



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

ANDREIA MARCELINO BARBOSA

**Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST
em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas**

GOIÂNIA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA
DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES
E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese

2. Nome completo do autor

ANDREIA MARCELINO BARBOSA

3. Título do trabalho

**Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em
pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas**

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Katia Karina Verolla de Oliveira Moura, Usuário Externo**, em 16/10/2021, às 03:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANDREIA MARCELINO BARBOSA, Discente**, em 18/10/2021, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2347555** e o código CRC **FEFEF0B7**.

ANDREIA MARCELINO BARBOSA

Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Kátia Karina Verolla de O. Moura

Coorientador: Prof^o Dr^o. Sérgio Marcelino de Oliveira

GOIÂNIA

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barbosa, Andreia Marcelino

Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas [manuscrito] / Andreia Marcelino Barbosa. - 2021.
110 f.

Orientador: Profa. Dra. Kátia Karina Verolla de Oliveira Moura; co orientador Dr. Sérgio Marcelino Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui tabelas.

1. Aterosclerose. 2. Estatinas. 3. Genes. 4. Stents. I. Moura, Kátia Karina Verolla de Oliveira, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE ANDREIA MARCELINO BARBOSA - Aos três dias do mês de setembro do ano de 2021 (03/09/2021), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **Katia Karina Verolla de Oliveira Moura** (PUC/GO), **Paulo Roberto de Melo Reis** (PUC/GO), **Cláudio Carlos da Silva** (PUC/GO), **Iasmim Ribeiro da Costa Rizzo** (PUC/GO) e **Kleber Santiago Freitas e Silva** (UFG) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública por Webconferência, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas”**, em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, de autoria de **ANDREIA MARCELINO BARBOSA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador da discente, Profa. Dra. **KATIA KARINA VEROLLA DE OLIVEIRA MOURA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora**Aprovada / Reprovada**

Profª. Dra. Katia Karina Verolla de Oliveira Moura

___Aprovada___

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

___Aprovada___

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

___Aprovada___

Profª. Dra. Iasmim Ribeiro da Costa Rizzo

___Aprovada___

Prof. Dr. Kleber Santiago Freitas e Silva

___Aprovada___

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata ___Habilitada___. (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**, na área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 45 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por **Katia Karina Verolla de Oliveira Moura, Usuário Externo**, em 06/09/2021, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **IASMIM RIBEIRO DA COSTA RIZZO, Usuário Externo**, em 07/09/2021, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kleber Santiago Freitas e Silva, Usuário Externo**, em 08/09/2021, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **PAULO ROBERTO DE MELO REIS, Usuário Externo**, em 09/09/2021, às 07:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Carlos da Silva, Usuário Externo**, em 10/09/2021, às 06:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2278151** e o código CRC **DA3CEFA4**.

RESUMO

Barbosa, Andreia Marcelino; Dr^a

Universidade Federal de Goiás – UFG (03/2021)

Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas

Kátia Karina Verolla de Oliveira Moura e Sérgio Marcelino de Oliveira

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica sendo uma das principais causas de doença cardíaca coronária e derrame em humanos. Afeta grandes e pequenas artérias e é caracterizada pelo desenvolvimento de placas ricas em lipídios na parede vascular. A intervenção coronária percutânea com *stents* pode ser uma alternativa aceitável para pacientes com doença arterial coronariana, sendo um dos procedimentos mais comuns para o tratamento de lesões ateroscleróticas. Evidências têm sugerido que as estatinas, além da redução da lipoproteína de baixa densidade, exibem propriedades de estabilização da placa aterosclerótica e homeostase endotelial; efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiproliferativos e imunomoduladores; normalização do fluxo simpático e prevenção da agregação plaquetária. A busca por determinantes genéticos da aterosclerose vem ocorrendo há décadas. Atualmente, esta linha de pesquisa está focada na identificação de genes candidatos implicados em vias de aterogênese conhecidas e na realização de estudos de associação para avaliar seus papéis no desenvolvimento da patologia. Analisar o polimorfismo dos genes das famílias eNOS, GST, CYP em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas, analisando um grupo caso – aqueles que possuem *stent* – e um grupo controle – aqueles que não possuem *stent* – para realizar uma comparação da terapêutica das estatinas. O estudo das frequências alélicas e genotípicas demonstraram que a população se encontra em desequilíbrio de Hardy Weinberg e isto comprova a influência de fatores evolutivos.

Palavras-chave: Aterosclerose. Estatinas. Genes. *Stents*.

ABSTRACT

Barbosa, Andreia Marcelino; Dr^a

Universidade Federal de Goiás – UFG (03/2021)

Análise do polimorfismo dos genes das famílias eNOS, CYP e GST em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas

Kátia Karina Verolla de Oliveira Moura e Sérgio Marcelino de Oliveira

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease and is one of the main causes of coronary heart disease and stroke in humans. It affects large and small arteries and is characterized by the development of lipid-rich plaques in the vascular wall. Percutaneous coronary intervention with *stents* may be an acceptable alternative for patients with coronary artery disease, being one of the most common procedures for the treatment of atherosclerotic lesions. Evidence has suggested that statins, in addition to low density lipoprotein reduction, exhibit atherosclerotic plaque stabilization properties and endothelial homeostasis; anti-inflammatory, antioxidant, antiproliferative and immunomodulatory effects; normalization of sympathetic flow and prevention of platelet aggregation. The search for genetic determinants of atherosclerosis has been going on for decades. Currently, this line of research is focused on identifying candidate genes involved in atherogenesis pathways and conducting association studies to assess their roles in the development of the pathology. To analyze the polymorphism of genes from the eNOS, GST, CYP families in atherosclerotic patients who use statins, analyzing a case group - those who have *stents* - and a control group - those who do not have *stents* - to perform a comparison of statins therapy. The study of allelic and genotypic frequencies showed that a population is in Hardy Weinberg imbalance and this proves the influence of evolutionary factors.

Keywords: Atherosclerosis. Statins. Genes. *Stents*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. HISTÓRICO	9
2.2. DISLIPIDEMIAS	10
2.3. DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	11
2.4. ATHEROSCLEROSE	11
2.4.1. Processo Inflamatório	12
2.4.2. Placas Atheroscleróticas	13
2.4.3. Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	14
2.4.4. Disfunção Endotelial	15
2.5. STENT E REESTENOSE	16
2.6. ESTATINAS	18
2.7. GENÉTICA DA ATHEROSCLEROSE	19
2.8. GENES CANDIDATOS	20
2.8.1. Genes <i>eNOS T786C</i> e <i>eNOS G894T</i>	20
2.8.2. Genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	22
2.8.3. Genes <i>CYP3A5</i> e <i>CYP2C19</i>	24
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	29
5. ARTIGOS	30
5.1. ARTIGO 1: Lack of association of restenosis with the T786C polymorphism of eNOS in atherosclerotic patients and in silico evidence of interaction between statin and the eNOS protein	33
5.2. ARTIGO 2: Evaluation of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in atherosclerotic patients undergoing statin therapy and stenting	52
5.3. ARTIGO 3: O polimorfismo <i>G894T</i> do gene <i>eNOS</i> em pacientes com reestenose em uso de estatinas, Goiânia – Goiás	62
6. CONCLUSÕES GERAIS	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica sendo uma das principais causas de doença cardíaca coronária e derrame em humanos (STEINBERG, 2002). Aafeta grandes e pequenas artérias e é caracterizada pelo desenvolvimento de placas ricas em lipídios na parede vascular (MARTINEZ et al., 2017).

A dislipidemia, exemplificada pela hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia, é uma força motriz para o desenvolvimento da aterosclerose (GOLDBERG et al, 2011; HOPKINS et al., 2011). São alterações relacionadas ao metabolismo dos lipídeos, sendo classificadas como primárias, relacionadas a alterações mono ou poligenéticas, ou secundárias, exibindo-se como resultado à presença de outra doença ou uso de medicamentos. Ambas as situações determinam estado de hipercolesterolemia, sendo esta uma condição fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose (BRITO, 2014).

A relação entre o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e a aterosclerose foi demonstrada em vários estudos anteriores (FERENCE et al., 2017). Conforme a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (XAVIER et al., 2013), algumas hiperlipidemias graves, altamente relacionadas ao desenvolvimento de doença aterosclerótica podem ser diagnosticadas através de genotipagem.

A formação de placas ateroscleróticas, que são caracterizadas pelo acúmulo de lipídios, inflamação local, proliferação de células musculares lisas (SMC), apoptose celular, necrose e fibrose, é o principal fator causador de estenose arterial e envolve uma resposta inflamatória crônica iniciada por dano endotelial e ativação de células inflamatórias (SINGH et al., 2002).

O estresse oxidativo, que é exemplificado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS) e lipoproteína de baixa densidade oxidada (Ox-LDL), tem um papel fundamental na progressão da doença cardiovascular ligada à aterosclerose. Um desequilíbrio entre a produção de radicais e os sistemas de eliminação de radicais é a principal causa do estresse oxidativo (SINGH et al., 2009). O estresse oxidativo aumenta a oxidação do LDL e prejudica a função endotelial (ZHOU et al., 2013; BLOOMER, 2007; FROSTEGÅR et al., 2003). Além disso, fatores de risco importantes, incluindo hipertensão, diabetes mellitus, resistência à insulina, obesidade, hipercolesterolemia, dislipidemia, alto nível de proteína C reativa (PCR), estresse, consumo de álcool, tabagismo, distúrbio imunológico, inflamação da parede vascular, predisposição genética e a infecção bacteriana têm sido implicadas no desenvolvimento da aterosclerose (LIBBY et al., 2002; WEBER; NOELS, 2011).

Atualmente os medicamentos anti-ateroscleróticos mais usados são as estatinas (KAZI et al., 2017). O objetivo da terapia com estatinas é reduzir o nível sanguíneo de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), que é um conhecido agente pró-aterogênico. As estatinas não apenas favorecem a depleção de lipídios do ateroma, mas também reduzem a adesão de células inflamatórias e o recrutamento de monócitos pelas células endoteliais (BU et al., 2010; YANG et al., 2013). Em pacientes com doença cardíaca isquêmica já estabelecida (prevenção secundária), as estatinas também reduzem efetivamente os eventos cardiovasculares (COLLINS et al., 2016).

A busca por determinantes genéticos da aterosclerose vem ocorrendo há décadas. Atualmente, esta linha de pesquisa está focada na identificação de genes candidatos implicados em vias de aterogênese conhecidas e na realização de estudos de associação para avaliar seus papéis no desenvolvimento da patologia. Esta abordagem resultou no estabelecimento dos papéis pró-aterogênicos de vários genes (ARNETT et al., 2007). A genética já está bem estabelecida e as diferenças herdadas são a base tanto da variação nos fenótipos lipídicos na população geral quanto da suscetibilidade a dislipidemias em pacientes (BERBERICH; HEGELE, 2019).

A farmacogenética consiste no estudo da variabilidade genética que está associada a uma variação na resposta a medicações. As pesquisas envolvem a procura por polimorfismos genéticos que influenciem a resposta ao tratamento. São considerados genes candidatos os que codificam proteínas que influenciam a farmacocinética dos fármacos (a absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e a farmacodinâmica (proteínas-alvo para a ação do fármaco) (ROSENDO et al., 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTÓRICO

A aterosclerose é uma doença que tem preocupado a humanidade por milênios, como exemplificado pelos achados de alterações degenerativas na aorta, coronárias e artérias periféricas de múmias egípcias (ZIMMERMAN, 1993). Ela foi descrita em artefatos pertencentes a múmias egípcias, e o primeiro sintoma clínico de angina de peito foi relatado por Hipócrates (460-370 a.C.) (FAVARATO; LUZ, 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MARTELLI, 2014). Essas lesões de antigos egípcios não são diferentes das atualmente observadas em cirurgia vascular, inclusive em suas características histológicas (MAYERL et al., 2006).

Médicos pesquisadores começaram a examinar mais de perto as alterações vasculares no início do século XIX. Em 1829, o cirurgião e patologista francês nascido na Alemanha, Jean Lobstein, introduziu o termo “arteriosclerose” em seu inacabado *Traité d'Anatomie Pathologique*, um tratado de quatro volumes sobre anatomia patológica, baseado em sua experiência pessoal ao longo da vida (LOBSTEIN, 1833). Em 1910, o químico alemão Windaus mostrou que as placas ateroscleróticas consistem em tecido conjuntivo calcificado e colesterol (WINDAUS, 1910). Três anos mais tarde, Anitschkow e Chaltow conseguiram induzir a aterosclerose em coelhos, alimentando-os com uma dieta rica em colesterol (ANITSCHKOW; CHALATOW, 1913) e identificando um fator de risco para progressão de alterações ateroscleróticas. Vários outros fatores de risco, como tabagismo, hipertensão arterial, estresse emocional elevado, dieta inadequada, diabetes etc., foram encontrados mais tarde para contribuir para a progressão da doença (MAYERL et al., 2006).

No final da década de 1970, Russell Ross e Glomset destacaram a importância da proliferação de células musculares lisas na formação de lesões ateroscleróticas e formularam a hipótese de que a lesão na parede arterial teve um papel importante na progressão da placa (ROSS; GLOMSET, 1976; ROSS, 1986). Estudos subsequentes de Libby e Hansson no final dos anos 1990 indicaram que o mecanismo de progressão da doença envolvia uma interação complexa entre os fatores de risco e a inflamação. Neste trabalho afastaram a ideia de que a aterosclerose era um distúrbio proliferativo brando, e passaram a entender como sendo uma complexa doença inflamatória da parede do vaso (LIBBY, 2002; HANSSON et al., 2002; HANSSON, 2005). Durante o mesmo período, Fuster e colaboradores observaram a progressão da placa em estágios: envolvimento inicial do endotélio, que foi causado pelo desenvolvimento

da íntima, com lesão adicional da média subjacente nas fases avançadas de desenvolvimento (FUSTER et al., 1992; FUSTER AND LEWIS, 1994).

Nos últimos 30 anos, os macrófagos surgiram como protagonistas da aterosclerose e de suas complicações. Os macrófagos se acumulam em lesões, ingerem lipídios e produzem um repertório diversificado de mediadores inflamatórios que exacerbam a doença (HANSSON; LIBBY, 2006; SWIRSKI; NAHRENDORF, 2013).

2.2. DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias são alterações no metabolismo dos lipídeos que desencadeiam mudanças nas concentrações das lipoproteínas plasmáticas e lipídeos circulantes, contribuindo assim com o desenvolvimento de doenças crônicas, principalmente doenças cardiovasculares, podendo ser classificadas como dislipidemias primárias ou secundárias (DÂMASO, 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

Elas possuem uma base multifatorial, tanto genética quanto ambiental. Na classificação genotípica, pode ser causada por mutação em um só gene ou em vários. Compreende quatro tipos principais bem definidos de acordo com a fração lipídica que se encontra alterada: hipercolesterolemia isolada (LDL-colesterol ≥ 160 mg/dL), hipertrigliceridemia isolada (Triglicérides ≥ 150 mg/dL), hiperlipidemia mista (LDL-colesterol ≥ 160 mg/dL e triglicérides ≥ 150 mg/dl) e redução do HDL-C (homens < 40 mg/dl e mulheres < 50 mg/dL) isolada ou associada com aumento do LDL-colesterol e/ou de triglicérides (SPOSITO et al., 2007; XAVIER et al., 2013).

Os níveis de HDL se correlacionam inversamente com o risco cardiovascular, presumivelmente porque ele aumenta o transporte reverso de colesterol e diminui a inflamação (DEGOMA; RADER, 2011). O aumento de 1 mg/dL (0,026 mmol/L) nos níveis de HDL-C foi associado a uma diminuição significativa no risco de doença cardíaca coronária de 2% em homens e 3% em mulheres (GORDON et al., 1989). No entanto, embora a associação da HDL com a doença cardiovascular (DCV) seja clara, os mecanismos pelos quais essa lipoproteína exerce seus efeitos atero-protetores não foram totalmente elucidados (TOLANI et al., 2013).

É entendido que a aterosclerose envolve o acúmulo progressivo de lipídios na parede vascular. Numerosos estudos experimentais e epidemiológicos têm relacionado a hipercolesterolemia e altos níveis séricos de LDL ao desenvolvimento de aterosclerose e suas complicações (THOMAS et al., 1966; BERENSON et al., 1998).

Embora a LDL tenha recebido atenção especial como a principal contribuinte para esses eventos vasculares, outras lipoproteínas são cada vez mais reconhecidas como moduladores

importantes da inflamação vascular e da aterogênese. Lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TGRL) e/ou seus remanescentes, podem, de forma semelhante a LDL, estimular a inflamação (DICHTL et al., 1999) e formação de células espumosas (TANAKA et al., 2001).

2.3. DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A doença arterial coronariana (DAC) continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, apesar dos muitos e contínuos avanços na terapia médica. Embora a taxa de sobrevivência de pacientes com DAC tenha melhorado continuamente, as DCV foram responsáveis por 17,3 milhões de mortes em todo o mundo em 2012, e esse número deve crescer para >23,6 milhões em 2030 (LASLETT et al., 2012).

O aumento da incidência de DCV é provavelmente o resultado de uma alta prevalência de fatores de risco não tradicionais, como inflamação, estresse oxidativo, agentes infecciosos e fatores de risco tradicionais, como hipertensão, dislipidemia (BALAGOPAL et al., 2011) e o avanço da idade (HERON, 2013). Acredita-se que esses fatores de risco sejam responsáveis por cerca de 50% da patogênese das doenças cardiovasculares ateroscleróticas, expressando que aqueles desconhecidos também possuem um papel substancial na aterogênese (RERIANI; LERMAN; LERMAN, 2010).

A prevenção primária e secundária da DAC se concentra no controle dos fatores de risco cardiovascular por meio da modificação do estilo de vida e da terapia medicamentosa, conforme necessário. Níveis elevados de LDL-C plasmático estão ligados ao desenvolvimento de doença vascular aterosclerótica. A terapia com estatinas, em indivíduos de alto risco, é defendida por diretrizes nacionais para prevenir e melhorar os resultados clínicos na população em geral (JR; MOON, 2012).

2.4. ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença crônica que progride silenciosamente sem quaisquer sintomas clínicos evidentes até cerca de 40 anos, quando se manifesta como ataque cardíaco ou derrame (ROSS; GLOMSET; HARKER, 1977; ROSS, 1993).

Caracteriza-se como uma doença sistêmica e que frequentemente ocorre em artérias, como a coronária e a carótida (SUGIOKA et al., 2010; LEBLANC et al., 2017). Esta enfermidade afeta artérias de grande e médio porte, levando a trombose grave ou estenose arterial, podendo evoluir para infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, lesão isquêmica de rins e intestinos e várias outras manifestações clínicas com risco de morte (BARBOSA et al., 2017).

O início da aterogênese se dá em locais suscetíveis específicos. Ela se origina como lesões arteriais focais com distribuição previsível para regiões de bifurcações, ramos e curvaturas internas. Respostas endoteliais funcionais e estruturais a fatores de risco ateroscleróticos, entre grandes artérias, alteram a permeabilidade endotelial, o equilíbrio da coagulação e as propriedades vasoativas da parede arterial (CIVELEK et al., 2009).

Atualmente, acredita-se que a doença aterosclerótica é o resultado da interação de uma variedade de fatores complexos (WATERMAN; KIAN-KAI; GRIFFIN, 2010). Merched e Chan (2013) e Bogiatzi et al. (2018) constataram que a aterosclerose está relacionada principalmente a distúrbios do metabolismo lipídico, dano endotelial, resposta inflamatória, tensão de cisalhamento da parede vascular.

2.4.1. PROCESSO INFLAMATÓRIO

Uma das teorias proposta para descrever os eventos envolvidos na aterogênese é a da hipótese de “resposta à lesão”: o evento inicial é a lesão do revestimento endotelial da parede da artéria, levando à subsequente migração de monócitos e lipoproteínas circulantes, principalmente a LDL, para o espaço íntimo (ROSS; GLOMSET; HARKER, 1977; ROSS, 1993).

Os níveis aumentados de colesterol podem resultar no aumento da captação da LDL modificada levando à formação de células espumosas (NENSETER et al., 2013). Essas células são derivadas das células musculares lisas, que são os principais tipos de células no precoce espessamento da íntima das artérias e um dos principais componentes da maioria dos estágios da aterosclerose humana. Elas expressam os receptores sequestradores e tornam-se células espumosas na exposição a lipoproteínas (YAN et al., 2011; BEYEA et al., 2012).

Esta sugestão de formação de células espumosas é devida, em parte à sua reduzida capacidade de efluxo de excesso de colesterol (CHOI et al., 2009). Essas secretam matriz extracelular que promove ainda mais a retenção de lipoproteínas, bem como citocinas pró-inflamatórias, que aumentam o recrutamento de monócitos adicionais, células T e neutrófilos. Diante de estímulos inflamatórios persistentes e outros fatores citotóxicos, muitas células lesionadas tornam-se apoptóticas. No início, as células apoptóticas são eliminadas de forma eficiente por macrófagos vizinhos em uma tentativa de limitar a lesão celular geral (TABAS, 2005). O acúmulo dessas células, carregadas de lipídios na parede da artéria, é a marca registrada da aterosclerose (ROSS; GLOMSET; HARKER, 1977; ROSS, 1993).

Quando as lipoproteínas circulantes, contendo xenobióticos, se acumulam em áreas específicas, na matriz subendotelial das artérias (WILLIAMS; TABAS, 1995), particularmente

após a oxidação, geram um estímulo inflamatório que conduz o influxo de leucócitos na parede do vaso (YURDAGUL et al., 2014; YURDAGUL; ORR, 2016; YURDAGUL et al., 2016 – A; YURDAGUL et al., 2016 – B). A internalização da LDL modificada pelos macrófagos, leva à formação da estria gordurosa, a marca registrada da aterosclerose precoce (SHAO; PENNATHUR; HEINECKE, 2012).

A inflamação é um dos pilares principais na fisiopatologia da aterosclerose (LIBBY et al., 2011) e altos níveis da LDL e baixos níveis da HDL estão intimamente associados (MINEO et al., 2006). É caracterizada pelo recrutamento de numerosas células inflamatórias circulantes, incluindo monócitos/macrófagos, linfócitos T e neutrófilos (GALKINA; LEY, 2009). A lesão aterosclerótica típica contém uma grande quantidade de componentes que atraem lipídios e células necróticas (O'ROURKE et al., 2015).

Acredita-se que a entrada e retenção da LDL na parede arterial seja um evento precoce na aterogênese. As lipoproteínas modificadas aumentam o influxo de células inflamatórias, bem como estimulam as respostas inflamatórias nas células circundantes. A liberação de citocinas, por macrófagos e linfócitos T, causa influxo adicional de células inflamatórias, bem como ativação adicional de células da parede vascular. Este complexo conjunto de interações celulares envolve quase todos os tipos de células inflamatórias e leva à ativação dos sistemas imune inato e adaptativo, e promove respostas pró-ateroscleróticas típicas nas células da parede vascular (RAINES; ROSS, 1993).

Macrófagos e linfócitos T desempenham papéis críticos na iniciação e desenvolvimento da aterosclerose. O endotélio ativado recruta monócitos pela secreção de quimioatrativos, após o qual se ligam e subsequentemente transmigram pela camada endotelial. Além dos macrófagos, os linfócitos CD4⁺ são detectados na aterogênese precoce e lesões ateroscleróticas, compatíveis com o papel da imunidade adquirida no desenvolvimento da lesão. Os linfócitos lesionados secretam a citocina inflamatória interferon gamma (IFN- γ), que ativa ainda mais os macrófagos e células vasculares (BOLICK et al., 2009).

2.4.2. PLACAS ATEROSCLERÓTICAS

A formação de placas vasculares é um processo complexo que envolve a interação dos lipídios plasmáticos com a parede vascular e as células imunológicas, havendo relação direta entre o grau de oxidação e gravidade da doença (STOCKER; KEANEY, 2004; FÖRSTERMANN et al., 2017).

A morte dos macrófagos e a capacidade deles de fagocitar as células mortas, um processo denominado eferocitose, são determinantes cruciais do estágio da lesão e da

estabilidade da placa. O acúmulo da LDL oxidada (oxLDL), a formação da HDL disfuncional e o aumento da inflamação, causada por oxidantes derivados da peroxidase e espécies reativas de oxigênio (EROS), contribuem para a formação de placas vulneráveis, aumentando a apoptose de macrófagos e eferocitose defeituosa, causando aumento do tamanho do núcleo necrótico, uma característica fundamental das placas vulneráveis (SHAO; PENNATHUR; HEINECKE, 2012; HUANG et al., 2016). A ruptura da placa promove trombose, bloqueando o fluxo sanguíneo na artéria e resultando em eventos cardiovasculares ateroscleróticos isquêmicos agudos (LINTON et al., 2016).

