



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE DA REDE PRO CENTRO-OESTE

INFLUÊNCIA DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE CYP2C19 NA
ATEROSCLEROSE

IASMIM RIBEIRO DA COSTA

Goiânia-GO
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO 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 nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese


2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Iasmim Ribeiro da Costa

Título do trabalho: INFLUÊNCIA DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE *CYP2C19* NA ATEROSCLEROSE

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹



Iasmim Ribeiro da Costa

Ciente e de acordo:



Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Data: 06 / 10 / 2019

IASMIM RIBEIRO DA COSTA

INFLUÊNCIA DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE CYP2C19 NA ATEROSCLEROSE

Orientadora:

Prof^a Dr^a. Kátia Karina Verolli de O. Moura

Defesa apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biodiversidade.

Goiânia-GO
2019

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

Costa, Iasmim Ribeiro da
INFLUÊNCIA DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE CYP2C19 NA
ATEROSCLEROSE [manuscrito] / Iasmim Ribeiro da Costa. - 2019.
74 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Aterosclerose. 2. CYP2C19. 3. Clopidogrel. 4. Polimorfismo. 5.
Reestenose. I. Moura, Kátia Karina Verolli de Oliveira, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE
Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362
email: pgbb.goias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DE IASMIM RIBEIRO DA COSTA - Aos quatro dias do mês de setembro do ano de 2019 (04/09/2019), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. KÁTIA KARINA VEROLLI DE OLIVEIRA MOURA, APARECIDO DIVINO DA CRUZ, SÉRGIO HENRIQUE NASCENTE COSTA, PAULO ROBERTO DE MELO REIS e RITA DE CÁSSIA PEREIRA DA COSTA E SILVA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada na ÁREA IV DA PUC-GOIÁS SALA DO MESTRADO DE GENÉTICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS CYP2C19 NA ATEROSCLEROSE E NA REESTENOSE"**, em nível de DOUTORADO, área de concentração em BIOTECNOLOGIA, de autoria de IASMIM RIBEIRO DA COSTA, 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. KÁTIA KARINA VEROLLI 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 a 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

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz
Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva

Aprovada / Reprovada

APROVADA
APROVADA
APROVADA
REPROVADA
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 16 h 50 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 e por mim em duas vias de igual teor.
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Influência de variantes polimórficas de CYP2C19 na aterosclerose.

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura (PUC/GO)

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz (PUC/GO)

Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa (UFGO)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis (PUC/GO)

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva (UFGO)

Secretário da Pós-Graduação:

AGRADECIMENTOS

À melhor orientadora que alguém poderia ter, Prof^a Dr^a. Kátia Karina Verolli de O. Moura, alguém que eu me espelho e admiro muito. Sempre estive ao meu lado, me apoiando tanto nos momentos fáceis, quanto nos momentos difíceis dessa jornada.

À minha família:

Meu filho, Felipe, que torna cada dia da minha vida mais feliz. Que muitas vezes precisou ir comigo nas orientações. Compreendeu que nem sempre eu podia brincar, devido as obrigações do doutorado.

Meus pais, Vera e Luís, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas. Sem eles nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Cristal e Tadeu, meu cunhado Danniell, minha sobrinha Serena, meus avós Toinha e Cegy, presentes entre nós, Edith e Ruruco, que infelizmente não estão mais conosco e primos por tornarem esse momento mais leve.

Ao Brunno, Jane e Celso que estavam sempre dispostos a me ajudar, enquanto eu concluía meus experimentos e créditos das disciplinas.

Às minhas queridas orientandas de iniciação científica, Bárbara, Ivone e Thais. Sem vocês esse resultado não seria possível.

Aos amigos, aos quais compartilhei as alegrias e angústias do dia a dia.

À todos os colegas do Núcleo de Pesquisa Replicon e do MGene, que estavam sempre dispostos a ajudar.

Às minhas bancas de qualificação e defesa, Profs. Drs. Aparecido da Cruz (Peixoto), Sérgio Nascente, Paulo Roberto, Rita de Cássia e Kleber Santiago, pelas considerações feitas. Elas ajudaram muito na evolução do trabalho.

À PUC-Goiás por incentivar a minha qualificação.

À Rede Pró Centro Oeste e à Universidade Federal de Goiás (UFG), pela colaboração e incentivo financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa de estudo concedida durante o doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
LISTA DE APÊNDICES	xiii
RESUMO E PALAVRAS-CHAVE	xiv
ABSTRACT AND KEYWORDS	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Doenças cardiovasculares e a aterosclerose	20
2.2 Etiopatogenia	21
2.3 Diagnóstico	25
2.4 Tratamento.....	25
2.5 Genes associados à aterosclerose.....	26
2.6 Polimorfismo CYP2C19 e a resposta ao clopidogrel.....	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Amostras.....	30
Cálculo amostral.....	31
4.2 Extração de DNA	32
4.3 Reação em Cadeia de Polimerase – PCR.....	32
4.4 Análise Estatística.....	36
4.5 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	37
5. RESULTADOS	38
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO.....	52
8. BIBLIOGRAFIA	53
APÊNDICE I.....	61
APÊNDICE II	63
APÊNDICE III.....	69
APÊNDICE IV	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. (Ross & Glomset, 1976; Steinberg & Wilztum, 1990; Santos Filho <i>et al.</i> , 2002; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013).....	21
Figura 2: Processo de aterogênese (Robbins <i>et al.</i> , 2016).	23
Figura 3: Evolução da placa aterosclerótica e suas consequências (Robbins <i>et al.</i> , 2016).	24
Figura 4: Localização do gene CYP2C19, estrutura do gene e localização dos polimorfismos citocromo P450 2C (CYP2C) (Department of Health & Human Services, 2017; National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2017 adaptado)	28
Figura 5: Fluxograma das amostras	31
Figura 6: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*2 antes a digestão enzimática.....	34
Figura 7: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*2.	35
Figura 8: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*3 antes a digestão enzimática.....	35
Figura 9: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*3.	36
Figura 10: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da ARMS-PCR para o polimorfismo CYP2C19*17.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Sequências de primers, tempos de ciclagem, enzimas de restrição utilizadas e os fragmentos obtidos após a digestão enzimática	32
Tabela II: Protocolo para a amplificação do polimorfismo CYP2C19*2 para PCR-RFLP.	33
Tabela III: Protocolo para a amplificação do polimorfismo CYP2C19*3 para PCR-RFLP.	33
Tabela IV: Protocolo para a amplificação do polimorfismo CYP2C19*17 para ARMS-PCR.....	34
Tabela V: Caracterização do estilo de vida dos pacientes com e sem a aterosclerose..	38
Tabela VI: Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos CYP2C19*2, *3 e *17 nos grupos com e sem aterosclerose.....	39
Tabela VII: Comparação dos genótipos CYP2C19 nos grupos com e sem aterosclerose.	39
Tabela VIII: Comparação das combinações genotípicas em relação a aterosclerose... 40	
Tabela IX: Resultado da distribuição da frequência alélica dos polimorfismos CYP2C19 e a sua influência no uso de stent.	41
Tabela X: Influência dos genótipos dos polimorfismos CYP2C19 no uso de stent.....	42
Tabela XI: Combinações genotípicas dos polimorfismos CYP2C19 em pacientes com aterosclerose e a sua influência no uso de stent.....	42
Tabela XII: Resultado da comparação da frequência alélica do CYP2C19 com a reestenose em pacientes ateroscleróticos.	43
Tabela XIII: Influência das combinações genotípicas do gene CYP2C19 na reestenose.	44
Tabela XIV: Influência dos fenótipos de metabolização do clopidogrel e o desenvolvimento da reestenose.	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS - Ácido Acetilsalicílico

