo T.

O SNP na região promotora -217 A/G foi digerido com a enzima *Msp I* e gerou fragmentos com tamanhos de 40, 43, 99, 128 e 227 pb (**Figura 10**). Os fragmentos 40 e 43 pb são gerados pela presença de sítios constitutivos e são visualizados em todas as amostras.

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídio dos produtos de restrição do SNP -217 A/G do gene *AGT*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb. Linha 2: genótipo GG. Linha 3: genótipo GA. Linha 4: genótipo AA. Linha 5: produto da PCR.

Na **Tabela 3**, são apresentados os tamanhos dos fragmentos dos produtos de restrição para os SNPs -174 G/C, 97 C/T e -217 A/G.

Tabela 3. Fragmentos dos produtos de restrição dos SNPs -174 G/C (*IL-6*), 97 C/T (*KCNE5*) e -217 A/G (*AGT*).

Polimorfismo	Genótipo			Tamanho do produto da PCR íntegro
	GG	GC	CC	
-174 G/C	164 pb	53 pb	53 pb	226 pb
	62 pb	62 pb	62 pb	
		111 pb	111 pb	
		164 pb		
97 C/T	CC / C*	CT	TT / T*	209 pb
	47 pb	47 pb	47 pb	
97 C/T	48 pb	48 pb	162 pb	209 pb
	114 pb	114 pb		
		162 pb		
-217 A/G	GG	GA	AA	310 pb
	40 pb	40 pb	40 pb	
-217 A/G	43 pb	43 pb	43 pb	310 pb
	99 pb	99 pb	227 pb	
	128pb	128pb		
		227 pb		

Nota: O polimorfismo 97 C/T está localizado no cromossomo X, portanto indivíduos do sexo masculino possuem o alelo C ou o alelo T.

3.8. Sequenciamento de DNA

Os resultados de genotipagem pela PCR-RFLP para os SNPs -174 G/C, 97 C/T e -217 A/G foram confirmados por sequenciamento de DNA.

Na composição dos reagentes para PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, iniciadores 10 µmoles/L (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), deoxinucleotídeos (dNTPs) 10 mmoles/L (GE HealthCare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, Brasil), DNA polimerase 1 U e tampão de reação 10X (Tris-HCl a 75 mM (pH 9,0)), MgCl₂ a 2 mM, KCl a 50 mM, (NH₄)₂ SO₄ a 20 mM) em volume final com água MilliQ autoclavada de 25 µl.

Para o sequenciamento do SNP -174 G/C, a PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98°C por 3 minutos, seguida da etapa de amplificação: desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridização dos iniciadores de 56°C a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Esta etapa foi realizada

com 30 ciclos. Após a etapa de amplificação, realizou-se polimerização final, onde a temperatura se mantém em 72°C por 10 minutos.

Para o sequenciamento dos SNPs 97 C/T e -217 A/G, os produtos da PCR foram gerados nas mesmas condições descritas anteriormente, mas com temperaturas de hibridização de 62°C por 1 minuto e 15 segundos.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se colunas de purificação por tamanho molecular (GFX™ PCR DNA and gel band purification kit, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), seguindo as recomendações do fabricante.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). A separação eletroforética foi realizada por 30 minutos a 100 V e 60 mA, utilizando-se a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, SP).

Os produtos da PCR foram visualizados sob a luz UV após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e fotodocumentadas por sistema de captura de imagem *Chemilmager™ 4.400* (v 5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

As concentrações dos produtos da PCR foram determinadas comparando-se as intensidades com as o marcador de massa molecular de DNA (*Low Mass DNA Ladder*, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

O sequenciamento de DNA foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo) a partir do produto de PCR purificado produzido em nosso laboratório. Para essa finalidade, foi utilizado kit comercial *DYEnamic ET Dye Terminator Kit com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase* (GE Health Care, Chalfont St. Giles, Reino Unido) de acordo com as instruções do fornecedor e separados no sistema de eletroforese de alta resolução *MegaBace 1000* (GE Health Care, Reino Unido).

As seqüências foram então, analisadas em nosso laboratório utilizando-se o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v .7.0.9, disponível na página da internet (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

A genotipagem pela PCR-RFLP não pode ser confirmada para o SNP -174 G/C, pois os primers sense e antisense escolhidos para a análise do SNP estão localizados muito próximos da região polimórfica impedindo a análise efetiva da seqüência.

Para o SNP 97C/T, não foram confirmados todos os genótipos, pois quando as amostras foram enviadas para sequenciamento ainda não havíamos no estudo indivíduos com todos os genótipos possíveis do SNP.

O genótipo AA (homozigoto para o alelo raro) do SNP -217 A/G também não pode ser confirmado, por motivo semelhante ao descrito anteriormente, com relação ao SNP 97C/T.

Os eletroferogramas das reações de sequenciamento dos SNP 97 C/T e -217 A/G estão ilustrados nas **Figuras 11 e 12**, respectivamente.

Figura 11. Eletroferogramas do sequenciamento de DNA para o SNP 97 C/T do gene *KCNE5*. (A). Genótipo CC (indivíduo do sexo feminino); (B). Genótipo T (indivíduo do sexo masculino); (C). Genótipo C (indivíduo do sexo masculino).

Figura 12. Eletroferogramas do sequenciamento de DNA para o SNP -217 A/G do gene *AGT*. (A). Genótipo GG e (B). Genótipo GA.

3.9. Análise da expressão de RNAm pela RT-PCR em tempo real

A quantificação da expressão de mRNA do genes *IL-6*, *KCNE5* e *AGT* foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Como controle endógeno da expressão de RNAm dos genes em estudo analisamos a expressão de RNAm do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*).

A primeira etapa consistiu da síntese de cDNA a partir de 200 ng de RNA, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 µM dNTP 10 mM (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™ II RT RNase H⁻) e tampão de RT (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM) (Invitrogen, MD, EUA). O ensaio de RT foi realizado no termociclador *Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Os iniciadores e sondas usados para amplificar o cDNA da *IL-6*, *KCNE5* e *AGT*, pela PCR em tempo real foram selecionados utilizando o programa *Primer Express®* v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com base nas seqüências gênicas disponíveis no banco de genes do NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov) e estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real

Genes	Iniciadores	Fragmento
<i>IL-6</i>	5' AGCCCTGAGAAAGGAGACATGTA3' 5' TCTGCCAGTGCCTCTTTGCT3'	66 pb
<i>KCNE5</i>	5' TGCCATCTTCTGCTGAGGATT3' 5'GAGGAGAGGCATTTGGAAGTACTG3'	67 pb
<i>AGT</i>	5' TGGGTACTACAGCAGAAGGGTATG3' 5' ACCGGCAGGAGCCATCTC3'	63 pb
<i>GAPDH</i>	5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA3' 5' CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC3'	230 pb

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov. Números de Acesso GenBank: NM 000600, NM 012282.2 e NM 000029.2

Na segunda etapa, o cDNA de cada gene foi amplificado pela PCR em tempo real, utilizando-se os iniciadores na concentração final de 300 nM, sondas de detecção marcadas com FAM na concentração final de 250 nM, 10 ng de cDNA, solução denominada *Master Mix* (demais componentes da PCR) (MgCl_2 25 mM, dNTPs 10 mM, AmpErase^R UNG 30U, enzima AmpliTaq Gold 150 U e tampão de reação) (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) sendo que essa solução foi diluída 2 vezes para uso. O volume final com água DEPEC autoclavada foi de 10 μl e foram realizados em duplicata.

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

A fluorescência das sondas *TaqMan* foram detectados pelo equipamento *ABI Prism 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *7500 Fast System SDS Software v. 1.4 0.25* (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) que geram curvas semi-logarítmicas de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro denominado *ciclo threshold* (C_t) (BUSTIN, 2000; LIVAK & SCHMITTGEN 2001). Para cada amostra cDNA, o C_t de cada gene é registrado e comparado com o do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase que é utilizado como controle endógeno.

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 (1:2, 1:4 e 1:8) de cDNA de amostras usadas apenas para teste da PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de C_t foram plotados em gráfico que permite 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 fórmula ($E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100$), onde α é a inclinação da curva (PFAFFL, 2001). Segundo LIVAK e SCHMITTGEN, 2001, para a PCR em tempo real ter alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3, como demonstrado na **Figura 13**. Quando esses critérios não são atendidos, é necessário verificar as concentrações de iniciadores e sondas em outras curvas-padrão.

Figura 13. Curva-padrão do gene da IL-6. CT: threshold cycle.

Na **Tabela 5**, são 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
<i>IL-6</i>	- 3,30	100%
<i>KCNE5</i>	- 3,30	100%
<i>AGT</i>	- 3,38	98%
<i>GAPDH</i>	- 3,43	96%

O cDNA das amostra de pacientes foi diluído 1X que corresponde à quantidade de cDNA intermediária nas curvas-padrão para a maioria dos genes. Os valores de Ct obtidos nas PCRs foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPDH* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Os valores de ΔCt do cDNA das amostras dos pacientes no pós-operatório foram normalizados em relação ao Delta Ct médio do cDNA dos pacientes no pré-operatório, utilizando-se o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) que é calculado pela fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{pós-operatório}} - \Delta Ct_{\text{pré-operatório}})$$

Os dados de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases (pré e pós-operatório) e entre os portadores de diferentes genótipos estudados. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após o tratamento.

3.10. Controle de qualidade da PCR-RFLP e RT-PCR

As PCRs foram monitorizadas utilizando-se um tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a amplificação, exceto a amostra de DNA ou cDNA, em cada conjunto de reações. As PCRs em tempo real para cada amostra foram realizadas em duplicata.

Os produtos de PCR-RFLP dos polimorfismos -174 G/C (*IL-6*), 97 C/T (*KCNE5*) e -217 A/G (*AGT*) apresentam em sua seqüência um sítio de reconhecimento da enzima de restrição, denominado sítio constitutivo, que permitiu a avaliação da atividade enzimática durante a reação de restrição, sendo controle útil da reação. Também foram repetidos 20% dos testes de PCR-RFLP para cada polimorfismo, aleatoriamente.

3.11. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados através do programa *SigmaStat v 1.0* (SPSS Inc., Chicago, EUA). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

Para avaliar as diferenças de freqüências das variáveis qualitativas como obesidade e sexo foram realizados o teste de qui-quadrado.

Todos os indivíduos incluídos nesse estudo foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio (RM), e os parâmetros bioquímicos do pré e pós-operatório desses indivíduos foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*. Para esta comparação, os grupos foram divididos em grupo de estudo (GFA) e grupo controle (GC), onde primeiramente comparamos os dados do pré e pós-operatório de cada grupo e depois, comparamos o pré e pós-operatório entre os GFA e GC pelo teste de *Mann-Whitney Rank Sum*.

Observamos que nossas amostras apresentavam elevados valores de desvio padrão, que prejudicaria a análise dos dados, então para darmos maior confiabilidade às análises estatísticas optamos por analisarmos os dados com testes não paramétricos e para isso as análises foram verificadas com o teste de *Wilcoxon*. Para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos estudados utilizamos o teste *Mann-Whitney Rank Sum*.

Para as análises dos polimorfismos genéticos, os indivíduos negros foram agrupados com os indivíduos pardos, a fim de aumentar o poder estatístico dos testes. Para a mesma finalidade, os genótipos heterozigóticos foram agrupados com o genótipo heterozigótico do alelo raro. A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada utilizando o programa *MS-DOS Q Basic v. 1.1* (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil). A relação entre os genótipos e o perfil bioquímico foi comparado por teste *Mann-Whitney Rank Sum*.

Os valores de expressão foram transformados em logaritmo para fazer os testes paramétricos. Para avaliar a influência dos polimorfismos -174 G/C (*IL-6*) e 97 C/T (*KCNE5*) nas expressões gênicas dos genes *IL-6* e *KCNE5* foram utilizados os testes teste *t* de Student e o teste de *Wilcoxon*.

Para avaliar a correlação da concentração plasmática de *IL-6* com a expressão de RNAm do gene da *IL-6*, em LTSP e tecido, foi realizado o teste de Correlação de Pearson. O mesmo teste foi utilizado para avaliar a correlação da expressão de RNAm em LTSP e em apêndice auricular direito do gene *KCNE5*.

4. RESULTADOS

Foram analisados 68 pacientes, sendo que 16 desenvolveram FAPo e foram incluídos no grupo de estudo (GFA), 52 não desenvolveram FAPo e foram incluídos no grupo controle (GC).

4. 1. Resultados do grupo com FAPo e do grupo sem FAPo

4.1.1. Dados dos pacientes

Na **Tabela 6**, são apresentados os dados de características clínicas e variáveis antropométricas dos indivíduos do grupo de estudo com FAPo (GFA) e do grupo controle sem FAPo (GC).

Tabela 6. Características clínicas e variáveis antropométricas dos indivíduos incluídos no grupo de estudo (GFA) e no grupo controle (GC).

Variável	GFA (16)	GC (52)	
Gênero (Masculino/Feminino)	12/4	40/12	p = 0,043 ^c
Etnia (brancos/negros)	10/6	41/11	p = 0,202 ^c
Idade (anos)	65 ± 8	59 ± 8	p < 0,001 ^a
IMC (Kg/m ²) *	29 ± 4	28 ± 5	p = 0,477 ^b
Tabagista (%)	25	23	p = 1,000 ^c
Hipertensão (%)	100	94	p = 1, 000 ^c
Pressão Sistólica (mmHg)	140 ± 18	130 ± 20	p = 0,133 ^b
Pressão Diastólica (mmHg)	80 ± 14	80 ± 15	p = 0,688 ^b
Diabetes Mellitus (%)	50	40	p = 0,696
Obesidade (%)	31	23	p = 0,523 ^c
IAM prévio (%)	44	67	p = 0,161
Tempo em CEC (minutos)	70 ± 27	80 ± 27	p = 0,365 ^b
Tempo de anoxia (minutos)	44 ± 20	55 ± 15	p = 0,447 ^a
Uso de beta bloqueador (%)	69	63	p = 0,930

Nota: Número de indivíduos em parênteses. *Índice de massa corpórea.

Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste t de Student ^(a) ou Mann Whitney Rank Sum Test ^(b). Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (X²) e Teste Exato de Fischer ^(c).

Observou-se maior frequência relativa de homens em ambos os grupos (GFA = 12 vs. GC = 40). Além disso, a distribuição de homens e mulheres no grupo com FAPo comparados com grupo sem FAPo foi diferente ($p = 0,043$). Tanto no grupo com FAPo, como no grupo sem FAPo pode-se observar o predomínio de indivíduos brancos (GFA = 10 vs. GC = 41), e a distribuição de indivíduos brancos e negros, foi similar no grupo com FAPo e sem FAPo ($p = 0,202$).

Como já descrito na literatura a média de idade foi maior no grupo com FAPo ($p < 0,001$) do que no grupo sem FAPo.

Os grupos com FAPo e sem FAPo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao IMC (GFA = 29 ± 4 vs. GC = 28 ± 5 ; $p = 0,477$), pressão sistólica (GFA = 140 ± 18 vs. GC = 130 ± 20 ; $p = 0,133$), pressão diastólica (GFA = 80 ± 14 vs. GC = 80 ± 15 ; $p = 0,688$).

Alguns parâmetros, tais como o tempo de circulação extracorpórea (CEC) (GFA = 70 ± 27 vs. GC = 80 ± 27 ; $p = 0,365$) e o tempo de anoxia (GFA = 44 ± 20 vs. GC = 55 ± 15 ; $p = 0,447$) dos indivíduos submetidos à cirurgia de RM também foram avaliados e não houve diferenças significativas entre os grupos, contudo o tempo de CEC e de anoxia no grupo sem FAPo foi maior que no grupo com FAPo, ao contrário do que esperávamos.

No GFA e GC não houve diferença estatística com relação a tabagismo (GFA = 4 vs. GC = 12 $p = 1,000$), hipertensão (GFA = 16 vs. GC = 33; $p = 1,000$), diabetes (GFA = 8 vs. GC = 21; $p = 0,696$), obesidade (GFA = 5 vs. GC = 12; $p = 0,523$) e infarto agudo do miocárdio (IAM) prévio (GFA = 7 vs. GC = 35; $p = 0,161$). Apesar dos dados não serem significativos, obteve-se resultado não esperado entre os grupos, tais como o IAM prévio que apresentou maior frequência no grupo controle do que no grupo de estudo.

O uso de beta-bloqueadores não influenciou na prevenção do desenvolvimento da fibrilação atrial pós cirúrgica (GFA = 11 vs. GC = 33; $p = 0,930$). A porcentagem de indivíduos que utilizavam beta bloqueadores, no pré-operatório da cirurgia cardíaca, foi semelhante em ambos os grupos.

Para avaliação de possíveis eventos isquêmicos foram utilizados os marcadores CK e CKMB. A concentração plasmática de PCRus e IL-6 foram avaliadas como marcadores de inflamação sistêmica. Os pacientes do GFA e GC apresentaram aumento significativo nas concentrações séricas desses marcadores, entre o pré e pós-operatório ($p < 0,001$ e $p = 0,002$), porém esses aumentos não foram

significativos entre os grupos, como foi demonstrado nas **Figuras 14, 15, 16 e 17** (CK; $p=0,789$ e $p=0,680$; CKMB; $p=0,856$ e $p=0,701$; PCRus; $p=0,806$ e $p=0,247$; IL-6; $p=0,887$ e $p=0,988$).

Figuras 14 e 15: Boxes plots das concentrações séricas de CK e CKMB em indivíduos do GFA e do GC, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). CK: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatina-fosfoquinase.

Figuras 16 e 17: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GFA e do GC, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana,

distância interquartilica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6.

4.1.2. Análise dos polimorfismos genéticos

A análise das freqüências relativas dos alelos a distribuição dos genótipos dos SNPs -174 G/C (*IL-6*), 97C/T (*KCNE5*) e -217 A/G (*AGT*) nos pacientes do GFA e do GC, podem ser observadas nas **Tabelas 7, 8 e 9**.

Tabela 7. Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos do SNP -174 G/C IL-6 em pacientes sem FAPo (GC) e com FAPo (GFA), separados por gênero e na população total.

Gênero	Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
		-174 G/C	GG	GC	CC	G
Mulheres	GC	42%	33%	25%	58,3%	41,7%
	(12)	(5)	(4)	(3)	(14)	(10)
	GFA	75%	25%	0%	87,5%	12,5%
	(4)	(3)	(1)	(0)	(7)	(1)
X ² = 1,733 (2df, p=0,420)					X ² = 1,154 (1df, p=0,283)	
Homens	GC	48%	50%	2%	73,5%	27,5%
	(40)	(19)	(20)	(1)	(58)	(22)
	GFA	50%	42%	8%	70,8%	29,2%
	(12)	(6)	(5)	(1)	(17)	(7)
X ² = 0,962 (2df, p=0,618)					X ² = 0,00996 (1df, p=0,920)	
População total	GC	46%	46%	8%	69,2%	30,8%
	(52)	(24)	(24)	(4)	(72)	(32)
	GFA	56%	38%	6%	75%	25%
	(16)	(9)	(6)	(1)	(24)	(8)
X ² = 0,499 (2df, p=0,779)					X ² = 0,164 (1df, p=0,686)	

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (X^2) ou Teste Exato de Fischer ^(c).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP -174G/C(*IL-6*): GFA, $X^2 = 0,0$ (1 df, p> 0.05) e GC, $X^2 = 0,356$ (1 df, p> 0.05).

Tabela 8. Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos do SNP 97 C/T KCNE5 em pacientes sem FAPo (GC) e com FAPo (GFA), separados por gênero e na população total.

Gênero	Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
		97 C/T*	CC/C	CT	TT/T	C
Mulheres	GC	85%	15%	0%	92,3%	7,7%
	(13)	(11)	(2)	(0)	(24)	(2)
	GFA	100%	0%	0%	100%	0%
	(4)	(4)	(0)	(0)	(8)	(0)
p=1,000 ^c				p=1,000 ^c		
Homens	GC	87%	-	13%	87,2%	12,8%
	(39)	(34)	-	(5)	(34)	(5)
	GFA	100%	-	0%	100%	0%
	(12)	(12)	-	(0)	(12)	(0)
p=1,000 ^c				p=1,000 ^c		
População total	GC	87%	3%	10%	89,2%	10,8%
	(52)	(45)	(2)	(5)	(58)	(7)
	GFA	100%	0%	0%	100%	0%
	(16)	(16)	(0)	(0)	(20)	(0)
p=1,000 ^c				p=0,191 ^c		

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (X^2) ou Teste Exato de Fischer ^(c). SNP localizado no cromossomo X.

Tabela 9. Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos do SNP -217 A/G AGT em pacientes sem FAPo (GC) e com FAPo (GFA), separados por gênero e na população total.

Gênero	Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
		-217 A/G	GG	GA	AA	G
Mulheres	GC	50%	40%	10%	70,0%	30,0%
	(10)	(5)	(4)	(1)	(14)	(6)
	GFA	75%	25%	0%	87,5%	12,5%
	(4)	(3)	(1)	(0)	(7)	(1)
		p=1,000 ^c			p=0,633 ^c	
Homens	GC	80%	20%	0%	89,7%	10,3%
	(39)	(31)	(8)	(0)	(70)	(8)
	GFA	75%	25%	0%	87,5%	12,5%
	(12)	(9)	(3)	(0)	(21)	(3)
		p=1,000 ^c			p=1,000 ^c	
População total	GC	71%	27%	2%	84,1%	15,9%
	(44)	(31)	(12)	(1)	(74)	(14)
	GFA	75%	25%	0%	87,5%	12,5%
	(16)	(12)	(4)	(0)	(28)	(4)
		p=1,000 ^c			p=1,000 ^c	

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fischer ^(c).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP -217A/G(AGT): GFA, $\chi^2 = 0,315$ (1df, $p > 0,05$) e GC, $\chi^2 = 0,006$ (1df, $p < 0,05$).

Os SNPs *IL-6* -174 G/C e *AGT* -217 A/G estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Não há diferença significativa ($p > 0,05$) na frequência gênica ou genotípica entre o grupo de indivíduos com FAPo (GFA) e sem FAPo (GC), sugerindo que os polimorfismos estudados não parecem associados com o desenvolvimento da FAPo em cirurgia cardíaca de RM.

Ao analisar separadamente as frequências alélicas e genotípicas dos pacientes do grupo GC, observa-se que a distribuição de genótipos e as frequências relativas de alelos dos SNPs *IL-6* -174 G/C e *AGT* -217 A/G é similar entre homens e mulheres ($p > 0,05$).

O SNP *KCNE5* 97 C/T está localizado no cromossomo X, portanto indivíduos do gênero masculino apresentam somente o alelo C ou o alelo T, enquanto indivíduos do gênero feminino podem apresentar os 3 genótipos (CC, CT e TT). Para melhor interpretação dos resultados, analisamos separadamente os gêneros, porém os dados não são representativos, uma vez que, os números totais de

pacientes e de indivíduos do gênero feminino incluídos no estudo foi pequeno, o que impossibilita uma análise mais precisa.

Na avaliação de possíveis eventos isquêmicos, foram avaliadas as concentrações de CK e CKMB. Como se observam nas **Figuras 18 e 19**, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C ($p>0,05$). Nas **Figuras 20 e 21**, são apresentados os dados das concentrações séricas de PCRus e IL-6, no pré e pós-operatório, dos indivíduos com FAPo (GFA) separados de acordo com os genótipos do polimorfismo *IL-6* -174 G/C. Para aumentar o poder estatístico do teste os genótipos GC e CC foram agrupados. Não houve aumento significativo de PCRus e IL-6 plasmática entre os diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C ($p>0,05$) no GFA.

Figuras 18 e 19: Boxes plots das concentrações séricas de CK e CKMB em indivíduos do GFA portadores de diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 20 e 21: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GFA portadores de diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina-6.

Nas **Figuras 22 e 23**, são apresentadas as concentrações plasmáticas de CK e CKMB dos indivíduos sem FAPo (GC), antes e após a cirurgia, separados de acordo com os diferentes genótipos do polimorfismo *IL-6* -174 G/C. Pode-se observar que não há diferenças significativas entre os genótipos GG vs. GC/CC ($p > 0,05$).

Os mesmos resultados, não significativos, foram observados para os marcadores PCRus e IL-6 entre os diferentes genótipos do grupo sem FAPo (GC), como se pode observar nas **Figuras 24 e 25**, respectivamente. As concentrações séricas, antes e após a cirurgia, de PCRus e IL-6 apresentaram diferenças significativas, como já era esperado.

Figuras 22 e 23: Boxes plots das concentrações séricas de CK e CKMB em indivíduos do GC portadores de diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 24 e 25: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GC portadores de diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6.

Na **Tabela 10**, são apresentadas as concentrações séricas das análises laboratoriais realizadas. Nesta tabela, são demonstrados os GFA e GC e seus resultados nos diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C.

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos dos grupos sem FAPo (GC) e com FAPo (GFA), no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, nos diferentes genótipos do SNP *IL-6* -174 G/C.

Variáveis		(GC) Grupo controle (52)			(GFA) Grupo de estudo (16)		
		-174 GG (24)	-174 GC/CC (28)	p**	-174 GG (9)	-174 GC/CC (7)	p**
CK (U/L)	Pré-operatório	62 (320-23)	69 (256-16)	0,680	53 (90-27)	73 (103-30)	0,159
	Pós-operatório	776 (4391-337)	763 (2887-181)	0,755	1017 (4055-379)	1046 (2041-290)	1,000
CKMB (U/L)	Pré-operatório	14 (41-1)	11 (27-2)	0,151	14 (22-10)	9 (22-0)	0,239
	Pós-operatório	27 (123-3)	30 (86-13)	0,594	34 (191-13)	23 (55-5)	0,458
PCRus (mg/L)	Pré-operatório	3,2 (76,0-0,2)	4,3 (26,7-0,5)	0,854	3,2 (45,9-1,0)	3,4 (25,2-1,1)	1,000
	Pós-operatório	172,8 (383,7-1,7)	160,8 (408,0-8,7)	0,517	126,4 (244,8-28,1)	139,1 (232,2-8,4)	0,949
IL-6 (pg/mL)	Pré-operatório	6,4 (108-2,3)	3,8 (112,0-2,0)	0,376	5,5 (8,9-2,3)	5,2 (11,9-4,2)	0,415
	Pós-operatório	75,1 (238,0-2,0)	56,3 (442,0-2,8)	0,876	30,1 (341-13,9)	65,6 (241-43,3)	0,290

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os valores são apresentados como mediana (valor máximo - valor mínimo) dos dados. CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatina-fosfoquinase; PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6. Comparados por: ** Mann-Whitney Rank Sum.