O ingurgitamento de macrófagos com colesterol é a característica patológica definidora das placas ateroscleróticas, a causa da maioria dos ataques cardíacos e derrames. O acúmulo de colesterol nessas células não apenas contribui para a retenção de colesterol dentro da parede do vaso, mas também altera a sua biologia. Macrófagos carregados com colesterol secretam placas de metaloproteinases da matriz e produzem fator tecidual que promove a trombose quando há ruptura das placas. A LDL, a principal portadora de colesterol plasmático, entra na parede do vaso e nos macrófagos. A concentração dessa lipoproteína dentro da parede do vaso é de cerca de duas vezes ($\cong 2$ mg/ml) sua concentração sanguínea (KRUTH, 2013).

2.4.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Pesquisadores sugeriram que a deficiência, alterações no mecanismo antioxidante, o aumento da produção de EROS e o dano ao DNA são importantes agentes participantes na iniciação e progressão do evento oxidativo e aterogênico (LIN et al., 2009; LIBETTA et al., 2011; FAROUK et al., 2013).

Os radicais livres são gerados continuamente como resultado do mecanismo de defesa antioxidante do corpo. Condições que perturbam o equilíbrio natural dos radicais livres podem danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, que subsequentemente, causam disfunção celular, como foi observado na fisiopatologia de doenças como aterosclerose, câncer e diabetes (WEST, 2000; RAHMAN, 2007).

O estresse oxidativo é o resultado da superprodução de EROS e/ou deficiência de mecanismos antioxidantes e depende do equilíbrio entre a geração de EROS e sistemas enzimáticos ou não enzimáticos de proteção antioxidante. Vários fatores, como hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes, obesidade e envelhecimento são fatores de risco estabelecidos para DCV baseadas na aterosclerose, em que o estresse oxidativo é aumentado e as defesas antioxidantes são comprometidas (GRUBISA et al., 2018).

A fumaça do cigarro contém muitos radicais livres e os remete diretamente na parede do vaso sanguíneo. Além de ser fornecedora de radicais livres, essa fumaça facilita a liberação endógena de EROS por meio da ativação de células inflamatórias (BURKE; FITZGERALD, 2003). Portanto, fumar está associado a estresse oxidativo, inflamação e liberação de fatores circulantes que estão associados a lesão endotelial e disfunção endotelial (CASEY et al., 2004). Além disso, foi relatado que fumar diminui os níveis de colesterol HDL, que é conhecido por ter propriedades antiateroscleróticas e melhorar a função endotelial (SPIEKER et al., 2002).

2.4.4. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio vascular é uma camada única de células que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos. Esta camada celular não serve apenas como uma interface entre o sangue e os tecidos circundantes, mas também desempenha um papel importante na inflamação, angiogênese, coagulação sanguínea e controle do tônus vascular (KOO et al., 2013).

A disfunção endotelial, ou seja, o estado no qual as células endoteliais não podem mais responder a estímulos externos para preservar a homeostase, é frequentemente seguida pela deterioração da função vascular e pelo desenvolvimento de várias patologias vasculares, incluindo a aterosclerose (KOO et al., 2013). Há muito tempo tem sido mostrada como um componente crítico e precoce de lesão de órgão após a isquemia miocárdica ou cerebral, hemorragia, bem como outros estados de doença, incluindo a hipercolesterolemia e o diabetes (ENDO; KURODA; TSUJITA, 1976; LEFER et al., 1991). A integridade funcional do endotélio é um elemento fundamental da saúde vascular. A disfunção endotelial não é apenas um iniciador, mas também pode ser um fator importante na progressão da doença cardiovascular aterosclerótica (BARTON; HAUDENSCHILD, 2001).

É uma das principais alterações patológicas entre a exposição aos fatores de risco cardiovascular e o desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica. Além disso, a disfunção endotelial é observada na fase inicial da maioria das doenças cardiovasculares (YANG et al., 2010). Portanto, a função endotelial mostra um índice integrado de todos os fatores aterogênicos e ateroprotetores presentes em um indivíduo (YEBOAH et al., 2009) e desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase vascular, mantendo um delicado equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição (KASPRZAK; KŁOSIŃSKA; DROZDZ, 2006).

A vasodilatação é mediada principalmente por fatores como óxido nítrico (NO) (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003), considerado o vasodilatador endógeno mais potente do corpo (MUDAU et al., 2012). Além disso, também mantém a homeostase da parede vascular

ao inibir a agregação plaquetária, inflamação, estresse oxidativo, migração e proliferação de células do músculo liso vascular e adesão de leucócitos (TOUSOULIS et al., 2014). Quando alterada, em parte devido à redução da disponibilidade de eNOS, está associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares adversos (YEBOAH et al., 2007; HALCOX et al., 2009; YEBOAH et al., 2009). Além do bem conhecido papel pró-aterogênico da LDL, com seus potenciais efeitos adversos nas funções das células endoteliais (HANSSON, 2005; TABAS; WILLIAMS; BOREN, 2007; LIBBY et al., 2011; MOORE; TABAS, 2011).

Uma avaliação de risco para doença cardiovascular que depende apenas de fatores de risco tradicionais pode ser insuficiente para identificar o risco atual de um indivíduo. Muitas evidências foram relatadas de que a progressão da disfunção endotelial está relacionada à intensidade e duração dos fatores de risco do paciente (POREDOS, 2002).

As células vasculares são equipadas com uma variedade de enzimas de defesa antioxidantes, permitindo a redução da carga oxidativa (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017). Alterações nas funções dessas células, incluindo redução da disponibilidade de óxido nítrico endotelial (eNOS), ativação de células endoteliais pró-inflamatórias, aumento da apoptose de células endoteliais e ativação pró-trombótica, têm contribuído para a patologia vascular, em particular para o desenvolvimento de aterosclerose e doença arterial coronariana, com suas sequelas clínicas (LANDMESSER; HORNIG; DREXLER, 2004; HALCOX et al., 2009).

O envelhecimento é um importante determinante do risco cardiovascular em homens e mulheres, e o aumento da idade tem sido considerado um dos principais fatores que predispõe as pessoas à disfunção endotelial (BRANDES; FLEMING; BUSSE, 2005). Além disso, o mecanismo de disfunção endotelial durante o processo de envelhecimento é acompanhado pela deterioração do equilíbrio, que se caracteriza principalmente por uma redução da biodisponibilidade do NO e um aumento na produção de fatores vasoconstritores. Foi relatado que há uma expressão e atividade reduzidas de eNOS e de NO em animais mais velhos (SMITH; VISIOLI; HAGEN, 2006).

2.5. STENT E REESTENOSE

A intervenção coronária percutânea (ICP) com *stents* pode ser uma alternativa aceitável para pacientes com DAC (CAPODANNO et al., 2011; MORICE et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2016), sendo um dos procedimentos mais comuns para o tratamento de lesões ateroscleróticas (WEINTRAUB, 2007). Observou-se uma queda nas taxas de mortalidade por DCV, o que pode ser atribuída a muitos fatores, incluindo a introdução de técnicas de revascularização do miocárdio, como cirurgia de revascularização e ICP (BYRNE et al., 2017).

As complicações mais comuns na aterosclerose é a estenose devido a DAC. Apesar dos diversos avanços desde o ingresso das técnicas de revascularização para o tratamento dessa doença, grandes vantagens ocorreram por meio do desenvolvimento tecnológico dos instrumentos de dilatação (*stents*) e os sistema de apoio (imageamento cardíaco e ultrassom coronário) (CENTEMERO et al., 2004).

A implantação de *stents* tem uma taxa de falha significativa devido à reestenose arterial (WEINTRAUB, 2007). A reestenose é definida como a redução do diâmetro do lúmen após ICP, com ou sem implante de stent. No caso de estratégia com stent, é determinado por uma proliferação excessiva de tecido no vaso luminal do stent, chamada de “proliferação neointimal”, ou por um processo aterosclerótico de ocorrência recente denominado “neoaterosclerose” (EECKHOUT et al., 2012). Do ponto de vista clínico, a reestenose está frequentemente associada à recorrência dos sintomas de angina ou a uma síndrome coronariana aguda, e pode levar a uma reintervenção com bypass da artéria coronária ou re-ICP (ALFONSO et al., 2014).

A patogênese da reestenose intra-*stent* (RIS) é multifatorial, com disfunção endotelial (THANYASIRI et al., 2007), acúmulo de células inflamatórias nos vasos sanguíneos (WELT; ROGERS, 2002), proliferação de células vasculares do músculo liso da íntima (MARX; TOTARY-JAIN; MARKS, 2011), formação de trombos (KUBO et al., 2014), deposição de matriz extracelular (FARB et al., 2004) e modificação oxidativa de proteínas (BRÄSEN et al., 2001), todos contribuindo para a formação neointimal (WU et al., 2017). Além disso, as células endoteliais lesadas liberam menos NO, o que poderia contribuir ainda mais para a hiperplasia de endomembrana e proliferação de células musculares lisas, levando à estreitamento gradual, característica da RIS (SHIBATA et al., 2001; PALLERO et al., 2010). Os tipos de *stent* implantado e o procedimento de angioplastia carotídea, por exemplo, com ou sem dilatação por balão (HUNG et al., 2016), também podem influenciar a incidência de RIS substancialmente.

A respeito de todo esse progresso e da utilização sistemática dos *stents* coronários, a evolução clínica em médio prazo (1º ano) do paciente ainda pode ser afetada pela reestenose do vaso tratado, tal fenômeno que atinge cerca de 10% a 30% dos pacientes, levando novamente a um quadro de isquemia miocárdica e à necessidade de novos procedimentos, adicionando um custo financeiro considerável às despesas médicas para o seu diagnóstico e tratamento (CENTEMERO et al., 2004).

Mas em alguns casos, como o implante de *stent* foi aplicado em lesões coronárias mais desafiadoras, as taxas de reestenose tiveram um aumento para 30% ou mais, principalmente

devido à crescente incidência de fatores de risco que colaboram para reestenose, como o diabetes mellitus (HOLMES et al., 2004).

2.6. ESTATINAS

Há mais de duas décadas, William Clifford Roberts, MD, editor do *American Journal of Cardiology*, referiu-se às estatinas como “drogas milagrosas subutilizadas”, que são para a “aterosclerose o que a penicilina era para as doenças infecciosas” (ROBERTS, 1996). Elas têm sido o pilar da terapia de primeira linha para a gestão da hiperlipidemia nos últimos 30 anos (REINER et al., 2011; STONE et al., 2014). Seus efeitos benéficos, em termos de redução da LDL e redução do risco de mortalidade e morbidade cardiovascular têm sido bem documentados, tanto nos cuidados primários quanto nos secundários (CHEUNG et al., 2004; THAVENDIRANATHAN et al., 2006; BAIGENT et al., 2010; MIHAYLOVA et al., 2012; FULCHER et al., 2015).

A farmacodinâmica das estatinas atualmente é bastante compreendida, ela atua pela inibição competitiva da 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA), na qual leva a redução da síntese de mevalonato e a produção de colesterol no fígado. Apesar dos diversos efeitos benéficos comprovados cientificamente, uma pequena porcentagem de pacientes desenvolve efeitos colaterais provenientes das estatinas. Como efeitos colaterais são relatados, na qual ela pode desencadear estresse oxidativo, prejuízos da função mitocondrial e homeostase do cálcio muscular, levando a miototoxicidade e, conseqüentemente, à miopatia, mialgia, miosete e em casos mais raros, rabdomiólise (PETERS et al., 2009; ARRIGONI et al., 2017; RAMAKUMARI et al., 2018).

A HMG-CoA redutase é inibida de forma competitiva e reversível por estatinas (SIRTORI, 2014). Estão no mercado desde 1987 e cada uma varia em sua lipofilicidade, meia-vida de eliminação e potência (McTAGGART, 2003; SIRTORI, 2014; STONE et al., 2014). A inibição da síntese de colesterol leva à diminuição da produção de colesterol e à regulação positiva do receptor da LDL (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001).

Evidências têm sugerido que as estatinas, além da redução da LDL, exibem propriedades de estabilização da placa aterosclerótica e homeostase endotelial; efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiproliferativos e imunomoduladores; normalização do fluxo simpático e prevenção da agregação plaquetária. Esses efeitos independentes do colesterol foram chamados de efeitos pleiotrópicos (LIAO; LAUFS, 2005; ZHOU; LIAO, 2009). Podem ainda reduzir as citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, agindo tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (TOUSOULIS et al., 2014).

Foi proposto que as estatinas exercem efeitos tanto dependentes, quanto independentes, de LDL-C (ou pleiotrópicos) (LIAO; LAUFS, 2005). O efeito pleiotrópico é o efeito de classe das estatinas exibido por todas as estatinas que atuam nos tecidos não hepáticos, incluindo a pravastatina hidrofílica, que penetra fracamente através das membranas celulares das células não hepáticas (WANG; LIU; LIAO, 2008; ZHOU; LIAO, 2010).

Lee e colaboradores sugerem que, em um prazo mais longo e entre os pacientes de menor risco, submetidos à angiotomografia computadorizada coronária serial, as estatinas estão associadas a uma progressão mais lenta do volume geral da aterosclerose coronariana, com aumento da calcificação da placa e redução das características da placa de alto risco (LEE et al., 2018).

O tratamento farmacológico relatou efeitos nas doenças subjacentes e mostrou resultados consistentes em relação à restauração da função endotelial, como medicação anti-hipertensiva para controlar a pressão arterial, tratamento com estatinas para reduzir o LDL-C e antidiabéticos para reduzir os níveis de glicose no sangue (MATSUZAWA; LERMAN, 2014). O mecanismo de melhora da função endotelial induzida por estatinas parece ser independente dos efeitos hipolipemiantes. Os efeitos vantajosos das estatinas na função endotelial são atribuídos às suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (BONETTI et al., 2003).

O tratamento com sinvastatina resultou em uma redução significativa nos marcadores de disfunção endotelial, inflamação, estresse oxidativo e apoptose endotelial (KIRMIZIS et al., 2010). As estatinas são capazes de aumentar a expressão de eNOS (LAUFS et al., 1998). A maioria das estatinas demonstrou desempenhar um papel importante na correção da disfunção endotelial (DAVIGNON; GANZ, 2004).

O início precoce da terapia com estatinas pode melhorar a função endotelial, não apenas em pacientes com síndrome coronariana aguda, mas também em pacientes com doença arterial coronariana estável (DUPUIS et al., 2005; LING et al., 2005). Uma meta-análise recente mostrou que a terapia com estatinas está associada a melhora significativa na função endotelial periférica e coronariana (RERIANI et al., 2011).

2.7. GENÉTICA DA ATEROSCLEROSE

Marcadores moleculares são amplamente utilizados e são caracterizados pela detecção de variações naturais herdadas geneticamente em sequências de DNA entre indivíduos (YE et al., 2001). Tem havido um grande interesse em encontrar marcadores adicionais de estresse oxidativo, incluindo polimorfismos genéticos, que podem ser usados como preditores de risco de doença (GRUBISA et al., 2018).

Está bem estabelecido que os fatores genéticos desempenham um papel importante na patogênese da aterosclerose e que indivíduos geneticamente suscetíveis têm probabilidade de desenvolver a doença quando expostos a fatores de risco endógenos e ambientais (GRUBISA et al., 2018).

Estudos epidemiológicos demonstraram que DAC é uma doença multifatorial, causada por um ou mais genes em combinação com fatores ambientais, incluindo interações gene-ambiente (HAUSER; PERICAK-VANCE, 2000). O dano oxidativo ao DNA foi investigado em casos de DAC, e evidências de aumento na formação de EROS e proteção antioxidante prejudicada durante a progressão da doença foi fornecida (BOTTO et al., 2001; BOTTO et al., 2002; DEMIRBAĞ; YILMAZ; KOÇYIĞIT, 2005; RAJESH et al., 2011). Além disso, algumas variantes genéticas têm sido associadas ao risco de desenvolver DAC (TAŞPINAR et al., 2012; OLSHAN et al., 2003).

A predisposição genética para aterosclerose é crucial para sua ocorrência e desenvolvimento (YING et al., 2020). Pacientes com aterosclerose apresentam um traço genético muito complexo. Inúmeros genes estão relacionados à doença e regulam diversos processos biológicos, incluindo o metabolismo de macromoléculas, como colesterol, desintoxicação de xenobióticos, função endotelial, cicatrização e coagulação (SILVA, 2019).

Vários genes candidatos foram relatados como associados à suscetibilidade à aterosclerose (CHAMBERLAIN; GALTON, 1990; DJORDJEVIC et al., 2016; ÇOBAN et al., 2017; XIE; SHI; LIU, 2017).

2.8. GENES CANDIDATOS

2.8.1. Polimorfismos dos genes *eNOS T786C* e *eNOS G894T*

NO derivado do endotélio, sintetizado pela sintetase de eNOS, expresso constitutivamente em células endoteliais, plaquetas e glóbulos vermelhos, revelou ter propriedades anti-aterogênicas importantes, que poderiam inibir a agregação e adesão plaquetária (KADER et al., 2000; XUE et al., 2004; THIBEAULT et al., 2010). A evidência mostrou que a produção diminuída de NO pode levar à disfunção endotelial, o que pode contribuir para a aterosclerose (VANHOUTTE, 1997). Além disso, experimentos em modelos animais forneceram evidências de que camundongos sem o gene eNOS têm aterosclerose acelerada (DUPLAIN et al., 2001).

Ele está envolvido em vários processos fisiológicos e patológicos (PAGLIARO, 2003). Três isoformas de óxido nítrico sintase (NOSs: NOS neuronal, NOS induzível e NOS endotelial) podem sintetizar NO por meio da oxidação da L-arginina em L-citrulina.

(FORSTERMANN et al., 1994). A forma mais abundante dessas isoformas é a eNOS, que é derivada do endotélio vascular (RAFIKOV; FONSECA; KUMAR, 2011).

O gene *eNOS* é um regulador crítico da vasodilatação e um inibidor da adesão e agregação celular, protegendo humanos e animais da vaso-oclusão (NISHANK et al., 2013). Está localizado no cromossomo 7q35-36 e compreende 26 éxons, que se estendem por 21 kb, e é expresso principalmente no endotélio (HEY et al., 2011).

Devido a relevância do NO na regulação do sistema cardiovascular, levantou-se interesse de diversos pesquisadores no mundo, a respeito dos polimorfismos no gene da eNOS a muitas doenças cardiovasculares. Os polimorfismos do tipo “SNPs” (*single nucleotide polymorphisms*) são os tipos mais comuns e podem ocorrer em regiões que regulam a expressão gênica, tais como o promotor do gene. Como no caso do SNP na região promotora *T786C*, no qual, tem a capacidade de reduzir a atividade do promotor e predispor ao espasmo coronário e ao infarto do miocárdio em uma população japonesa (MARRONI et al., 2005).

O polimorfismo *T786C*, localizado na região flanqueadora 5' do gene *eNOS* (FATINI et al., 2004) promove a substituição da base nitrogenada timina por citosina reduzindo a atividade do gene *eNOS* (BARBOSA et al., 2017). É um polimorfismo que afeta a transcrição do gene e está associado à doença arterial coronariana em fumantes (WANG et al., 1996) e à aterosclerose em várias populações (KONSOLA et al., 2016; ARMENIS et al., 2017; CHANG et al., 2017).

Segundo Zago (2013) a presença do polimorfismo no gene *eNOS* explica os diferentes níveis de atividade enzimática, os quais podem estarem relacionados com o aumento do risco cardiovascular, sendo de grande importância do ponto de vista clínico e farmacogenético. A presença do alelo C diminui em até 50% a atividade transcricional, provavelmente o resultado da ligação da proteína repressora RPA1 à região promotora quando esse alelo está presente (NAGASSAKI et al., 2006; ZAGO et al., 2013).

Como complicações devido a esse polimorfismo há a redução da atividade enzimática: o alelo C têm sido relacionados a essa diminuição, ao aumento da disfunção endotelial e a doenças cardiovasculares. É sabido que as estatinas possuem efeitos pleiotrópicos conhecidos, os quais incluem a regulação da função endotelial reduzindo o estresse oxidativo e a trombogenicidade (ZAGO et al., 2013).

O polimorfismo *G894T* está localizado no éxon 7 e codifica uma mudança de Glu para Asp na posição 298 e se mostrou associado à produção de NO basal reduzida (KARVONEN et al., 2010; KUMAR; SPURTHI; KUMAR, 2012), por causa da diminuição da ligação entre a

eNOS e a caveolina-1, reduzindo fortemente a disponibilidade e atividade da enzima, atenuando a produção de NO na camada íntima dos vasos sanguíneos (COZMA et al., 2019).

Existem muitos estudos de associação genética abordando o impacto dos polimorfismos Glu298Asp no risco de aterosclerose, com resultados parcialmente promissores (WANG et al., 1996; HINGORANI et al., 1999; COLOMBO et al., 2003; CASAS et al., 2004). Todos os fatores de risco estabelecidos para aterosclerose aumentam o estresse oxidativo e induz o desacoplamento da eNOS na parede vascular (LI; FÖRSTERMANN, 2013; LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013) levando não apenas à redução da sua produção, mas também à potencialização do estresse oxidativo (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017).

Os efeitos dos polimorfismos em genes que codificam diferentes enzimas, receptores e fatores de crescimento na RIS ou DAC estão sendo ativamente investigados, sugerindo uma relação entre essas e a variação genética que ocorre no gene *eNOS* (GOMMA et al., 2002; SUZUKI et al., 2002; SHUVALOVA et al., 2012).

2.8.2. Genes *GSTM1* e *GSTT1*

A superfamília da Glutathione S-Transferase (GST) são enzimas antioxidantes de fase II, responsáveis pela desintoxicação celular (SAFARINEJAD; SHAFIEI; SAFARINEJAD, 2010) e na desintoxicação de xenobióticos tóxicos, metabolitos e produtos reativos de processos intracelulares (PINHEIRO, 2013).

GSTs são um grupo de enzimas que desempenham papéis vitais na regulação da desintoxicação celular de várias toxinas exógenas (SINGH, 2015). Além disso, acredita-se que as GSTs também podem proteger as células contra o estresse oxidativo e seus danos associados ao DNA (ZHANG; XU; LI, 2014). Estas enzimas, estão diretamente relacionadas a mecanismos de defesa contra os danos do estresse oxidativo que promove alta liberação de radicais livres provocando a disfunção endotelial e oxidação do LDL. Todos estes processos e moléculas estão envolvidos no processo da aterosclerose (TÜRKANOĞLU, et al., 2010).

Por meio da conjugação com a glutathione, o GST participa da defesa do organismo contra mutações e estresse oxidativo que levam à aterosclerose. Como sua atividade depende dos polimorfismos do gene GST, estes podem aumentar o risco de carcinogênese e processos inflamatórios (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Alterações genéticas, como variações nas sequências de bases que codificam GSTs, são responsáveis pela falta de codificação de proteínas ou pela codificação de enzimas deficientes. Esse fator genético parece estar fortemente relacionado a uma maior susceptibilidade a aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (ETEMAD

et al., 2016). Essas enzimas intracelulares, atuam na fase II do metabolismo xenobióticos, catalisando o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutatona a substâncias que possuem em sua composição um átomo de carbono, hidrogênio ou enxofre eletrofílico. Assim, elas inibem a ação de toxinas endógenas e exógenas nas células, evitando que essas toxinas danifiquem o DNA celular (SONG et al., 2012).

Polimorfismos em *GSTs*, que codificam enzimas com funções de desintoxicação, alteram a sensibilidade de um organismo aos processos inflamatórios envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose (WILSON et al., 2000; IZZOTTI et al., 2001; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; MARINKOVIĆ; PASALIĆ; POTOČKI, 2013).

Existem três famílias de glutatona-S transferases: microsomal, mitocondrial e citosólica. As isoformas mais frequentes da família citosólica são alfa (*GSTA*), mu (*GSTM*), pi (*GSTP*), sigma (*GSTS*), ômega (*GSTO*), zeta (*GSTZ*) e teta (*GSTT*). Esta é a família de enzimas que desintoxica compostos eletrofílicos reativos, mas também está envolvida no metabolismo de lipídios e na biossíntese de compostos biogênicos derivados de lipídios (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Os genes *GSTM1* e *GSTT1* humanos exibem um polimorfismo muito comum que exclui, parcial ou completamente, esses genes e suas enzimas (MASETTI et al., 2003).