apo - Apolipoproteínas

ApoA-I - Apolipoproteína A-I

ApoB - Apolipoproteína B

ApoE - Apolipoproteína E

AVC - Acidentes Vasculares Cerebrais

CYP - Citocromo P450

DAC - Doenças Arteriais Coronarianas

DAOP - Doença Arterial Obstrutiva Periférica

DCC - Doença Cardíaca Coronariana

DCV - Doenças Cardiovasculares

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Trifosfato

DP - Desvio Padrão

eNOS - Óxido Nítrico-Sintase Endotelial

EROs - Espécimes Reativas do Oxigênio

EUA - Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration*

GST - Glutathione-S-transferase

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

IDL - Lipoproteínas de Densidade Intermediária

HAPs - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

HDL - Lipoproteínas de Alta Densidade

Ld - Ladder

LDL - Lipoproteínas de Baixa Densidade

LDL-ox - Lipoproteínas de Baixa Densidade Oxidadas

Lp (a) - Lipoproteínas (a)

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de Base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SUS - Sistema Único de Saúde

USG - Ultrassonografia

VLDL - Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

LISTA DE APÊNCICES

Apêndice I: Questionário – Projeto de pesquisa polimorfismos de genes envolvidos no processo de aterogênese primária	61
Apêndice II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	63
Apêndice III: Aprovação do projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUC GOIÁS.	69
Apêndice IV: Artigos publicados durante o período do doutorado.....	70

RESUMO

As enzimas da família citocromo P450 (CYP) são responsáveis pela detoxificação do organismo, além de atuarem na biotransformação de vários medicamentos. Pacientes com aterosclerose, submetidos à procedimentos intervencionistas possuem risco aumentado para a formação de trombos, sendo necessária a utilização de antiagregantes plaquetários. O antiagregante plaquetário clopidogrel é um pró-fármaco que necessita ser ativado pelas enzimas da família CYP. Polimorfismos dessa família, além de estarem relacionados com a aterogênese, podem influenciar na resposta a esse medicamento. Esse estudo teve como objetivo verificar a possível associação dos genótipos CYP2C19 na resposta ao clopidogrel. Foram analisadas 299 amostras de DNA de pacientes com e sem aterosclerose para o polimorfismo CYP2C19*2, *3 e *17 pelas técnicas de ARMS-PCR e PCR-RFLP. Em relação ao processo de aterogênese, foi observado que a presença de dois alelos polimórficos para o *2 ou um alelo para o *3 podem ter influenciado no desenvolvimento da aterosclerose. O alelo 17 funcionou como fator de proteção, mesmo na presença de um *2 ou *3. A combinação de dois alelos *2 mutados e a presença do *3, influenciaram no desenvolvimento da aterosclerose, mesmo quando o *17 estava presente. Ao avaliar os polimorfismos CYP2C19 e sua associação com a progressão da doença, e a necessidade da implantação de *stent*, geraram resultados um pouco contraditórios. Em relação a resposta ao clopidogrel e as combinações dos polimorfismos CYP2C19, foi verificado que o fenótipo metabolizador lento (*1*2/*1*3/*1/*17) foi mais prevalente no grupo de pacientes com reestenose, refletindo a falta de ativação do clopidogrel pela enzima CYP. Apesar de existirem estudos contraditórios em relação a resposta ao clopidogrel em pacientes portadores dos polimorfismos de perda de função para o gene CYP2C19, verificamos que o alelo 2 além de influenciar no processo de aterogênese, também influencia na resposta ao clopidogrel.

PALAVRAS-CHAVE: Aterosclerose; CYP2C19; Clopidogrel; Polimorfismo; Reestenose; *Stent*.

ABSTRACT

The cytochrome P450 (CYP) family enzymes are responsible for detoxification of the organism, as well as acting on the biotransformation of various drugs. Atherosclerosis patients undergoing interventional procedures are at increased risk for thrombus formation, and the use of platelet antiaggregants is required. Clopidogrel antiplatelet is a prodrug that needs to be activated by CYP family enzymes. Polymorphisms of this family, besides being related to atherogenesis, may influence the response to this drug. This study aimed to verify the possible association of CYP2C19 genotypes in response to clopidogrel. Two hundred and ninety-nine DNA samples from patients with and without atherosclerosis for the CYP2C19 * 2, * 3 and * 17 polymorphism were analyzed by ARMS-PCR and PCR-RFLP techniques. Regarding the atherogenesis process, the presence of two polymorphic * 2 alleles or one * 3 allele may have influenced the development of atherosclerosis. Allele 17 functioned as a protective factor, even in the presence of a * 2 or * 3. The combination of two mutated * 2 alleles and the presence of * 3 influenced the development of atherosclerosis, even when * 17 was present. By evaluating CYP2C19 polymorphisms and their association with disease progression, the need for stenting, generated somewhat contradictory results. Regarding response to clopidogrel and combinations of CYP2C19 polymorphisms, we found that the poor metabolizing phenotype (* 1 * 2 / * 1 * 3 / * 1 / * 17) was more prevalent in the restenosis group, reflecting the lack of activation of clopidogrel by the enzyme CYP. Although there are contradictory studies regarding the response to clopidogrel in patients with loss of function polymorphisms for the CYP2C19 gene, we found that allele 2 not only influences the atherogenesis process, but also influences the response to clopidogrel.

KEYWORDS: Atherosclerosis; CYP2C19; Clopidogrel; Polymorphism; Restenosis; Stent.