Na avaliação de possíveis eventos isquêmicos, utilizaram-se as atividades de CK e CKMB. Como se observam nas **Figuras 26 e 27**, respectivamente. Indivíduos portadores do genótipo GG apresentaram valores elevados significativos entre o pré e pós-operatório da cirurgia, comparados pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). Na comparação dos genótipos GG vs. GA/AA no pré-operatório da cirurgia, observa-se resultados significativos ($p < 0,05$) de CKMB.

Nas **Figuras 28 e 29** estão apresentados os dados de concentrações séricas de PCRus e IL-6, antes e após a cirurgia de RM, dos indivíduos com FAPo (GFA) separados de acordo com os genótipos do polimorfismo *AGT* -217 A/G. Para melhorar o poder estatístico do teste os genótipos GA e AA foram agrupados. As concentrações de PCRus e IL-6 dos portadores dos genótipos GG foram comparados com os portadores dos genótipos GA+AA, pelo teste de Mann-Whitney e não foram significativos ($p > 0,05$).

Figuras 26 e 27: Boxes plots das concentrações séricas de CK e CKMB em indivíduos do GFA portadores de diferentes genótipos do SNP *AGT* -217 A/G, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 28 e 29: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GFA portadores de diferentes genótipos do SNP AGT -217 A/G, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6.

Para o grupo sem FAPo (GC) as análises de comparação também foram realizadas entre o pré e pós-operatório pelo teste de Wilcoxon. **Figuras 30 e 31** observam-se os marcadores de possíveis eventos isquêmicos, tais como CK e CKMB, na comparação entre o pré e pós-operatório de cada genótipo (GG e GA/AA) todos os resultados foram significativos ($p < 0,05$). Quando se comparou os valores de pré-operatório dos diferentes genótipos (GG vs. GA/AA) obteve-se valores significativos de CKMB, o mesmo ocorreu para os valores de CKMB no pós-operatório. As concentrações de PCRus e IL-6 dos portadores dos genótipos GG foram comparados com os portadores dos genótipos GA+AA, pelo teste de Mann-Whitney. Observa-se nas **Figuras 32 e 33**, que a concentração plasmática de PCRus não foi significativa nos portadores de diferentes genótipos ($p > 0,05$). O valor plasmático de IL-6 no pós-operatório de cirurgia do GC foi significativo ($p < 0,05$) nos diferentes genótipos (GG vs. GA/AA).

Figuras 30 e 31: Boxes plots das concentrações séricas de CK e CKMB em indivíduos do GC portadores de diferentes genótipos do SNP AGT -217 A/G, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os box plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 32 e 33: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GC portadores de diferentes genótipos do SNP AGT -217 A/G, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os box plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6.

Tabela 11. Parâmetros bioquímicos do grupo sem FAPo (GC) e com FAPo (GFA), no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, nos diferentes genótipos do SNP AGT -217 A/G.

Variáveis		(GC) Grupo controle (49)			(GFA) Grupo de estudo (16)		
		-217 GG (36)	-217 GA/AA (13)	p**	-217 GG (12)	-217 GA/AA (4)	p**
CK (U/L)	Pré-operatório	68 (320-16)	66 (87-23)	0,389	56 (102-27)	72 (103-54)	0,297
	Pós-operatório	776 (4391-265)	721 (1867-181)	0,319	929 (2617-290)	1544 (4055-379)	0,303
CKMB (U/L)	Pré-operatório	14 (41-2)	9 (14-1)	0,002	11 (18-0,1)	19 (22-14)	0,021
	Pós-operatório	32 (123-15)	20 (74-3)	0,018	26 (191-4,7)	51 (108-24)	0,129
PCRus (mg/L)	Pré-operatório	2,5 (57,8-0,2)	5,3 (76,0-0,5)	0,267	3,3 (45,9-1,0)	10,1 (25,2-1,5)	0,856
	Pós-operatório	183,8 (383,7-1,7)	95,1 (408,0-8,7)	0,405	144,1 (244,8-19,5)	81,0 (183,0-8,4)	0,288
IL-6 (pg/mL)	Pré-operatório	3,7 (108,0-2,0)	6,4 (17,6-2,4)	0,301	5,8 (11,9-2,3)	3,5 (5,2-2,7)	0,069
	Pós-operatório	82,2 (238,0-2,0)	30,5 (156,0-3,2)	0,045	52,3 (341,0-13,9)	85,7 (143,0-43,1)	0,303

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os valores são apresentados como mediana (valor máximo - valor mínimo) dos dados. CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatina-fosfoquinase; PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6. Comparados por: **Mann-Whitney Rank Sum.

Na **Tabela 11** estão apresentadas as concentrações séricas das análises laboratoriais realizadas. Nesta tabela, são demonstrados os GFA e GC e seus resultados nos diferentes genótipos do SNP *AGT* -217 A/G.

O gene *KCNE 5* está localizado no cromossomo X, portanto indivíduos do sexo masculino possuem o alelo C u o alelo T, enquanto indivíduos do sexo feminino podem ser portadores dos genótipos CC, CT ou TT. No grupo com FAPo, agrupamos os gêneros para aumentar o poder estatístico dos testes. Nesse estudo, só obtivemos no grupo de estudo, portadores do genótipo CC (sexo feminino) e portadores do alelo C (sexo masculino).

Nas **Figuras 34 e 35** respectivamente, observam-se as atividades enzimáticas de CK e CKMB em indivíduos do GFA, no pré e pós-operatório, de cirurgia cardíaca de RM. Indivíduos portadores do genótipo CC apresentaram alterações significativas de CK quando comparados com indivíduos portadores do alelo C ($p < 0,05$). Na análise entre valores de CK e CKMB, no pré-operatório, (C vs. CC) não se observou resultados significativos. O mesmo ocorreu para valores de CKMB, no pós-operatório ($p > 0,05$).

Na avaliação dos marcadores de inflamação sistêmica, PCRus e IL-6 houve aumento significativo entre os valores de pré e pós-operatório, dos indivíduos portadores do alelo C (sexo masculino) ($p < 0,05$). Quando se comparou os valores basais (pré-operatórios) dos marcadores entre os diferentes genótipos e alelos (C vs. CC), não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$). O mesmo ocorreu para o pós-operatório, conforme observam-se nas **Figuras 36 e 37**.

Figuras 34 e 35: Boxes plots das concentrações séricas de CK e CKMB em indivíduos do GFA portadores de diferentes genótipos e alelos do SNP *KCNE5* 97 C/T, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 36 e 37: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GFA portadores de diferentes genótipos e alelos do SNP *KCNE5* 97 C/T, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6.

As análises do GC para o SNP *KCNE5* 97 C/T foi dividida por gênero, uma vez que indivíduos do gênero masculino podem ser portadores dos alelos C ou T e indivíduos do gênero feminino podem ser portadores dos genótipos CC, CT e TT.

As análises do GC do gênero masculino, ou seja, indivíduos portadores dos alelos C ou T demonstraram significância estatística quanto as concentrações séricas de CK e CKMB, antes e após a cirurgia de RM ($p < 0,05$). Porém ao compararmos os valores plasmáticos de CK e CKMB, no pré-operatório, entre os diferentes alelos não foram observados valores ($p > 0,05$), ilustrados nas **Figuras 38 e 39**.

As concentrações séricas de PCRus e IL-6 apresentaram aumento significativo do pré para o pós-operatório nos portadores do alelo C ($p < 0,05$), já nos portadores do alelo T o aumento de IL-6 no pós-operatório não foi significativo ($p > 0,05$), ilustrado nas **Figuras 40 e 41**.

Figuras 38 e 39: Boxes plots das atividades enzimáticas de CK e CKMB em indivíduos do GC portadores de diferentes alelos do SNP *KCNE5* 97 C/T (gênero masculino), no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 40 e 41: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GC portadores de diferentes alelos do SNP *KCNE5* 97 C/T (gênero masculino), no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra sensível; IL-6: interleucina 6.

Também para o GC as análises de comparação foram realizadas entre o pré e pós-operatório pelo teste de Wilcoxon, com indivíduos do gênero feminino. Em parâmetros tais como, CK e CKMB, mulheres portadoras dos diferentes genótipos (CC e CT) apresentaram resultados significativos entre o pré e pós-operatório ($p < 0,05$), exceto para o valor plasmático de CK em mulheres portadoras do genótipo CT ($p > 0,05$), conforme ilustrado nas **Figuras 42 e 43**.

Nas **Figuras 44 e 45**, observam-se os marcadores de inflamação sistêmica, como PCRus e IL-6. Na comparação entre o pré e pós-operatório dos diferentes genótipos (CC e CT), os portadores dos genótipos CC apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$). Quando comparado os valores de pré-operatório dos diferentes genótipos (CC vs. CT), não observou diferenças significativas nos valores de PCRus e IL-6. O mesmo foi verificado, para esses marcadores, no pós-operatório.

Figuras 42 e 43: Boxes plots das atividades enzimáticas de CK e CKMB em indivíduos do GC portadores de diferentes genótipos do SNP *KCNE5* 97 C/T (gênero feminino), no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos). CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatinoquinase.

Figuras 44 e 45: Boxes plots das concentrações séricas de PCRus e IL-6 em indivíduos do GC portadores de diferentes genótipos do SNP *KCNE5* 97 C/T (gênero feminino), no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6.

Na **Tabela 12**, são apresentadas as concentrações séricas das análises laboratoriais realizadas. Nesta tabela, são demonstrados os GFA e GC e seus resultados nos diferentes genótipos e alelos do SNP *KCNE5* 97 C/T.

Tabela 12. Parâmetros bioquímicos em indivíduos do sexo feminino e masculino grupo controle GC (sem FAPo) e do grupo de estudo GFA (com FAPo) nos diferentes genótipos do polimorfismo 97 C/T do gene KCNE..

Variáveis		(GC) Grupo controle						(GFA) Grupo de estudo		
		Sexo feminino (13)			Sexo masculino (39)			Sexo masculino (12)	Sexo feminino (4)	
		97 CC (11)	97 CT (2)	p**	97 C (34)	97 T (5)	P**	97 C (12)	97 CC (4)	p**
CK (U/L)	Pré-operatório	46 (116-16)	79 (85-73)	0,24 0	68 (256-20)	82 (320-64)	0,10 6	72 (103-30)	47 (73-27)	1,000
	Pós-operatório	673 (4391-181)	840 (1132-548)	0,76 7	747 (3746-265)	1093 (2681-708)	0,12 5	849 (2041-290)	1940 (4055-840)	0,004
CKMB (U/L)	Pré-operatório	14 (19-3)	19 (25-12)	0,20 4	13 (27-1)	12 (41-7)	0,81 7	14 (22-5)	13 (18-0)	0,425
	Pós-operatório	24 (123-9)	33 (38-27)	0,83 0	28 (86-3)	22 (66-20)	0,41 2	26 (55-13)	73 (191-5)	0,363
PCRus (mg/L)	Pré-operatório	3,4 (29,5-1,8)	1,3 (2,0-0,5)	0,26 8	5,5 (76,0-0,2)	0,9 (3,2-0,5)	0,04 2	4,9 (45,9-1,0)	2,3 (18,1-1,1)	0,505
	Pós-operatório	81,9 (331,0-1,7)	208,0 (154,5-163,0)	0,42 5	171,3 (408,0-8,7)	166,0 (188,0-65,0)	0,67 4	141,6 (244,8-8,4)	94,5 (170,0-28,1)	0,421
IL-6 (pg/mL)	Pré-operatório	3,7 (112,0-2,5)	4,2 (4,8-3,5)	0,92 1	6,2 (35,5-2,0)	3,0 (108,0-2,4)	0,41 1	5,0 (11,9-2,3)	6,2 (8,9-2,7)	0,823
	Pós-operatório	85,6 (156,0-11,8)	64,4 (108,0-20,8)	0,75 5	68,0 (442,0-2,0)	6,4 (116,0-7,2)	0,43 7	52,3 (341,0-13,9)	104,5 (241,0-30,1)	0,249

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os valores são apresentados como mediana (valor máximo - valor mínimo) dos dados. CK total: creatinoquinase; CKMB: fração MB da creatina-fosfoquinase; PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; IL-6: interleucina 6. Comparados por: **Mann-Whitney Rank Sum.

4.1.3. Resultados de expressão gênica em leucócitos totais de sangue periférico

As expressões de mRNA do gene *IL-6* e *KCNE5* em leucócitos totais de sangue periférico (LTSP) foram analisadas em 16 indivíduos do GFA e 52 do GC. Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPDH* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt). Os valores de ΔCt do cDNA das amostras de pacientes com FAPo foram normalizados em relação ao ΔCt médio do cDNA dos pacientes sem FAPo, utilizando-se o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

Os dados de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases pré e pós-operatória e entre os portadores de diferentes genótipos estudados. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após a cirurgia.

A **Figura 46** ilustra a variação de expressão gênica normalizada dos genes *IL-6* e *KCNE5*, transformada em escala logarítmica em LTSP dos indivíduos incluídos no estudo, no pré (boxes pretos) e pós (boxes brancos) à cirurgia de RM. Observa-se grande variabilidade entre os indivíduos para os genes estudados.

Figura 46: Boxes plots dos valores de expressão normalizada dos genes *IL-6* e *KCNE5* em LTSP dos indivíduos incluídos no estudo, antes e após a cirurgia de RM. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos). Número de indivíduos entre parênteses.

Para o gene *AGT* sua expressão em LTSP não foi constatada. Para demonstrar que esse gene não foi expresso em LTSP e descartou-se a possibilidade de erros metodológicos, realizou-se as análises de expressão em tecido adiposo. Como demonstrado na **Figura 47**, o gene *AGT* estava expresso em tecido adiposo, assim constatamos a não expressão desse gene em LTSP.