Os genes *GSTM1* e *T1* são polimórficos em populações e o genótipo nulo para cada um desses genes tem uma alta prevalência em populações humanas (10-65%) (KATOH et al., 1996; KUMAR; AGARWAL; GOEL, 2009). Deleções desses genes levam à falta de atividade enzimática (YALIN et al., 2007). Espera-se que a atividade *GST* alterada, associada a polimorfismos, afete a DAC, doença renal e risco de câncer, por meio da redução da proteção contra danos ao DNA de eletrólitos reativos (DE FLORA et al., 1997). Uma vez que a produção de *GSTs* determina a capacidade de um indivíduo desintoxicar produtos de EROS, as deleções duplas, provavelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, incluindo aterosclerose (GRUBISA et al., 2018).

O *GSTM1*, está presente no cromossomo 1p.13.3 e é polimórfico. A superfamília μ (*GSTM*), possui 5 genes distintos, sendo eles: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5* (RODRIGUES, 2017). Polimorfismos no gene *GSTM1*, pode levar a alterações nos níveis de hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL-colesterol (MACIEL et al., 2009). Quando ativo, atua na detoxificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Já quando a *GSTM1* está nula, ocorre uma ausência do gene e da sua função, acarretando alteração na atividade enzimática (RODRIGUES, 2017).

O *GSTM1* consiste em 8 éxons, que têm comprimento de 36-112 bp, enquanto os íntrons variam em comprimento de 87-2641 bp. Está inserido em uma região de extensas homologies, sendo flanqueado por duas regiões com trechos idênticos de 4,2 kb (MANFREDI et al., 2009). Quando ativo é responsável pela desintoxicação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes nos cigarros e em solventes como o benzeno. A sua ausência pode aumentar a suscetibilidade ao câncer devido à redução da eficiência da desintoxicação de carcinógenos (MARINKOVIĆ; PASALIĆ; POTOČKI, 2013; ZI et al., 2014).

Este gene, responsável pela codificação da isoenzima *GSTM1*, é polimórfico e pode apresentar um alelo nulo e, portanto, codificar uma proteína com capacidade metabólica reduzida ou não codificar a proteína (SHARMA et al., 2000). De 20 a 50% dos indivíduos expressam a forma mutada do gene *GSTM1*, essa mutação é conhecida como deleção do gene homozigoto. Esta deleção ocorre quando um ou mais nucleotídeos são deletados da sequência de DNA. Estudos epidemiológicos indicam que indivíduos com deleção homozigótica do *GSTM1* apresentam alto risco de desenvolver vários tipos de doenças, como câncer de mama, câncer de pele, hipertensão arterial, entre outras (MORAIS et al., 2008).

O gene *GSTT1* foi mapeado no cromossomo 22q11.13, possui dois alelos: um alelo presente (*GSTT1*1*) e a sua forma nula (*GSTT1*0*). Vários estudos indicam que o alelo *GSTT1*0* é responsável pela supressão total ou parcial da *GSTT1*. Esta atividade enzimática está intimamente ligada ao processo de desintoxicação celular (SHARMA et al., 2000). Estima-se que cerca de 20 a 60% dos indivíduos apresentam deleção do gene *GSTT1* (MORAIS et al., 2008).

2.8.3. Genes *CYP3A5* e *CYP2C19*

Diversos estudos farmacogenéticos recentes têm como objetivo correlacionar polimorfismos genético específicos com a efetividade de diversas drogas, entre elas as estatinas. Acredita-se que polimorfismo do gene da CYP pode afetar na eficácia do tratamento com estatinas, embora os resultados não sejam claros (KOLOVOU; KOLOVOU, 2014).

A superfamília da proteína do citocromo P450 (CYP P450), é um sistema de extrema importância para o organismo humano, na qual é presente na membrana de diversas espécies de animais, vegetais e microrganismos. A superfamília da isoenzima CYP na qual compreende cerca de 60 genes e 33 pseudogenes organizados em 18 famílias e 42 subfamílias (BOZINA; BRADAMANTE; LOVRIC, 2009; ELFAKI et al., 2018). Avanços na biologia molecular e na genômica permitiu a caracterização bioquímica das enzimas da família CYP P450A

individualmente, na qual revelou muitas informações sobre o sistema enzimático no qual é capaz de metabolizar drogas principalmente no fígado (NEBERT; RUSSELL, 2002).

A superfamília do citocromo P450 está localizada principalmente no fígado, intestino delgado e rim (THELEN, 2009; RENAUD et al., 2011). As enzimas CYPs P450 catalisam diferentes reações de oxidação e algumas reações de redução (GUENGERICH, 2007). Exemplos de substratos de CYPs incluem compostos exógenos (xenobióticos) e endógenos, como colesterol, testosterona, progesterona, prostaglandina H₂, corticosterona, ácido retinóico, vitamina D₃ e ácido araquidônico (GUENGERICH, 2017). As CYPs catalisam as reações de fase 1 (SIM; INGELMAN-SUNDBERG, 2013), que são oxidação ou desmetilação (IYANAGI, 2007). A duração da ação de muitos medicamentos depende de sua taxa de metabolismo (FERNANDEZ et al., 2011). Estas enzimas CYP450, portanto, previnem ou regridem a aterosclerose (LUOMA, 2007). Polimorfismos genéticos em CYPs são uma das principais causas da variação interindividual no metabolismo de drogas. Eles levam à ocorrência de variação na resposta aos medicamentos, desde efeitos adversos até a falta de eficácia (INGELMAN-SUNDBERG; OSCARSON; MCLELLAN, 1999).

A isoforma hepática e intestinal CYP3A5 é o tipo mais abundante da família, sendo que ela pode representar mais de 50% do CYP3A total em certos indivíduos e pode exercer uma maior ação metabólica, isso difere em indivíduos que possuam um alelo polimórfico do CYP3A5. O alelo do tipo selvagem do CYP3A5 é definido como CYP3A5 * 1, e diversas mutações são relatadas (LOLODI et al., 2017; LU et al., 2017).

Existe a ocorrência de diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no CYP3A5 como descrito por Lolodi e colaboradores (2017), sendo que o melhor estudado é o que ocorre na posição 6986 (6986 A>G), no qual está localizado dentro do íntron 2 do gene CYP3A5 (CHEN; PRASAD, 2018).

Pacientes que apresentam pelo menos uma cópia do nucleotídeo A são classificados como portadores do alelo *1 e são conhecidos como expressores do CYP3A5, e este alelo é associado à maior expressão da enzima CYP3A5. Já aqueles indivíduos que apresentam nucleotídeos GG homozigóticos na posição 6986 são conhecidos como portadores *3/*3 e são considerados não expressores. Quando ocorre a substituição de G por A, AG pode gerar processamento de mRNA incorreto, levando a um códon de parada precoce que resulta em uma proteína não funcional, sendo classificado em *1/*3 (CHEN; PRASAD, 2018).

Embora existam resultados incertos, é relatado que o alelo CYP3A5*3 reduz a expressão do CYP3A5 e foi correlacionado com a diferença na exposição sistêmica a uma dose única de

qualquer fármaco da classe das estatinas, embora existem resultados conflitantes (PETERS et al., 2009).

Acredita-se que a variação interindividual da CYP3A têm afetado significativamente o metabolismo de fármacos, no qual são relatados na população em geral e pode resultar em diferenças significativas na eficácia e tolerabilidade de drogas administradas em doses padrões (WEI; ZHANG, 2015). Do ponto de vista farmacológico, o alelo CYP3A5*1 do tipo selvagem está relacionada a uma maior produção da enzima CYP3A5 funcional, e consequentemente a uma maior atividade de metabolização de fármacos em geral pelo CYP3A (CHEN; PRASAD, 2018).

O citocromo P450 2C19 é codificado pelo cromossomo 10 e é expresso no fígado humano (UEHARA et al., 2015). É o membro mais polimórfico da subfamília CYP2C (LEE, 2012). O polimorfismo genético no CYP2C19 resulta em diferenças interindividuais na expressão da enzima e na atividade metabólica. A variação alélica classificou a população de acordo com a atividade catalítica da CYP2C19 em fenótipos pobres, extensos e ultrarrápidos para eliminação do fármaco (REYNALD et al., 2012).

O polimorfismo *CYP2C19**2 (G681A) consiste em uma mutação pontual, onde uma guanina é substituída por uma adenina na posição 681 do éxon 5 do gene *CYP2C19*. Este SNP leva a uma alteração do *splicing* alternativo e à produção de uma proteína inativa (SANTOS et al., 2014; DENISENKO et al., 2017).

A perda de função do CYP2C19 aumenta o risco de eventos cardiovasculares graves, como síndromes coronárias agudas. O alelo selvagem *1 está associado ao metabolismo funcional do gene CYP2C19 (SCOTT et al., 2013).

Entre eles, o alelo CYP2C19*1 de tipo selvagem está associado ao metabolismo funcional mediado por CYP2C19, enquanto os alelos mais comuns da variante de perda de função de CYP2C19 são CYP2C19*2 e *3, que respondem pela maioria dos defeitos no genótipo (YIN; MIYATA, 2011).

Por outro lado, as EROS também são geradas por reações catalíticas CYP2C em células endoteliais da artéria coronária (FLEMING et al., 2001). Quando o CYP2C é super produzido, ele irá gerar mais EROS (ERCAN et al., 2008). Os efeitos deletérios das EROS incluem a inibição do relaxamento mediado pelo óxido nítrico e a elevada atividade do fator de transcrição redox-sensível (NF-κB) (FLEMING et al., 2001).

3. JUSTIFICATIVA

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no Brasil e no mundo, determinando aumento da morbidade e incapacidade ajustadas pelos anos de vida (NASCIMENTO et al., 2018) e a principal causa de mortalidade em muitas nações economicamente desenvolvidas, sendo responsável por cerca de 30% de todas as mortes. Sua incidência ainda está aumentando e se tornou uma das principais causas de incapacidade e mortalidade prematura em todo o mundo (ROTH et al., 2017; BEAGLEHOLE; YACH, 2003; WHO, 2014). Em 2030, prevê-se que aproximadamente 23,6 milhões de pessoas morram dessa doença. O enorme e, ainda crescente, número de doenças cardiovasculares sobre os indivíduos, famílias e sistemas de saúde indica uma necessidade urgente de pesquisa sobre doenças ateroscleróticas e implementação de medidas preventivas (PEIGE, et al., 2020).

A aterosclerose, o principal processo patológico da maioria das doenças cardiovasculares, pode começar cedo na vida e permanecer latente e assintomática por longos períodos antes de progredir para seus estágios avançados (HONG, 2010; MCGILL et al., 2000). É um processo que dura toda a vida e progride em várias taxas, dependendo de fatores genéticos e não genéticos (TABAS; BOREN, 2007). Uma compreensão atualizada do número de pessoas com aterosclerose é decisiva para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e manejo primários e para informar as partes interessadas. No entanto, nenhuma estimativa atual da prevalência da aterosclerose está disponível em nível global (PEIGE et al., 2020).

O progresso da biologia celular e molecular nos permitiu refinar nossa compreensão dos mecanismos envolvidos no aparecimento da aterosclerose (BENNETT et al., 2016). Apesar dos avanços contínuos na medicina cardiovascular, as complicações agudas da aterosclerose continuam sendo as principais causas de morte em todo o mundo. É preocupante pois as abordagens comuns, baseadas em fatores de risco e biomarcadores, falham em identificar uma proporção considerável de indivíduos com alto risco de eventos cardiovasculares (DAVIDSON, et al., 2011).

Com o desenrolar do século XX, com base em inúmeras observações epidemiológicas e estudos de intervenção, os fatores de risco cardiovasculares foram identificados e direcionados com o objetivo de diminuir o número de doenças cardiovasculares em todo o mundo. Ao longo dos séculos, as mudanças nos padrões de alimentação humana, uma diminuição progressiva da atividade física e uma maior prevalência de obesidade (fatores que contribuem para as taxas alarmantes de diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia) levaram aos distúrbios relacionados à aterosclerose - infarto do miocárdio, cardiomiopatia isquêmica,

acidente vascular cerebral e doença arterial periférica -, sendo uma consequência inevitável do processo evolutivo que temos que enfrentar na atualidade (ALLAM et al., 2011).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar o polimorfismo dos genes das famílias eNOS, GST, CYP em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas, analisando um grupo caso – aqueles que possuem *stent* – e um grupo controle – aqueles que não possuem *stent* – para realizar uma comparação da terapêutica das estatinas.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1 Analisar a prevalência desses polimorfismos do grupo analisado.
- 4.2.2 Verificar a frequência dos polimorfismos em pacientes ateroscleróticos que fazem o uso de estatinas e que possuem ou não *stent*.
- 4.2.3 Pesquisar se o polimorfismo dos genes influenciou na resposta a estatina em pacientes com *stent*.
- 4.2.4 Averiguar o polimorfismo dos genes e ver a relação com a reestenose.

5. ARTIGOS

5.1. ARTIGO 1: Publicado na revista Genetics and Molecular Research (GMR). DOI: 10.4238/GMR18539

Lack of association of restenosis with the T786C polymorphism of eNOS in atherosclerotic patients and in silico evidence of interaction between statin and the eNOS protein

Andreia Marcelino Barbosa^{1,3#}, Oximano da Silva Dias Neto^{2,3#}, Kleber Santiago Freitas e Silva^{5*}, Isabela Barros Lima^{3,4}, Ulisses dos Santos Vilarinho^{3,4}, Lilian Castilho de Araújo Gianotti^{2,3}, Fábio Oliveira de Souza^{2,3}, Iasmim Ribeiro da Costa^{1,3,4}, Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura^{1,2,3,4*}

¹Institute of Biotechnology and Biodiversity, Federal University of Goiás, UFG, Goiânia-GO, Brazil;

²Department of Genetics, Pontifical University Catholic of Goiás, Goiânia-GO, Brazil;

³Replicon Research Center, School of Agrarian and Biological Sciences, Pontifical University Catholic of Goiás, Goiânia-GO, Brazil;

⁴School of Medical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Pontifical University Catholic of Goiás, Goiânia-GO, Brazil;

⁵Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, UFG, Goiânia-GO, Brazil.

#The authors contributed equally to this research.

Running title: **Restenosis and eNOS polymorphism**

Keywords: Atherosclerosis; eNOS T786C; nitric oxide; stent; polymorphism.

*Corresponding author: Silva, KSF

Biological Sciences Institute
Federal University of Goiás
74710-310, Goiânia, Goiás, Brazil.
smallbinho@hotmail.com

ABSTRACT

Atherosclerosis is a multifactorial chronic-inflammatory disease related to endothelial aggression to the intimate layer of medium and large caliber arteries. Hyperlipidemia and atherosclerosis causes eNOS to lose its function, producing superoxide and leading to endothelial dysfunction. The nitric oxide derived from eNOS is anti-atherogenic. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region reduce its activity and predispose individuals to cardiovascular diseases. The aim of this study was to analyze the T786C polymorphism of *eNOS* in atherosclerotic patients under statin treatment, due to the clinical importance of such genetic variation. The study of atherosclerotic patients with stent may bring information regarding the frequency of restenosis occurrence. The design of the study comprised an experimental group with stent patients (35) and a control group without stent (44) in order to analyze the efficiency of the statin therapy. We collected 79 peripheral blood samples from patients diagnosed with atherosclerosis undergoing statin treatment. Interestingly, the TC genotype was prevalent in stent patients who smoke but there was no relation between the polymorphism under study and restenosis. We used an *in silico* approach through molecular modeling and molecular docking to show that statins act stabilizing the eNOS protein. Seven amino acid residues in the eNOS binding pocket interact with the statin molecule, as this family of drugs acts stabilizing the eNOS protein. Thus, the use of such drugs may interfere with the development of restenosis.

Keywords: Atherosclerosis; *eNOS T786C*; nitric oxide; stent; polymorphism.

INTRODUCTION

Despite advances in Science, cardiovascular diseases are the leading cause of death, being responsible for approximately 48% of deaths in the world's population. According to the World Health Organization (WHO), over 17.3 million people died due to heart attack in 2008 and 23.6 million people may die due to cardiovascular diseases in 2030. Atherosclerosis is the main cause of coronary heart disease (Sargowo et al. 2018). Atherosclerosis is a multifactorial chronic-inflammatory disease, which occurs in response to endothelial aggression and affects mainly the intimate layer of medium and large-caliber arteries. The pathology is triggered by cholesterol accumulation but is influenced by associations between environmental factors, genetic components, immune system, hematological and endothelial cells, coagulation factors and inflammatory mediators (Lusis 2000; Avezedo et al. 2010; Xavier et al. 2013; Faludi et al. 2017).

Atherosclerosis mediates the formation of atherosclerotic plaques as a response to aggression of the vascular endothelium and influenced by risk factors such as dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension and smoking (Xavier et al. 2013; Faludi et al. 2017). Mediators of inflammation in the atheroma stimulate the migration and proliferation of smooth muscle cells of the arterial medial layer. These cells produce cytokines, growth factors and extracellular matrix, which compose the fibrous layer of the atherosclerotic plaque. The plaque essentially contains cellular elements, components of the extracellular matrix and a lipidic and a necrotic nucleus (Xavier et al. 2013; Bentzon et al. 2014; Faludi et al. 2017)..

There are several classes of drugs used in the treatment and prevention of hyperlipidemias and statins are one of the most used in this type of therapy. Statins' activity

decrease serum levels of cholesterol-rich lipoproteins reducing the risk of developing coronary artery diseases (Campo and Carvalho 2007; Xavier et al. 2013). Statins inhibit the synthesis of cholesterol in the liver through inhibition of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA), consequently inhibiting the initial steps of the cholesterol biosynthesis (Fonseca 2005; Campo and Carvalho 2007; Souza-Costa et al. 2007; Xavier et al. 2013). Among the beneficial effects of statin therapies are improvement of endothelial function, stabilization of atherosclerotic plaques, inhibition of oxidative stress, reduction of inflammation and reduction of thrombogenic response (Li and Förstermann 2009). In addition, statins stimulate eNOS expression mediated by eNOS mRNA and protein stability leading to an increase in the production of nitric oxide in endothelial cells. Scientific evidence indicates that statins promote the reduction of oxidative stress related to the onset of cardiovascular diseases (Liao and Laufs 2005; Nagassaki et al. 2006).

The *eNOS* gene encodes a 135 kDa protein in which it contains around 1,203 amino acids. There are several polymorphism related to *eNOS* described in the literature, among them the most common are Glu298Asp, G894T, T786C (Hingorani 2001; Vecoli 2014). The protein eNOS loses its function and produces superoxide leading to endothelial dysfunction in atherosclerotic and dyslipidemic patients. In vitro studies demonstrate that eNOS-derived nitric oxide acts as an antiatherogenic molecule (Kawashima and Yokoyama 2004). Due to the relevance of nitric oxide in the regulation of the cardiovascular system, polymorphisms of the *eNOS* gene have been suggested to be related to several cardiovascular diseases. Single nucleotide polymorphisms (SNP) may occur in regions that regulate gene expression affecting protein stability. A SNP in the T786C promoter region reduce promoter activity, affect protein folding and predispose individuals to coronary spasm and myocardial infarction (Marroni et al. 2005).

In addition to complications related to the polymorphism, stenosis has been target of studies. Restenosis of the treated vessels affect 10% to 30% of patients. Technological advances developed dilation instruments such as stents in order to restore the flow of blood in arteries (Centemero et al. 2004). In this way, the aim of this study was to analyze the eNOS T786C polymorphism in atherosclerotic patients undergoing statin therapy and stent implantation and analyze through an in silico approach statins interaction with the eNOS protein.

MATERIALS AND METHODS

We collected peripheral blood samples of 79 patients from the service of cardiology and peripheral vascular surgery in private hospitals of Goiânia (Brazil) from October 2014 to February 2015. All patients had previous diagnosis of atherosclerosis and dyslipidemia undergoing statin treatment. Atherosclerosis diagnosis was based on clinical examination and confirmed by imaging methods. Patients who underwent surgical intervention of stent placement were classified into the experimental group and those without stent comprised the control group. Both groups were formed by patients with atherosclerosis and were under statin therapy. The inclusion criteria were patients older than 38 years of age, suffering from atherosclerosis with or without restenosis, under statin therapy and subjected to stent placement. All individuals had accepted to respond the questionnaire and signed the informed consent form. Patients who did not comply with any of those criteria were excluded from the study.

The present research was approved by the National Commission of Ethics in Research/National Information System on Ethics in Research involving Human Beings of CEP/PUC GOIÁS under the protocol number 35321614.3.0000.0037.

The collected peripheral blood samples were subjected to molecular tests in order to detect the *eNOS* (T786C) gene polymorphism. After the DNA extraction, the samples were submitted to PCR (polymerase chain reaction) amplification in a final volume of 25 μ L, according to a protocol proposed previously (Silva and Moura 2016). All the analyzes were performed in triplicate. DNA fragments were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis in 1x EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) Tris-borate solution (TBE) subjected to an electric field of 10 V/cm. The gels were stained with ethidium bromide (5 μ g / mL) and the visual record was made on a BIORAD Photo-documentator (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

The genotyping of the *eNOS* gene (T786C) were performed by ARMS-PCR (amplification refractory mutation system-PCR) for the detection of known sequence polymorphisms. The technique simultaneously amplify mutant and normal alleles and allow the amplification of an internal DNA control.

The results of the *eNOS* (T786C) gene polymorphism were organized into Excel spreadsheets. Statistical analysis was performed by G-test and chi-square (χ^2) in order to determine possible relationship between the polymorphism and atherosclerotic disease. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant and the statistical tests were performed by the BioEstat® 5.3 software.

In order to perform the *in silico* approach, the three-dimensional structure of the monomer and dimer forms of the proteins eNOS were modeled by the I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) server (Yang et al. 2015). The procedures is based on template homology from protein structures experimentally available in the PDB (protein databank). The best predicted model of the protein under study is determined by conformation recognition through Monte Carlo simulations. In summary, the prediction of eNOS structures comprised by a few steps. The determination of secondary structure by PSSpred (Protein Secondary Structure Prediction) and refinement of templates by LOMETS (Local Meta-

Threading-Server) (Wu and Zhang 2007). Clusterization of conformations according to energy score by SPICKER (Zhang and Skolnick 2004) to determine possible and near native structures. Finally, molecular dynamics, structure refinement and the prediction of biological function by COACH (Yang et al. 2013).

The interaction between statin and eNOS was predicted by the SwissDock server (Grosdidier et al. 2007). The algorithm performs the prediction through binding modes in a local box or in cavities of the protein. Energy estimation is performed based on CHARMM force field and the most stable clusters are then generated. The visualization software PyMol was used in order to analyze the interaction between the eNOS binding pocket and statin and to generate figures of the *in silico* approach.

RESULTS

Analyzing the genotype frequency of the experimental stent group for the *eNOS* T786C polymorphism, the TT and CC homozygous genotype were less frequent than the TC heterozygous genotype. The analysis of the control group without stent also resulted in a higher frequency of the heterozygous. There was no statistically significant difference between the groups in relation to the genotypic distribution (Table 1).

We assessed the genotypic frequency of the *eNOS* T786C polymorphism in relation to the occurrence of restenosis in patients with stent and significant difference was found in the analysis (Table 2). Twelve patients from the experimental stent group developed restenosis and half of those had the TC genotype of the *eNOS* T786C polymorphism (Table 2). In addition, more than half of the restenosis patients reported to be active smokers. The frequency of smoker patients with stent was higher both in control and experimental groups (Table 3).

Table 1: Frequency of the eNOS T786C polymorphisms in relation to the presence or absence of stent.

Group	TT n	TC n	CC n	Total	*p
Experimental group with stent	1	22	12	35	0.3139
Control group without Stent	4	30	10	44	

*G Test

We found a statistically significant difference ($p = 0.0207$) in the experimental stent group regarding smoking (Table 4). (Table 4).

Table 2: Genotypic frequency of the eNOS T786C polymorphism in relation to the occurrence of restenosis in patients with stent.

Group	TT n	TC n	CC n	Total	p*
Experimental group with Stent	1	22	12	35	0.6264
Patients group with Restenosis	1	6	5	12	

*G Test

The I-TASSER server (Yang et al. 2015) modeled the monomer and dimer forms of the eNOS protein. Figure 1A shows the surface of the monomer and figure 1C the surface of the eNOS dimer, both with statin inside the binding pocket. The in silico docking approach between eNOS and statin showed that there is no significant difference when statin interacts with the binding pocket of the protein in the monomer or the dimer form. In addition, the binding of statin to eNOS does not alter the conformation of the protein in the dimer form, the binding takes place in the same region and with the same amino acid residues either in the monomer or in the dimer. The amino acid residues represented in red stabilize the interaction between statin and the binding pocket of the protein through hydrogen bonds (Figure 1). The hydrogen bond forming residues are the same for the monomer and the dimer of the protein. The disposition of statin inside the binding pocket is highlighted in figure 1B.