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é a principal causa de morte no Brasil e no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública. Assim, vários estudos têm sido propostos com o objetivo de se identificar na população os indivíduos com risco elevado de desenvolvê-la, mediante o uso de técnicas moleculares de caracterização estrutural e funcional do genoma. Atualmente, o seu diagnóstico clínico, é realizado a partir de exame físico das artérias do paciente, utilizando métodos não invasivos e invasivos como angiotomografia e cateterismo. Porém, os métodos atualmente disponíveis não apresentam possibilidade de avaliação prognóstica dos pacientes (Corrêa-Camacho; Dias-Melicio; Soares, 2007; Campedelli, 2016; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Os acidentes vasculares cerebrais (AVC) e as doenças cardiovasculares (DCV) levam a vida de 17,7 milhões de pessoas no mundo todos os anos, sendo a principal causa de morte (OPAS/OMS Brasil, 2018). Os AVC são provocados quando placas ateroscleróticas interrompem ou reduzem o fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais, sendo esses problemas provocados principalmente pela aterosclerose. Cerca de 6,0 milhões de pessoas no mundo perdem a vida em consequência dos AVC, correspondendo a terceira causa de morte. Dados levantados pelo Ministério da Saúde, no ano de 2016, revelaram que 188.200 pessoas no Brasil foram internadas para tratamento de AVC, destes a mais de 40.000 foram a óbito (Türkanoglu *et al.*, 2010; Conforto *et al.*, 2013; Ministério da Saúde, 2018). No ano de 2015 foram 36.869 internações por doenças do aparelho circulatório no Estado de Goiás, levando a 2.732 óbitos em pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (SES-GO, 2016). Em Goiânia as mortes por doenças do aparelho circulatório chegaram a 2.228 no ano de 2017 (IBGE, 2017).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, que ocorre pelo acúmulo de lipídios na túnica íntima das artérias de médio e grande calibre. O depósito lipídico juntamente com fatores plaquetários estimulam a proliferação das células musculares desta região. Uma placa composta por células musculares, leucócitos e lipídios é formada e promove o estreitamento da luz arterial, podendo evoluir para fibrose e calcificação da placa depositada (Stedman, 2003; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Indivíduos dislipidêmicos apresentam uma maior predisposição ao processo de aterogênese. A dislipidemia pode ser resultado do aumento isolado das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) (Hipercolesterolemia isolada); aumento isolado dos triglicérides

(Hipertrigliceridemia isolada); aumento do colesterol LDL e dos triglicérides (Hiperlipidemia mista); e pela redução isolada da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) ou em associação ao aumento de LDL ou triglicérides (Colesterol HDL baixo). Isso ocorre porque as LDL ficam retidas nas paredes dos vasos que estão sofrendo o processo inflamatório. As LDL sofrem oxidação promovendo adesão leucocitária nas paredes dos vasos, iniciando, assim, a formação das placas de ateromas, na expressão clínica da cardiopatia isquêmica ou doença arterial obstrutiva periférica (DAOP). Outros fatores de risco para o AVC que devem ser destacados são: fatores genéticos, sexo, idade, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, etilismo, sedentarismo, obesidade, uso de contraceptivos orais e climatério (Santos Filho *et al.*, 2002; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Os seres humanos, assim como todas as espécies de seres vivos, apresentam uma grande variabilidade no seu material genético, sendo responsável pela adaptação e manutenção da espécie e pelo desenvolvimento de algumas patologias. (Ianni, 2004; Barbieri, 2010). Acredita-se que mais de 400 genes podem estar envolvidos no processo aterosclerótico, entre eles podemos destacar os polimorfismos dos genes de *CYP*, *GSTs* (Glutathione-S-transferase), *ApoE* (Apolipoproteína E) e *eNOS* (Óxido Nítrico-Sintase Endotelial) (Marques e Sá, 2011; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013). Alguns desses genes estão associados ao estresse oxidativo, que apresenta um importante papel na aterosclerose. A liberação excessiva de radicais livres induzem a disfunção endotelial e a oxidação do LDL que se liga nas paredes dos vasos (Türkanoglu *et al.*, 2010; Zivkovic *et al.*, 2014).

As enzimas da família citocromo P450 são responsáveis pela detoxificação e atuam como biotransformadores de um grande número de medicamentos. Pode apresentar diferentes níveis de metabolização de drogas, de acordo com a variabilidade genética, psicológica, patológica e ambiental do indivíduo. A subfamília CYP2C metaboliza cerca de 20% das drogas clinicamente utilizadas nas rotinas médicas, como a mefenitoina, omeprazol, propranolol, imipramina e clopidogrel (Miners & Birkett, 1998; Goldstein, 2001; Allabi *et al.*, 2003; Fricke-Galindo *et al.*, 2016).

Vários tipos de polimorfismos no gene CYP2C19 foram identificados, cujas variantes geram enzimas inativas ou altamente responsivas. Os indivíduos portadores dos alelos CYP2C19*2 e *3 são considerados como metabolizadores lentos e os que apresentam o alelo *17, metabolizadores rápidos (De Moraes *et al.*, 1994; Allabi *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2006; Fricke-Galindo *et al.*, 2016). O polimorfismo CYP2C19 está

bastante disseminado nas populações caucasianas e orientais, contudo é pouco encontrada em indivíduos negros (Allabi *et al.*, 2003). Os polimorfismos são variações do genoma encontrados em mais de 1% dos indivíduos de uma população, diferente das mutações que são encontradas em menos de 1% dos indivíduos. As variações polimórficas são herdáveis e estão presentes em todas as células do organismo (Dai *et al.*, 2016; Nussbaum; McInnes; Willard, 2016)

Pacientes com aterosclerose, principalmente os que foram submetidos à procedimentos intervencionistas como angioplastias e/ou implante de *stents* e, portanto possuem risco aumentando para a formação de trombos, utilizam antiagregantes plaquetários como o AAS. Porém, a ativação e agregação das plaquetas ainda pode ocorrer pelas vias independentes do tromboxano A₂, levando, conseqüentemente, à formação de trombina. O clopidogrel, outra classe de antiagregantes plaquetários, é um derivado tienopiridínico, que possui efeito antitrombótico e sinérgico quando combinado com o AAS (Mega *et al.*, 2009; Mega *et al.*, 2011).

O clopidogrel é um pró-fármaco que necessita da ativação do gene CYP para atuar como antiagregante plaquetário (Jia *et al.*, 2013). Os polimorfismos da família CYP, além de estarem relacionados com o desenvolvimento da aterosclerose, podem estar relacionados à resposta ou não ao clopidogrel. Diversos estudos demonstram que presença de pelo menos uma cópia do alelo *2 ou *3 para a CYP2C19 reduz a sua resposta farmacocinética e farmacodinâmica (Mega *et al.*, 2009; Mega *et al.*, 2011; Verschuren *et al.*, 2012).

Estima-se que nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 50 a 100 bilhões de dólares sejam gastos por ano em consequência de doenças arteriais coronarianas (DAC). O uso da biotecnologia poderia reduzir esses gastos, identificando indivíduos ateroscleróticos com polimorfismos genéticos em CYP2C19 que não responderiam ao clopidogrel. Nesta situação, os *stents* medicamentosos seriam os de escolha para o tratamento, ao invés dos não medicamentosos, como é feito rotineiramente pelo SUS e recomendado pelos planos de saúde particulares no Brasil. Prevenir a formação de trombos nos pacientes evitaria a colocação posterior de um novo *stent*, que, em geral, será o medicamentoso, economizando para o sistema e evitando procedimentos invasivos desnecessários subsequentes. Além disso, o manejo adequado de cada situação médica reduziria as consequências deletérias para os pacientes e proporcionaria maior qualidade de vida à população com risco elevado de reincidivas de um AVC (Santos Filho *et al.*, 2002; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). Este estudo tem como objetivo

verificar a possível influência dos genótipos de variantes polimórficas de SNPs CYP2C19 na aterosclerose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças cardiovasculares e a aterosclerose

A aterosclerose é definida como doença inflamatória crônica, que ocorre pelo acúmulo de lipídios na camada mais interna das artérias (túnica íntima) de médio e grande calibre. A aterosclerose acomete as artérias elásticas e musculares, principalmente a aorta e as artérias coronarianas, cerebrais, mesentéricas, renais, ilíacas e femorais. Ao contrário do que muitos acreditam, as lesões ateroscleróticas apresentam crescimento progressivo iniciando nos primeiros anos de vida, tornando-se maiores e mais graves nos indivíduos com o avanço da idade (Ross & Glomset, 1976; Santos Filho *et al.*, 2002; Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016).