Figura 47: Expressão do gene *AGT* em tecido adiposo (número de ciclos = 28,5 ciclos). Número de ciclos ideal $\leq$ de 34 ciclos.

Na **Tabela 13**, são apresentados os valores medianos e os intervalos (25 e 75%) de expressão do mRNA do gene *IL-6* em LTSP, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM, do GFA e GC. A cirurgia modificou a expressão de mRNA do gene *IL-6* (GFA; $p=0,013$ e GC; $p<0,001$).

Tabela 13. Variação da expressão de mRNA do gene *IL-6*, no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em LTSP de indivíduos do GFA e GC.

Grupo	IL-6 ($2^{-\Delta Ct}$ pré) (ΔCt IL-6 ^{pré} - ΔCt GAPD ^{pré})	IL-6 ($2^{-\Delta Ct}$ pós) (ΔCt IL-6 ^{pós} - ΔCt GAPD ^{pós})	P
GFA (16)	0,000330 (0,000187 – 0,000717)	0,0000538 (0,0000386 – 0,000118)	0,013 ^a
GC (52)	0,000247 (0,000152 – 0,000456)	0,0000419 (0,0000270 – 0,0000840)	< 0,001 ^a
P	0,523 ^b	0,450 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão são apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test^(b).

Para o gene *IL-6*, considerando que os dados são menores que 1, pode-se considerar que os pacientes do GFA e GC têm menor expressão no pós-operatório que o GFA e GC no pré-operatório, e aparentemente a expressão do gene *IL-6* não foi alterada no GFA em relação ao GC. Pode-se então, concluir que a expressão do gene *IL-6* em LTSP parece não estar associada ao desenvolvimento da FAPo.

Na **Figura 48**, é demonstrada a expressão normalizada do gene *IL-6* representada na Tabela 13.

Figura 48: Scatters dots plots da variação de expressão normalizada de RNAm do gene *IL-6*, no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em LTSP de indivíduos do GFA e GC. Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test^(b).

Na **Tabela 14** estão demonstradas a expressão *IL-6* em indivíduos do GFA nos diferentes genótipos do SNP -174 G/C. Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre os pré-operatórios nos diferentes genótipos (GG vs. GC/CC) ($p>0,05$), o mesmo ocorreu no pós-operatório. Já a expressão entre pré e pós-operatório de cada genótipo foram observadas diminuições significativas de expressões de RNAm ($p<0,05$). Pode-se ainda constatar que indivíduos portadores do genótipo GG tiveram seus valores de expressão menores, do pré para o pós-operatório, do que os indivíduos portadores dos genótipos GC+CC.

Tabela 14. Influência do polimorfismo -174 G/C na expressão de mRNA do gene *IL-6* em LTSP em indivíduos do GFA, antes e após a cirurgia de RM.

GFA	GG (9)	GC+CC (7)	**P (GG vs. GC/CC)
IL-6 $2^{-\Delta ct}$ pré (Δct IL6 ^{pré} - Δct GAPD ^{pré})	0,000234 (0,000172- 0,000642)	0,000222 (0,000187- 0,000995)	1,000 ^b
IL-6 $2^{-\Delta ct}$ pós (Δct IL6 ^{pós} - Δct GAPD ^{pós})	0,000053 (0,000036- 0,000103)	0,000075 (0,000039- 0,000118)	0,792 ^b
P	0,021 ^a	0,031 ^a	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por: Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e **Mann-Whitney ^(b).

Na **Tabela 15** estão demonstradas a expressão *IL-6* em indivíduos do GC nos diferentes genótipos do SNP -174 G/C. Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre os pré-operatórios nos diferentes genótipos (GG vs. GC/CC) ($p > 0,05$), o mesmo ocorreu no pós-operatório. Já a expressão entre pré e pós-operatório de cada genótipo foram observadas diminuições significativas de expressões de RNAm ($p < 0,05$). Pode-se ainda constatar que indivíduos portadores do genótipo GC+CC tiveram seus valores de expressão menores, do pré para o pós-operatório, do que os indivíduos portadores dos genótipos GG.

Tabela 15. Influência do polimorfismo -174 G/C na expressão de mRNA do gene *IL-6* em LTSP em indivíduos do GC, antes e após a cirurgia de RM.

GC	GG (24)	GC+CC (28)	**P (GG vs. GC/CC)
IL-6 $2^{-\Delta ct}$ pré (Δct IL6 ^{pré} - Δct GAPD ^{pré})	0,000240 (0,000156- 0,000551)	0,000222 (0,000187- 0,000995)	0,857 ^b
IL-6 $2^{-\Delta ct}$ pós (Δct IL6 ^{pós} - Δct GAPD ^{pós})	0,000249 (0,000151- 0,000448)	0,000039 (0,000026- 0,000070)	0,278 ^b
P	<0,001 ^a	<0,001 ^a	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por: Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e **Mann-Whitney ^(b).

Na **Tabela 16** estão apresentados os valores medianos e os intervalos (25 e 75%) de expressão do mRNA do gene *KCNE5* em LTSP, no pré e pós-operatório de cirurgia cardíaca de RM, do GFA e GC. A cirurgia de RM não modificou a expressão de mRNA do gene *KCNE5* (GFA; $p=0,277$ e GC; $p=0,969$).

Tabela 16. Variação da expressão de mRNA do gene *KCNE5*, no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em LTSP de indivíduos do GFA e GC.

Grupo	KCNE5 ($2^{-\Delta Ct}$ pré) (ΔCt KCNE5 ^{pré} - ΔCt GAPD ^{pré})	KCNE5 ($2^{-\Delta Ct}$ pós) (ΔCt KCNE5 ^{pós} - ΔCt GAPD ^{pós})	P
GFA (16)	0,0151 (0,0056 – 0,0377)	0,0048 (0,0024 – 0,0176)	0,277 ^a
GC (52)	0,0149 (0,0052 – 0,0410)	0,0160 (0,0061 – 0,0517)	0,969 ^a
P	0,870 ^b	0,063 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão são apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test ^(b).

Para o gene *KCNE5*, considerando que os dados são menores que 1, pode-se considerar que os pacientes do GFA e GC têm menor expressão no pós-operatório que o GFA e GC no pré-operatório, portanto a expressão do gene *KCNE5* não foi alterada no GFA em relação ao GC. Pode-se então, concluir que a expressão do gene *KCNE5* em LTSP não está associada ao desenvolvimento da FAPo.

Na **Figura 49** está demonstrada a expressão normalizada do gene *KCNE5* representada na Tabela 16.

Figura 49: Scatters dots plots da variação de expressão normalizada de RNAm do gene *KCNE5*, no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em LTSP de indivíduos do GFA e GC. Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test^(b).

Na **Tabela 17** estão demonstradas a expressão *KCNE5* em indivíduos do GFA nos diferentes genótipos do SNP 97 C/T. Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre os pré-operatórios nos diferentes genótipos e alelos (CC vs. C) ($p>0,05$), o mesmo ocorreu no pós-operatório. Para os valores de expressão entre pré e pós-operatório de cada genótipo, foram observados diminuições nas expressões de RNAm deste gene, porém essa diminuição não foi significativa ($p>0,05$).

Tabela 17. Influência do polimorfismo 97 C/T na expressão de mRNA do gene *KCNE5* em LTSP em indivíduos do GFA, antes e após a cirurgia de RM.

GFA	CC (4)	C (12)	**P (CC vs. C)
KCNE5 2 ^{-Δct} pré (Δct KCNE5 ^{pré} - Δct GAPD ^{pré})	0,0217 (0,0102-0,0642)	0,0126 (0,00427-0,0333)	0,613 ^b
KCNE5 2 ^{-Δct} pós (Δct KCNE5 ^{pós} - Δct GAPD ^{pós})	0,0070 (0,0045-0,441)	0,00392 (0,00205-0,0156)	0,348 ^b
P	1,000 ^a	0,204 ^a	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores de expressão são apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test ^(b).

Na **Tabela 18** estão demonstradas a expressão *KCNE5* em indivíduos do GC do sexo masculino nos diferentes alelos do SNP 97 C/T. Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre os pré-operatórios nos diferentes alelos (C vs. T) ($p>0,05$), o mesmo ocorreu no pós-operatório. Na expressão entre pré e pós-operatório de cada alelo foram observados aumento de expressões de RNAm, porém esse aumento não foi significativo ($p>0,05$). Pode-se ainda constatar que indivíduos portadores do alelo T tiveram seus valores de expressão maiores, do pré para o pós-operatório, do que os indivíduos portadores do alelo C.

Tabela 18. Influência do polimorfismo 97 C/T na expressão de mRNA do gene *KCNE5* em LTSP em indivíduos do GC do sexo masculino, antes e após a cirurgia de RM.

GC (sexo masculino)	C (34)	T (2)	**P (C vs. T)
KCNE5 2 ^{-Δct} pré (Δct KCNE5 ^{pré} - Δct GAPD ^{pré})	0,0116 (0,0050-0,0224)	0,286 (0,0206-0,551)	0,127 ^b
KCNE5 2 ^{-Δct} pós (Δct KCNE5 ^{pós} - Δct GAPD ^{pós})	0,0145 (0,0059-0,0313)	0,638 (0,0047-1,272)	0,749 ^b
P	0,681 ^a	0,514 ^a	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores de expressão são apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test ^(b).

Na **Tabela 19** estão demonstradas a expressão *KCNE5* em indivíduos do GC do sexo feminino nos diferentes genótipos do SNP 97 C/T. Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas entre os pré-operatórios nos diferentes genótipos (CC vs. CT) ($p>0,05$), o mesmo ocorreu no pós-operatório. Na expressão entre pré e pós-operatório de cada genótipo foram observadas diminuições de expressões de RNAm do gene *KCNE5*, porém essa diminuição não foi significativa ($p>0,05$). Pode-se ainda constatar que indivíduos portadores do genótipo CC tiveram seus valores de expressão menores, do pré para o pós-operatório, do que os indivíduos portadores do genótipo CT.

Tabela 19. Influência do polimorfismo 97 C/T na expressão de mRNA do gene *KCNE5* em LTSP em indivíduos do GC do sexo feminino, antes e após a cirurgia de RM.

GC (sexo feminino)	CC (11)	CT (2)	**P (CC vs. CT)
KCNE5 $2^{-\Delta Ct}$ pré (ΔCt KCNE5 ^{pré} - ΔCt GAPD ^{pré})	0,0322 (0,0080-0,1320)	0,0072 (0,0052-0,0092)	0,237 ^b
KCNE5 $2^{-\Delta Ct}$ pós (ΔCt KCNE5 ^{pós} - ΔCt GAPD ^{pós})	0,0286 (0,0076-0,0922)	0,0043 (0,0021-0,0065)	0,163 ^b
P	0,322 ^a	0,500 ^a	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores de expressão são apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e Mann-Whitney Rank Sum Test ^(b).

As análises de correlação entre os valores de expressão de mRNA normalizados, com o controle endógeno *GAPDH*, do gene *IL-6* em LTSP e a concentração plasmática de IL-6 do GFA e do GC, antes e após a cirurgia de RM (ΔCt pós ($\Delta Ct_{gene} - \Delta Ct_{GAPDH}$) - ΔCt pré ($\Delta Ct_{gene} - \Delta Ct_{GAPDH}$)) estão representadas nas **Figuras 50, 51, 52 e 53**.

Não houve correlação significativa entre a concentração plasmática de IL-6 pré e pós-operatória e a expressão de mRNA pré e pós-operatório em LTSP do gene *IL-6* no GFA e no GC (GFA pré; $r=0,0473$, $p=0,455$); (GFA pós; $r=0,0447$, $p=0,468$); (GC pré, $r=0,0004$, $p=0,00000013$); e (GC pós; $r=0,0195$, $p=0,893$). As correlações encontradas sugerem que a expressão de RNAm em LTSP não reflete o aumento ou diminuição dessa proteína do sangue.

Figuras 50, 51, 52 e 53: Análises de correlações entre a concentração plasmática de IL-6 e a expressão de RNAm IL-6 em LTSP no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em indivíduos do GFA e do GC. IL-6: interleucina 6.

4.1.4. Resultados de expressão gênica em apêndice auricular direito

As expressões de mRNA do gene *IL-6* e *KCNE5* em auriculetta foram analisadas em 16 indivíduos do GFA e 52 do GC.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPDH* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt). Os valores de ΔCt do cDNA das amostras de pacientes com FAPo foram normalizados em relação ao ΔCt médio do cDNA dos pacientes sem FAPo, utilizando-se o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases pré e pós-operatória e entre os

portadores de diferentes genótipos estudados. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após a cirurgia.

A **Figura 54** ilustra a variação de expressão gênica normalizada dos genes *IL-6* e *KCNE5*, transformada em escala logarítmica em auriculeta dos indivíduos incluídos no estudo e submetidos à cirurgia de RM. Observa-se grande variabilidade entre os indivíduos para os genes estudados.

Figura 54: Boxes plots dos valores de expressão normalizada dos genes *IL-6* e *KCNE5* em tecido de apêndice atrial direito dos indivíduos incluídos no estudo. Os boxes plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos).

As análises de correlação entre os valores de expressão de mRNA normalizados com o controle endógeno *GAPDH* do gene *IL-6* em LTSP, antes e após a cirurgia de RM, e na auriculeta do GFA e do GC estão representada nas **Figuras 55, 56, 57 e 58**.