Table 3: Association of smoking habits with patients with stents compared with patients without stents.

GROUPS	Experimental Stent Group n	Control Without Stent n	TOTAL	p*
Smokers	24	29	53	0.8025
Non-smokers	11	15	26	

*Chi-squared test

The score of interaction between statin in the binding pocket for the best conformation of the drug within the eNOS proteins was -41.8446 KJ/mol, ranked among 46 clusters of eNOS-statin determined by the SwissDock server (Grosdidier et al. 2007). Figure 2A shows the disposition of statin inside the binding pocket by a cartoon representation. Interestingly, the drug fits well within the protein cavity helping to stabilize its conformation. The eNOS interacting residues with statin protrude into the region where statin stabilize inside the pocket (Figure 2B). The binding pocket showed to be highly hydrophobic and contribute to the interaction with statin.

Table 4: Association of the eNOS T786C genotypic frequency with smoking in relation to the presence or absence of stent in atherosclerotic patients.

absence of stent in atherosclerotic patients.					
GROUPS	TT	TC	CC	TOTAL	p*
	n	n	n		
STENT GROUP					
smokers	1	15	8	24	0.0207
non-smokers	0	2	9	11	
CONTROL GROUP					
smokers	3	21	5	29	0.4842
non-smokers	1	9	5	15	

*G Test

Statin interacts with seven eNOS amino acid residues inside the binding pocket mainly through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Figure 3A shows the interaction between three amino acid residues highlighting the distance of the bonds. The residue M358 (methionine) interacts via two bonds within 2.5 Å of distance. It also interacts three times with W356 (tryptophan) within 2.5, 2.9 and 3.1 Å and G355 (glycine) within 2.5 Å. Other two amino

acid residues that interacts with statin are W447 and V336 (valine) within 2.5 and 2.4 Å, respectively (Figure 2B). The amino acids G186 and C184 (cysteine) help to stabilize statin inside the eNOS binding pocket through in interactions of 2.5 and 2.0 Å for the former and 2.3 Å for the latter (Figure 2C).

DISCUSSION

In the present study, the genotype frequency of *eNOS* T786C polymorphism show a 2.3-fold higher incidence of TC genotypes in relation to the mutant genotype (CC) in the experimental and control groups. This result is similar to the findings of Barbosa et al. (2017), Silva (2019) and Oliveira et al. (2019). They found a higher prevalence of the TC genotype in patients with atherosclerosis in a Brazilian population. Zeng and co-workers (2017) conducted a study in Chinese patients with stents and found similar results where the TC genotype was 2 fold higher in that population (Zeng et al. 2017). However, different results were found in India. They analyzed the relationship between *eNOS* T786C polymorphism and the susceptibility to atherosclerosis and found a greater prevalence of the TT genotype in that population (Shankarishan et al. 2014). Other studies have also try to relate the *eNOS* T786C polymorphism with cardiovascular diseases.

An association between *eNOS* T786C polymorphism with the development of coronary artery disease in Korean individuals has been described (Sung et al. 2015). Another study showed that the CC genotype was 2.7 times higher in patients with acute coronary syndrome in a Ukrainian population (Ciftçi et al. 2008). Nakayama et al. (1999) showed that the CC genotype reduces nitric oxide synthesis and predisposes patients with the allele mutation to coronary spasm. Conversely, it has been stated that the C mutant allele is not a predisposing factor for severe coronary artery disease (Ragia et al. 2010). The results are conflicting since

other studies found otherwise showing positive association of the *eNOS* T786C polymorphism with coronary artery disease (Colombo et al. 2003; Afrasyap and Ozturk 2004). In addition, it is well established that the T786C polymorphism results in a drastic decrease in the production and activity of nitric oxide (Zago et al. 2013a), increasing the susceptibility of patients to cardiovascular diseases (Nakayama et al. 1999).

Analyzing the T786C genotype frequency of smoker patients, we found nearly two-fold higher ratio of the TT genotype. Similar results were found in a Japanese population, where the TT genotype was prevalent among atherosclerotic smoker patients (Nasreen et al. 2002). Although smoking has shown an increased risk of developing cardiovascular disease, the effect of nicotine, the main component of cigarette smoking on the cardiovascular system, is still unknown (Ruixing et al. 2007). Nicotine drives angiogenesis in the scenarios of inflammation, ischemia, tumor and atherosclerosis. Moreover, nicotine stimulates the growth of atherosclerotic plaques and inhibit apoptosis in human coronary artery endothelial cells (Heeschen et al. 2001). Ruixign et al. (2007) demonstrated that nicotine might accelerate intimal proliferation and damage the iliac artery increasing risk of restenosis.

It has been showing that statins benefit patients with atherosclerosis, improve nitric oxide production and the prognosis of patients (Lacchini et al. 2010; Zago et al. 2013b; Ramakumari et al. 2018). Zeng et al. (2017) showed that the C allele the T786C polymorphism is linked to an increased risk of in-stent restenosis in Chinese patients (Zeng et al. 2017). Studies have compared the use of pharmacological and conventional stent and showed that patients with the pharmacological stent presented two to three times more events related to restenosis (Pfisterer et al. 2006; Araújo et al. 2007) and significant increase in the risk of death and heart disease (Anstrom et al. 2007; Eisenstein et al. 2007).

Statins are a group of compounds classified as HMG-CoA inhibitors (Istvan 2003; Prospective Studies Collaboration et al. 2007). This class of drugs belong to a fatty-acid-

lowering drug family used as a treatment of patients with increased risk of developing cardiovascular diseases, such as atherosclerosis. Their mechanisms of action are related to lowering LDL cholesterol (Alenghat and Davis 2019) and stabilizing eNOS mRNA (Kosmidou et al. 2007). Here, we hypothesize through an in silico approach that these family of drugs also acts stabilizing the eNOS protein. We found seven amino acid residues inside the eNOS binding pocket and statin. Interesting, two W residues from eNOS interact with statin (Figure 3A and B) and it has been shown that statin also interacts with tow W residues in the binding pocket of HMG-CoA (Tabernero et al. 2003). An experimental approach to test the interaction between statin and the eNOS protein is under design.

CONCLUDING REMARKS

The investigation of the relationship between eNOS polymorphisms and susceptibility to atherosclerosis has led to conflicting results. Here, we found no association between atherosclerotic groups with or without stent in relation to the T-786C polymorphism of the eNOS gene. Regarding smoking habits there was no significant difference between the control group without stent and smoker patients in comparison based on the *eNOS* T786C genotype. Interestingly, we found a positive association in the experimental stent group with the presence of the TC genotype and smoking habit. In addition, we propose a mode of interaction between statin and eNOS, indicating that this drug besides improving eNOS mRNA stability, also stabilize the eNOS protein in order to make statin treatment more efficient and to maintain positive effects of nitric oxide. More studies are needed to increase our understanding of the relationship between *eNOS* T786C polymorphism and atherosclerosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The author acknowledge all the personnel directly or indirectly involved in the present research, especially the Pontifical University Catholic of Goiás. There was no funding available for the present research.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors state that there was no conflict of interest.

REFERENCES

- Afrasyap L and Ozturk G (2004) NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. *Acta Biochim Biophys Sin* 36:661–6.
- Alenghat FJ and Davis AM (2019) Management of Blood Cholesterol. *JAMA* 321(8):800-801
- Anstrom KJ, Kong DF, Shaw LK, Tuttle RH, et al. (2007) Clopidogrel Use and Long-term Stent Implantation. *JAMA* 297:159–168.
- Araújo DV, Lima VC and Ferraz MB (2007) Análise de impacto do stent farmacológico no orçamento do Sistema Único de Saúde. *Arq Bras Cardiol* 88:458–463.
- Avezedo S, Oliveira DC De and Victor E (2010) Diabetes mellitus e aterosclerose: noções básicas da fisiopatologia para o clínico geral. *Rev Soc Bras Clín Méd* 8:524.
- Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R and Falk E (2014) Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 114:1852–66.
- Barbosa AM, Silva KFS, Lagares MH, Rodrigues DA et al. (2017). Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. *Genet. Mol. Res.* 16(3): gmr16039708

Campo VL and Carvalho I (2007) Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Quim Nova* 30:425–430.

Centemero MP, Sousa AGMR, Tanajura LF, et al (2004) Reestenose Intra-Stent: Como Diagnosticar, Quando Tratar e Qual o Prognóstico? *Rev Bras Cardiol Invasiva* 12:185–192.

Ciftçi C, Melil S, Cebi Y, Ersöz M, et al (2008) Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids Health Dis* 7:5.

Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, et al (2003) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 49:389–95.

Eisenstein EL, Anstrom KJ, Kong DF, Shaw LK, et al. (2007) Clopidogrel Use and Long-term Clinical Outcomes After Drug-Eluting Stent Implantation. *JAMA* 297:159–168.

Faludi A, Izar M, Saraiva J, Chacra A, et al. (2017) Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose -2017. *Arq Bras Cardiol* 109:1-76.

Fonseca FAH (2005) Pharmacokinetics of statins. *Arq Bras Cardiol* 85:9–14.

Grosdidier A, Zoete V and Michielin O (2007) EADock: Docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Protein Struct Funct Genet* 67:1010–1025.

Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, et al (2001) Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7:833–9. doi: 10.1038/89961

Hingorani AD (2001) Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atheroscler* 154:521–7.

Istvan E (2003) Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl* 4:3–8.

Kawashima S and Yokoyama M (2004) Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:998–1005.

Kosmidou I, Moore JP, Weber M and Searles CD (2007) Statin treatment and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2642–2649.

Lacchini R, Silva PS and Tanus-Santos JE (2010) A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106:357–361.

Li H and Förstermann U (2009) Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des* 15:3133–45.

Liao JK and Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89–118.

Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233–41.

Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, et al (2005) Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 12:177–82.

Nagassaki S, Sertório JTC, Metzger IF, et al (2006) eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free radical bio med* 41:1044–1049.

Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, et al. (1999) T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864–2870.

Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H, et al (2002) T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:605–610.

Oliveira FRB, Corrêa JF, Silva KSF, Costa IA, et al. (2019). The eNOS T786C polymorphism is not related to atherosclerosis and cofactors in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.* 18(3): GMR18269. DOI: 10.4238/gmr18269.

Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, et al Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S and Kaiser C (2006) Late Clinical Events After Clopidogrel Discontinuation May Limit the Benefit of Drug-Eluting Stents: An Observational Study of Drug-Eluting Versus Bare-Metal Stents. *J Am Coll Cardiol* 48:2584–2591.

Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, et al (2007) Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 370:1829–1839.

Ragia G, Nikolaidis E, Tavridou A, Arvanitidis KI, et al (2010) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms -786T >C and 894G >T in coronary artery bypass graft surgery patients. *Hum Genomics* 4:375–383.

Ramakumari N, Indumathi B, Katkam SK and Kutala VK (2018) Impact of pharmacogenetics on statin-induced myopathy in South-Indian subjects. *Indian Heart J Suppl* 3:S120–S125.

Ruixing Y, Qi B, Tangwei L and Jiaquan L (2007) Effects of nicotine on angiogenesis and restenosis in a rabbit model. *Cardiology* 107:122–31.

Sargowo D, Oviante N, Susilowati E, Ubaidillah N, et al. (2018) The role of polysaccharide peptide of *Ganoderma lucidum* as a potent antioxidant against atherosclerosis in high risk and stable angina patients. *Indian Heart J.* 70:608–614.

Shankarishan P, Borah PK, Ahmed G and Mahanta J (2014) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of hypertension in an Indian population. *Biomed Res Int* 2014:793040.

Silva KSF and Moura KKVO (2016) Genetic polymorphisms in patients with endometriosis: an analytical study in Goiânia (Central West of Brazil). *Genet Mol Res.* 115: gmr.15028135.

Silva KSF. (2019). Commentary: Atherosclerosis, Analysis of the eNOS (T786C) Gene Polymorphism. *J Cardiol and Cardiovasc Sciences*. 3(1): 11-12.

Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, et al (2007) Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis* 193:438–44.

Sung JH, Lee BE, Kim JO, Jeon YJ, et al. (2015) Association between eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 14:16508–16520.

Tabernero L, Rodwell VW and Stauffacher CV (2003) Crystal structure of a statin bound to a class II hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* 278:19933–19938.

Vecoli C (2014) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease. *Vitam Horm* 96:387–406.

Wu S and Zhang Y (2007) LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res* 35:3375–3382.

Xavier H, Izar M, Faria Neto J, Asaad M, et al. (2013) V Brazilian Guidelines of dyslipidemias prevention of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 101:1–22.

Yang J, Roy A and Zhang Y (2013) Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* 29:2588–2595.

Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, et al (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12:7–8.

Zago VH de S, Santos JET dos, Danelon MRG, Silva RMM da, et al (2013b) Effects of atorvastatin and T-786C polymorphism of eNOS gene on plasma metabolic lipid parameters. *Arq Bras Cardiol* 100:14–20.

Zeng W-P, Zhang R, Li R, Luo J-F et al (2017) Association of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T786C Polymorphism with In-Stent Restenosis in Chinese Han Patients with Coronary Artery Disease Treated with Drug-Eluting Stent. *PloS one* 12:e0170964.

Zhang Y and Skolnick J (2004) SPICKER: a clustering approach to identify near-native protein folds. *J Comput Chem* 25:865–871.

Figure Legends

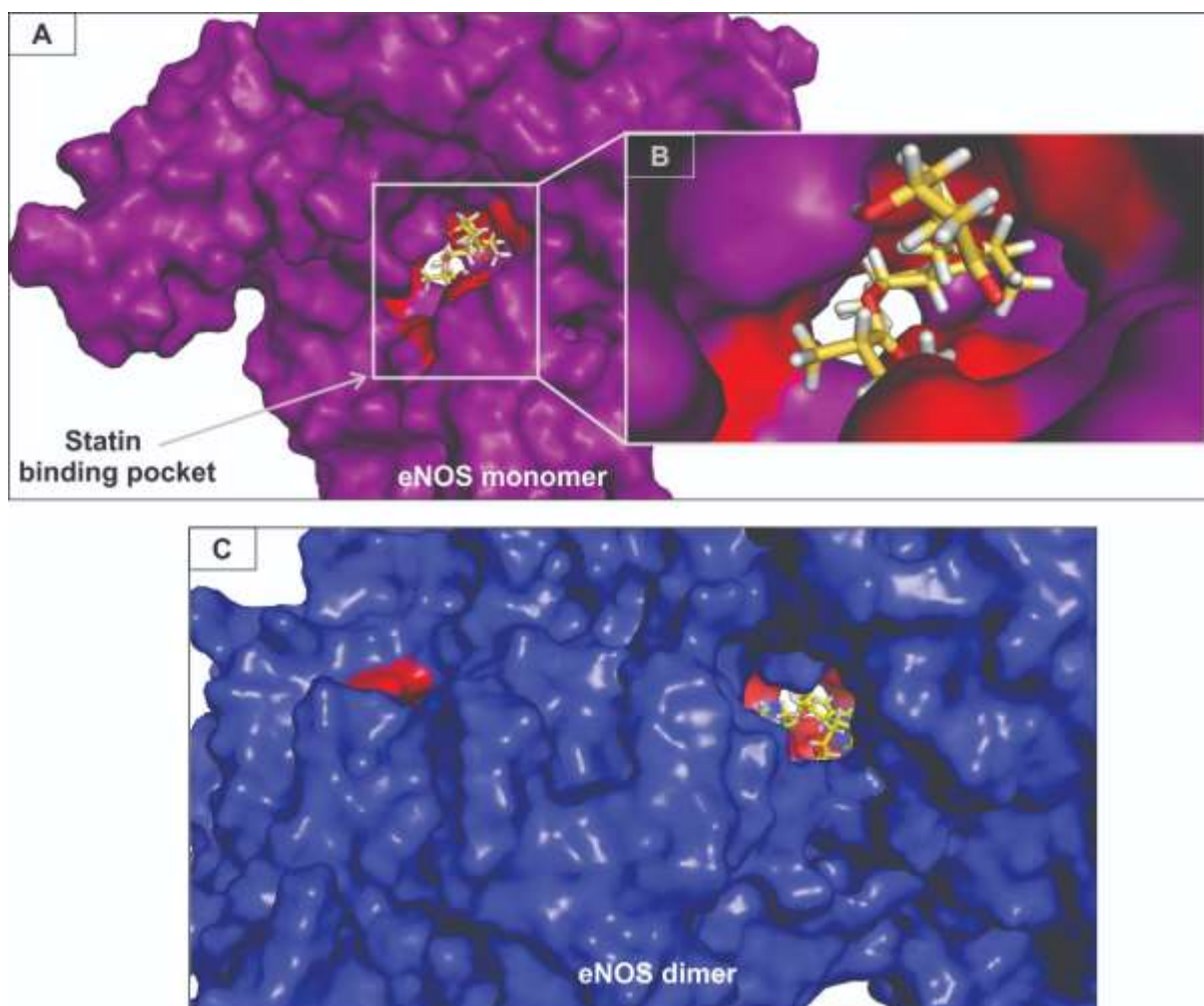


Figure 1 – Statin interaction with eNOS in the binding pocket. (A) The interaction between the monomer form of eNOs (purple) with statin (yellow) shows that the drug stabilizes within the binding pocket of the protein. Red regions indicate amino acid residues within the binding pocket that directly interact with statin. (B) Magnified view of the binding pocket showing the disposition of statin inside the protein. (C) The interaction between the dimer form of eNOs (blue) with statin (yellow) shows that the drug stabilizes within the binding pocket of the protein similar to the interaction in the monomer form.

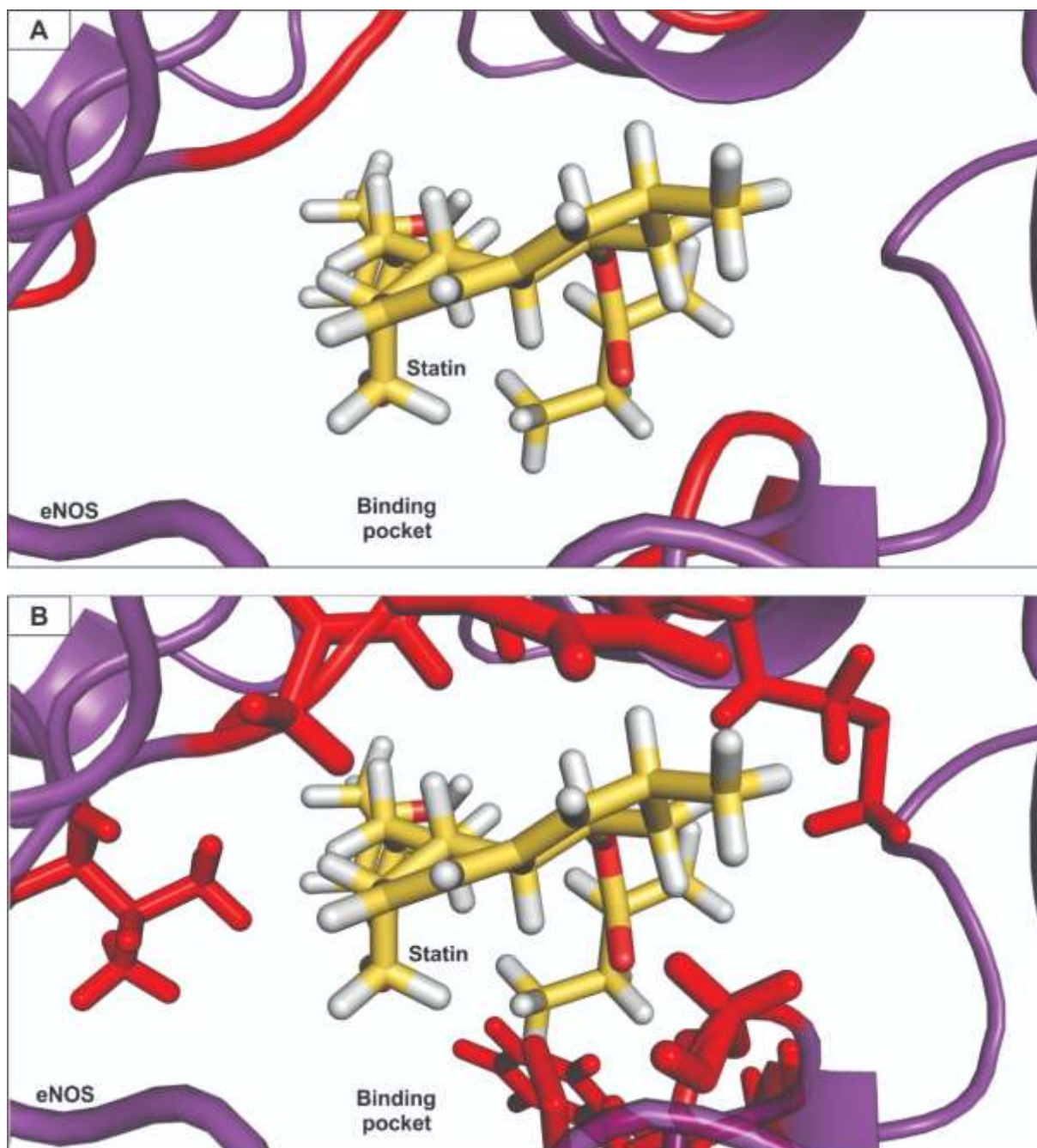


Figure 2 – Cartoon representation of statin interaction with eNOS within the binding pocket. (A) The best conformation of statin (yellow) inside the binding pocket of eNOS (purple) according to the interaction prediction performed by SwissDock (Grosdidier et al. 2007). (B) The red residues on the eNOS protein protrude into the inner part of binding pocket and into the region where statin is located. Statin interacts with seven amino acid residues within the binding pocket.

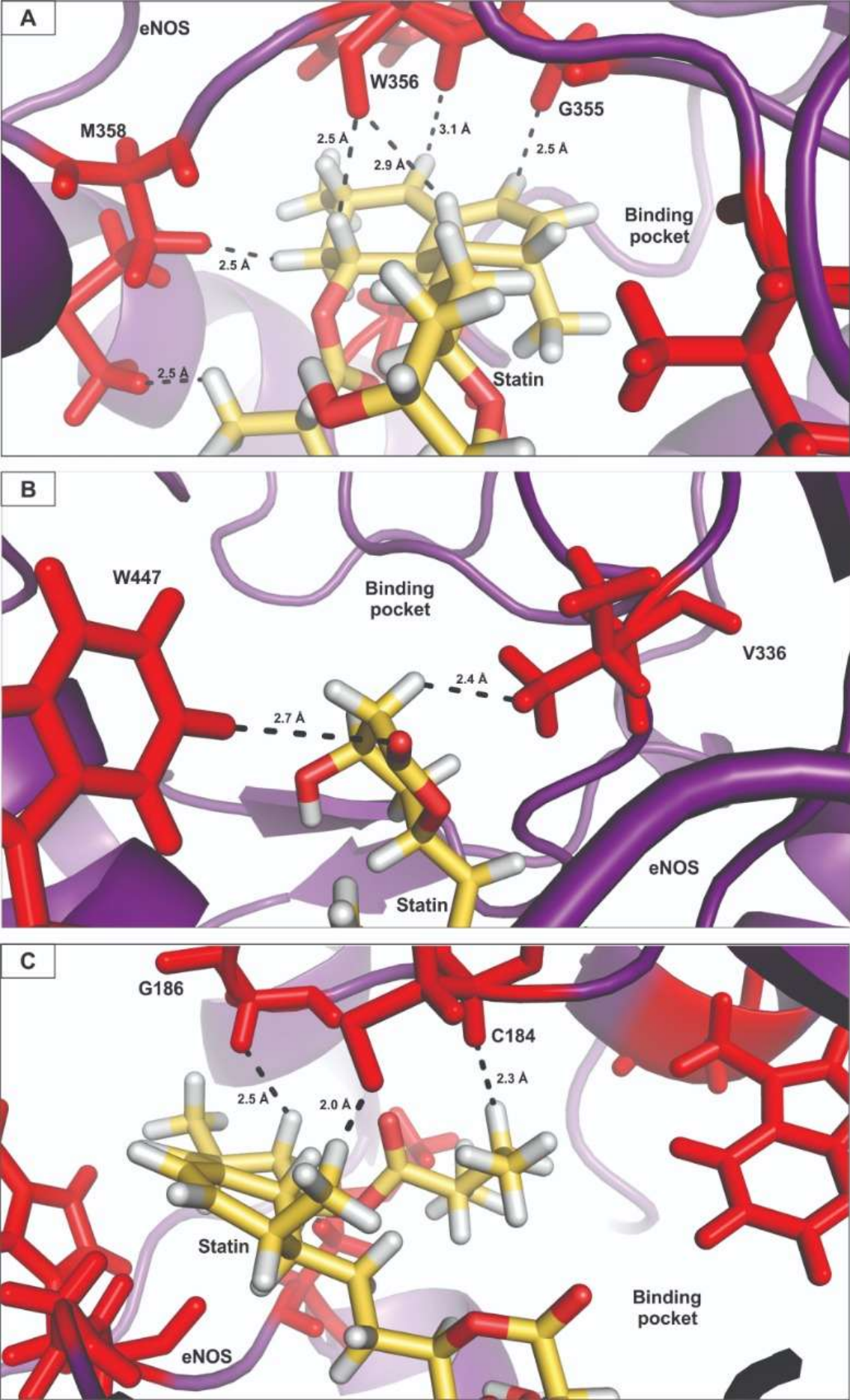


Figure 3 – Different views of how statin is stabilized within the eNOS binding pocket via hydrogen bonds. (A) Statin interaction with M (methionine) 358, W (tryptophan) 356 and G (glycine) 355. (B) Statin interaction with W447 and V (valine) 336. (C) Statin interaction with G186 and C (cysteine) 184. Most of the bonds between eNOs amino acid residues and statin are in the distance range of 2.5-3.0 Å.