Associado ao depósito lipídico, fatores plaquetários estimulam a proliferação das células musculares na região afetada, além da migração de leucócitos para essa região, formando as placas ateromatosas, que provocam o estreitamento da luz arterial, diminuindo ou interrompendo o fluxo sanguíneo. Quando as placas ateroscleróticas interrompem ou reduzem o fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais, podem provocar AVC (Ross & Glomset, 1976; Stedman, 2003; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Embora inúmeros estudos comprovem a correlação entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento de DAC, sabe-se que outros importantes fatores estão associados ao seu desenvolvimento (Figura 1) (Ross & Glomset, 1976; Steinberg & Wilztum, 1990; Santos Filho *et al.*, 2002; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013). Os estudos de associação entre níveis elevados de colesterol plasmático, xantoma e doença cardíaca coronariana (DCC) prematura se iniciou em 1930 com Carl Miller, que revelou a participação potencial de componentes genéticos no desenvolvimento da patologia, que é complexa e heterogênea (DAI *et al.*, 2016).

As DAC ateroscleróticas são a principal causa de morte no Brasil e no mundo. Elas são compostas por um amplo espectro de entidades clínicas como a aterosclerose subclínica assintomática e suas complicações clínicas, que incluem angina de peito, infarto agudo do miocárdio (IAM) e morte súbita cardíaca. Dentre as consequências das DAC, destacam-se os AVC (Türkanoglu *et al.*, 2010; Conforto *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2016).

Nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 1,5 milhões de pessoas sofrem de IAM por ano e quase todos os casos são decorrentes de placas ateroscleróticas nas coronárias. A prevalência é de cerca de 45% entre os indivíduos com idade maior ou igual

a 65 anos (Santos Filho *et al.*, 2002). No Brasil os infartos totalizam 300 mil casos/ano, destes 30% são fatais (Ministério da Saúde, 2017). Em Goiás o IAM é responsável por 30% dos óbitos relacionados às doenças do aparelho circulatório (SES-GO, 2016).

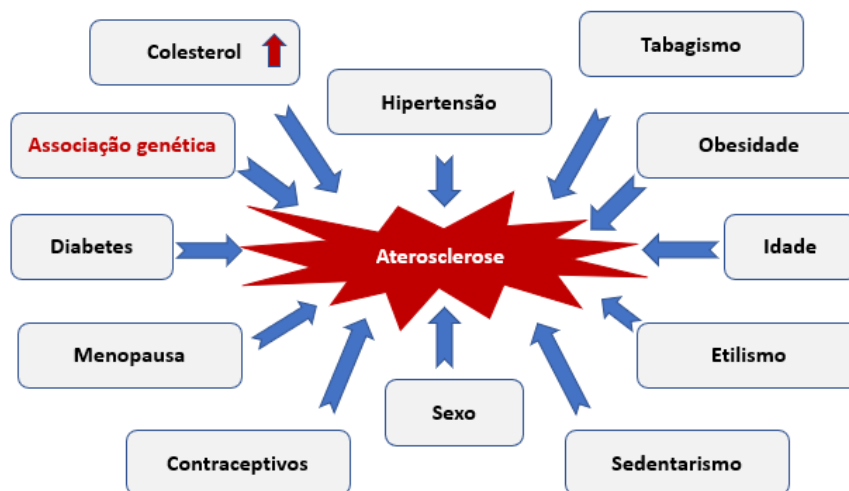


Figura 1: Fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. (Ross & Glomset, 1976; Steinberg & Wilztum, 1990; Santos Filho *et al.*, 2002; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013)

2.2 Etiopatogenia

A etiopatogenia da aterosclerose é bastante complexa e envolve múltiplos fatores. Inicialmente, acreditava-se que o seu desenvolvimento se dava pela perda de células endoteliais da superfície arterial, o que ficou conhecida como a hipótese de lesão endotelial. Com o tempo, verificou-se existência de outros fatores envolvidos no processo, como a agregação plaquetária em resposta à lesão endotelial inicial, as frações lipoproteicas (LDL e VLDL - lipoproteínas de muito baixa densidade), além da exposição das fibras de colágeno presente na matriz conjuntiva e a proliferação de fibras musculares lisas (Steinberg & Wilztum, 1990; Gimbrone Jr & García-Cardena, 2016).

Atualmente, com a mudança dos hábitos de vida, as pessoas estão mais expostas a substâncias químicas como as presentes no cigarro, bebidas alcoólicas e produtos industrializados que favorecem o desenvolvimento da aterosclerose. Os distúrbios hemodinâmicos (hipertensão arterial, turbulência do fluxo, etc.), assim como alguns agentes infecciosos, como a *Chlamydomphila pneumoniae*, também podem ser fatores agressivos ao endotélio e iniciar o processo de aterogênese (Santos Filho *et al.*, 2002; Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017). Além dos fatores citados anteriormente, a correria do dia a dia levam as pessoas a se alimentarem mal, consumindo *fastfood*, tornando-se cada vez mais obesas, sedentárias e estressadas.

No caso das mulheres, ainda existem outros fatores agravantes, que inclui o uso de contraceptivos orais que podem aumentar os níveis plasmáticos de colesterol pela mudança da metabolização das lipoproteínas no climatério (Godsland *et al.*, 1990; Santos Filho *et al.*, 2002; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Os vasos sanguíneos são revestidos internamente por uma camada contínua de células endoteliais. Agressão ao endotélio leva a um desequilíbrio na homeostase do sistema cardiovascular, contribuindo para patogênese da aterosclerose e suas complicações. O endotélio lesionado promove uma maior expressão de moléculas de adesão a leucócitos (responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a íntima) e o aumento do espaço entre as células endoteliais. Esses fatores facilitam a passagem de substâncias (lipoproteínas) entre as células (permeabilidade endotelial) para a região subendotelial, favorecendo a agregação plaquetária. As lipoproteínas aprisionadas no espaço subendotelial sofrem modificações físico-químicas, que levam ao recrutamento de monócitos do sangue para íntima, onde se diferenciam em macrófagos (Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016; Gimbrone Jr & García-Cardena, 2016; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

As lipoproteínas são compostas por lipídeos e proteínas (Apolipoproteínas – apo), essa associação permite a solubilização e transporte dos lipídeos. As lipoproteínas são divididas em 4 classes: os quilomícrons e as VLDL (ricas em triglicérides), e as LDL e HDL (ricas em colesterol). Existem ainda as Lipoproteínas de Densidade Intermediária (IDL) e as Lipoproteínas (a) - Lp (a). Embora a função fisiológica das Lp (a) não seja conhecida, sabe-se que existe uma associação com a formação da placa aterosclerótica e sua progressão. A Apolipoproteína A-I (ApoA-I) é a principal apoproteína da HDL, onde uma partícula de HDL pode transportar várias moléculas de ApoA-I. A Apolipoproteína B (ApoB) é encontrada associada às lipoproteínas aterogênicas (VLDL, IDL, LDL e Lp (a)), na proporção de uma molécula de ApoB para cada molécula de lipoproteína. A Lp (a) é composta por uma partícula de LDL com uma Apo adicional, a Apo (a), ligada à ApoB (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