Não houveram correlações negativas significativas entre as expressões de RNAm em LTSP do gene *IL-6*, do pré e pós-operatório, e a expressão de RNAm do gene *IL-6* em apêndice auricular (GFA pré; $r=-0,210$, $p=0,513$); (GFA pós; $r=-0,140$, $p=0,665$); (GC pré; $r=-0,215$, $p=0,151$); e (GC pós; $r=-0,215$, $p=0,156$). As correlações encontradas sugerem que a expressão de RNAm do gene *IL-6* em LTSP não reflete o aumento ou diminuição da expressão de RNAm do gene *IL-6* em tecido (auriculeta).

Figuras 55, 56, 57 e 58: Análises de correlações entre a expressão de RNAm normalizada *IL-6* em LTSP e a expressão de RNAm *IL-6* em tecido (auricleta) no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em indivíduos do GFA e do GC. IL-6: interleucina 6.

As análises de correlação entre os valores de expressão de mRNA normalizados com o controle endógeno *GAPDH* do gene *KCNE5* em LTSP, antes e após a cirurgia de RM, e na auricleta do GFA e do GC estão representada nas **Figuras 59, 60, 61 e 62**.

Não houve correlações significativas entre as expressões de RNAm em LTSP do gene *KCNE5*, do pré e pós-operatório, e a expressão de RNAm do gene *KCNE5* em apêndice auricular (GFA pré; $r=-0,095$, $p=0,735$); (GFA pós; $r=-0,138$, $p=0,639$); (GC pré; $r=0,231$, $p=0,118$); e (GC pós; $r=0,053$, $p=0,718$). As correlações encontradas sugerem que a expressão de RNAm do

gene *KCNE5* em LTSP não reflete o aumento ou diminuição da expressão de RNAm do gene *KCNE5* em tecido (auriculeta).

Figuras 59, 60, 61 e 62: Análises de correlações entre a expressão de RNAm normalizada *KCNE5* em LTSP e a expressão de RNAm *KCNE5* em tecido (auriculeta) no pré e pós-operatório de cirurgia de RM, em indivíduos do GFA e do GC. *KCNE5*: Canal de Potássio voltagem-dependente subfamília E subunidade 5.

5. DISCUSSÃO

Na literatura, a incidência da FAPo varia de 17 % a 33% em cirurgias de revascularização do miocárdio, dados semelhantes ao de nosso estudo onde a incidência de FAPo foi de 21 % (ARANKI *et al.*, 1996).

Quanto à raça, um estudo realizado por Leung e colaboradores demonstrou que indivíduos negros têm menor risco de FAPo que indivíduos brancos (LEUNG *et al.*, 2004), entretanto em nosso estudo não foi constatada esta associação.

A associação entre FAPo e a idade avançada foi descrita em estudos com pacientes submetidos à cirurgia cardíaca de RM com uso de CEC e que estavam em ritmo sinusal no pré-operatório. A idade avançada promove alterações atriais tais como dilatação, hipertrofia e fibrose que estão associadas com a destruição do nó sinusal (LAWRENCE *et al.*, 1993; FOX *et al.*, 2004). Neste estudo, obtivemos dados semelhantes aos da literatura, uma vez que a idade média dos indivíduos com FAPo foi maior dos que não desenvolveram FAPo após a cirurgia cardíaca de RM.

Outras características biodemográficas, como gênero, IMC, hipertensão, história de IAM prévio foram também descritas como fatores de risco no desenvolvimento da FAPo (HAKALA *et al.*, 2003), porém no presente estudo essas características não foram preditoras, uma vez que não foram demonstradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os indivíduos do GFA e indivíduos do GC.

Em estudo desenvolvido por Aranki e colaboradores sugeriu-se que indivíduos do gênero masculino possuem maior risco de desenvolvimento da FAPo, devido a alterações na expressão de canais iônicos (ARANKI *et al.*, 1996). Em nosso estudo houve maior frequência de indivíduos do gênero masculino em ambos os grupos (GFA e GC),

O índice de massa corpórea foi descrito como fator predisponente da FAPo, devido ao aumento de tecido adiposo que constitui um fértil substrato anatômico para o desenvolvimento da FAPo, conferindo um aumento atrial e alterações na pressão intratorácica que alteram as propriedades eletrofisiológicas do átrio, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento

da FAPo (DUCCESCHI *et al.*, 1999). Em nosso estudo não se constatou a associação entre o IMC e o desenvolvimento da FAPo.

A amostra avaliada não demonstrou-se associação entre hipertensão no desenvolvimento da fibrilação atrial pós-cirúrgica, inclusive o número de indivíduos hipertensos em ambos os grupos foi semelhante, o que poderia explicar essa ausência de associação, uma vez que esses indivíduos mantinham a pressão arterial controlada por medicamentos. A hipertensão foi descrita como fator de risco pré-operatório no desenvolvimento da FAPo, pois está associada à ativação do RAS no átrio humano (GOETTE *et al.*, 2000) e em modelos animais (LI *et al.*, 2001). A angiotensina II ativa a via mitogênica da proteína quinase, responsável pela proliferação dos fibroblastos e hipertrofia dos cardiomiócitos (KOMURO *et al.*, 2000). Além disso, a angiotensina II pode estar envolvida no mecanismo de remodelamento estrutural e elétrico cardíaco (TSAI *et al.*, 2004).

O IAM prévio também é indicado na literatura como um fator associado ao desenvolvimento da FAPo, contudo em nosso estudo esta associação não foi observada.

O tempo de anoxia e de CEC não apresentaram diferença significativa entre os pacientes que desenvolveram FAPo e aqueles que se mantiveram em ritmo sinusal. Dados que confirmam estudos anteriores, onde é comparada a incidência de FAPo em pacientes que foram submetidos à cirurgia de RM com uso de CEC e sem o uso de CEC, não podendo afirmar que o uso de CEC é um fator predisponente (ASHER *et al.*, 1999).

O uso de beta-bloqueadores não influenciou na prevenção do desenvolvimento da fibrilação atrial pós cirúrgica (GFA = 11 vs. GC = 33; $p=0,930$). A porcentagem de indivíduos que utilizavam beta bloqueadores, no pré-operatório da cirurgia cardíaca, foi semelhante em ambos os grupos.

As concentrações plasmáticas de CK e CKMB entre pré e pós-operatório de cirurgia de RM sofreram alterações significativas, o que sugeri que esses marcadores isquêmicos estão associados ao trauma cirúrgicos à que esses pacientes foram submetidos. No entanto, entre as atividades plasmáticas dessas enzimas no pré-operatório entre os grupos e no pós-operatório entre os grupos (GFA e GC) essas alterações enzimáticas não foram significativas, sugerindo que esses marcadores não estão associados

ao desenvolvimento da FAPo. Estudos relatam que CK e CKMB poderiam ser utilizados como marcadores na detecção precoce de insuficiência cardíaca ou em complicações após cirurgia de revascularização do miocárdio. No presente estudo não foi observado associação dos valores de CK e CKMB pré-operatório e pós-operatório com a incidência de FAPo, como complicação pós-operatória de cirurgia de RM. (THIELMANN *et al.* 2004; BIGNAMI *et al.*, 2009).

Além disso, há na literatura estudos que demonstram a associação entre a concentração sérica de CK-MB e o risco de três vezes maior no desenvolvimento da FAPo (AHLSSON *et al.*, 2007), contudo no presente estudo não foi demonstrada essa associação entre as atividades plasmáticas de CK e CKMB como marcadores de predisposição no desenvolvimento da fibrilação atrial pós-cirúrgica.

É conhecido que cirurgia de revascularização do miocárdio promove ativação do sistema complemento e disseminação de inflamação sistêmica no pós-operatório cirúrgico. As citocinas endógenas têm um papel essencial na resposta inflamatória e a PCRus é utilizada como marcador inflamatório há vários anos no diagnóstico de infecções. Observa-se um aumento significativo da PCRus, entre o início e após a cirurgia no GFA e GC, mostrando que a cirurgia de RM promove um aumento de proteínas de fase aguda como a PCRus associada a significativa inflamação pós-operatória. A relação entre inflamação e o desenvolvimento da FAPo, já foi demonstrada em vários estudos, assim sugerindo que inflamação participa da patogênese da FAPo (OHKI *et al.*, 2004; BENNERMO *et al.*, 2004; ENGELMANN *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2006; CANBAZ *et al.*, 2008), onde evidenciou-se o aumento da concentração plasmática da PCRus, em indivíduos com FAPo quando comparados com indivíduos sem FAPo (ENGELMANN *et al.*, 2005), contudo em nosso estudo não houve diferenças significativas na concentração plasmática de PCRus entre os grupos de estudo. As nossas amostras biológicas apresentaram grande variabilidade, alto desvio-padrão, o que promoveu um menor poder estatístico dos testes.

Citocinas pró-inflamatórias, tais com fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6 e IL-8 desempenham papel fundamental na regulação da cascata inflamatória. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória multifuncional e têm papel

importante na isquemia. A concentração plasmática de IL-6 elevou imediatamente após a cirurgia de RM, devido ao trauma cirúrgico e associou-se ao desenvolvimento da FAPo em estudo realizado por Ishida e colaboradores (ISHIDA *et al.*, 2006), contudo no presente estudo demonstrou-se o aumento significativo da IL-6 plasmática entre o pré e pós-operatório de cirurgia de RM, mas o aumento não se associou ao desenvolvimento da FAPo.

Neste estudo a frequência do alelo -174G, do polimorfismo -174 G/C, foi de 75,0% no grupo de indivíduos que desenvolveram fibrilação atrial pós-cirúrgica e 69,2% no grupo de indivíduos que não desenvolveram fibrilação atrial pós-cirúrgica e não houve associação entre a presença do alelo -174G e desenvolvimento de fibrilação atrial pós-operatória. Gaudino e colaboradores demonstraram a associação entre indivíduos europeus portadores do genótipo GG do SNP IL-6 -174 G/C com o desenvolvimento da FAPo, sendo que a frequência do genótipo GG em indivíduos que desenvolveram FAPo foi de 33,9% (GAUDINO *et al.*, 2003). No presente estudo a frequência de indivíduos que são portadores do genótipo GG do polimorfismo -174 G/C e que desenvolveram FAPo foi de 28%, portanto similar ao da população européia, mas não foi associado ao desenvolvimento de FAPo.

Além disso, o polimorfismo -174 G/C está associado com a prevalência, incidência e/ou prognóstico de doenças ateroscleróticas e cardiovasculares. O alelo -174G foi associado com o aumento da resposta transcricional a estímulos, como a endotoxina ou IL-1 β *in vitro*. Diversos estudos foram realizados para investigar o papel do polimorfismo -174 G/C na concentração plasmática de IL-6 *in vivo*, porém os resultados são conflitantes (BENNERMO *et al.*, 2004). No presente estudo não houve diferenças entre os valores de IL-6 plasmáticos no pré e pós-operatório em indivíduos portadores dos diferentes genótipos (GG x GC+CC) do GFA e do GC, mas observou-se que aumento significativo na concentração plasmática de IL-6 do pré para o pós-operatório em todos os genótipos e em ambos os grupos, colaborando com a proposta da elevação dessa citocina devido ao trauma cirúrgico em todos os indivíduos. O mesmo foi realizado para o marcador de inflamação aguda, a PCRus, e os resultados obtidos foram semelhantes.

Para os marcadores isquêmicos, CK e CKMB, nos diferentes genótipos do polimorfismo -174G/C no GFA e no GC, obtivemos valores significativos entre o pré e pós-operatório cirúrgico nos diferentes genótipos do polimorfismo, sugerindo que esse aumento está associado à cirurgia e não ao desenvolvimento da FAPo.

A FA foi descrita pela primeira vez como uma doença genética familiar em 1943 (WOLFF et al., 1943). Darbar e colaboradores demonstraram que 5% dos indivíduos com FA e mais de 15% de indivíduos com FA isolada poderiam ter a forma familiar da doença (DARBAR et al., 2003). O primeiro gene associado ao desenvolvimento de FA foi descoberto em 2003, associando a canalopatia a doença. A FA é considerada uma canalopatia, uma vez que alterações em proteínas codificadoras dos canais iônicos promovem alterações de estrutura e função, predispondo o desenvolvimento da FA (CHEN et al., 2003).

Um estudo realizado na população dinamarquesa demonstrou que indivíduos portadores do alelo T do SNP 97C/T do gene KCNE apresentaram redução no risco de desenvolvimento de FA crônica e associado a função anormal ou disponibilidade da proteína do gene KCNE5. A frequência do alelo T em indivíduos com FA crônica foi de 12 % e no grupo sem FA foi de 23%, sugerindo que o alelo T reduz o risco de FA crônica.

No presente estudo, avaliou-se o SNP 97C/T e as frequências do alelo raro T nos GFA e GC foram de 0% e 10,8%, respectivamente. Como esse gene está localizado no cromossomo X, verificamos as frequências alélicas entre os gêneros do GFA e GC, sendo a frequência do alelo T em indivíduos do sexo masculino de 0% e 12,8% não houve diferenças de frequências entre o GFA e GC (0%). A frequência do alelo T em indivíduos do sexo feminino foi de 0% e 7,7% e não verificamos diferenças entre os grupos. Concluindo que a presença do alelo T não está associado como fator protetor ao desenvolvimento da FAPo.

Ao avaliarmos os possíveis marcadores isquêmicos CK e CKMB, por genótipo e alelo (gene localizado no cromossomo X), em indivíduos do GFA, verificamos que indivíduos portadores do alelo C (sexo masculino) apresentaram maiores concentrações plasmáticas do pré para o pós-operatório em relação aos portadores do genótipo CC (indivíduos do sexo feminino). Porém essa diferença pode ser explicada pelo pequeno número de

indivíduos portadores do genótipo CC e precisa ser mais investigada. Para os marcadores inflamatórios, PCRus e IL-6 no GFA, os indivíduos portadores do alelo C apresentaram maiores concentrações plasmáticas quando comparados com indivíduos portadores do genótipo CC, o que também pode ser explicado pelo pequeno número de indivíduos portadores do genótipo CC. Observa-se um aumento desses marcadores do pré para o pós-operatório decorrente da cirurgia de RM.