5.2. ARTIGO 2: Submetido na revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia.

Evaluation of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in atherosclerotic patients undergoing statin therapy and stenting

Ulisses dos Santos Vilarinho^{3,4#}, Andreia Marcelino Barbosa^{1,3#}, Isabela Barros Lima^{3,4#}, Débora Acyole Rodrigues de Moraes¹, José Vitor Magalhães Martins⁷, Kleber Santiago Freitas e Silva^{5*}, Iasmim Ribeiro da Costa^{1,3,4}, Magda Helena Lagares², Fábio Lemos Campedelli⁶, Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura^{1,2,3,4*}

¹Institute of Biotechnology and Biodiversity, Federal University of Goiás, UFG, Goiânia-GO, Brazil;

²Department of Genetics, Pontifical University Catholic of Goiás, Goiânia-GO, Brazil;

³Replicon Research Center, School of Agrarian and Biological Sciences, Pontifical University Catholic of Goiás, Goiânia-GO, Brazil;

⁴School of Medical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Pontifical University Catholic of Goiás, Goiânia-GO, Brazil;

⁵Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, UFG, Goiânia-GO, Brazil;

⁶Hospital São Francisco de Assis, Goiânia-Go, Brasil;

⁷Faculdade Fan Padrão, Departamento de Biomedicina, Goiânia-Go, Brasil.

#The authors contributed equally to this research.

Abstract

Background: The pathogenesis of atherosclerosis involves environmental and genetic factors, with the development of a plaque that leads to obstruction of arterial segments. Treatment occurs in a non-invasive and invasive manner. The stent implant aims to expand the vessel's light, restoring blood flow and leading to restenosis. Glutathione-S-transferases are phase II enzymes that act in cell detoxification and protection against oxidative stress. The GSTM1 and GSTT1 genes are related to the pathogenesis of the disease. **Objectives:** The aim of the present study was to assess the presence or absence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in atherosclerotic patients undergoing statin therapy and stenting. **Methods:** Polymerase chain reaction was used to identify the presence or absence of the polymorphisms and statistical analyses were performed to compare the frequencies of genotypes between groups. **Results:** The present was the most frequent in the case and control groups for the polymorphisms of the GSTM1 and GSTT1 genes. There was no significant association between the combined genotypes in the patients in this study. Most patients were not smokers and the GSTM1 and GSTT1 present genotypes were more frequent for both genes. **Conclusions:** Regardless of the need for further procedures, the first stent placement or restenosis, patients in both groups did not show difference in polymorphisms.

Keywords: GSTM1, GSTT1, polymorphism, atherosclerosis, stent, statins.

Introduction

Atherosclerosis is an inflammatory, chronic, slow and progressive disease. Its implications increase morbidity and mortality rates through the formation of a lipid plaque in the intima layer. The atheroma plaque is directly proportional to the concentration of low density lipoprotein (LDL) in plasma, which blocks blood flow leading to serious problems, such as acute myocardial infarction and aortic aneurysm¹⁻³. Several factors are related to the development of atheroma plaque, such as environmental and genetic risks, comprising family history, alcoholism, smoking, high LDL, hypertension, obesity and diabetes^{2,3}.

Atherogenesis starts as an endothelial lesion caused by cholesterol accumulation, increased expression of adhesion factors from endothelial cells, and the presence of macrophages that release cytokines and release of reactive oxygen species (ROS). Oxidation of LDL (LDL-OXI) has an immunogenic effect. The macrophages phagocytose LDL-OXI, turning into foamy cells that can spread leading to necrosis. Cytotoxic LDL-OXI lesions the endothelium, forming the atherosclerotic plaque³⁻⁵. The diagnosis is based on the patient's clinical and family history, risk factors and via physical, biochemical and imaging tests. The clinical evaluation of the patient along with imaging exams estimate the probability of the patient developing coronary atherosclerotic disease (CAD). CAD is identified by angiography, screening for the presence of stenosis and one of its symptoms is angina⁶.

The treatment of CAD is medication and usually statins are the most prescribed group of drugs. It is a competitive inhibitor of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which blocks the conversion of HMG-CoA into mevalonic acid, damaging the main stage of cholesterol biosynthesis. This reduction, leads to an increase in the synthesis of receptors for LDL and increases the degradation of lipoproteins. Biochemically, it decreases plasma concentration of LDL, total cholesterol, triglycerides and increases that of HDL. In addition, it has anti-inflammatory and antithrombotic effects with the ability to reduce complications such as myocardial infarction and stroke. Early treatment diminishes the effects and improves prognosis reducing cardiovascular events^{5,7-11}. Statins reduce cholesterol levels by pleiotropic effects. It regulates endothelial function, increases the stability of atheroma plaques, and decreases oxidative stress and thrombogenic response. Physical activity and a healthy diet must be associated to drug treatment^{6,12}.

The invasive treatment is based on angioplasty, revascularization surgery that uses grafts for the coronary artery and catheterization. Stent implantation, which consists of a device that expands the lumen of the vessel, prevents the blood flow blockage caused by the atheroma plaque. It is the most used method because it has a low probability of restenosis, but some factors such as stent design, patient's age and characteristics of the plaque can lead to complications^{6,13,14}.

Several genetic components are associated with the pathogenesis of the disease. The Glutathione S-Transferase (GST) superfamily are phase II antioxidant enzymes, responsible for cellular detoxification and detoxification of toxic xenobiotics, metabolites and reactive products of intracellular processes. They guarantee protection against oxidative stress (OS). The OS acts largely on atherogenesis, so modifications of GSTs lead to greater susceptibility to atherosclerosis^{15,16}. The GSTM1 gene is present on chromosome 1p.13.3 and is polymorphic. Polymorphisms in the GSTM1 gene can lead to changes in HDL- and LDL-cholesterol levels.¹⁷ The GSTT1 gene located in the chromosomal region 22q11.2¹⁸⁻²⁰. The absent GSTT1 and GSTM1 genotypes are related to complications in several cardiovascular diseases. These enzymes are directly related to defense mechanisms against OS damage that promotes high release of free radicals causing endothelial dysfunction and LDL oxidation^{21,22}.

The objective of the present study was to assess the presence or absence of polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes in atherosclerotic patients submitted to statin therapy and stent implantation.

Materials e Methods

The research was approved by the National Commission on Ethics in Research/National Information System on Ethics in Research involving Human Beings CEP/PUC GOIÁS, number: 35321614.3.0000.0037.

We collected 80 peripheral blood samples from patients with atherosclerosis and using statins, diagnosed through clinical and imaging exams, from October 2014 to February 2015 at the Angiogyn Clinic located in Goiania, GO. Thirty-five underwent stent placement along with statin treatment (case group) and 45 patients undergoing statin treatment but were not submitted to stent placement (control group).

The analyses were performed at the Núcleo de Pesquisas Replicon - PUC Goiás, where the samples of peripheral blood were submitted to tests to analyze the presence or absence of polymorphism of the GSTM1 and GSTT1 genes.

DNA extractions from the collected samples were performed according to the instructions in the Kaswi® kit (Genomic DNA Purification Kit). The samples were submitted to quantification in the spectrophotometer NanoVue™ Plus according to the manufacturer's instructions. Samples with the concentration of DNA higher than 5ng/μl was considered significant. The extracted DNA was maintained at a temperature of -20°C until the amplification by the polymerase chain reaction (PCR) method was performed.

The final volume of the samples subjected to PCR was 25uL. The process was processed in a laminar flow chapel to avoid contamination. The PCR products were submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis in 1X EDTA Tris-borate (TBE) solution in a 10 V/cm electric field. The gel was stained with 5mg/mL ethidium bromide and visualized in a BIORAD photodocumentator.

The amplification of the GSTM1 and GSTT1 genes confirmed the presence or absence of the alleles. The results were tabulated and statistical analyses were performed applying the G Test and *Oddis Ratio*, with the help of BioEstat® software version 5.3 and $p < 0.05$ was set as statistically significant.

Results

When analyzing the polymorphisms of the GSTM1 and GSTT1 genes in Table 1, no statistically significant relationship was found between case and control group. A prevalence of the present genotype in the case and control groups is noted for both genes with 68.57% in the case group and 60.00% in the control group, respectively for GSTM1 ($p=0.4274$) and 88.57% in the case group and 86.67% in the control group for GSTT1 ($p=0.7977$).

Table 1: Distribution of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in case and control groups.

Table 1: Distribution of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in case and control groups.			
	Case N (%)	Control N (%)	P*
GSTM1			
Present	24 (68.57)	27 (60.00)	0.4274
Absent	11 (31.43)	18 (40.00)	
GSTT1			
			P*
Present	31 (88.57)	39 (86.67)	0.7977
Absent	4 (11.43)	6 (13.33)	

Test G*; N = number of patients; P= Probability.

There was no significant relationship regarding genotypic frequencies of GSTM1 and GSTT1 as shown in Table 2. The frequencies of GSTM1 and GSTT1 present genotypes were 62.86% in the case group and 51.11% in the control group. The present genotype was the most prevalent among patients for both genes. The absent genotype frequency of GSTM1 and GSTT1 was 25.71% in the case group and 35.56% in the control group.

Table 2: Analysis of combined genotypes in case and control groups.

GSTM1/GSTT1	Case N (%)	Control N (%)	OR	95% IC	P
Present/Present	22 (62.86)	23 (51.11)	1.62	0.66-3.99	0.4103
Present/Absent	2 (2.86)	4 (8.89)	0.62	0.11-3.60	0.9148
Absent/Present	9 (25.71)	16 (35.56)	0.63	0.24-1.66	0.4846
Absent/Absent	2 (8.57)	2 (4.44)	1.30	-	0.7960

N = number of patients; OR = Odds Ratio; IC = Confidence Interval; P = Probability.

Most of the patients in the case and control groups declared to be non-smokers (Table 3). The frequency of the present genotype for GSTT1 and GSTM1 genes in both groups was higher. For the GSTT1 gene polymorphism, 100% of smokers showed the present genotype and for GSTT1, 85.18% of non-smokers showed the present genotype in the case group. In the control group, 71.43% of smokers showed the GSTT1 present genotype and among non-smokers 89.47%. For the GSTM1 87.50% of smokers and 62.96% of non-smokers showed the present genotype in the case group. In the control group, the frequency of the absent genotype in smokers was higher (57.14%) compared to non-smokers (63.16%). There was no statistical significance between groups.

Table 3: Association between the genotypes of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with smoking, in the case and control groups.

Case	Fumante	Não fumante	P*
GSTT1 present N (%)	8 (100)	23 (85.18)	0.1358
GSTT1 ausent N (%)	0 (0.00)	4 (14.82)	
Control	Fumante	Não fumante	P*
GSTT1 present N (%)	5 (71.43)	34 (89.47)	0.2382
GSTT1 absent N (%)	2 (28.57)	4 (10.53)	

Case	Fumante	Não fumante	P*
GSTM1 present N (%)	7 (87.50)	17 (62.96)	0.1624
GSTM1 absent N (%)	1 (12.50)	10 (37.04)	
Controle	Fumante	Não fumante	P*
GSTM1 present N (%)	3 (42.85)	24 (63.16)	0.3188
GSTM1 absent N (%)	4 (57.14)	14 (36.84)	

Test G*; N = number of patients; P= Probability.

Restenosis was found in 37.14% of patients. There was no association between restenosis and smoking ($p=0.0955$). The majority of the patients who did not present restenosis were non-smokers (Table 4).

Table 4: Association between restenosis and smoking in patients with stenting.

	Non-smoking N (%)	Smoking N (%)	P*
With restenosis	8 (29.63)	5(62.50)	0.0955
Without restenosis	19(70.37)	3(37.50)	

Test G*; N = number of patients; P = Probability.

DISCUSSION

Taspinar and collaborators²³ showed that the polymorphism of the GSTM1 gene is important in predicting CAD. Similar to our results, they observed in case and control groups the prevalence of the GSTM1 present genotype. Similarly, Rodrigues and collaborators²⁴ evaluated GSTM1 polymorphism in patients with atherosclerosis in the population of Goiânia and found higher prevalence for the GSTM1 present genotype. However, Turkanoglu and collaborators²² assessed patients with ischemic stroke and observed a higher prevalence of the absent genotype in the population under study. The differences showed here are likely due to ethnic genetic variation.

We found a higher prevalence of the GSTT1 gene polymorphism in the case group with stent. Grubisa and collaborators²⁰ found similar results in a population of Serbia, with 77% of the atherosclerotic patients showing the present genotype. Finally, Zivkovic and collaborators¹⁵, showed that the GSTT1 polymorphism as present inn 94.51% of the patients under studied.

Similar to our results, Nomani and collaborators²⁵ studied polymorphisms in patients diagnosed with CAD through angiography from western Iran and found a higher prevalence of the GSTT1 present genotype in the case and control groups. The same group evaluated the GSTT1 genotype regarding smoking and found a higher prevalence of the GSTT1 present genotype in smokers and non-smokers patients in the case and control. Microstructural changes can occur after the stent placement in patients with different smoking status. Differently from the results of the present work, Marino and collaborators²⁶ analyzed patients with and without

CAD and observed a predominance of smokers with a significant p of 0.0132 regarding changes due to stent placement.

Li and collaborators²⁷ showed that the habit of smoking in a USA population, smoking 20 packs of cigarettes per year, has a significant relationship with the presence of the genotype GSTT1 and CAD. The chemicals present in cigarette smoke would be a substrate for GST's and may be involved in with the onset of the disease, according to the authors. However, Yeh and collaborators²⁸ analyzing the GSTT1 genotype in Taiwanese CAD patients found a higher prevalence of the absent genotype in patients with at least 3 stenosed vessels. The association with smoking, sex, alcoholism and age was not significant. As in Yeh's study, our patients were mostly non-smokers, but on the contrary a higher prevalence of genotype present in GSTT1 in case and control groups was obtained. The quantity of cigarettes, and the type of tobacco can influence the results, causing variations in some studies.

In a study by Kim and collaborators²⁹ associated hypertension, diabetes, male gender and dyslipidemia as independent risk factors for CAD. They found that in smokers with the absent genotype of GSTT1, the risk of CAD is increased. When absent GSTT1 and GSTM1 is considered in smoking patients, the risk increases. Here, most patients were non-smokers and had a higher prevalence of the GSTT1 and GSTM1 present genotype. We did not find a relationship between smoking and the genotype of patients with stent or patients with restenosis.

The vascular smooth muscle cells, in atherosclerosis, through an inflammatory response, migrate and proliferate in the intima of the arteries, influencing restenosis post-angioplasty or intra stent restenosis. Compounds that inhibit smooth muscle cell proliferation and the induction of several GST's members that besides acting in detoxification and redox state regulation have been explored. In addition, it is associated with cell cycle control and cell proliferation, such as vascular smooth muscle. Thus important in the processes of stenosis and restenosis of vessels³⁰. In the present study, all patients used statins and the highest percentage of patients with stent did not develop restenosis (62.86%). Kocas³¹ evaluated the use of statins in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stent. They showed that patients without adherence to the use of statins, had increased risk of intra-stent restenosis. Kim³² and collaborators, showed that the rate of restenosis in patients who use statins is lower than in patients who do not use statins. Another study showed that atorvastatin inhibited proliferation and abnormal migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis with a protective effect³³.

CONCLUSION

This study presented a higher prevalence of the GSTM1 and GSTT1 present genotype. We also analyzed the frequency of those genotypes regarding smoking, we found higher prevalence of the present genotype both in smoking and non-smoking patients, and regardless of the need for subsequent stent placement procedures, patients showed no differences in the polymorphisms under study. Genetic susceptibility increases the risk of stent restenosis. The identification of patients and the determination of genes involved along with an appropriate individually treatment based on the patients' genotype may improve their quality of life and reduce the high rate of mortality of CAD.

REFERENCES

- (1) NAVARO, S.C., C., C. I. The Risk Factors of the Atherosclerotic Disease. *The risk factors of the Atherosclerotic disease*. 6th ed. 2002, pp 151–156.
- (2) Polanczyk, C. A. Fatores de risco cardiovascular no Brasil: os próximos 50 anos! *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2005**, *84* (3), 199–201. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2005000300001>.
- (3) Camacho, C. R. C.; Melicio, L. A. D.; Soares, Â. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq. ciênc. saúde* **2007**, *14* (1), 41–48.
- (4) Steinberg, D. Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (34), 20963–20966. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20963>.
- (5) Xavier, H. T.; Izar, M. C.; Faria Neto, J. R.; Assad, M. H.; Rocha, V. Z.; Sposito, A. C.; Fonseca, F. A.; dos Santos, J. E.; Santos, R. D.; Bertolami, M. C.; Faludi, A. A.; Martinez, T. L. R.; Diamant, J.; Guimarães, A.; Forti, N. A.; Moriguchi, E.; Chagas, A. C. P.; Coelho, O. R.; Ramires, J. a. F. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2013**, *101* (4), 1–20. <https://doi.org/10.5935/abc.2013S010>.
- (6) Campbell, L. A.; Rosenfeld, M. E. Infection and Atherosclerosis Development. *Arch. Med. Res.* **2015**, *46* (5), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.006>.
- (7) Nassif, M. C.; Hoppe, J.; Salbego, C. G. COLESTEROL, APOEε4 E ESTATINAS: IMPLICAÇÕES NA DOENÇA DE ALZHEIMER. *Infarma - Ciências Farmacêuticas* **2013**, *17* (5/6), 46–49.
- (8) Campo, V. L.; Carvalho, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova* **2007**, *30* (2), 425–430. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200033>.
- (9) Tsai, N.-W.; Lin, T.-K.; Chang, W.-N.; Jan, C.-R.; Huang, C.-R.; Chen, S.-D.; Cheng, K.-Y.; Chiang, Y.-F.; Wang, H.-C.; Yang, T.-M.; Lin, Y.-J.; Lin, W.-C.; Chang, H.-W.; Lee, L.-H.; Lu, C.-H. Statin Pre-Treatment Is Associated with Lower Platelet Activity and Favorable Outcome in Patients with Acute Non-Cardio-Embolic Ischemic Stroke. *Critical Care* **2011**, *15* (4), R163. <https://doi.org/10.1186/cc10303>.
- (10) Bonfim, M. R.; Oliveira, A. S. B.; Amaral, S. L. do; Monteiro, H. L.; Bonfim, M. R.; Oliveira, A. S. B.; Amaral, S. L. do; Monteiro, H. L. Treatment of Dyslipidemia with

Statins and Physical Exercises: Recent Findings of Skeletal Muscle Responses. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2015**, 104 (4), 324–331. <https://doi.org/10.5935/abc.20150005>.

(11) Pontes, H. B. D.; Pontes, J. C. D. V.; Azevedo Neto, E. de; Vendas, G. S. da C.; Miranda, J. V. C.; Dias, L. do E. S.; Oliva, J. V. D. G.; Almeida, M. H. M. de; Chaves, I. de O.; Sampaio, T. L.; Santos, C. H. M. dos; Dourado, D. M.; Pontes, H. B. D.; Pontes, J. C. D. V.; Azevedo Neto, E. de; Vendas, G. S. da C.; Miranda, J. V. C.; Dias, L. do E. S.; Oliva, J. V. D. G.; Almeida, M. H. M. de; Chaves, I. de O.; Sampaio, T. L.; Santos, C. H. M. dos; Dourado, D. M. Evaluation of the Effects of Atorvastatin and Ischemic Postconditioning Preventing on the Ischemia and Reperfusion Injury: Experimental Study in Rats. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* **2018**, 33 (1), 72–81. <https://doi.org/10.21470/1678-9741-2017-0108>.

(12) Bonfim, M. R.; Hansen, A.; Turi, B. C.; Zanini, G. de S.; Oliveira, A. S. B.; Amaral, S. L. do; Monteiro, H. L.; Bonfim, M. R.; Hansen, A.; Turi, B. C.; Zanini, G. de S.; Oliveira, A. S. B.; Amaral, S. L. do; Monteiro, H. L. Aderência ao tratamento por estatinas e fatores associados em usuárias do Sistema Único de Saúde. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* **2014**, 48 (3), 477–483. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420140000300013>.

(13) Scoble, J. E.; Takats, D. de; Ostermann, M. E.; Connolly, J. O.; Scott, N. R.; Beeso, J. A.; Poyser, K. H.; Peters, T. J.; Sherwood, R. A. Lipid Profiles in Patients with Atherosclerotic Renal Artery Stenosis. *NEF* **1999**, 83 (2), 117–121. <https://doi.org/10.1159/000045487>.

(14) Kotsugi, M.; Takayama, K.; Myouchin, K.; Wada, T.; Nakagawa, I.; Nakagawa, H.; Taoka, T.; Kurokawa, S.; Nakase, H.; Kichikawa, K. Carotid Artery Stenting: Investigation of Plaque Protrusion Incidence and Prognosis. *JACC: Cardiovascular Interventions* **2017**, 10 (8), 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2017.01.029>.

(15) Zivković, M.; Stanković, A.; Djurić, T.; Končar, I.; Kolaković, A.; Djurdjević, V.; Davidović, L.; Alavantić, D. Effects of Glutathione S-Transferase T1 and M1 Deletions on Advanced Carotid Atherosclerosis, Oxidative, Lipid and Inflammatory Parameters. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, 41 (2), 1157–1164. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2962-z>.

(16) Safarinejad, M. R.; Shafiei, N.; Safarinejad, S. The Association of Glutathione-S-Transferase Gene Polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with Idiopathic Male Infertility. *Journal of Human Genetics* **2010**, 55 (9), 565–570. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.59>.

(17) Maciel, S. S.; Pereira, A. da C.; Silva, G. J. J.; Rodrigues, M. V.; Mill, J. G.; Krieger, J. E. Association between Glutathione S-Transferase Polymorphisms and

Triglycerides and HDL-Cholesterol. *Atherosclerosis* **2009**, *206* (1), 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.011>.

(18) Hayes, J. D.; Strange, R. C. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *PHA* **2000**, *61* (3), 154–166. <https://doi.org/10.1159/000028396>.

(19) Gattás, G. J. F.; Kato, M.; Soares-Vieira, J. A.; Siraque, M. S.; Kohler, P.; Gomes, L.; Rego, M. a. V.; Bydlowski, S. P. Ethnicity and Glutathione S-Transferase (GSTM1/GSTT1) Polymorphisms in a Brazilian Population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2004**, *37* (4), 451–458. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400002>.

(20) Grubisa, I.; Otasevic, P.; Vucinic, N.; Milicic, B.; Jozic, T.; Krstic, S.; Milasin, J. Combined GSTM1 and GSTT1 Null Genotypes Are Strong Risk Factors for Atherogenesis in a Serbian Population. *Genetics and Molecular Biology* **2018**, *41* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0034>.

(21) Lagares, M. H.; Silva, K. S. F.; Barbosa, A. M.; Rodrigues, D. A.; Costa, I. R.; Martins, J. V. M.; Morais, M. P.; Campedelli, F. L.; Moura, K. K. V. O. Analysis of P53 Gene Polymorphism (Codon 72) in Symptomatic Patients with Atherosclerosis. *Genet. Mol. Res.* **2017**, *16* (3). <https://doi.org/10.4238/gmr16039721>.

(22) Türkanoglu, A.; Can Demirdöğen, B.; Demirkaya, Ş.; Bek, S.; Adalı, O. Association Analysis of GSTT1, GSTM1 Genotype Polymorphisms and Serum Total GST Activity with Ischemic Stroke Risk. *Neurol Sci* **2010**, *31* (6), 727–734. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0330-5>.