As LDL e as VLDL possuem lipídios envolvidos na aterogênese, cujo depósito dessas lipoproteínas é proporcional a sua concentração no plasma. A VLDL, juntamente com os quilomícrons remanescentes, são rapidamente removidos do plasma por lipases ou são convertidos em LDL para não se acumularem. Porém, dietas ricas em lipídios ou pacientes com disbetalipoproteinemia apresentam dificuldade na remoção do VLDL, favorecendo seu acúmulo no plasma. Contudo em relação ao LDL, verifica-se uma

associação entre a aterogênese e a presença de uma hipercolesterolemia familiar, causada por um defeito no gene que codifica o receptor desta lipoproteína, elevando seus níveis plasmáticos (Steinberg & Wiltum, 1990; Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

As LDL retidas na íntima são oxidadas (LDL-ox) pelos radicais livres, passando a expor vários neoepítomos tornando-se imunogênica. Além disso, as moléculas de LDL-ox são citotóxicas e lesionam o endotélio, que passa expressar e produzir moléculas que recrutam e promovem adesão leucocitária em sua superfície (Corrêa-Camacho; Dias-Melicio; Soares, 2007). Conseqüentemente, monócitos e linfócitos são atraídos para a região da lesão e migram para a camada íntima. Os monócitos são transformados em macrófagos, que, juntamente com as fibras musculares lisas, iniciam a fagocitose das LDL-ox. Os macrófagos repletos de lipídeos constituem as células espumosas, que amplificam o processo inflamatório por liberarem citocinas, enzimas proteolíticas e fatores de crescimento. Neste contexto, amplia-se o dano tecidual e inicia-se a formação da placa ateromatosa. As lesões se iniciam como estrias lipídicas, resultado da presença de células espumosas na camada íntima, dando aspecto de manchas lineares amareladas nessa região (Figura 2) (Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016; Gimbrone Jr & García-Cardeña, 2016; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

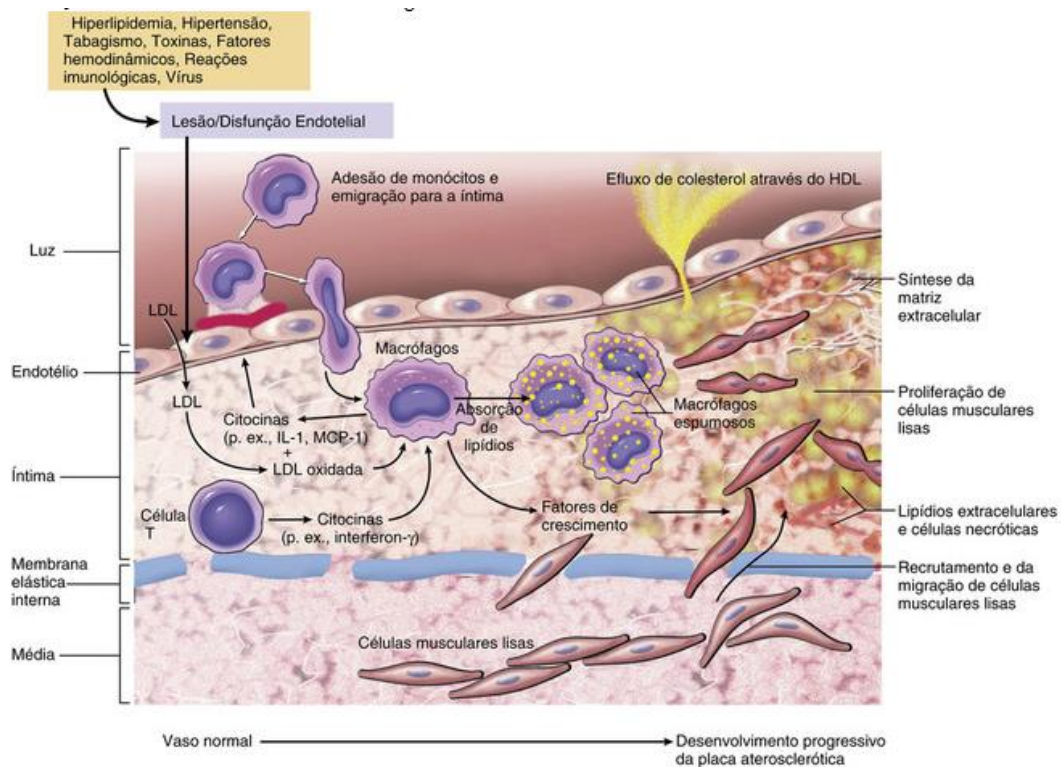


Figura 2: Processo de aterogênese (Robbins *et al.*, 2016).

Caso as lesões ateromatosas continuem a progredir, serão formadas as placas ateromatosas ou ateromas. Essas lesões apresentam tamanhos e formas variadas, fazem saliência na luz do vaso e apresentam cor branco-amarelada. As placas contém macrófagos, fibras musculares, fibroblastos, fibras colágenas, elásticas e lipídios (colesterol) que podem estar dentro ou fora dos macrófagos. As células musculares começam a se proliferar sintetizando matriz extracelular que forma uma placa fibromuscular abaixo do endotélio. À medida que a lesão progride, ocorre o seu remodelamento resultando na formação de uma capa fibrosa envolvendo um núcleo necrótico rico em lipídeos, cristais de colesterol, células integras e restos celulares, podendo levar a calcificação dessa placa. Ao seu redor ocorre angiogênese para manutenção e nutrição do tecido lesionado (Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016; Gimbrone Jr & García-Cardena, 2016).

As placas ateromatosas que apresentam predomínio de lipídeos são denominadas placas moles ou instáveis. Essas placas ricas em lipídeos apresentam um caráter pró-inflamatório que contribui sua instabilidade devido às modificações proteolíticas dos componentes da matriz extracelular. A instabilidade da placa pode resultar na sua ruptura e liberação do conteúdo no lúmen, desencadeando uma oclusão aterotrombótica. Com o tempo, as lesões podem de modificar e causar complicações como aneurisma, hemorragia, trombose, estenose e calcificação. Aquelas com predomínio de componentes fibrosos, poucas células lipídicas e inflamatórias são chamadas de duras ou estáveis. As placas estáveis podem invadir o lúmen do vaso causando isquemia local. (Figura 3) (Brasileiro Filho & Bogliolo, 2016; Gimbrone Jr & García-Cardena, 2016; Robbins *et al.*, 2016).