O polimorfismo 97 C/T não apresentou associação com o aumento plasmático em indivíduos do sexo masculino do GC, portanto não está associado ao desenvolvimento da FAPo. Porém indivíduos do sexo masculino do GC e portadores do alelo 97C apresentaram concentrações plasmáticas maiores de PCRus em comparação a indivíduos do GC portadores do alelo T, sugerindo um fator protetor no desenvolvimento da FAPo, demonstrado pela primeira vez no presente estudo.

O RAS está envolvido em doenças cardiovasculares, incluindo fibrose miocárdica, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, IAM e cardiomiopatias. Diversos estudos sugerem que o desenvolvimento da FA está associado com a ativação do RAS em átrio humanos, sendo a angiotensina II responsável por desencadear a atividade mitogênica e proliferação de fibroblastos ou hipertrofia de cardiomiócitos (GOETTE *et al.*, 2000). Uma vez que a angiotensina II é o produto ativo da molécula precursora angiotensinogênio, estudos dos polimorfismos no gene AGT sugerem que alterações neste gene podem predispor ao desenvolvimento da FAPo (TSAI *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2008).

No presente estudo não se verificou associação do SNP AGT -217A/G no desenvolvimento da FAPo. As frequências alélicas do -217 G foi similar entre os indivíduos do grupo de estudo (85,7%) e indivíduos do grupo controle (86,3%). A frequência do alelo -217G no GFA no presente estudo foi de 87,5% similar ao estudo realizado na população de Taiwan, onde 87% dos indivíduos com FA eram portadores do alelo -127G (TSAI *et al.*, 2004). Além disso, demonstrou-se pela primeira vez a maior frequência desse polimorfismo em pacientes com FAPo.

Indivíduos do GFA e portadores do alelo -217A não apresentaram aumento significativo de marcadores isquêmicos, CK e CKMB. O mesmo

ocorreu para a PCRus, um marcador de inflamação. Indivíduos do GC e portadores do alelo -217A apresentaram aumento significativo do pré para o pós-operatório tanto de marcadores isquêmicos como de marcadores inflamatórios, porém esse resultado precisará ser mais investigado, pois o número de indivíduos foi pequeno.

Avaliou-se neste estudo a expressão relativa de RNAm do gene *IL-6* em LTSP de 16 indivíduos com FAPo e 52 indivíduos grupo controle, ou seja sem FAPo, antes e após a cirurgia de RM. Os valores pré-operatórios de expressão de RNAm do *IL-6* de indivíduos com FAPo e sem FAPo apresentaram grande dispersão.

As diferenças de expressão de RNAm pré-operatórias entre os grupos GFA e GC parecem não estar associadas com os polimorfismos do gene *IL-6* estudado,. Portanto outras variantes ou outros fatores podem estar relacionados com essa variabilidade na expressão gênica. Indivíduos tanto do GFA como do GC apresentaram diminuição significativa de expressão de RNAm em LTSP do pré para o pós-operatório, o que sugeriria uma diminuição de células circulantes (sistêmica) e um recrutamento de infiltrados inflamatórios para o local de lesão cirúrgica. Essa análise é inédita por isso necessita de maiores investigações a fim de explicar esse mecanismo, contudo conclui-se que a cirurgia de RM diminui a expressão de RNAm em LTSP do gene *IL-6*.

Ainda com relação à expressão de RNAm do gene *IL-6*, pode-se constatar que indivíduos do GFA e do GC portadores dos genótipos GC + CC não apresentaram diferenças de expressão quando comparados com indivíduos portadores do genótipo GG. Este resultado demonstra que o SNP - 174 G/C, localizado na região promotora do gene *IL-6*, não têm papel na regulação da expressão gênica do gene.

Diversos estudos já demonstraram alterações de marcadores inflamatórios plasmáticos em indivíduos com FAPo (ZHLER et al., 1999; KAWAHITO et al., 2000; PAPARELLA et al., 2002; COSGRAVE et al., 2006; ANSELM et al., 2009), porém nenhum estudo verificou essas alterações plasmáticas com a expressão do gene em LTSP. Portanto verificou-se a expressão do gene *IL-6* em LTSP e sua correlação com a proteína *IL-6* plasmática. Demonstrou-se que não houve associação entre os valores plasmáticos de *IL-6* e sua expressão, no pré e no pós-operatório de cirurgia

cardíaca. As correlações encontradas sugerem que a expressão de RNAm em LTSP não reflete o aumento ou diminuição dessa proteína do sangue.

Um estudo utilizando microarrays de DNA em apêndice atrial direito, realizado na população japonesa com FA crônica por Ohki e colaboradores, demonstrou que aproximadamente 100 genes foram modulados no átrio de pacientes com FA, e assim, sugerindo que esses genes poderiam estar associados no desenvolvimento e manutenção da FA e na patofisiologia do remodelamento atrial. O estudo demonstrou ainda 33 genes específicos com FA, sendo que alguns desses genes codificam as proteínas IL-6 beta, fator de inibição de migração de macrófagos e fator de crescimento endotelial B (OHKI et al., 2005). Baseado no estudo de Ohki e colaboradores, sugerimos no presente estudo verificar a expressão do gene IL-6 no apêndice atrial direito de pacientes com FAPo, sua correlação com a expressão em LTSP e a concentração de IL-6 plasmática.

Pela primeira vez foi demonstrado que a expressão do gene IL-6 em apêndice atrial direito em pacientes com FAPo não pode ser correlacionado com a expressão desse gene em LTSP. Concluindo que a expressão em LTSP do gene IL-6 não reflete a expressão desse gene no tecido e não é um biomarcador para o desenvolvimento de FAPo.

Brundel e colaboradores demonstraram que FA persistente é associada à redução de RNAm e proteínas de vários canais de potássio, sendo que em indivíduos com FA paroxística essa redução foi observada predominantemente em proteínas e não nos níveis de RNAm, sugerindo regulação pós-transcricional. Em nosso estudo demonstramos redução de expressão de RNAm do gene KCNE5 em LTSP do pré para o pós-operatório de cirurgia cardíaca. Não houve diminuição significativa entre indivíduos do GFA e do GC, portanto essa redução de expressão de RNAm do gene KCNE5 em LTSP não está associada ao desenvolvimento de FAPo, como demonstramos pela primeira vez.

Ainda com relação à expressão de RNAm do gene KCNE5, pode-se constatar que indivíduos do GFA portadores do genótipo CC e do alelo C não apresentaram diferenças de expressão, e ambos os grupos apresentaram redução de expressão de RNAm em LTSP. Este resultado demonstra que o SNP 97 C/T, localizado na região promotora do gene IL-6, não têm papel na regulação da expressão gênica do gene. Os indivíduos do sexo masculino sem FAPo portadores dos alelos C ou T apresentaram aumento da expressão

de RNAm do pré para o pós-operatório de cirurgia de RM, isso pode ser associado ao gênero, uma vez que esse gene está localizado no cromossomo X. Por isso, no presente estudo indivíduos do sexo feminino sem FAPo portadores dos genótipos CC e CT apresentaram redução da expressão de RNAm em LTSP do pré para o pós-operatório, confirmando que essas alterações de expressão de RNAm em LTSP do grupo sem FAPo possam ser associadas ao gênero.

Avaliou-se ainda nesse estudo a correlação das expressões de RNAm em LTSP (no pré e pós-operatório) dos grupos com FAPo e sem FAPo mostrando ausência de correlações entre as expressões de RNAm de LTSP e expressões de RNAm do apêndice atrial direito, em ambos os grupos.

Para o gene *AGT* sua expressão de RNAm em LTSP não foi constatada e sua expressão em tecido de apêndice auricular direito foi pouco expressa, concluímos que esse gene não está associado ao desenvolvimento da FAPo .

6. CONCLUSÕES

Os polimorfismos dos genes *IL6* (G-174C), *KCNE5* (C97T) e *AGT* (A-217G) não estão associados ao desenvolvimento de fibrilação atrial pós-operatória de cirurgia cardíaca de RM.

As expressões de RNAm em sangue periférico (LTSP) antes e 48 horas após a cirurgia não foram influenciadas pelos polimorfismos dos genes *IL6* (G-174C), e *KCNE5* (C97T). Não houve expressão de RNAm do gene *AGT* em LTSP e a expressão de RNAm em apêndice auricular direita foi extremamente baixa.

Não houve correlações entre as expressões de RNAm dos genes *IL6*, *KCNE5* e *AGT* em sangue periférico e apêndice auricular direito, não permitindo que a análise de sangue periférico seja utilizada como modelo de seguimento clínico laboratorial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, G. W.; GOLDSTEIN, S.A. Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). **Mol Interv.** V. 1, p. 95-107, 2001.

AHLSSON, A. J.; BODIN, L.; LUNDBLAD, O. H.; ENGLUND, A. G. Postoperative atrial fibrillation is not correlated to C-reactive protein. **Ann Thorac Surg.** V. 83, p. 1332-1337, 2007.

ANDREWS, M.; NELSON, B. P. Atrial fibrillation. **The Mount Sinai Journal of Medicine.** V. 73, n. 1, p. 482-492, 2006.

ANSELM, A.; POSSATI, G.; GAUDINO, M. Postoperative inflammatory reaction and atrial fibrillation: simple correlation or causation? **Ann Thorac Surg.** V. 88, n. 1, p. 326-33, 2009.

ARANKI, S. F.; SHAW, D. P.; ADAMS, D. H.; RIZZO, R. J.; COUPER, G. S.; VANDERVLIT, M.; COLLINS, J. J.R.; COHN, L. H.; BURSTIN, H. R. Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. **Circulation.** V. 94, n. 3, p. 390-396, 1996.

ASHER, C. R.; DIMENGO, J. M.; ARHEART, K. L.; WEBER, M. M.; GRIMM, R. A.; BLACKSTONE, E. H.; COSGROVE, D. M. 3rd.; CHUNG, M. K. Atrial fibrillation early postoperatively following minimally invasive cardiac valvular surgery. **Am J Cardiol.** V. 84, p. 744-747, 1999.

ASSELBERGS, F. W.; VAN B.; STUVELING, E. M.; DIERCHS, G. F.; HILLEGE, H. L.; KORS, J. A.; DE JONG P. E.; VAN GILST, W. H.; PREVEND STUDY GROUP. Relation of electrocardiographic abnormalities to levels of serum C-reactive protein. **Am J Cardiol.** V. 91, p. 1358-1360, 2003.

AVILES, R. J.; MARTIN, D. O.; APPERSON-HANSEN, C.; HOUGHTALING, P. L.; RAUTAHARJU, P.; KRONMAL, R. A.; TRACY, R. P.; VAN WAGONER, D. R.; PSATY, B. M.; LAUER, M. S.; CHUNG, M. K. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. **Circulation.** V. 108, p. 3006-3010, 2003.

BANNERMO, M.; HELD, C.; STEMME, S.; ERICSSON, C-G.; SILVEIRA, A.; GREEN, F.; TORNVALL, P. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: Implications for a variety of major diseases? **Clinical Chemistry.** V. 50, n. 11, p. 2136-2140, 2004.

BARHANIN, J.; LESAGE, F.; GUILLEMARE, E.; FINK, M.; LAZDUNSKI, M.; ROMEY, G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. **Nature.** V. 384, p. 78-80, 1996.

BIGNAMI, E.; LANDONI, G.; CRESCENZI, G.; GONFALINI, M.; BRUNO, G.; PAPPALARDO, F.; MARINO, G.; ZANGRILLO, A.; ALFIERI, O. Role of cardiac biomarkers (troponin I and CK-MB) as predictors of quality of life and long-term outcome after cardiac surgery. **Ann Card Anaesth.** V. 12, n. 1, p. 22-6, 2009.

BRUGADA, R.; TAPSCOTT, T.; CZERNUSZEWICZ, G. Z.; MARIAN, A. J.; IGLESIAS, A.; MONT, L.; BRUGADA, J.; GIRONA, J.; DOMINGO, A.; BACHINSKI, L. L.; ROBERTS, R. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. **The New England Journal of Medicine.** V. 336, n. 13, p. 905-910, 1997.

BRUGADA, RAMON. Is atrial fibrillation a genetic disease? **Journal Cardiovasc Electrophysiol.** V. 16, p. 553-556, 2005.

BRUNDEL, B. J.; GELDER, V. C. I.; HENNING, R. H.; TUINENBURG, A. E.; WIETSES, M.; GRANDJEAN, J. G.; WILDE, A. A. M.; GILST, W. H. V.; CRIJNS, H. J. G. M. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K⁺ channels. **Journal of the American College of Cardiology.** V. 37, n. 3, p. 926-932, 2001.

BURZOTTA, F.; IACOVELLO, L.; DI CASTELNUOVO, A.; GLIECA, F.; LUCIANI, N.; ZAMPARELLI, R.; SCHIAVELLO, R.; DONATI, M. B.; MASERI, A.; POSSATI, G.; ANDREOTTI, F. Relation of the -174G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. **Am J. of Cardiol.** V. 88, p. 1125-1128, 2001.

CANBAZ, S.; ERBAS, H.; HUSEYIN, S.; DURAN, E. The role of inflammation in atrial fibrillation following open heart surgery. **J Int Med Res.** V. 36, n. 5, p. 1070-6, 2008.

CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Trends Neurosci.** V.16, p. 500-506, 1993.

CHEN, S.; ZHANG, L.; BRYANT, R. M.; VINCENT, G.M.; FLIPPIN, M.; LEE, J. C.; BROWN, E.; ZIMMERRMAN, F.; ROZICH, R.; SZAFRANSKI, P.; OBERTI, C.; STERBA, R.; MARANGI, D.; TCHOU, P. J.; CHUNG, M. K.; WANG, Q. KCNQ1 mutations in patients with a family history of lethal cardiac arrhythmias and sudden death. **Clin Genet.** V. 63, p. 273-282, 2003.

CORVOL, P.; MICHAUD, A.; SOUBRIER, F.; WILLIAMS, T. A. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. **J Hypertens Suppl.** V. 13, p. S3-S10, 1995.

CORVOL, P.; SOUBRIER, F.; JEUNEMAITRE, X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. **Pathol Biol (Paris)**. V. 45, p. 229-239, 1997.

COSGRAVE, J.; FOLEY, J. B.; MCGOVERN, E.; BENNETT, K.; YOUNG, V.; TOLAN, M.; CREAN, P.; WALSH, M. Brain natriuretic peptide elevation and the development of atrial fibrillation following coronary artery bypass surgery. **Interact Cardiovasc Thorac Surg**. V. 5, n. 2, p. 111-4, 2006.

CRESWELL, L. L.; SCHUESSLER, R. B.; ROSENBLOOM, M.; COX, J. L. Hazards of postoperative atrial arrhythmias. **Ann Thorac Surg**. V. 56, n. 3, p. 539-49, 1993.
DARBAR, D.; HERRON, K. J.; BALLEW, J. D.; JAHANGIR, A.; GERSH, B. J.; SHEN, W. K.; HAMMILL, S. C.; PACKER, D. L.; OLSON, T. M. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. **J Am Coll Cardiol**. V. 18n. 12, p. 2185-92, 2003.

DUCCESCHI, V.; D'ANDREA, A.; LICCARDO, B.; SARUBBI, B.; FERRARA, L.; ALFIERI, A.; ROMANO, G. P.; SANTANGELO, L.; IACONO, A.; COTRUFO, M. Perioperative correlates of malignant ventricular tachyarrhythmias complicating coronary surgery. **Heart Vessels**. V. 14, p. 90-95, 1999.

ELLINOR, T., PATRICK; PETROV-KONDRATOV I., VANDIM; ZAKHAROVA, ELENA; NAM G., EDWIN; MACRAE A., CALUM. Potassium channel gene mutations rarely cause atrial fibrillation. **BMC Medical Genetics**. V. 7, p. 70, 2006.

ENGELMANN, M. D.; SVENDSEN, H. J. Inflammation in the genesis and perpetuation of atrial fibrillation. **European Heart Journal**. V. 26, p. 2083-2092, 2005.

FALK, R. H. Atrial fibrillation. **N Engl J Med**. v.344, p.1067-78, 2001.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**. V. 102, p. 1369-1376, 1998.

FOX, A. A.; SHERMAN, S. K.; BODY, S. C. Predictive genomics of adverse events after cardiac surgery. **Seminars in Cardiothoracic Vascular Anesthesia**. V. 8, n. 4, p.297-315, 2004.

FRAKER, T. D. JR.; FIHN, S. D.; 2002 CHRONIC STABLE ANGINA WRITING COMMITTEE; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; AMERICAN HEART ASSOCIATION, GIBBONS, R. J.; ABRAMS, J.; CHATTERJEE, K.; DALEY, J.; DEEDWANIA, P. C.; DOUGLAS, J. S.; FERGUSON, T. B. JR.; GARDIN, J. M.;

O'ROURKE, R. A.; WILLIAMS, S. V.; SMITH S. C. JR.; JACOBS, A. K.; ADAMS, C. D.; ANDERSON, J. L.; BULLER, C. E.; CREAGER, M. A.; ETTINGER, S. M.; HALPERIN, J. L.; HUNT, S. A.; KRUMHOLZ, H. M.; KUSHNER, F. G.; LYTLE, B. W.; NISHIMURA, R.; PAGE, R. L.; RIEGEL, B.; TARKINGTON, L. G.; YANCY, C. W. 2007 chronic angina focused update of the ACC/AHA 2002 guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group to develop the focused update of the 2002 guidelines for the management of patients with chronic stable angina. **J Am Coll Cardiol**. V. 50, n. 23, p. 2264-74, 2007.

GAUDINO, M.; ANDREOTTI, F.; ZAMPARELLI, R.; DI CASTELNUOVO, A.; NASSO, G.; BURZOTTA, F.; IACOVIELLO, L.; DONATI, B. M.; SCHIAVELLO, R.; MASERI, A.; POSSATI, G. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. **Circulation**. V.108, suppl. II, p.195-199, 2003.

GOETTE, A.; STAACK, T.; ROCKEN, C.; ARNDT, M.; GELLER, J. C.; HUTH, C.; ANSORGE, S.; KLEIN, H.; LENDECKEL, U. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. **J Am Coll Cardiol**. V. 35, P. 1669-1677, 2000.

HAKALA, T.; HEDMAN, A. Predicting the risk of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery. **Scand Cardiovasc J**. V. 37; p. 309 – 315, 2003.

HAY, I. D.; BAYER, M. F.; KAPLAN, M. M.; KLEE, G. G.; LARSEN, P. R.; SPENCER, C. A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. The Committee on Nomenclature of the American Thyroid Association. **Clin Chem**. V. 37, n. 11, p. 2002-8, 1991.

HOFMAN, P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**. V.3, p.1-9, 2004.

HØRDER, M.; JØRGENSEN, P. J.; HAFKENSCHIED, J. C.; CARSTENSEN, C. A.; BACHMANN, C.; BAUER, K.; NEUWALD, C.; ROSALKI, S. B.; FOO, A. Y.; VOGT, W. Creatine kinase determination: a European evaluation of the creatine kinase determination in serum, plasma and whole blood with the Reflotron system. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**. V. 29, n. 10, p.691-6, 1991.

HOUGUE, C. W. JR.; CRESWELL, L. L.; GUTTERMAN, D. D.; FLEISHER, L. A.; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS. Epidemiology, mechanisms, and risks: American College of Chest Physicians guidelines for the prevention and management of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. **Chest**. V. 128, p. 9s-16s, 2005.

ISHIDA, K.; KIMURA, F.; IMAMAKI, M.; ISHIDA, A.; SHIMURA, H.; KOHNO, H.; SAKURAI, M.; MIYAZAKI, M. Relation of inflammatory cytokines to atrial fibrillation after off-pump coronary artery bypass grafting. **Eur J Cardiothorac Surg.** V. 29, n. 4, p. 501-5, 2006.

JAHANGIRI, M.; WEIR, G.; MANDAL, K.; SABELIEVA, I.; CAMM, J. Current strategies in the management of atrial fibrillation. **Ann Thorac Surg.** V. 82, p. 357-364, 2006.

JAIN, S.; TANG, X.; NARAYANAN, C. S.; AGARWAL, Y.; PETERSON, S. M.; BROWN, C. D.; OTT, J.; KUMAR, A. Angiotensinogen gene polymorphism at -217 affects basal promoter activity and is associated with hypertension in African-Americans. **J Biol Chem.** V. 277, p. 36889-36896, 2002.

KAWAHITO, K.; ADACHI, H.; INO, T. Influence of surgical procedures on interleukin-6 and monocyte chemotactic and activating factor responses: CABG vs. valvular surgery. **J Interferon Cytokine Res.** V. 20, n. 1, p.1-6, 2000.

KOMURO I. Molecular mechanism of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. **Jpn Heart J.** V. 41, p. 117-129, 2000.

KRUMMEN, D. E.; NARAYAN, S. M. Mechanisms for the initiation of human atrial fibrillation. **Heart Rhythm.** V. 6, Suppl.8, p.12-16, 2009.

KUMAR, A.; LI, Y.; PATIL, S.; JAIN, S. A haplotype of the angiotensinogen gene is associated with hypertension in african americans. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** V.32, p. 495-502, 2005.

LAI, L-P.; LIN, J-L.; HUANG, S. K. S. Molecular genetic studies in atrial fibrillation. **Cardiology.** V. 100, p. 109-113, 2003.

LAMM, G.; AUER, J.; WEBER, T.; BERENT, R.; NG, C.; EBER, B. Postoperative white blood cell count predicts atrial fibrillation after cardiac surgery. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia.** V. 20, n. 1, p. 51-56, 2006.

LELORIER, P.; KLEIN, G. Prevention and management of postoperative atrial fibrillation. **Curr Probl Cardiol.** V. 27, n. 9, p. 367-403, 2002.

LEUNG, J. M.; BELLOWES, W. H.; SCHILLER, N. B. Impairment of left atrial function predicts post-operative atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery. **Eur Heart J.** V. 25, n. 20, p. 1836-44, 2004.

LI, D.; SHINAGAWA, K.; PANG, L.; LEUNG, T. K.; CARDIN, S.; WANG, Z.; NATTEL, S. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. **Circulation.** V. 104, p. 2608-2614, 2001.

LUNDQUIST, A. L.; MANDERFIELD, L. J.; VANOYE, C. G.; ROGERS, C. S.; DONAHUE, B. S.; CHANG, P. A.; DRINKWATER, D. C.; MURRAY, K. T.; GEORGE, A.L. JR. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks). **J Mol Cell Cardiol.** V. 38, p. 277-287, 2005.

MADRID, A. H.; BUENO, M. G.; REBOLLO, J. M.; MARÍN, I.; PEÑA, G.; BERNAL, E.; RODRIGUEZ, A.; CANO, L.; CANO, J. M.; CABEZA, P.; MORO, C. Use of irbesartan to maintain sinus rhythm in patients with long-lasting persistent atrial fibrillation: a prospective and randomized study. **Circulation.** V. 106, p. 331-336, 2002.

MAISEL, W. H.; RAWN, J. D.; STEVENSON W. G Atrial fibrillation after cardiac surgery. **Ann Intern Med.** V. 135, p.1061-1073, 2001.

MANNING, W. J.; SILVERMAN, DI.; KATZ, S. E.; RILEY, M. F.; COME, P. C.; DOHERTY, R. M.; MUNSON, J. T.; DOUGLAS, P. S. Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. **J Am Coll Cardiol.** V. 23, p. 1535-40, 1994.

MATHEW, J. P.; FONTES, M. L.; TUDOR, I. C.; RAMSAY, J.; DUKE, P.; MAZER, C. D.; BARASH, P. G.; HSU, P. H.; MANGANO, D.T.; Investigators of the Ischemia Research and Education Foundation; Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. A multicenter risk index for atrial fibrillation after cardiac surgery. **JAMA.** V. 291, p. 1720-9, 2004.

NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, K.; FUKUSHIMA-KUSANO, K.; OHTA, K.; MATSUBARA, H.; HAMURO, T.; YATUNI, C.; OHE, T. Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis. **Thromb Res.** V. 111, p. 137-142, 2003.

NAKASHIMA, H.; KUMAGAI, K.; URATA, H.; GONDO, N.; IDEISHI, M.; ARAKAWA, K. Angiotensin II antagonist prevents electrical remodeling in atrial fibrillation. **Circulation.** V. 101, p. 2612-2607, 2000.

OHKI, R.; YAMAMOTO, K.; UENO, S.; MANO, H.; MISAWA, Y.; FUSE, K.; IKEDA, U.; SHIMADA, K. Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. **International Journal of Cardiology.** V. 102, p. 233-238, 2005.

PAN, M.; ZHU, J. H.; JIANG, W. P.; LIU, Z. H.; LI, H. M.; YU, X.; YANG, X. J. Inflammation: a possible pathogenic link to atrial fibrillation. **Med Hypotheses.** V. 67, p. 1305-1307, 2006.

PAPARELLA, D.; YAU, T. M.; YOUNG, E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. **Eur J Cardiothorac Surg.** V. 21, n. 2, p. 232-44, 2002.

PAUL, M.; WAGNER, J.; DZAU, V. J. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. **J. Clin. Invest.** V. 91, p. 2058-2064, 1993.

PODGOREANU, M. V.; SCHWINN, D. A. New paradigms in cardiovascular medicine. **Journal of the American College of Cardiology.** V. 46, n. 11, p. 1965-77, 2005.

RAVN, L. S.; HOFMAN-BANG, J.; DIXEN, U.; LARSEN, S. O.; JENSEN, G.; HAUNSO, S.; SVENDSEN, J. H.; CHRISTIANSEN, M. Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. **Am J Card.** V.96, p.405-407, 2005.

RIBEIRO, MOREIRA D. A. Arritmias no pós-operatório de cirurgia cardíaca. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.** V. 11, p. 941-52, 2001.

ROBERTS, R. Mechanisms of disease: genetic mechanisms of atrial fibrillation. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.** V. 3, n. 4, p. 276-282, 2006.

SCHUMACHER, G.; HILSCHER, W.; MÖLLERING, H.; SIEDEL, J.; BUCKEL, P. Engineering enzymes for clinical diagnosis. **Ann Biol Clin (Paris).** V.51, n. 9, p. 815-819, 1993.

SILVA, R. G.; LIMA, G. G.; LARANJEIRA, A.; COSTA, A. R.; PEREIRA, E.; RODRIGUES, R. Risk factors, morbidity, and mortality associated with atrial fibrillation in the postoperative period of cardiac surgery. **Arq Bras Cardiol.** V.83, P. 105-110, 2004.