(23) Taspinar, M.; Aydos, S.; Sakiragaoglu, O.; Duzen, I. V.; Yalcinkaya, A.; Oztuna, D.; Bardakci, H.; Tutar, E.; Sunguroglu, A. Impact of Genetic Variations of the CYP1A1, GSTT1, and GSTM1 Genes on the Risk of Coronary Artery Disease. *DNA Cell Biol.* **2012**, *31* (2), 211–218. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1252>.

(24) Rodrigues, D. A.; Martins, J. V. M.; E Silva, K. S. F.; Costa, I. R.; Lagares, M. H.; Campedelli, F. L.; Barbosa, A. M.; de Morais, M. P.; Moura, K. K. V. O. GSTM1 Polymorphism in Patients with Clinical Manifestations of Atherosclerosis. *Genet. Mol. Res.* **2017**, *16* (1). <https://doi.org/10.4238/gmr16019101>.

(25) Nomani, H.; Mozafari, H.; Ghobadloo, S. M.; Rahimi, Z.; Raygani, A. V.; Rahimi, M. A.; Haghi, A. F.; Keshavarz, A. A. The Association between GSTT1, M1, and P1 Polymorphisms with Coronary Artery Disease in Western Iran. *Mol Cell Biochem* **2011**, *354* (1), 181–187. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0817-2>.

- (26) Marino, B. C. A.; Nascimento, G. A.; Rabelo, W.; Marino, M. A.; Marino, R. L.; Ribeiro, A. L. P.; Marino, B. C. A.; Nascimento, G. A.; Rabelo, W.; Marino, M. A.; Marino, R. L.; Ribeiro, A. L. P. Reestenose Clínica de Stent Coronariano: Seguimento após Tratamento com Análise de Desfechos Clínicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2015**, *104* (5), 375–386. <https://doi.org/10.5935/abc.20140216>.
- (27) Li, R.; Boerwinkle, E.; Olshan, A. F.; Chambless, L. E.; Pankow, J. S.; Tyroler, H. A.; Bray, M.; Pittman, G. S.; Bell, D. A.; Heiss, G. Glutathione S-Transferase Genotype as a Susceptibility Factor in Smoking-Related Coronary Heart Disease. *Atherosclerosis* **2000**, *149* (2), 451–462. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00483-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00483-9).
- (28) Yeh, H.-L.; Kuo, L.-T.; Sung, F.-C.; Chiang, C.-W.; Yeh, C.-C. GSTM1, GSTT1, GSTP1, and GSTA1 Genetic Variants Are Not Associated with Coronary Artery Disease in Taiwan. *Gene* **2013**, *523* (1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.02.052>.
- (29) Kim, S.-J.; Kim, M.-G.; Kim, K.-S.; Song, J.-S.; Yim, S.-V.; Chung, J.-H. Impact of Glutathione S-Transferase M1 and T1 Gene Polymorphisms on the Smoking-Related Coronary Artery Disease. *Journal of Korean Medical Science* **2008**, *23* (3), 365. <https://doi.org/10.3346/jkms.2008.23.3.365>.
- (30) Ranganna, K.; Mathew, O. P.; Yatsu, F. M.; Yousefipour, Z.; Hayes, B. E.; Milton, S. G. Involvement of Glutathione/Glutathione S-Transferase Antioxidant System in Butyrate-Inhibited Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *The FEBS Journal* **2007**, *274* (22), 5962–5978. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06119.x>.
- (31) Kocas, C.; Abaci, O.; Kocas, B. B.; Cetinkal, G.; Arslan, S.; Yildiz, A.; Ersanli, M. Impact of Statin Non-Adherence on in-Stent Restenosis Following Bare-Metal Stent Implantation. *International Journal of Cardiology* **2016**, *203*, 529–531. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.085>.
- (32) Kim, W.; Gandhi, R. T.; Peña, C. S.; Herrera, R. E.; Scherthaner, M. B.; Acuña, J. M.; Becerra, V. N.; Katzen, B. T. The Influence of Statin Therapy on Restenosis in Patients Who Underwent Nitinol Stent Implantation for de Novo Femoropopliteal Artery Disease: Two-Year Follow-up at a Single Center. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* **2016**, *27* (10), 1494–1501. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2016.05.037>.
- (33) Chen, S.; Dong, S.; Li, Z.; Guo, X.; Zhang, N.; Yu, B.; Sun, Y. Atorvastatin Calcium Inhibits PDGF-B β -Induced Proliferation and Migration of VSMCs Through the G0/G1 Cell Cycle Arrest and Suppression of Activated PDGFR β -PI3K-Akt Signaling Cascade. *CPB* **2017**, *44* (1), 215–228. <https://doi.org/10.1159/000484648>.

5.3. ARTIGO 3: Artigo para submissão.

O polimorfismo *G894T* do gene *eNOS* em pacientes com reestenose em uso de estatinas, Goiânia - Goiás

Ulisses dos Santos Vilarinho, Isabela Barros Lima, Andreia Marcelino Barbosa, Kátia

Karina Verolli de Oliveira Moura

INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no mundo. Ela atribui-se principalmente a aterosclerose, uma condição que ocorre de forma lenta e progressiva até se tornar clinicamente evidente. A placa aterosclerótica se forma a partir de uma inflamação causada nas células do endotélio vascular que liberam substâncias químicas, como citocinas, fatores de crescimento e forças hemodinâmicas que atraem moléculas de adesão, como leucócitos e monócitos que se ligam a parede do vaso. A lesão causada pelas substâncias químicas e pelas moléculas de adesão, provocam o acúmulo e a oxidação de lipídeos, principalmente a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a migração e proliferação de células do músculo liso e a formação de uma “capa” fibrosa. Diversos estudos demonstram que inúmeros fatores se relacionam ao desenvolvimento da placa de ateroma, como a hipercolesterolemia, o hábito de fumar, a obesidade, o diabetes mellitus (DM), a hipertensão arterial sistêmica (HAS), a dislipidemia, a idade, o sexo e fatores genéticos (CAM, et al., 2005; CHEN, et al., 2012; CAMPEDELLI, et al., 2017; ADAM, et al., 2018).

Diversos genes se relacionam ao desenvolvimento da aterosclerose, pois estão envolvidos na regulação da função endotelial, no processo de inflamação, no metabolismo de lipídeos e carboidratos, como por exemplo: eNOS, ApoE, CYP e GST (IDRISSI, et al., 2016; CAMPEDELLI, et al., 2017).

O óxido nítrico (NO) é uma substância produzida nas células endoteliais, pela conversão da L-arginina pela L-citrulina pela ação da enzima eNOS (óxido nítrico sintetase) após um estresse vascular. O NO se relaciona com o desenvolvimento de DCV, onde atua fatores envolvidos na formação da aterosclerose, inibindo o metabolismo e oxidação da LDL, a migração e aderência das moléculas de adesão e a agregação plaquetária (KIM, et al., 2007; ALREFAI, et al., 2016; CAMPEDELLI, et al., 2017).

O gene eNOS encontra-se no cromossomo 7q37-36 e possui 26 éxons. Ele contribui para a homeostasia e regulação das funções cardiovasculares, como a vasodilatação, regulação da pressão arterial, além de ações vaso protetivas e anti-aterogênicas. Um dos polimorfismos mais frequentes nesse gene encontra-se no éxon 7 e ocorre pela substituição da guanina por timina na posição 894, resultando na mudança de glutamina (Glu - GAG) para aspartato (Asp - GAT), chamado de G894T. Esse polimorfismo está associado a alterações no perfil lipídico, da pressão arterial e na degradação acelerada do NO. Todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento DCV, hipertensão, aterosclerose e infarto agudo do miocárdio (IAM) (CAM, et al., 2005; IDRISSI, et al., 2016; CAMPEDELLI, et al., 2017).

O tratamento da aterosclerose envolve a adesão de diferentes fatores como a cessação do tabagismo, a melhora na alimentação, prática de atividade física, redução do consumo de álcool. Esses fatores podem ser adotados isoladamente ou em associação com medicamentos, como a estatina. Esse fármaco atua inibindo a enzima hidroximetil-glutaril coenzima A redutase (HMG CoA redutase) que atua inibindo a síntese de mevalonato, um precursor do colesterol, de forma reversível e competitiva. Além de reduzir os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total e triglicérides e aumentar os níveis séricos de lipoproteína de alta densidade (HDL), as estatinas possuem efeito pleiotrópico: anti-inflamatórios, diminui a oxidação da LDL, do estresse oxidativo, aumenta a disposição de ON, diminui a agregação plaquetária e estabiliza a placa de ateroma (KAZI, et al., 2017; ADAM, et al., 2018; OLIVEIRA, et al., 2019).

Tratamentos invasivos, como a angioplastia e a colocação de stent, são procedimentos que diminuem a oclusão da artéria causada pela aterosclerose, restituindo o fluxo sanguíneo e a pressão arterial. A reestenose é uma complicação destes procedimentos, que ocorre em uma incidência de 30% nos pacientes de 3 a 6 meses após o tratamento. A reestenose ocorre devido a uma lesão seguida de uma inflamação causada pelo *stent*. (CHEN, et al., 2012; ELMORE, et al., 2016, KAZI, et al., 2017; NICOLAIS, et al., 2018).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue periférico com heparina de 80 pacientes na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil referentes ao Departamento de Angiogênese/Cirurgia Vascular e Cardiologia Angiogyn. Todos os pacientes foram diagnosticados com aterosclerose e faziam o uso de estatina. Todos possuem diagnóstico de aterosclerose por meio de uma avaliação da história clínica, de um exame físico e confirmada pela angiografia, que fazem uso de estatinas

e que possuem *stent*. O grupo com *stent* foi chamado de grupo caso (35 pacientes) e o sem *stent* (45 pacientes), de grupo controle.

Todos os pacientes aceitaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o projeto foi aprovado pelos Comitês Nacionais de Ética em Pesquisa e Sistema Nacional de Informação em Ética em Pesquisa com Sujeitos Humanos CEP/PUC GOIÁS (Número 35321614.3.0000.0037).

Foi feita a extração do DNA genômico das amostras de sangue utilizando o kit Kaswi (Kit de Purificação de DNA Genômico) seguindo as recomendações do fabricante no Laboratório de Pesquisa do Núcleo Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Em seguida, o DNA foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoVue™ Plus, e aplicou-se apenas amostras superiores a 5 ng/μL. Posteriormente, o DNA foi amplificado pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificar o polimorfismo do gene eNOS G894T (Frare et al., 2013).

Foram utilizados três pares de primers para detectar o polimorfismo do gene eNOS G894T: primer forward, primer reverse normal e primer reverse mutante. As reações em cadeia da polimerase (PCR's) foram realizadas em triplicata.

O produto PCR foi submetido a gel de agarose a 2% e a eletroforese em um campo elétrico de 10 V/cm, corado com brometo de etídio (5 mg/ mL) e visualizado no VDS®.

Para análise estatística dos polimorfismos do gene eNOS G894T foi utilizado o software Biostat 5.0 para a realização o teste G e o Equilíbrio de Hardy Weinberg. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram realizadas análises estatísticas para verificar se a população estudada estava ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi encontrado em nenhum dos grupos estudados esse equilíbrio (grupo caso: $p=0,000004$; grupo controle: $p=0,001633$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS versão 26, utilizando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (MacDonald; Gardner, 2000).

O alelo mais frequente nos grupos, é o alelo mutante T, mas sem diferenças substanciais. O genótipo mais frequente, nesta população, em ambos os grupos, é o heterozigoto GT (Tabela 1).

Tabela 1: Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Caso		Observado	Esperado	p*
GG		1	7,8	0,000004
GT		31	17,4	
TT		3	9,8	
Frequência alélica		G	T	
		0,47	0,53	
Frequência genotípica	GG	GT	TT	
	2,8	88,6	8,6	
Controle		Observado	Esperado	p*
GG		7	12,3	0,001633
GT		33	22,5	
TT		5	10,3	
Frequência alélica		G	T	
		0,48	0,52	
Frequência genotípica	GG	GT	TT	
	15,6	73,3	11,1	
Caso e Controle		Observado	Esperado	p*
GG		8	20	0,000000
GT		64	40	
TT		8	20	
Frequência alélica		G	T	
		0,5	0,5	
Frequência genotípica	GG	GT	TT	
	10	80	10	

p* = Valor do teste qui quadrado; <0,05 não consistente com equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na Tabela 2, dos pacientes que foram submetidos a colocação de *stent*, 37,1% desenvolveram reestenose, com maior frequência do genótipo heterozigoto G/T com 92,3%. Os pacientes submetidos ao mesmo procedimento, mas que não tiveram reestenose apresentaram 86,4% do genótipo heterozigoto G/T. A comparação entre os grupos em relação ao genótipo não obteve relação estatística, com p=0,6126. A frequência de pacientes que não tiveram reestenose, foi 1,7 vezes maior comparado com a frequência dos que tiveram a complicação.

Tabela 2: Distribuição genotípica do polimorfismo *eNOS G894T* em relação a reestenose.

Genótipos	G/G n ° (%)	G/T n° (%)	T/T n° (%)	Total n° (%)	p*
Com Reestenose	0 (0,0)	12 (92,3)	1 (7,7)	13 (37,1)	0,6126
Sem Reestenose	1 (4,5)	19 (86,4)	2 (9,1)	22 (62,9)	

*Teste G. n° = números de pacientes

A Tabela 3 apresenta a distribuição genotípica em relação ao tabagismo. Os pacientes fumantes apresentaram maior frequência do genótipo GT no grupo caso com 22,9% e no grupo controle com 8,9%. O genótipo GG foi 3 vezes mais frequente em fumantes do grupo controle. Observa-se também que nenhum dos pacientes fumantes apresentaram o genótipo homozigoto T/T. A análise estatística aproximou-se da significância com $p=0,065$.

Os pacientes não fumantes apresentaram o mesmo padrão em relação ao genótipo heterozigoto G/T, com 65,7% em não fumantes do grupo caso e 64,4% em não fumantes do grupo controle. O genótipo TT apresentou maior frequência em não fumantes com 11,1% dos pacientes do grupo controle, comparado com não fumantes do grupo caso com 8,6%. O genótipo homozigoto GG obteve frequência 4 vezes maior em não fumantes do grupo controle.

Tabela 3: Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *eNOS G894T* e o tabagismo nos grupos caso e controle.

	Caso			Controle			p*
	GG n°(%)	GT n°(%)	TT n°(%)	GG n°(%)	GT n°(%)	TT n°(%)	
Fumante	0 (0,0)	8 (22,9)	0 (0,0)	3 (6,7)	4 (8,9)	0 (0,0)	0,065
Não fumante	1 (2,8)	23 (65,7)	3 (8,6)	4 (8,9)	29 (64,4)	5 (11,1)	0,533
Total	35 (100,0)			45 (100,0)			

*Teste G. n° = números de pacientes

DISCUSSÃO

Um dos processos iniciais no desenvolvimento da aterosclerose é a disfunção endotelial. Já é bem descrito que alterações envolvendo a *eNOS*, afetam a síntese, liberação e atividade do óxido nítrico. O polimorfismo *G894T* do gene *eNOS*, leva a uma diminuição da ligação entre a *eNOS* e a caveolina-1, reduzindo fortemente a disponibilidade e atividade da enzima, assim a produção de óxido nítrico na camada íntima dos vasos sanguíneos diminui (COZMA, et al., 2019).

O genótipo homozigoto G/T foi o que mais predominou na população em estudo com 73,3% dos pacientes, seguido do genótipo homozigoto G/G com 15,6%, e o genótipo homozigoto T/T com 11,1%.

A população egípcia com doença cardíaca coronariana estudada por Arafa e colaboradores (2018), apresentou o polimorfismo *G894T* do gene *eNOS* como um fator de risco para a doença. Neste estudo o genótipo mais frequente foi o heterozigoto G/T com 46%, sendo o genótipo homozigoto T/T o menos frequente. Camppedelli e colaboradores (2017) em um estudo analisando pacientes com aterosclerose que residiam em Goiânia, observaram a prevalência do genótipo G/T no grupo caso e controle, com 76% e 85% respectivamente. Ambos corroborando com o presente estudo.

Gad e colaboradores (2012) em outro estudo egípcio com pacientes que tiveram infarto agudo do miocárdio, apresentaram maior frequência do genótipo homozigoto G/G (50%), e o genótipo G/T e T/T com 45,2% e 4,8% respectivamente. Ao analisar a associação do polimorfismo *eNOS* com a hipertensão arterial sistêmica, Alrefai e colaboradores (2016) relataram a prevalência do genótipo GG nos grupos caso com 70% e no grupo controle com 90%. Observa-se que o genótipo T/T é o menos frequente nas diferentes populações.

As variantes do gene *eNOS* apresentam frequências diferentes em relação às etnias. Já foi destacado que um genótipo pode predispor ao infarto do miocárdio na população japonesa, contudo, na população caucasiana da França, isso não ocorre. Essas diferenças interétnicas podem explicar a redução da biodisponibilidade de NO, risco cardiovascular e até a resposta a medicamentos em indivíduos dos diferentes grupos étnicos. Existem diferenças polimórficas significativas entre negros e brancos brasileiros em relação ao gene *eNOS*. Resultados bem próximos comparados aos estudos na população americana ajudam a entender a frequência das variantes nas diferentes populações e suas consequências clínicas (MORRONI, et al., 2005; THOMAS, et al., 2013).

Uma metanálise realizada por Luo e colaboradores em 2014, mostrou uma associação entre o polimorfismo *G894T* do gene *eNOS* e o infarto do miocárdio no grupo de pacientes asiáticos, mostrando uma forte relação entre a etnia e o polimorfismo.

Em relação ao tabagismo, 2,8% dos pacientes do grupo caso, com genótipo G/G não eram fumantes, no genótipo G/T com 22,9% fumantes e 65,7% não fumantes e no genótipo T/T com 8,6% dos pacientes não fumantes. O grupo controle apresentou genótipos parecidos em relação ao tabagismo, 6,7% de fumantes e 8,9% de não fumantes com genótipo G/G. O genótipo G/T com maior frequência de fumantes 8,9% e não fumantes 64,4%. Já no genótipo T/T, 11,1% dos pacientes não eram fumantes.

Em seu estudo, Campedelli e colaboradores (2017), observaram a prevalência do genótipo G/T tanto em pacientes fumantes do grupo caso e controle, com 80% e 88%

respectivamente, quanto dos pacientes não fumantes do grupo caso com 73,3% e do grupo controle com 83,8%, corroborando com o presente estudo.

Dentre os pacientes que utilizavam *stent*, no grupo caso, 92,3% tinham o genótipo G/T, e 7,7% com genótipo T/T. Não foi observado presença de indivíduos com reestenose e com o genótipo G/G no presente estudo.

Um estudo Russo que relata uma associação entre polimorfismos dos genes *eNOS* e a reestenose intra *stent* coronariana, também observou que o genótipo G/T foi o mais frequente em sua população com reestenose, com 46,67% dos pacientes, seguido por G/G e T/T, ambos com 26,67% dos casos. Este trabalho mostrou que o polimorfismo *G894T* do gene *eNOS* pode ser utilizado como um marcador adicional de risco em pacientes com implante de *stent* (OGORODOVA, et al., 2017).

Outro estudo com pacientes do Cazaquistão também apresentou o mesmo resultado sendo o polimorfismo *G894T* um marcador de risco para reestenose (ZHOLDYBAYEVA, et al., 2016). Além disso, o estudo realizado por Gorchakova e colaboradores (2003) associaram o polimorfismo com maior risco de reestenose e o genótipo T/T ligado a risco aumentado de morte e infarto agudo do miocárdio em um período de 1 ano pós-*stent*.

As estatinas têm como efeito clínico principal, a redução do colesterol pelo bloqueio da HMG-CoA. Esta ação da estatina não é afetada pelos polimorfismos do gene *eNOS*, porém estão associadas de modo recíproco, onde a redução do colesterol pode elevar produção de óxido nítrico endotelial e melhorar a função endotelial. As estatinas podem reduzir a atividade da caveolina aumentando a quantidade de NO, que é um mecanismo importante, já que no polimorfismo *G894T* ocorre uma redução do NO endotelial. Além disso, conseguem aumentar a expressão de *eNOS* estabilizando e prolongando a meia vida do mRNA. Esses efeitos pleiotrópicos podem ajudar a evitar riscos cardiovasculares em pacientes que fazem terapia com estatina (COZMA, et al., 2019).

Um trabalho realizado por Kim e colaboradores (2016) acompanhou por dois anos pacientes com *stent* em uso de estatina e verificaram que a incidência de reestenose no grupo com uso de estatina foi menor. Liao e colaboradores em 2020, apresentaram dados com resultados compatíveis que demonstram que a estatina está associada a redução de reestenose e melhor desfecho clínico nos pacientes cardíacos tratados com estatina após implante de *stent*.

CONCLUSÃO

A população estudada de pacientes Goianos, teve maior frequência do genótipo G/T do polimorfismo *G894T* do gene *eNOs*. O mesmo genótipo foi mais frequente em pacientes que tiveram reestenose, mas sem associação significativa para essa variável.

Mais estudos são necessários com um número maior de pacientes, para avaliar a relação direta do polimorfismo *G894T* em associação a reestenose intra stent em pacientes com uso de estatinas e verificar seus efeitos pleiotrópicos.

O estudo das frequências alélicas e genotípicas demonstram que a população se encontra em desequilíbrio de HW e isto comprova a influência de fatores evolutivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHAM, Salma et al. Statines en prévention primaire des événements cardiovasculaires. **La Revue de médecine interne**, v. 39, n. 1, p. 42-49, 2018.

ALREFAI, Abeer A. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene *G894T* polymorphism with hypertension risk and complications. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 421, n. 1-2, p. 103-110, 2016.

ARAFA, Sherif et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu 298 Asp (*G894T*) and Apolipoprotein E gene polymorphism as possible risk factors for coronary heart disease among Egyptians. **The Egyptian Heart Journal**, v. 70, n. 4, p. 393-401, 2018.

CAM, Sirri F. et al. The *G894T* polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. **Thrombosis research**, v. 116, n. 4, p. 287-292, 2005.

CAMPEDELLI, F. L. et al. Polymorphism of the gene eNOS *G894T* (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.

CHEN, Li-Jing et al. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. **Journal of biomedical science**, v. 19, n. 1, p. 79, 2012.

COZMA, Angela et al. Pharmacogenetic Implications of eNOS Polymorphisms (Glu298Asp, T786C, 4b/4a) in Cardiovascular Drug Therapy. **in vivo**, v. 33, n. 4, p. 1051-1058, 2019.

ELMORE, Julius B. et al. Restenosis of the coronary arteries. **Interventional Cardiology Clinics**, v. 5, n. 3, p. 281-293, 2016.

FRARE AB, BARBOSA AM, COSTA IR, SOUZA SR, et al. (2013). GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in endometriosis in women from Goiás, Brazil. **Genet. Mol. Res.** 12: 2764-2770.

GAD, Mohamed Z. et al. Endothelial nitric oxide synthase (*G894T*) gene polymorphism in a random sample of the Egyptian population: comparison with myocardial infarction patients. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 16, n. 7, p. 695-700, 2012.

GORCHAKOVA, Olga et al. Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement. **European heart journal**, v. 24, n. 9, p. 820-827, 2003.

IDRISSI, Hind Hassani et al. Association of G894T eNOS, 4G/5G PAI and T1131C APOA5 polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction in Morocco. **Meta Gene**, v. 9, p. 56-61, 2016.

KAZI, Dhruv S.; PENKO, Joanne M.; BIBBINS-DOMINGO, Kirsten. Statins for primary prevention of cardiovascular disease: review of evidence and recommendations for clinical practice. **Medical Clinics**, v. 101, n. 4, p. 689-699, 2017.

KIM, In Jai et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (–786T> C, 4a4b, 894G> T) in Korean patients with coronary artery disease. **Thrombosis research**, v. 119, n. 5, p. 579-585, 2007.

KIM, Wonho et al. The influence of statin therapy on restenosis in patients who underwent nitinol stent implantation for de novo femoropopliteal artery disease: two-year follow-up at a single center. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 27, n. 10, p. 1494-1501, 2016.

LIAO, Feng-Ching et al. Statin Therapy for the Prevention of Cardiac Event in Instent Restenosis Patients Treated with Drug-Eluting Balloon. **International Journal of Gerontology**, v. 14, n. 1, p. 23-27, 2020.

LUO, Jian-Quan et al. Endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and myocardial infarction: a meta-analysis of 34 studies involving 21068 subjects. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87196, 2014.