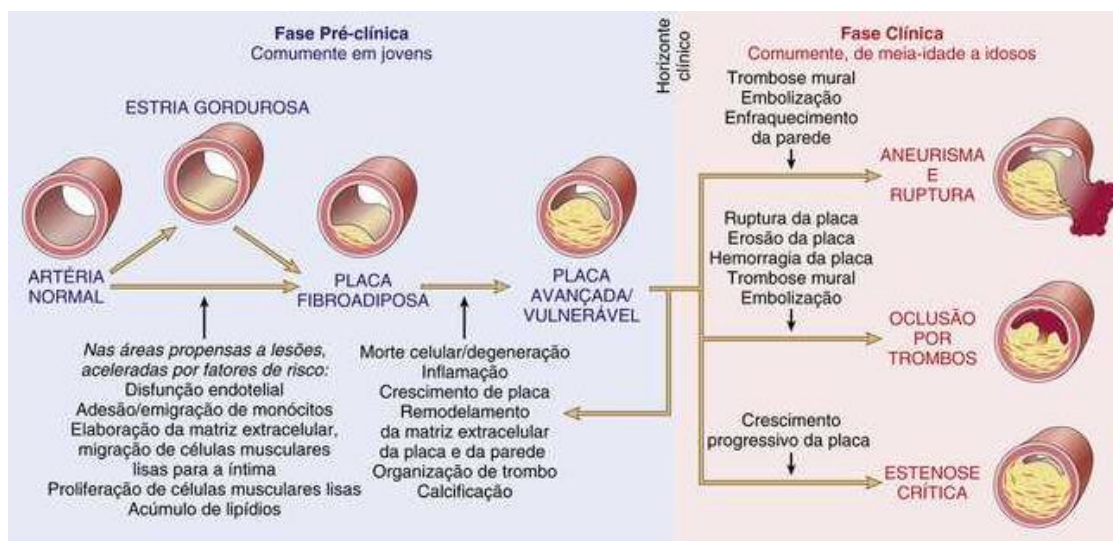


Figura 3: Evolução da placa aterosclerótica e suas consequências (Robbins *et al.*, 2016).

2.3 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico da aterosclerose é feito a partir da avaliação clínica do paciente, associada aos resultados de exames laboratoriais e de imagem. As dosagens do perfil lipídico (triglicérides, colesterol total e suas frações), de apolipoproteínas, de glicemia e da proteína C reativa ultrasensível auxiliam no diagnóstico da patologia, uma vez que seus níveis encontram-se normalmente alterados nesses pacientes (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

Os exames de imagem têm como função realizar o estudo das artérias do paciente. Dentre esses exames existem técnicas não invasivas, como a ultrassonografia (USG) vascular utilizado na análise das artérias periféricas. A angiotomografia e o cateterismo são técnicas invasivas que podem ser utilizadas tanto para análise de artérias periféricas como de artérias centrais (coronárias e cerebrais) (Campedelli, 2016).

Exames moleculares ainda não são utilizados rotineiramente para identificar indivíduos que apresentam alto risco de desenvolver aterosclerose, uma vez que os resultados dos estudos desta natureza ainda não são abundantes e há contradições nas conclusões. As técnicas moleculares poderiam ainda auxiliar na escolha do medicamento mais adequado para o paciente (Corrêa-Camacho; Dias-Melicio; Soares, 2007; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017).

2.4 Tratamento

Uma das principais formas de tratamento da doença aterosclerótica é a angioplastia, quando *stents* são implantados na região obstruída pela placa aterosclerótica. Os *stents* são malhas metálicas com formato tubular que exercem força na parede do vaso obstruído dilatando sua luz, permitindo novamente a passagem de sangue na região. A técnica foi realizada pela primeira vez no ano de 1977 por Gruentzig em Zurique (Santos Filho *et al.*, 2002).

Um dos grandes problemas da angioplastia com a colocação de *stent* é a reestenose. Para evitar tal complicação, os pacientes iniciam a terapêutica com dois tipos de antiagregantes plaquetários, o AAS e o clopidogrel, 24hs antes do procedimento. Porém, a resposta farmacodinâmica ao clopidogrel varia significativamente entre os pacientes, fazendo com que indivíduos com doença coronariana pouco responsivos a esta droga aumentem o risco individual de eventos cardiovasculares (Santos Filho *et al.*, 2002; Mega *et al.*, 2009; Collet *et al.*, 2011). O uso de drogas sistêmicas para prevenir as complicações decorrentes da aterosclerose apresentam resultados insatisfatórios e o

procedimento mais eficaz é a colocação de um *stent* farmacológico no local da placa. Os *stents* farmacológicos são recobertos por moléculas altamente lipofílicas, que exercem um efeito imunossupressor ou antiproliferativo sobre as fibras musculares arteriais (Santos Filho *et al.*, 2002; CONITEC-SUS, 2014).

2.5 Genes associados à aterosclerose

Vários estudos comprovam a associação entre os polimorfismos genéticos e o desenvolvimento de várias patologias, como é o caso da aterosclerose. Atualmente mais de 400 genes parecem estar relacionados com a sua gênese, merecendo destaque os polimorfismos de *CYP*, *GSTs*, *ApoE* e *eNOS* (Marques e Sá, 2011; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013; Gimbrone Jr & García-Cardena, 2016).

Os polimorfismos dos genes envolvidos na biotransformação dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) parecem ter uma relação importante no processo de aterogênese, pois auxiliam na adesão de monócitos na parede endotelial. HAPs são compostos tóxicos, mutagênicos e teratogênicos, produzidos pela atividade humana, principalmente em processos industriais. Partículas de HAPs estão presentes no ar, solo e água, tendo como principais portas de entrada do corpo humano a inalação de gases do ambiente e fumaça de tabaco e a ingestão de alimentos contaminados. Para evitar o acúmulo de HAPs no organismo, as enzimas da primeira fase de biotransformação de xenobiótico (citocromo P450 e hidrolase epóxido microsomal) são ativadas, produzindo espécies reativas do oxigênio (EROs). Elas podem ser alteradas quando se ligam ao DNA (Ácido Desoxirribonucleico) formando adutos de DNA (Marinković; Pasalić; Potocki, 2013).

As enzimas da família citocromo P450, em especial a subfamília CYP1A, estão envolvidas na primeira fase da metabolização dos HAPs. Essas enzimas foram descobertas em torno de 1960 e são importantes na monooxigenação de substratos lipofílicos, como os HAP. Grande parte dos estudos relaciona este polimorfismo com uma predisposição humana às DAC (Mansuy, 1998; Marinković; Pasalić; Potocki, 2013).

As enzimas GST, GSTM1 e GSTT1, participam da segunda fase de metabolização dos HAP e auxiliam na prevenção do estresse oxidativo. O principal papel da isoforma M1 é a detoxificação de xenobióticos eletrofílicos, produtos de CYP1A1, e o da isoforma T1 é a conjugação de lípidos oxidados e compostos halogenados. A ação das enzimas GSTs previnem o dano oxidativo e a indução de mutação no DNA. O polimorfismo dos gene GSTs gera diminuição ou ausência da atividade enzimática nos produtos

enzimáticos, contribuindo para o desenvolvimento da inflamação e das desordens degenerativas presentes na aterosclerose (Marinković; Pasalić; Potocki, 2013).

2.6 Polimorfismos do gene CYP2C19 e a resposta ao clopidogrel

O estudo dos polimorfismos do gene CYP2C19 foi recomendado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para se identificar indivíduos metabolizadores lentos. Para esse grupo de pacientes terapias alternativas ou dosagens adequadas do medicamento podem ser estabelecidas. Porém estudos recentes questionam essa recomendação (Katzung & Trevor, 2017).