SUGIUCHI, H.; UJI, Y.; OKABE, H.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; KAYAHARA, N.; MIYAUCHI, K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. **Clin Chem.** V.41, n. 5, p. 717-23, 1995.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. Enzymatic urea determination in the blood and serum in the Warburg optical test. **Klin Wochenschr.** V. 1, n. 43, p.174-5, 1965.

THIELMANN, M.; MASSOUDY, P.; MARGGRAF, G.; KNIPP, S.; SCHMERMUND, A.; PIOTROWSKI, J.; ERBEL, R.; JAKOB, H. Role of troponin I, myoglobin, and

creatine kinase for the detection of early graft failure following coronary artery bypass grafting. **Eur J Cardiothorac Surg.** V. 26, n. 1, p. 102-9, 2004.

TIETZ, N. W.; RINKER, A. D. Should accuracy of iron measurements be improved? **Clin Chem.** V. 40, n. 7, p. 1347-8, 1991.

TINEL, N.; DIOCHOT, S.; BORSOTTO, M.; LAZDUNSKI, M.; BARHANIN, J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. **EMBO J.** V. 19, p. 6326-6330, 2000.

TSAI, C. T.; LAI, L. P.; LIN, J. L.; CHIANG, F. T.; HWANG, J. J.; RITCHIE, M. D.; MOORE, J. H.; HSU, K. L.; TSENG, C. D.; LIAU, C. S.; TSENG, Y. Z. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. **Circulation.** V. 6, P. 1640-1646, 2004.

VALDERRAMA, A. L.; DUNBAR, S. B.; MENSAH, G.A. Atrial fibrillation: public health implications. **Am J Prev Med.** V. 29, Suppl 1, p. 75-80, 2005.

WANG, Z.; TRISTANI-FIROUZI, M.; XU, Q.; LIN, M.; KEATING, M. T.; SANGUINETTI, M.C. Functional effects of mutations in KvLQT1 that cause long QT syndrome. **J Cardiovasc Electrophysiol.** V. 10, p. 817-826, 1999.

WAZNI, O. M.; MARTIN, D. O.; MARROUCHE, N. F.; LATIF, A. A.; ZIADA, K.; SHAARAOU, M.; ALMAHAMEED, S.; SCHWEIKERT, R. A.; SALIBA, W. I.; GILLINOV, A. M.; TANG, W. H.; MILLS, R. M.; FRANCIS, G. S.; YOUNG, J. B.; NATALE, A. Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. **Circulation.** V. 110, p. 124-127, 2004.

WIJFFELS, M. C.; KIRCHHOF, C. J.; DORLAND, R.; ALLESSIE, M. A. Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation. A Study in Awake Chronically Instrumented Goats. **Circulation.** V. 92, p. 1954-1968, 1995.

WOLFF, L. Familial auricular fibrillation. **N Engl J Med.** P. 396-97, 1943

WOLFORD, J. K.; COLLIGAN, P. B.; GRUBER, J. D.; BOGARDUS, C. Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians. **Mol Genet Metab.** V. 80, p. 338-343, 2003.

WYNDHAM, C. R. Atrial fibrillation: the most common arrhythmia. **Tex. Heart Inst. J.** V. 27, p. 257-267, 2000.

YANG, Y.; XIA, M.; JIN, Q.; BENDAHOU, S.; SHI, J.; CHEN, Y.; LIANG, B.; LIN, J.; LIU, Y.; LIU, B.; ZHOU, Q. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. **Am. J. Genet.** V. 75, p. 899-905, 2004.

ZAHLER, S.; MASSOUDY, P.; HARTL, H.; HÄHNEL, C.; MEISNER, H.; BECKER, B. F. Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. **Cardiovasc Res.** V. 41, n. 3, p. 722-30, 1999.

ANEXO A **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

9136 - 5842781/1 - Carla Prisinzano Pastorelli

Email: carlabiomed@usp.br

Data de Nascimento: 18/09/1981

Cédula de Identidade: RG - 44.043.641-2 - SP

Local Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade de Mogi das Cruzes -
- São Paulo - Brasil - 2006

Curso: Mestrado em Farmácia

Área: Análises Clínicas

Data da Matrícula: 04/04/2007

Início da Contagem de Prazo: 04/04/2007

Data Limite: 04/10/2009

Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 04/04/2007 a
19/09/2007 E.Mail: dspa@usp.br

Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 20/09/2007 a -- E.Mail:
mhhirata@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 04/04/2007

Exame de Qualificação: Aprovado em 02/02/2009

Data do Depósito do Trabalho:

Data máxima para aprovação da Banca:

Título do Trabalho:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Ocorrência: Última matrícula em 19/07/2009

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred .	Freq.	Conc .	Exc .	Sit. Matric.
FBC5759-1	Estudo de proteínas de interesse diagnóstico pela aplicação de técnicas de biologia molecular e estrutural	08/05/2007	19/06/2007	60	4	92.00	B	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	05/06/2007	02/07/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5757-1	Seminários em	06/08/2007	18/11/2007	30	2	80.00	A	N	Concluída

	Análises Clínicas II	7	7						a
HEP5732-9	Bioestatística I	06/08/2007	10/09/2007	30	2	100.00	B	N	Concluída
BMB5790-4	Métodos de Biologia Molecular Aplicados ao Estudo de Proteínas de Membrana	13/08/2007	28/09/2007	150	0	0.00	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMB5781-3	Eletrofisiologia de Células	11/09/2007	20/11/2007	120	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
FBC5764-4	Protídeos em Bioquímica Clínica	03/10/2007	30/10/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5756-1	Alterações moleculares na doença renal crônica	08/10/2007	29/10/2007	45	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
TIC5003-1	Pesquisa em Medicina Cardiovascular : Planejamento, Execução e Avaliação	17/10/2007	27/11/2007	90	6	100.00	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0512 Bioquímica Clínica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/02/2008	30/06/2008	-	3	0.00	-	-	-
FBC5793-8	Seminários em Análises Clínicas	11/03/2008	23/06/2008	30	2	77.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	27
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0

Total:	25	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

<p>Conceito até 31/12/1996:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.</p> <p>Conceito a partir de 02/01/1997:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.</p> <p>Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.</p>

Situação em: 16/08/2009 21:20

Anexo C

ENTRADA: 08 de março de 2007.

1ª AVALIAÇÃO: 05 de abril de 2007.

AVALIAÇÃO FINAL: 17 de maio de 2007.

CAAE: 0026.0.131.131-07

N.º DO PROTOCOLO NO CEP: 3511.

(ESTE N.º DEVERÁ CITAR NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Prof. Mario Hiroyuki Hirata

PROJETO DE PESQUISA: "Polimorfismos na Fibrilação Atrial Pós-Operatória: Modelo em Cirurgia Cardíaca".

ÁREA TEMÁTICA ESPECIAL: Genética Humana.

PATROCINADOR: Não se aplica

DURAÇÃO DA PESQUISA: 02 anos.

N.º DE PARTICIPANTES NO CENTRO: 220

Comentários/Considerações:

O estudo irá relacionar a presença dos polimorfismos, -174 G/C do gene da interleucina-6, 97C/T do canal do potássio KCNE5 e -217 A/G do gene da AGT com suas expressões gênicas (no fragmento de aurícula direita) no operatório de cirurgia cardíaca.

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

- a) O projeto respondeu as solicitações da pendência anterior;
- b) 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.

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

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- **Protocolo de Estudo:** Aprovado.
- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** Aprovado.

Apresentação do protocolo: Acompanha o projeto o encaminhamento de submissão ao CEP, juntamente com a Folha de Rosto corretamente preenchida; Lista contendo os nomes dos colaboradores que possuem currículo na plataforma lattes (prof. Tit. Mario H. Hirata, Prof. Assist. Rosário D. C. Hirata, Dr. Dikran Armaganijan, Aluna de mestrado Carla P. Pastorelli, Dr. Marcelo F. Sampaio, Dr. Dalmo A . R. Moreira, Dr. Jarbas F. Dinkhuysen, Dra. Valéria F. da Silva, Lídio G. L. Neto, Fernanda A . Silva, Vivian Silbiger, Luiz R. de Moraes, Ricardo G. Habib, César D. de L. Barbosa) o currículo da colaboradora Simone L. Barroso está em anexo; Termo de Responsabilidade e Declaração de tornar público os resultados também estão em anexo; Acompanha o projeto as declarações de participação dos colaboradores mencionados na lista do currículo; carta do Prof. Dr. Jarbas F. Dinkhuysen para a Coordenadora do CEP FCF/USP; O Orçamento financeiro e a lista de Instituições participantes do projeto estão em anexo; Lista contendo o nome de todos os participantes do projeto também estão em anexo; Os formulários de coleta de exame

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 63/2007

São Paulo, 29 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Dr. Mário Hyroyki Hirata
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de maio de 2007, **APROVOU** o projeto "Polimorfismos na fibrilação atrial pós-operatória: Modelo em cirurgia cardíaca" (Protocolo CEP nº 420) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

Anexo D

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Serviço de Saúde da Grande São Paulo
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: "POLIMORFISMOS NA FIBRILAÇÃO ATRIAL PÓS-OPERATÓRIA: MODELO EM CIRURGIA CARDÍACA".

Dados de identificação do sujeito da pesquisa:

Nome do paciente: _____

Documento de identidade nº _____

Sexo: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Nº _____

Apto _____

Bairro _____ Cidade _____

CEP _____

Telefone _____

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado que estamos desenvolvendo com a equipe de médicos da Seção de Coronária do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Este estudo é necessário para identificar possíveis marcadores para o diagnóstico da fibrilação atrial pós-operatória.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e serão necessárias suas amostras de sangue e uma pequena amostra da aurícula direita, que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico do IDPC e no centro cirúrgico pelo seu médico, respectivamente. O risco à saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. A coleta do fragmento da aurícula será feita durante a cirurgia e também não apresentará risco a sua saúde.

Além de você, outros duzentos e dezenove pacientes também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e uso de medicamentos.

Inicialmente serão coletadas amostras de sangue (pré-operatório) para análise bioquímica, hormonal e genética (polimorfismos e expressão gênica), sendo que na sua cirurgia será coletada a amostra da aurícula direita. Durante sua internação (após 48 horas) será realizada outra coleta de sangue e sua participação no estudo se encerrará.

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo, que são: glicose, colesterol total e frações, uréia, creatinina, ácido úrico, CK, CKMB, PCRus, T4, TSH, IL-6, TNF- α , TGO, TGP, sódio e potássio. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação. Caso seja de seu interesse, também disponibilizarei os resultados da análise genética no final da pesquisa.

Os dados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desse estudo forem publicados em revistas, artigos a serem tema de debates e aulas.

O DNA e o RNA extraído de seu sangue e de seu fragmento de aurícula serão armazenados e ficarão sob responsabilidade do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do estudo e pegar sua amostra de volta, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia não será afetado.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outra complicação se continuar à participação, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou outras questões administrativas.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, ou se ocorrer lesão ou doença relacionada à investigação você poderá entrar em contato com a pesquisadora Carla Prisinzano Pastorelli (telefones: 50856086), a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de
20_____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

Anexo E

PROJETO FA Po
FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

DADOS DO PACIENTE

Nome: _____ Paciente nº: _____
 Data: ____/____/____ Registro nº: _____
 Data de nascimento: ____/____/____
 Cor: () Branco () Negro () Pardo () Amarelo
 Sexo: () feminino () masculino Estado civil: _____
 Endereço: _____

Telephones: _____

FATORES DE RISCO

- Hipertensão arterial () sim () não

- Tabagismo () sim ; Atual _____ (carga) () não
Passado _____ (tempo)

- Diabetes () sim; Hipoglicemiante () não
Insulina ()

- Dislipidemias () sim; LDL _____
TG _____

- Antecedentes Familiares de DAC () sim () não

- Miocardiopatia () sim; () isquêmica () não
() outras

- Fibrilação Atrial (passado) () sim () não () familiar

- Uso de medicamentos:

- Outros:

HÁBITOS

- Atividade física () não () sim; frequentemente () sim () não

- Bebida alcoólica () não () sim; frequentemente () sim () não

- Stress () não () sim

EVENTOS CORONARIANOS

- Angina estável ☐ sim; tempo ☐ não

- Angina instável () sim; tempo _____ () não
- Infarto agudo () sim; tempo _____ tipo _____
localização _____ tratamento _____
() não

CIRURGIAS PRÉVIAS / ANGIOPLASTIAS

- Coronária () sim tipo _____ tempo _____
() não
- Válvula () sim tipo _____ tempo _____
() não
- Congênita () sim tipo _____ tempo _____
- Outros órgãos () sim tipo _____ tempo _____
() não

CINE

Local _____ Nr. _____
Data ____/____/____
DA _____
CX/Marginal _____
CD _____
VE _____
Dg _____

EXAME FÍSICO (prévio)

Peso _____ Kg Altura _____ cm IMC _____
PA _____ mmHg FC _____ bpm ECG _____
Sopro () sim () não

CIRURGIA REVASCULARIZAÇÃO (Atual)

Data internação: ____/____/____
Data cirurgia: ____/____/____
Descrição: _____

Complicações cirúrgicas () sim tipo _____
() não

Complicações pós-operatórias (UTI): () sim tipo _____
Complicações pós-operatórias (Enf.): () sim tipo _____
() não

Tempo em CEC: _____

DROGAS

UTI - _____ Enf. - _____
- _____ Enf. - _____
- _____ Enf. - _____
- _____ Enf. - _____
- _____ Enf. - _____