MacDonald, Paul L., and Robert C. Gardner. "Type I error rate comparisons of post hoc procedures for I j Chi-Square tables." **Educational and Psychological Measurement** 60.5 (2000): 735-754.

MARRONI, Aline S. et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. **Nitric Oxide**, v. 12, n. 3, p. 177-182, 2005.

NICOLAIS, Charles et al. Therapeutic options for in-stent restenosis. **Current cardiology reports**, v. 20, n. 2, p. 7, 2018.

OGORODOVA, L. M. et al. ASSOCIATION OF ENOS GENE POLYMORPHISMS AS A RISK FACTOR OF CORONARY IN-STENT RESTENOSIS. **Annals of the Russian academy of medical sciences**, v. 72, n. 2, p. 120-125, 2017.

OLIVEIRA, Roberta Acyole et al. Benefícios da utilização estratégica de estatinas associadas a outros hipolipemiantes no manejo de pacientes dislipidêmicos: síntese de evidências. **International Journal of Health Management Review**, v. 5, n. 3, 2019.

THOMAS, Bolaji N. et al. Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms. **Gene regulation and systems biology**, v. 7, p. GRSB. S10857, 2013.

ZHOLDYBAYEVA, Elena V. et al. Genetic risk factors for restenosis after percutaneous coronary intervention in Kazakh population. **Human genomics**, v. 10, n. 1, p. 15, 2016.

6. CONCLUSÕES GERAIS

eNOS T786C: foi encontrada uma associação entre o gene e os grupos estudados, mas pelo tamanho amostral ser pequeno é necessária uma maior quantidade de estudos para entender a relação do gene com aterosclerose.

GSTM1/GSTT1: encontrou-se uma alta prevalência de genótipo presente em ambos os genes. A genética aumenta a susceptibilidade do risco de reestenose e a identificação de pacientes e a determinação dos genes envolvidos, juntamente com um tratamento individualizado, pode melhorar a qualidade de vida do paciente e reduzir a taxa de mortalidade por DAC.

*CYP3A5/CYP2C*19*: foi encontrada uma alta incidência de indivíduos com proteína não funcional *CYP3A5* *1/*3 e não expressores *CYP3A5* *3/*3, tendo forte relação com aterosclerose e a responsividade frente a medicamentos como as estatinas e uma grande incidência de pacientes com alelo de perda de função (*CYP2C19* *1/*2 e *CYP2C19* *2/*2), tendo influência na resposta ao tratamento da dislipidemia e no desenvolvimento do processo aterogênico. O estudo das frequências alélicas e genotípicas demonstram que a população se encontra em desequilíbrio de HW e isto comprova a influência de fatores evolutivos.

eNOS G894T: Obteve-se maior frequência do genótipo G/T na população. O mesmo genótipo foi mais frequente em pacientes que tiveram reestenose, mas sem associação significativa para essa variável. Mais estudos são necessários com um número maior de pacientes, para avaliar a relação direta do polimorfismo em associação a reestenose intra *stent* em pacientes com uso de estatinas e verificar seus efeitos pleiotrópicos. O estudo das frequências alélicas e genotípicas demonstraram que a população se encontra em desequilíbrio de HW, comprovando a influência de fatores evolutivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.M. Barbosa, K.S.F. Silva, M.H. Lagares, D.A. Rodrigues, I.R. da Costa, M.P. Morais, J.V.M. Martins, R.S. Mascarenhas, F.L. Campedelli and K.K.V.O. Moura. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. *Genetics and Molecular Research*. 2017, 16 (3): gmr16039708.

Alfonso F, Byrne RA, Rivero F, et al. Current treatment of in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2659-73.

Allam AH, Thompson RC, Wann LS, Miyamoto M, Nur El-Din Arl H, El Maksoud GA, et al. Atherosclerosis in ancient Egyptian mummies: the Horus study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4(4):315-27.

Armenis I, Kalotychou V, Tzanetea R, et al. Prognostic Value of T786C and G894T ENOS Polymorphisms in Sickle Cell Disease. *Nitric Oxide*. 2017; 62: 17–23.

Arnett, D.K.; Baird, A.E.; Barkley, R.A.; Basson, C.T.; Boerwinkle, E.; Ganesh, S.K.; Herrington, D.M.; Hong, Y.; Jaquish, C.; McDermott, D.A.; et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; American Heart Association Stroke Council; Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Funct. Genom. Transl. Biol. Interdiscip. Work. Group* 2007, 115, 2878–2901.

ARRIGONI, E. et al. Pharmacogenetic Foundations of Therapeutic Efficacy and Adverse Events of Statins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, 6 jan. 2017.

BAIGENT, C.; CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) COLLABORATION; BLACKWELL, L.; EMBERSON, J.; HOLLAND, L. E.; REITH, C.; BHALA, N.; PETO, R.; BARNES, E.H.; KEECH, A.; SIMES, J.; COLLINS, R. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 376(9753), 1670-1681, 2010.

Balogopal PB, de Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, et al.; American Heart Association Committee on Atherosclerosis Hypertension and Obesity in Youth of the Council on

Cardiovascular Disease in the Young; Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism; Council on Epidemiology and Prevention (2011). Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 123: 2749-2769.

Barton M, Haudenschild CC. Endothelium and atherogenesis: endothelial therapy revisited. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: S23-5.

Beaglehole R, Yach D. Globalisation and the prevention and control of non-communicable disease: the neglected chronic diseases of adults. *Lancet* 2003; 362: 903–08.

Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):692-702.

Berberich A.J., Hegele R.A. The role of genetic testing in dyslipidaemia. *Pathology.* 2019 Feb;51(2):184-192.

Berenson GS, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338:1650–6.

BEYEA M.M., REAUME S., SAWYEZ C.G., EDWARDS J.Y., O’NEIL C., HEGELE R.A., PICKERING J.G., HUFF M.W. The oxysterol 24(s),25-epoxycholesterol attenuates human smooth muscle-derived foam cell formation via reduced lowdensity lipoprotein uptake and enhanced cholesterol efflux. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e000810.

Bloomer, R.J. Decreased Blood Antioxidant Capacity and Increased Lipid Peroxidation in Young Cigarette Smokers Compared to Nonsmokers: Impact of Dietary Intake. *Nutr. J.* 2007, 6, 39.

Bogiatzi C, Gloor G, Allen-Vercoe E, et al. Metabolic products of the intestinal microbiome and extremes of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2018;273:91-97.

BOLICK D.T., SKAFLEN M.D., JOHNSON L.E., KWON S., HOWATT D.,

DAUGHERTY A., RAVICHANDRAN K.S. AND HEDRICK C. G2A Deficiency in Mice Promotes Macrophage Activation and Atherosclerosis. *Circ Res.* 2009 February 13; 104(3): 318–327.

Bonetti P.O., Lerman L.O., Napoli C., Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering-are they clinically relevant? *Eur Heart J* 2003; 24: 225-48.

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 168-75.

Botto N, Masetti S, Petrozzi L, Vassalle C, Manfredi S, Biagini A, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2002; 13: 269-74.

Botto N, Rizza A, Colombo MG, Mazzone AM, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2001; 493: 23-30.

BOZINA, N.; BRADAMANTE, V.; LOVRIĆ, M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, v. 60, n. 2, p. 217–42, jun. 2009.

Brandes R.P., Fleming I., Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 286-94.

Bräsen JH, Kivelä A, Röser K, Rissanen TT, Niemi M, Luft FC, Donath K, Ylä-Herttuala S. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor-BB expression, iron deposition, and oxidation-specific epitopes in stented human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1720–1726.

BRITO, C.; MURILO, R.; DUQUE, A.; LOUREIRO, E.; MERLO, I.; FONSECA, FILHO V. “Cirurgia vascular: cirurgia endovascular, angiologia”. Revinter, 2014.

Bu, D.X., Tarrio, M., Grabie, N., Zhang, Y., Yamazaki, H., Stavrakis, G. et al. (2010) Statin-induced Kruppel-like factor 2 expression in human and mouse T cells reduces inflammatory

and pathogenic responses. *J. Clin. Invest.* 120, 1961–1970, Epub 2010 May 3.

Burke A., Fitzgerald G.A. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46: 79-90.

Byrne R. A., Stone G. W., Ormiston J., Kastrati A. Coronary balloon angioplasty, stents, and scaffolds. *Lancet* 2017; 390: 781–92.

Capodanno D, Stone GW, Morice MC, Bass TA, Tamburino C. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass graft surgery in left main coronary artery disease: a meta-analysis of randomized clinical data. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:1426-1432.

Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation.* 2004;109:1359–1365.

Casey R.G., Joyce M., Roche-Nagle G., Cox D., Bouchier-Hayes D.J. Young male smokers have altered platelets and endothelium that precedes atherosclerosis. *J Surg Res* 2004; 116: 227-33.

Cavalcante R, Sotomi Y, Lee CW, et al. Outcomes after percutaneous coronary intervention or bypass surgery in patients with unprotected left main disease. *J Am Coll Cardiol* 2016;68:999-1009.

CENTEMERO, M. P. et al. Reestenose Intra-Stent: Como Diagnosticar, Quando Tratar e Qual o Prognóstico? *Revista Brasileira Cardiologia Invasiva*, v. 12, n. 4, p. 185–192, 2004.

Chamberlain JG, Galton DJ (1990) Genetic susceptibility to atherosclerosis. *Br Med Bull* 46:917–940.

Chang J, Pan F, Tang Q, et al. ENOS Gene T786C, G894T and 4a4b Polymorphisms and Male Infertility Susceptibility: A Meta-Analysis. *Andrologia.* 2017; 49 (4).

CHEN, L.; PRASAD, G. V. R. CYP3A5 polymorphisms in renal transplant recipients:

influence on tacrolimus treatment. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, v. 11, p. 23–33, 7 mar. 2018.

CHEUNG, B. M.; LAUDER, I. J.; LAU, C. P.; KUMANA, C. R. Meta-analysis of large randomized controlled trials to evaluate the impact of statins on cardiovascular outcomes. *Br J Clin Pharmacol*, 57(5), p. 640-51, 2004.

CHOI H.Y., RAHMANI M., WONG B.W., ALLAHVERDIAN S., MCMANUS B.M., PICKERING J.G., CHAN T., FRANCIS G.A. ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation*. 2009;119:3223–3231.

CIVELEK M., MANDUCHI E., RILEY R.J., JR C.J.S. AND DAVIES P.F. Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circ Res*. 2009 August 28; 105(5): 453–461.

Çoban N, Güçlü Geyik F, Yıldırım Ö, Erginel Ünaltuna N (2017) Investigating the role of ceramide metabolism-associated CERS5 (LASS5) gene in atherosclerosis pathogenesis in endothelial cells. *Türk Kardiyol Dern Ars*45(2):118–125.

Collins, R., Reith, C., Emberson, J., Armitage, J., Baigent, C., Blackwell, L. et al. (2016) Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet* 388, 2532–2561.

Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003;49:389–395.

COZMA, Angela et al. Pharmacogenetic Implications of eNOS Polymorphisms (Glu298Asp, T786C, 4b/4a) in Cardiovascular Drug Therapy. *in vivo*, v. 33, n. 4, p. 1051-1058, 2019.

DÂMASO, A. *Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças*. Medsi. 2001.

Davidson MH, Ballantyne CM, Jacobson TA, et al. Clinical utility of inflammatory markers and advanced lipoprotein testing: Advice from an expert panel of lipid specialists. *J Clin Lipidol* 2011;5:338–367.

De flora S, Izzotti A, Walsh D, Degan P, Petrilli GL, Lewtas J. Molecular epidemiology of atherosclerosis. *FASEB J.* 1997;11:1021–1031.

Degoma E.M., Rader D.J. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nat. Rev. Cardiol.* 2011; 8:266–77.

Demirbağ R, Yılmaz R, Koçyiğit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570: 197-203.

Denisenko NP, Sychev DA, Sizova ZM, Ryzhikova KA, et al. (2017). Urine metabolic ratio of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphisms in Russian peptic ulcer patients. *Pharmgenomics Pers. Med.* 10: 253-9.

Dichtl W., Nilsson L., Goncalves I., Ares M.P., Banfi C., Calara F., Hamsten A., Eriksson P., Nilsson J., Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ B in endothelial cells, *Circ Res* 84 (1999) 1085–1094.

Djordjevic A, Zivkovic M, Stankovic A, Zivotic I, Koncar I, Davidovic L et al (2016) Genetic variants in the vicinity of LGALS-3 gene and LGALS-3 mRNA expression in advanced carotid atherosclerosis: an exploratory study. *J Clin Lab Anal* 30(6):1150–1157.

Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U (2001) Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 104:342–345.

Dupuis J, Tardif JC, Rouleau JL, Ricci J, Arnold M, Lonn E, Roux R, Title LM, Amyot R, Bonafede N, et al. Intensity of lipid lowering with statins and brachial artery vascular endothelium reactivity after acute coronary syndromes (from the BRAVER trial). *Am J Cardiol* 2005; 96: 1207-13.

Eeckhout E, Serruys PW, Wijns W, et al. editors. Percutaneous Interventional Cardiovascular Medicine: the PCR - EAPCI Text book. Europa Ed. PCR Publ., 2012:785-826.

ELFAKI, I. et al. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, v. 19, n. 8, p. 2057–2070, 24 ago. 2018.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. J Antibiot, 29, p. 1346–1348, 1976.

Ercan B, Ayaz L, Cicek D, Tamer L (2008). Role of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms in patients with atherosclerosis. Cell Biochem Funct, 26, 309-13.

Etemad A, Vasudevan R, Aziz AFA, Yusof AKM, et al. (2016). Analysis of selected glutathione S -transferase gene polymorphisms in Malaysian type 2 diabetes mellitus patients with and without cardiovascular disease. Genetics and Molecular Research. 15: 1-9.

Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. Circulation. 2004;110:940–947.

Farouk H., Kandil D., Kamel S., Elghoroury E.A., Elshamaa M.F., Sabry S. Effect of GSTM1 and GSTT1 deletions in the development of oxidative stress in children with chronic kidney disease. J Clin Basic Cardiol. 2013;16:1–5.

Fatini C, Sofi F, Gensini F, Sticchi E, Lari B, Pratesi G et al. (2004) Influence of eNOS gene polymorphisms on carotid atherosclerosis. Eur J Vasc Endovasc Surg27(5):540–544.

Favarato D and Luz PL (2003). Hipertensão e aterosclerose: Aspectos fisiopatológicos Hipertensão. Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 6(4).

Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA,

Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2459–2472.

Fernandez E, Perez R, Hernandez A, et al (2011). Factors and mechanisms for pharmacokinetic differences between pediatric population and adults. *Pharmaceutics*, 3, 53-72.

Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, et al (2001). Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*, 88, 44-51.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23(6 Pt 2):1121–1131.

Förstermann U., Xia N., Li H.. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120:713-735.

Frostedgård, J.; Ruihua, W.U.; Lemne, C.; Thulin, T.; Witztum, J.L.; de Faire, U. Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Increased in Hypertension. *Clin. Sci*. 2003, 105, 615–620.

FULCHER, J.; CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS (CTT) COLLABORATION; O'CONNELL, R.; VOYSEY, M.; EMBERSON, J.; BLACKWELL, L.; MIHAYLOVA, B.; SIMES, J.; COLLINS, R.; BAIGENT, C.; KIRBY, A.; COLHOUN, H.; BRAUNWALD, E.; LA ROSA, J.; PEDERSEN, T. R.; TONKIN, A.; DAVIS, B.; SLEIGHT, P.; FRANZOSI, M. G.; KEECH, A. Efficacy and safety of LDL- lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet*, 385(9976), p. 1397-1405, 2015.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. & Chesebro, J. H. The pathogenesis of coronary

artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* 326, 242–250 (1992).

Fuster, V., Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90, 2126–2146 (1994).

GALKINA E., LEY K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165–197.

Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ, Robinson JG, Daniels SR, Gidding SS, Ferranti S. D, Ito MK, McGowan MP, Moriarty PM, Cromwell WC, Ross JL, Ziajka PE. Familial Hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients. *J Clin Lipidol* 2011; 5: S1 – S8.

Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM, Humphries SE. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis. *Eur Heart J.* 2002; 23: 1955±1962.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79:8–15.

Grubisa I., Otasevic P., Vucinic N., Milicic B., Jozic T., Krstic S., Milasin J. Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are strong risk factors for atherogenesis in a Serbian population. *Genet. Mol. Biol.* vol.41 no.1 Ribeirão Preto Jan./Mar. 2018.

Guengerich FP (2007). Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol*, 21, 163-8.

Guengerich FP (2017). Intersection of the roles of cytochrome P450 enzymes with xenobiotic and endogenous substrates, relevance to toxicity and drug interactions. *Chem Res Toxicol*, 30, 2-12.

HALCOX J.P., DONALD A.E., ELLINS E., WITTE D.R., SHIPLEY M.J., BRUNNER E.J., MARMOT M.G., DEANFIELD J.E. Endothelial function predicts progression of carotid

intima-media thickness. *Circulation* 2009;119:1005–1012.

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:508–519.

Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685–1695 (2005).

Hansson, G. K., Libby, P., Schonbeck, U. & Yan, Z. Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.* 91, 281–291 (2002).

Hauser ER, Pericak-Vance MA. Genetic analysis for common complex disease. *Am Heart J* 2000; 140: 36-44.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.

Heron, M. Deaths: leading causes for 2010. *Natl Vital Stat. Rep.* 62, 1–96 (2013).

Hey Y., Fany Z., Zhang J., Zhang Q., Zheng M., Li Y., Zhang D., Gu1 S., Yang H. Polymorphisms of eNOS gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mutagenesis* 26 (2) (2011) 339–349.

Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298–>Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999;100:1515–1520.

HOLMES, D. R. et al. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation*, v. 109, n. 5, p. 634–40, 10 fev. 2004.

Hong YM. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean Circ J* 2010; 40: 1–9.

Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2011; 5: S9 – S17.

Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi JR, et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *J Leukoc Biol.* 2016; 99:541–548.

Hung CS, Lin MS, Chen YH, et al. Prognostic factors for neurologic outcome in patients with carotid artery stenting. *Acta Cardiol Sin* 2016; 32: 205–214.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 342-9.

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292:1160–1164.

Iyanagi T (2007). Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol*, 260, 35-112.

Izzotti A, Cartiglia C, Lewtas J and De Flora S (2001). Increased DNA alterations in atherosclerotic lesions of individuals lacking the GSTM1 genotype. *FASEB J.* 15: 752-757.

Jr. A.M.G. and Moon J.E. Management of Cardiovascular Risk: The Importance of Meeting Lipid Targets. *Am J Cardiol* 2012;110[suppl]:3A-14^a.

Kader KN, Akella R, Ziats NP, Lakey LA, Harasaki H, Ranieri JP et al (2000) eNOS-overexpressing endothelial cells inhibit platelet aggregation and smooth muscle cell proliferation in vitro. *Tissue Eng*6(3):241–251.

Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Rantala M, Kesäniemi YA (2010) Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and

carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J Intern Med* 251(2):102–110.

Kasprzak JD, Kłosińska M, Drozd J. Clinical aspects of assessment of endothelial function. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 33-40.

Katoh T, Naqata N, Kuroda Y, et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 1996;17:1855–1859.

Kazi, D.S.; Penko, J.M.; Bibbins-Domingo, K. Statins for Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Review of Evidence and Recommendations for Clinical Practice. *Med. Clin. N. Am.* 2017, 101, 689–699.

Kirmizis D, Papagianni A, Dogrammatzi F, Skoura L, Belechri AM, Alexopoulos E, Efstratiadis G, Memmos D. Effects of simvastatin on markers of inflammation, oxidative stress and endothelial cell apoptosis in patients on chronic hemodialysis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 1256-65.

KOLOVOU, V.; KOLOVOU, G. The influence of gene polymorphisms on evolution of atherosclerosis. *Health Science Journal*, v. 8, n. 1, p. 1–3, 2014.

Konsola T, Siasos G, Antonopoulos AS, et al. The Impact of T786C and G894T Polymorphisms of ENOS on Vascular Endothelial Growth Factor Serum Levels in Type 2 Diabetes Patients. *Int J Cardiol.* 2016; 222: 155–156.

KOO A., DEWEY C. F., AND GARCÍA-CARDEÑA G. Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C137–C146, 2013.

KRUTH H.S. Fluid-Phase Pinocytosis of LDL by Macrophages: A Novel Target to Reduce Macrophage Cholesterol Accumulation in Atherosclerotic Lesions. *Curr Pharm Des.* 2013 ; 19(33): 5865–5872.

Kubo S, Kadota K, Ichinohe T, et al. Comparison of long-term outcome after

percutaneous coronary intervention for stent thrombosis between early, late, and very late stent thrombosis. *Circ J.* 2014;78:101–109.

Kumar M, Agarwal SK, Goel SK. Lung cancer risk in north Indian population: Role of genetic polymorphisms and smoking. *Mol Cell Biochem.* 2009;322:73–79.

Kumar RG, Spurthi MK, Kumar KG (2012) Endothelial nitric oxide synthase polymorphism G298T in association with oxidative DNA damage in coronary atherosclerosis. *J Genet* 91(3):349–352.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N and Robbins (2005). e *Cotran Patologia. Bases Patológicas das Doenças.* Elsevier, Rio de Janeiro.

LANDMESSER U., HORNIG B., DREXLER H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004;109:II27–II33.

Laslett, L. J. et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60 (Suppl.), S1–S49 (2012).

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-35.

Leblanc S, Bibeau K, Bertrand OF, Lévesque V, Deschênes St-Pierre B et al (2017) Carotid versus coronary atherosclerosis burdens in acute compared with chronic symptomatic coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol* 95(8):878–887.

Lee et al. Effects of Statins on Coronary Atherosclerosis. *JACC: CARDIOVASCULAR IMAGING*, VOL. 11, NO. 10, 2018. :1475 – 8 4.

Lee SJ (2012). Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine. *Front Genet*, 3, 318.

LEFER, A. M.; TSAO, P. S.; LEFER, D. J.; MA, X. L. Role of endothelial dysfunction

in the pathogenesis of reperfusion injury following myocardial ischemia. *FASEB J*, 5, p. 2029–2034, 1991.

Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13:161–167.

Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:313–319.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89–118.

Libby P, et al. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473:317–25.

Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874 (2002).

Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105, 1135–1143.

Libetta C., Sepe V., Esposito P., Galli F., Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem*. 2011;44: 1189–1198.

Lin Y.S., Hung S.C., Wei Y.H., Tarng D.C. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:405–415.

Ling MC, Ruddy TD, deKemp RA, Ukkonen H, Duchesne L, Higginson L, Williams KA, McPherson R, Beanlands R. Early effects of statin therapy on endothelial function and microvascular reactivity in patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 2005; 149: 1137.

Linton M.F., Babaev V.R., Huang J., Linton E.F., Tao H. and Yancey P.G. Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J*. 2016 October 25; 80(11): 2259–2268.

LOLODI, O. et al. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery. *Current drug metabolism*, v. 18, n. 12, p. 1095–1105, 2017.

LU, Y. et al. Construction and verification of CYP3A5 gene polymorphisms using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system to predict drug metabolism. *Molecular medicine reports*, v. 15, n. 4, p. 1593–1600, abr. 2017.

Luoma PV (2007). Cytochrome P450-physiological key factor against cholesterol accumulation and the atherosclerotic vascular process. *Ann Med*, 39, 359-70.

MACIEL, S. S.; PEREIRA ADA, C.; SILVA, G. J.; RODRIGUES, M. V.; MILL, J. G.; KRIEGER, J. E. Association between glutathione S-transferase polymorphisms and triglycerides and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis*, 206, p. 204–8, 2009.

Manfredi S, Calvi D, del Fiandra M, Botto N, et al. (2009). Glutathione S-transferase T1- and M1-null genotypes and coronary artery disease risk in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics* 10: 29-34.

Marinković N, Pasalić D and Potočki S (2013). Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. *Biochem Med (Zagreb)* 23: 255-265.

MARRONI, A. S. et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric oxide: biology and chemistry*, v. 12, n. 3, p. 177–82, maio 2005.

Martelli A (2014). Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle. *Revista Saúde e Desenvolvimento Humano* 2: 41-52.

Martinez, M.S.; Garcia, A.; Luzardo, E.; Chavez-Castillo, M.; Olivar, L.C.; Salazar, J.; Velasco, M.I.; Rojas Quintero, J.J.; Bermudez, V. Energetic metabolism in cardiomyocytes: Molecular bases of heart ischemia and arrhythmogenesis. *Vessel Plus* 2017, 1, 130–141.

Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4:104–111.