O gene CYP2C19 localiza-se em 10q23.33 e apresenta altamente polimórfico, com mais de 40 alelos distribuídas nas populações humanas (Figura 4). Do conjunto de alelos descritos para CYP2C19, os que mais influenciam na resposta terapêutica são: o alelo funcional ou selvagem (*1), os não funcionais (*2 e *3) e o que apresenta função aumentada (*17). A partir das combinações desses alelos podemos encontrar indivíduos pouco responsivos aos medicamentos ativados por essa enzima (*2/*2, *2/*3 e *3/*3), como é o caso do clopidogrel. Há ainda indivíduos que apresentam expressão aumentada de CYP2C19, devido a presença do alelo *17 (*1/*17 e *17/*17). Vale ressaltar que a presença do alelo *17 não compensa a ausência de função dos alelos *2 e *3 (Department of Health & Human Services, 2017; Katzung & Trevor, 2017; National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2017).

Essas mutações são causadas por Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP), no qual o alelo CYP2C19*2 ocorre uma substituição de uma guanina por uma adenina (681G>A) provocando troca de aminoácido (Arg144Cis), resultando em defeito de *splicing*. O alelo CYP2C19*3 foi gerado por uma substituição dos aminoácidos Ile359Leu (636G>A), enquanto no CYP2C19*17 a troca de uma citosina por uma timina (806C>T) (Al-Jenoobi *et al.*, 2013; Katzung & Trevor, 2017).

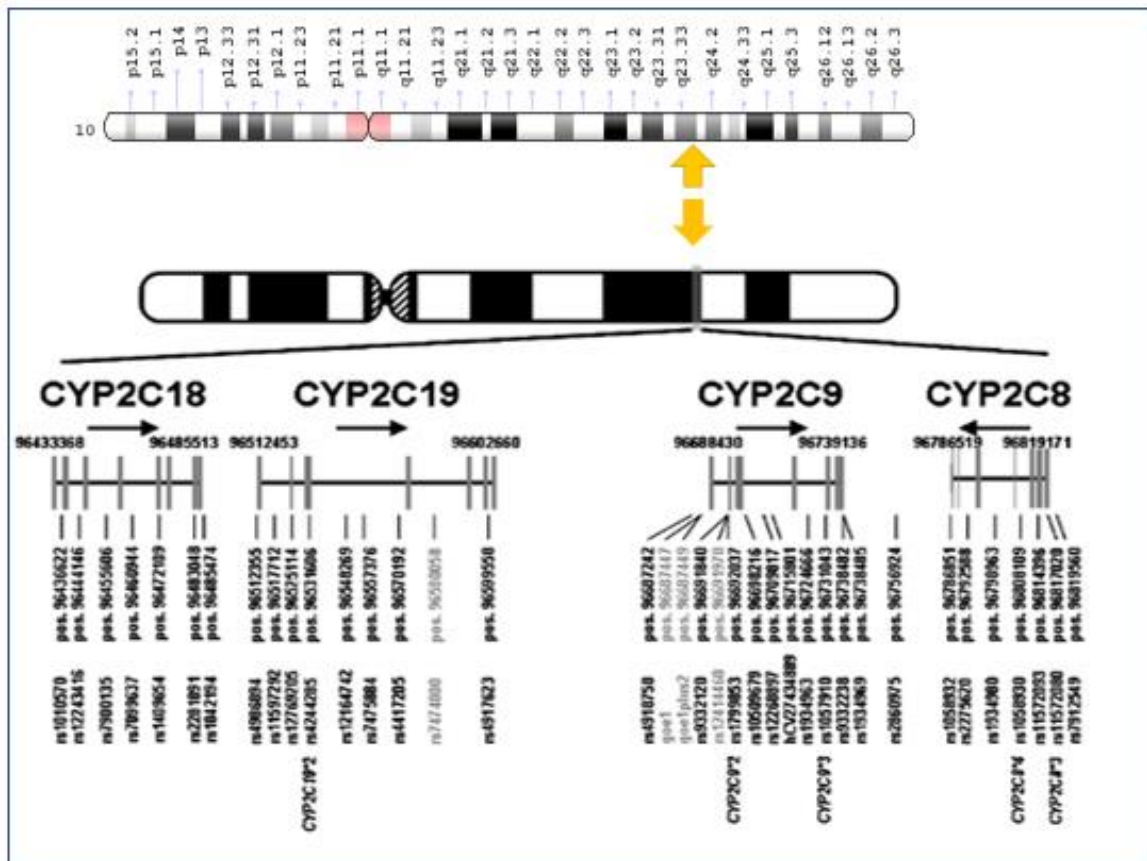


Figura 4: Localização do gene CYP2C19, estrutura do gene e localização dos polimorfismos citocromo P450 2C (CYP2C) (Department of Health & Human Services, 2017; National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2017 adaptado)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a possível influência dos genótipos de variantes polimórficas de SNPs CYP2C19 na aterosclerose.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Verificar a possível influência do sexo, consumo de bebida alcoólica e o tabagismo no desenvolvimento da aterosclerose.
- 3.2.2 Analisar a prevalência do polimorfismo CYP2C19 nos indivíduos com e sem aterosclerose.
- 3.2.3 Comparar os genótipos CYP2C19 nos grupos de pacientes com e sem *stent*.
- 3.2.4 Pesquisar se o polimorfismo do gene CYP2C19 influenciou na resposta ao medicamento clopidogrel em pacientes tratados.
- 3.2.5 Verificar os fenótipos de metabolização do polimorfismo CYP2C19 e sua influência na reestenose pós angioplastia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foi realizado um estudo transversal, onde foram coletadas 299 amostras de pacientes referenciados ao serviço de cardiologia e cirurgia vascular periférica, de Hospitais privados situados no município de Goiânia, que atendem pacientes tanto da rede privada como do SUS, com diagnóstico prévio de doença aterosclerótica baseado em exame clínico e confirmado através de métodos de imagem. Para DAOP e doença carotídea extracraniana foram utilizados Eco color Doppler, angiotomografia e/ou angiografia digital e para DAC utilizados angiotomografia e/ou cineangiocoronariografia. O grupo sem aterosclerose foi composto por amostras de pacientes sem diagnóstico de aterosclerose ou comorbidades.

Os critérios de inclusão foram: pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com ou sem aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos à procedimentos vasculares intervencionistas, que aceitaram responder ao questionário (APÊNCICE I) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE II). Os de exclusão foram: pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitaram participar da pesquisa. Como controle positivo dos testes moleculares foram utilizados DNA de indivíduos com a presença confirmada do polimorfismo CYP.

As amostras foram subdivididas em dois grandes grupos, pacientes com e sem aterosclerose. O grupo com aterosclerose foi dividido em sub grupos para melhor especificação do polimorfismo CYP2C19, de acordo com o uso de *stent* e a presença de reestenose. Os grupos de pacientes sem aterosclerose foi composto por indivíduo que fizeram cirurgias vasculares e não apresentavam processos ateroscleróticos, sem presença de diabetes, hipertensão arterial e sem obstrução das carótidas (Figura 5).