Masetti S, Botto N, Manfredi S, Colombo MG, Rizza A, Vassalle C, Clerico A, Biagini A, Andreassi MG. Interactive effect of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on occurrence and severity of coronary artery risk. *J Mol Med (Berl)* 2003;81:488-94.

Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery. disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis* 2014; 25: 713-24.

MAYERL C., LUKASSER M., SEDIVY R., NIEDEREGGER H., SEILER R., WICK G. Atherosclerosis research from past to present—on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* (2006) 449: 96–103.

McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (suppl): 1307–15.

McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atheroscler Suppl*. 2003;4:9–14.

Merched AJ, Chan L. Nutrigenetics and nutrigenomics of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2013;15(6):328.

MIHAYLOVA, B.; CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) COLLABORATION. CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) COLLABORATORS; EMBERSON, J.; BLACKWELL, L.; KEECH, A.; SIMES, J.; BARNES, E. H.; VOYSEY, M.; GRAY, A.; BAIGENT, C.; COLLINS, R. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*, 380(9841), p. 581-590, 2012.

Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98: 1352-64.

MOORE KJ, TABAS I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011;145: 341–355.

Morais LMTS, Cardoso Filho C, Lourenço GJ, Shinzato JY, et al. (2008). Características mamográficas do câncer de mama associadas aos polimorfismos GSTM1 e GSTT1. *Rev Assoc Med Bras*.54(1):61-6.

Morice MC, Serruys PW, Kappetein AP, et al. Five-year outcomes in patients with left main disease treated with either percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass grafting in the Synergy between Percutaneous Coronary Intervention with Taxus and Cardiac Surgery trial. *Circulation* 2014;129:2388-2394.

Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23: 222-31.

NAGASSAKI, S. et al. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 41, n. 7, p. 1044–1049, 2006.

Nascimento BR, Brant LCC, Oliveira GMM, Malachias MVB, Reis GMA, Teixeira RA, et al. Cardiovascular Disease Epidemiology in Portuguese Speaking Countries: data from the Global Burden of Disease, 1990 to 2016. *Arq Bras Cardiol*. 2018;110(6):500-11.

NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* (London, England), v. 360, n. 9340, p. 1155–62, 12 out. 2002.

Nenseter M.S., Narverud I., Græsdal A., Bogsrud M.P., Aukrust P.al, Retterstøl K., Ose L., Halvorsen B., Holven K.B. Cholesterol efflux mediators in homozygous familial hypercholesterolemia patients on low-density lipoprotein apheresis. *Journal of Clinical Lipidology*, Vol 7, No 2, April 2013.

Nishank, S.S.; Mendi, P.S.; Sunder, S.; Rajiv, Y.; Rasik, B.; Gupta, V.; Sadashiv, G.; Anil, G. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell

disease patients in India. *J. Hum. Genet.* 2013, 58, 775–779.

O'Rourke K, Vander Zanden A, Shepard D, Leach-Kemon K. Cardiovascular disease worldwide, 1990-2013. *JAMA.* 2015;314(18):1990-2013.

Olshan AF, Li R, Pankow JS, Bray M, Tyroler HA, Chambless LE, et al. Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione S-transferase genes. *Epidemiology* 2003; 14: 321-7.

Pagliari P (2003) Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci* 73(17):2137– 2149.

Pallero MA, Talbert Roden M, Chen Y-F, Anderson PG, Lemons J, Brott BC, et al. Stainless Steel Ions Stimulate Increased Thrombospondin-1-Dependent TGF-Beta Activation by Vascular Smooth Muscle Cells: Implications for In-Stent Restenosis. *J Vasc Res.* 2010; 47: 309±322.

Song P., Fang Z., Wang H., Cai Y., Rahimi K., Zhu Y., et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob Health* 2020; 8: e721–2.

PETERS, B. J. M. et al. Genetic determinants of response to statins. *Expert review of cardiovascular therapy*, v. 7, n. 8, p. 977–83, ago. 2009.

PINHEIRO DS. Avaliação do polimorfismo de deleção de GSTT1 e GSTM1 na susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 2. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

Poredos P. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 274-7.

Rafikov, R.; Fonseca, F.V.; Kumar, S. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J. Endocrinol.* 2011, 210, 271–284.

Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2: 219-236.

Raines E.W., Ross R., Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis, *Br Heart J* 69 (1993) S30–S37.

Rajesh KG, Surekha RH, Mrudula SK, Prasad Y, Sanjib KS, Prathiba N. Oxidative and nitrosative stress in association with DNA damage in coronary heart disease. *Singapore Med J* 2011; 52: 283-8.

RAMAKUMARI, N. et al. Impact of pharmacogenetics on statin-induced myopathy in South-Indian subjects. *Indian Heart Journal*, v. 70, p. S120–S125, 2018.

REINER, Z.; CATAPANO, A. L.; DE BACKER G.; et al. [ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias]. *Rev Esp Cardiol*, 64(12), 1168 e1- e60, 2011.

Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD (2011). Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol Sci*, 124, 261-77.

Reriani M.K., Lerman L.O., Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med* 2010; 4: 351-60.

Reriani MK, Dunlay SM, Gupta B, West CP, Rihal CS, Lerman LO, Lerman A. Effects of statins on coronary and peripheral endothelial function in humans: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011; 18: 704-16.

Reynald RL, Sansen S, Stout CD, Johnson EF (2012). Structural characterization of human cytochrome P450 2C19: active site differences between P450s 2C8, 2C9, and 2C19. *J Biol Chem*, 287, 44581-91.

Roberts WC. The underused miracle drugs: The statin drugs are to atherosclerosis what penicillin was to infectious disease. *American Journal of Cardiology*. 1996; 78(3):377–8.

RODRIGUES, D. A. et al. GSTM1 polymorphism in patients with clinical manifestations of atherosclerosis. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017.

ROSENDO, A. B.; DAL-PIZZOL, F.; FIEGENBAUM, M.; ALMEIDA, S. Farmacogenética e Efeito Antiinflamatório dos Inibidores da HMG-CoA Redutase. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51(4), p. 520-525, 2007.

Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977;86:675–684.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801–809.

Ross, R. & Glomset, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 295, 369–377 (1976).

Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis —an update. *N. Engl. J. Med.* 314, 488–500 (1986).

Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70: 1–25.

Safarinejad, M. R.; Shafiei, N.; Safarinejad, S. The Association of Glutathione- S - Transferase Gene Polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with Idiopathic Male Infertility. *Journal of Human Genetics* **2010**, 55 (9), 565–570. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.59>.

Santos A, Márquez I, Arria M, Brito J, et al. (2014). Determinación del polimorfismo CYP2C19*2 en los pacientes con síndrome coronario agudo ingresados en el Hospital “Dr Domingo Luciani”. *Av. Cardiol.* 34(1): 33-9.

Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot J, et al. (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy : 2013 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 94(3): 317-23.

Shao B, Pennathur S, Heinecke JW. Myeloperoxidase targets apo-lipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*. 2012; 287:6375–6386.

Sharma R, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC. (2000). Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes. *Acta Biochim Pol*. 47(3):751-62.

Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, Koba S, Geshi E, Katagiri T, et al. The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem Cell Biol*. 2001; 116: 471±481.

Shuvalova YA, Kaminnyi AI, Meshkov AN, Shirokov RO, Samko AN. Association between polymorphisms of eNOS and GPx-1 genes, activity of free-radical processes and instant restenosis. *Mol Cell Biochem*. 2012; 370: 241±249.

Silva KSF. Commentary: Atherosclerosis, Analysis of the eNOS (T786C) Gene Polymorphism. *J Cardiol and Cardiovasc Sciences*. 2019;3(1):11-12.

Sim SC, Ingelman-Sundberg M (2013). Update on allele nomenclature for human cytochromes P450 and the human cytochrome P450 allele (CYP-allele) nomenclature database. *Methods Mol Biol*, 987, 251-9.

Singh S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 75:1–15.

Singh, B.R.; Mengi, S.A.; Xu, Y.J.; Arneja, A.S.; Dhalla, N.S. Pathogenesis of Atherosclerosis: A Multifactorial Process. *Exp. Clin. Cardiol*. 2002, 7, 40–53.

Singh, P.P.; Mahadi, F.; Roy, A.; Sharma, P. Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian J. Clin. Biochem*. 2009, 24, 324–342.

Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*. 2014;88:3–11.

Smith AR, Visioli F, Hagen TM. Plasma membrane-associated endothelial nitric oxide synthase and activity in aging rat aortic vascular endothelia markedly decline with age. *Arch Biochem Biophys* 2006; 454: 100-5.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*, 2001.

Song K, Yi J, Shen X, Cai Y. (2012). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 7(11):4892-4.

Spieker L.E., Sudano I, Hürlimann D., Lerch P.G., Lang M.G., Binggeli C., Corti R., Ruschitzka F., Lüscher T.F., Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002; 105: 1399-402.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; BERTOLAMI, M. C.; NETO, A. A.; SOUZA, A. D. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, 2007;88:1–18.

Steinberg, D. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* 2002, 8, 1211–1217.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381–1478.

Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al.; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129:S1–45.

Sugioka K, Naruko T, Matsumura Y, Shirai N, Hozumi T, Yoshiyama M et al (2010)

Neopterin and atherosclerotic plaque instability in coronary and carotid arteries. *J Atheroscler Thromb* 17(11):1115–1121.

Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, et al. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol*. 2002; 86: 71±76.

Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013; 339:161–166.

Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications. *Circulation* 2007;116:1832–1844.

Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005) 25(11):2255–64.

Tanaka A., Ai M., Kobayashi Y., Tamura M., Shimokado K., Numano F., Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and their role in atherosclerosis, *Ann N Y Acad Sci* 947 (2001) 207–212.discussion 212–203.

Taşpınar M, Aydos S, Sakırağaoğlu O, Düzen IV, Yalçınkaya A, Öztuna D, et al. Impact of genetic variations of the CYP1A1, GSTT1, and GSTM1 genes on the risk of coronary artery disease. *DNA Cell Biol* 2012; 31: 211-8.

Thanyasiri P, Kathir K, Celermajer DS, Adams MR. Endothelial dysfunction and restenosis following percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol*. 2007;119:362–367.

THAVENDIRANATHAN, P.; BAGAI, A.; BROOKHART, M. A.; CHOUDHRY, N. K.. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*, 166(21), p. 2307-13, 2006.

Thelen K, Dressman JB (2009). Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol*, 61, 541-58.

Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, Faubert D, Wilkes BC et al (2010) S-nitrosylation of betacatenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell* 39(3):468–476.

Thomas HE Jr. et al. Cholesterol-phospholipid ratio in the prediction of coronary heart disease. The Framingham study. *N. Engl. J. Med.* 1966; 274:701–5.

Tolani et al. Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. *Atherosclerosis*. 2013 July ; 229(1): 79–85.

Tousoulis D, Psarros C, Demosthenous M, Patel R, Antoniadis C, Stefanadis C. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:2491–2502.

TÜRKANOĞLU et al. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *Neurol Sci* (2010) 31:727–734.

Uehara S, Uno Y, Inoue T, et al (2015). Novel marmoset cytochrome P450 2C19 in livers efficiently metabolizes human P450 2C9 and 2C19 substrates, S-warfarin, tolbutamide, flurbiprofen, and omeprazole. *Drug Metab Dispos*, 43, 1408-16.

Vanhoutte PM (1997) Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *EurHeart J*18(Suppl. E):E19–E29.

Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: Molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med*. 2008;14:37–44.

Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, Mccredie RM, Wilcken DEL (1996) A smoking dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *NatMed*2(1):41–45.

Waterman CL, Kian-Kai C, Griffin JL. Metabolomic strategies to study lipotoxicity in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(3):230-234.

Weber, C.; Noels, H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med*. 2011, 17, 1410–1422.

WEI, K.; ZHANG, L. Interactions between CYP3A5*3 and POR*28 polymorphisms and lipid lowering response with atorvastatin. *Clinical Drug Investigation*, v. 35, n. 9, p. 583–91, set. 2015.

Weintraub WS. The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol*. 2007;100:3K–9K.

Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1769–1776.

West I.C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med*. 17: 171-180.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.

Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early athero-genesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1995) 15(5):551–61.

Wilson MH, Grant PJ, Hardie LJ and Wild CP (2000). Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *FASEB J*. 14: 791-796.

Wu B.J, Li Y., Ong K.L., Sun Y., Shrestha S., L Hou L., Johns D., Barter P.J., Rye K. Reduction of In-Stent Restenosis by Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37: 2333-2341.

XAVIER, H. T., IZAR M. C., FARIA NETO, J. R., ASSAD, M. H., ROCHA V. Z., SPOSITO A. C., FONSECA F. A., DOS SANTOS J. E., SANTOS R. D., BERTOLAMI M.

C., FALUDI A. A., MARTINE T. L. R., DIAMENT ., GUIMARÃES A., FORTI N. A., MORIGUCHI ., CHAGAS A. C. P., COELHO O. R., RAMIRES, A. F.. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol, 2013.

Xie X, Shi X, Liu M (2017) The roles of TLR gene polymorphisms in atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis of 35,317 subjects. *Scand J Immunol* 86(1):50–58.

Xue G, Zhang J, Zhang H, Zhang B, Sun M (2004) eNOS gene transfected endothelial cells inhibit smooth muscle cell proliferation and platelet aggregation in vitro. *Mol Ther* 9(5):150–S150.

Yalin S, Hatungil R, Tamer L, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 2007;25:509–513.

YAN P, XIA C, DUAN C, LI S, MEI Z. Biological characteristics of foam cell formation in smooth muscle cells derived from bone marrow stem cells. *Int J Biol Sci.* 2011;7:937–946.

Yang G, Lucas R, Caldwell R, Yao L, Romero MJ, Caldwell RW. Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *J Cardiovasc Dis Res* 2010; 1: 59-63.

Yang, L., Zhou, X., Guo, R., Shi, Y., Liang, X. and Heng, X. (2013) Role of Kruppel-like factor 2 and protease-activated receptor-1 in vulnerable plaques of ApoE(-/-) mice and intervention with statin. *Can. J. Cardiol.* 29, 997–1005, Epub 2013 Feb 5.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, et al. (2001). An efficient produce for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 17(29): 1-8.

YEBOAH J, CROUSE JR, HSU FC, BURKE GL, HERRINGTON DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;115:2390–2397.

Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR,

Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* 2009; 120: 502-9.

Yin, T. & Miyata, T. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives. *Throm Res.* 128, 307–316 (2011).

Ying Li , Li Li , DuoJiao Fan , Zheng Wang & Yijie Cui (2020): Effects of GST null genotypes on individual susceptibility to atherosclerotic cardiovascular diseases: a metaanalysis, *Free Radical Research*.

Yurdagul A, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem J* (2016) 473(10):1281–95. - A.

Yurdagul A, Green J, Albert P, McInnis MC, Mazar AP, Orr AW. $\alpha 5\beta 1$ integrin signaling mediates oxidized low-density lipoprotein-induced inflammation and early atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2014) 34(7):1362–73.

Yurdagul A, Orr AW. Blood brothers: hemodynamics and cell-matrix inter-actions in endothelial function. *Antioxid Redox Signal* (2016) 25:415–34.

Yurdagul A, Sulzmaier FJ, Chen XL, Pattillo CB, Schlaepfer DD, Orr AW. Oxidized LDL induces FAK-dependent RSK signaling to drive NF- κ B activation and VCAM-1 expression. *J Cell Sci* (2016) 129(8):1580–91. – B.

ZAGO, V. H. DE S. et al. Efeitos da Atorvastatina e do Polimorfismo T-786C do Gene eNOS sobre Parâmetros do Metabolismo Lipídico Plasmático. *Arquivo Brasileiro Cardiologia*, v. 100, n. 1, p. 14–20, 2013.

Zhang PY, Xu X, Li XC. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18:3091–3096.

Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins: Basic research and clinical perspectives. *Circ J.* 2010;74:818–26.

Zhou Q, Liao JK. Statins and cardiovascular diseases: From cholesterol lowering to pleiotropy. *Curr Pharm Des.* 2009;15:467–78.

Zhou, S.M.; Chadipiralla, K.; Mendez, A.J.; Jaimes, E.A.; Silverstein, R.L.; Webster, K.; Raij, L. Nicotine Potentiates Proatherogenic Effects of OxLDL by Stimulating and Upregulating Macrophage CD36 Signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013, 305, H563–H574.

Zi Y, Wu S, Ma D, Yang C, et al. (2014). Association of GSTT1 and GSTM1 variants with acute myeloid leukemia risk. *Genet. Mol. Res.* 13: 3681-3685.

ZIMMERMAN MR (1993) The paleopathology of the cardiovascular system. *Texas Heart Inst J* 20:252–257.

ANEXOS

8.1. TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA (PROPE)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
GRUPO CONTROLE**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Farmacogenética: Resposta dos polimorfismos dos genes *ApoE*, *CYPs*, *eNos*, *GSTs*, *HMGCR*, *p53*, receptor de estrógeno e *SCAP* em pacientes dislipidêmicos ao tratamento com estatinas.**

Meu nome é _____, sou o pesquisador (a) responsável, Mestre em Genética. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável **Dra. Katia Karina Verolli de O. Moura** no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail kkverolli@pucgoias.edu.br.

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

- I. O paciente que está sob consulta sem diagnóstico de dislipidemia baseado em exames laboratoriais que procuraram o laboratório para outros tipos de exames, onde foi informado e contatado da pesquisa, caso aceite, assinará o TCLE-grupo controle. Caso não aceite ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.
- II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para diferentes polimorfismos (variações genéticas) que podem estar relacionados com alterações lipídicas.

- III. São objetivos da pesquisa a detecção de polimorfismos dos genes (variações genéticas) criando um painel de variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver essa doença.
- IV. As amostras de sangue periférico do grupo controle coletadas serão submetidas a testes de sangue, para verificar a ausência dos polimorfismos. Para o grupo controle os critérios de inclusão são pacientes diagnosticados com dislipidemia e em tratamento medicamentoso com estatina e que aceitem responder à entrevista e assinem o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo). Os de exclusão são os pacientes que não aceitem participar da pesquisa.
- V. Visto que a coleta de sangue é um procedimento simples e realizado em local apropriado, não verificamos a possibilidade de grandes riscos ao participante da pesquisa. Caso ocorra algum imprevisto o paciente será encaminhado a uma das unidades da rede formada para estudo destas alterações (Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas) localizado no Núcleo de Pesquisas Replicon/PUC Goiás, situado na Rua 235, nº40, setor Universitário, Goiânia, Goiás, CEP: 74-60510 Térreo do bloco L área IV (antigo prédio da Polícia Federal) conforme acordo firmado com as instituições. O risco durante essa coleta é mínimo e está relacionado a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxado. Caso ocorra alguma complicação o próprio serviço de referência se coloca à disposição para acompanhamento e tratamento.
- VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para algum polimorfismo, você será informado pelo médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com dislipidemia. Seu nome ou o material, que indique a sua participação, não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.
- VII. O material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa. Desde que autorizado pelo presente, os testes e os resultados podem ser utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressalvado o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa. O material após os exames será descartado.
- VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Fábio Lemos Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue periférico, durante o período da pesquisa. É

garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202, Setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

- IX. Está garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa o paciente não será penalizado de forma alguma, sem qualquer prejuízo, e será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.
- X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.
- XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

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

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do participante

___/___/___
Data

Assinatura da testemunha

___/___/___
Data

Assinatura do responsável pelo estudo

__/__/_____
Data

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA (PROPE)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Farmacogenética: Resposta dos polimorfismos dos genes *ApoE*, *CYPs*, *eNos*, *GSTs*, *HMGCR*, *p53*, receptor de estrógeno e *SCAP* em pacientes dislipidêmicos ao tratamento com estatinas.**

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

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

- I. O paciente que estará sob consulta e com o diagnóstico de dislipidemia (presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue) será contatado e informado da pesquisa. Caso aceite deverá assinar o TCLE e caso se recuse ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.
- II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para diferentes polimorfismos (variações genéticas) que podem estar relacionados com alterações sanguíneas.
- III. São objetivos da pesquisa a detecção de polimorfismos dos genes (variações genéticas) criando um painel de variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver essa doença.

- XII. As amostras de sangue periférico coletadas serão analisadas para verificar a presença destes polimorfismos. Os critérios de inclusão são pacientes diagnosticados com dislipidemia e em tratamento medicamentoso com estatina e que aceitem responder à entrevista e assinem o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo). Os de exclusão são os pacientes que não aceitem participar da pesquisa.
- IV. Visto que a coleta de sangue é um procedimento simples e realizado em local apropriado, não verificamos a possibilidade de grandes riscos ao participante da pesquisa. Caso ocorra algum imprevisto o paciente será encaminhado a uma das unidades da rede formada para estudo destas alterações (Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas) localizado no Núcleo de Pesquisas Replicon/PUC Goiás situado na Rua 235, nº 40, Setor Universitário, Goiânia-Goiás, CEP: 74-605010 Térreo do bloco L - Área IV (antigo prédio da Polícia Federal), conforme acordo firmado com as instituições. O risco durante essa coleta é mínimo e está relacionado a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxado. Caso ocorra alguma complicação o próprio serviço de referência se coloca à disposição pelo acompanhamento e tratamento.
- V. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para algum polimorfismo, você será informado pelo médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com dislipidemia. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.
- VI. O material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa. Desde que autorizado pelo presente, os testes e os resultados podem ser utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames será descartado.
- VII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fábio Lemos Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue periférico, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202, Setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

- VIII. Está garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa o paciente não será penalizado de forma alguma, sem qualquer prejuízo, e será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.
- IX. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.
- X. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

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

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do participante

___/___/___

Data

Assinatura da testemunha

___/___/___

Data

Assinatura do responsável pelo estudo

___/___/___

Data

8.2. QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO – PROJETO DE PESQUISA POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGENESE PRIMÁRIA

Nº PRONTUÁRIO:_____INICIAIS-_____Nº TUBO_____

NOME: _____

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

SEXO: ()M ; ()F

COR DA PELE: _____(Branco, negro ou pardo)

FILHOS: () SIM () NÃO.

QUANTOS: HOMENS (____) MULHERES(____)

ABORTO:_____QTOS_____

NATURALIDADE:_____

RESIDE EM:_____

TELEFONE: _____ TEL. CONTATO:_____

PROFISSÃO_____

1. ATUALMENTE FUMA: () SIM () NÃO

QUANTO TEMPO: () MAIS 10 ANOS () MENOS 10 ANOS INICIOU COM_____ANOS

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

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

3. BEBE () SIM () NÃO FREQUÊNCIA_____

VINHO () CERVEJA () CACHAÇA() OUTROS_____

1 COPO() 2-3 COPOS() 3 OU + COPOS ()

DIAGNÓSTICO:_____

INICIO DOS SINTOMAS AOS:_____

ANOS SINTOMAS:_____

DATA DO DIAGNÓSTICO:_____

INÍCIO DO TRATAMENTO_____

TRATAMENTO CLÍNICO: SIM() NÃO()

CO-MORBIDADES: HAS () DM () DISLIPIDEMIA ()

HIPERHOMOCISTEINEMIA() IRC () DIALÍTICO (____)

D. ISQ. CORONARIANA () IAM()____/____ AVE()____/____
 OUTRAS:_____

MEDICAMENTOS EM USO:_____

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

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

COMPLICAÇÕES?_____

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

FAZ USO DE CLOPIDOGREL? SIM () DOSE:____MG NÃO ().

POR QUANTO TEMPO?____ PAROU? () QUANTO TEMPO?____ INÍCIO
 ANTES DE INTERVENÇÃO () APÓS INTERVENÇÃO ()

OBSERVAÇÕES:

8.3. APROVAÇÃO DO PROJETO JUNTO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PUC GOIÁS

The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' web interface. The top navigation bar includes the 'Saúde' logo and the 'Plataforma Brasil' logo. Below the navigation bar, there are tabs for 'Pública', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The user is logged in as 'Luiz Carlos Ribeiro da Costa - Pesquisador | V5.8'. The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains the following information:

- Título da Pesquisa:** Análise de polimorfismos genéticos em aterosclerose
- Pesquisador Responsável:** KATIA KARINA VEROLLA DE OLIVEIRA MOURA
- Área Temática:** Versão: 6
- CAAE:** 35321614.3.0005.0007
- Submetido em:** 09/26/2015
- Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás
- Situação da Versão do Projeto:** Aprovado
- Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável
- Patrocinador Principal:** Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás

On the right side of the form, there is a circular stamp that reads 'COORDENADOR'. At the bottom right, there is a 'Comprovante de Recepção' (Receipt Confirmation) button and a file icon labeled 'PB_COMPROMISSO_RECEPCAO_349145'.