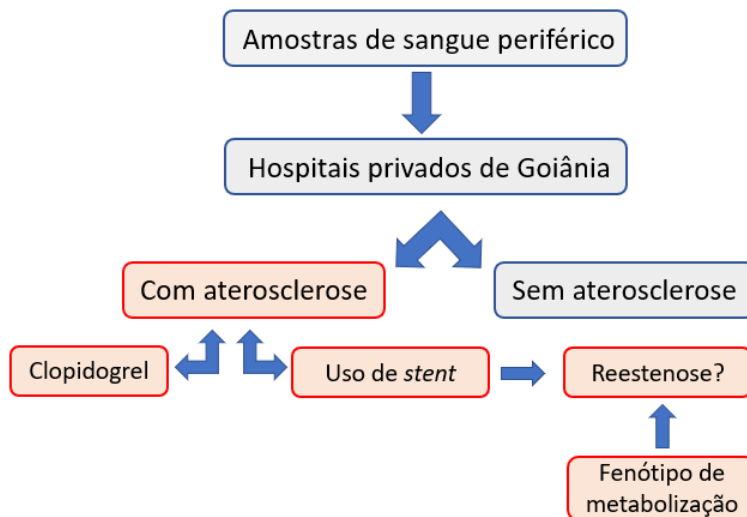


Figura 5: Fluxograma das amostras

Todos os pacientes responderam a um questionário de estilo de vida com idade, sexo, etilismo, tabagismo, doenças relacionadas tais como diabetes e hipertensão. Foram considerados não fumantes indivíduos que nunca tiveram esse hábito ou que pararam de fumar a 15 anos ou mais. Compõem o grupo dos fumantes indivíduos que são usuários de cigarro ou pararam de fumar a menos de 15 anos. Essa classificação está de acordo com o Projeto e Diretrizes da Associação Médica Brasileira (Silva, 2013).

Cálculo amostral

Para calcular o tamanho da amostra de pacientes com aterosclerose foi considerado o número de internações por doenças do aparelho circulatório, que seriam causadas pela aterosclerose no ano de 2014, no estado de Goiás (40.458). E para o grupo de pacientes que não apresentaram aterosclerose foi considerado o número total de internações por outras doenças crônicas não transmissíveis ($N = 51.162$). Para tanto foi utilizado o procedimento clássico descrito por Lwanga e Lemeshow (1991) para se estimar o “n” de acordo com a equação:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot P \cdot (1 - P)}{Z^2 \cdot P \cdot (1 - P) + E^2 \cdot (N - 1)}$$

onde n = amostra calculada; N = população; Z = variável normal padronizada associada ao intervalo de confiança; P = estimativa da proporção na amostra; E = erro amostral. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%, erro amostral de 5% e estimativa da proporção de 90%. Desta forma foi obtido um tamanho amostral de pacientes com e sem aterosclerose de 276.

4.2 Extração de DNA

A partir das amostras coletadas, foram realizadas extrações do DNA utilizando os protocolos do Kit Kaswi® (*Genomic DNA Purification Kit*). Após a extração as amostras foram submetidas a quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus de acordo com as instruções do fabricante, tendo relevância apenas as amostras cujo os resultados da quantificação em relação a concentração de DNA eram superiores a 5ng/μl.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à amplificação, visando à detecção dos polimorfismos do gene CYP2C19. As amostras foram submetidas a testes moleculares (ARMS-PCR e PCR- RFLP), no Laboratório do Núcleo de Pesquisa Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, para verificar presença dos polimorfismos do gene CYP2C19*2, *3 e *17. A tabela I apresenta as sequências de primers, ciclagens, enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos utilizados nas reações de ARMS-PCR e na PCR-RFLP.

Tabela I – Sequências de primers, tempos de ciclagem, enzimas de restrição utilizadas e os fragmentos obtidos após a digestão enzimática

Alelo	Primers	PCR	Enz. de restrição	Fragmento de DNA
*2 FP	5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3'	(37 ciclos)	<i>MspI</i>	FA 169
RP	5'-TATCACTTTCCATAAAAGCAAG-3'	94 °C 60''		SH 120,49
		58 °C 30''		HE
		72 °C 30''		169,120,49
				MH 169
*3 FP	5'-AAC ATC AGG ATT GTA AGC AC-3'	(37 ciclos)	<i>BamHI</i>	FA 119
RP	5'-TCA GGG CTT GGT CAA TAT AG-3'	94 °C 60''		SH 93, 26
		58 °C 30''		HE 119, 93,
		72 °C 30''		26
				MH 119
*17 FP	5'-AAG AAG CCT TAG TTT CTC AAG-3'	(35 ciclos)	---	507 bp
RP	5'-AAA CAC CTT TAC CAT TTA ACC C-3'	95°C 30''		507 bp
TSS	TGT CTT CTG TTC TCA AAG TA	60°C 30''		218 bp
CSA	ATTA TCT CTT ACA TCA GAG ATG	72°C 50''		330 bp

FA, Fragmento amplificado; SH, Selvagem Homozigoto; HE, Heterozigoto; MH, Mutante homozigoto; FP, Primer Forward; RP, Primer Reverse; TSS, Primer T specific (sense); CSA, Primer C specific (antisense)

Fonte: *2 (Chaudhry; Kochhar; Kohli, 2009); *3 (Ikebuchi *et al.*, 2003); *17 (Cuisset *et al.*, 2012)

As reações da PCR foram realizadas segundo o protocolo proposto por (Sambrook; Maccallum; Russell, 2001), com um volume final de 25 µl. Utilizando os protocolos especificados nas tabelas II, III e IV. Após realização da amplificação as amostras foram digeridas com as respectivas enzimas de restrição segundo tempo e temperatura indicada na bula.

Tabela II – Protocolo para a amplificação do polimorfismo CYP2C19*2 para PCR-RFLP.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 mM	1,25 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,75 µL de cada = 3,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer *2 FP	0,02 mM	0,5 µL
Primer *2 RP	0,02 mM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	14,95 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

Tabela III – Protocolo para a amplificação do polimorfismo CYP2C19*3 para PCR-RFLP.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 mM	1,25 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,75 µL de cada = 3,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer *3 FP	0,02 mM	0,5 µL
Primer *3 RP	0,02 mM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	14,95 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

Tabela IV – Protocolo para a amplificação do polimorfismo CYP2C19*17 para ARMS-PCR.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 mM	1,25 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,75 µL de cada = 3,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer *17 FP	0,02 mM	0,5 µL
Primer RP	0,02 mM	0,5 µL
Primer TSS	0,024 mM	0,6 µL
Primer CSA	0,024 mM	0,6 µL
H ₂ O Mili Q	---	13,75 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em um campo elétrico de 100 V/cm e corado com brometo de etídio (5mg/mL) sendo visualizado em seguida no fotodocumentador BIORAD (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

A figura 6 e 7 mostram os possíveis genótipos do polimorfismo CYP2C19*2 utilizando o protocolo PCR-RFLP, antes e após a digestão enzimática, respectivamente.

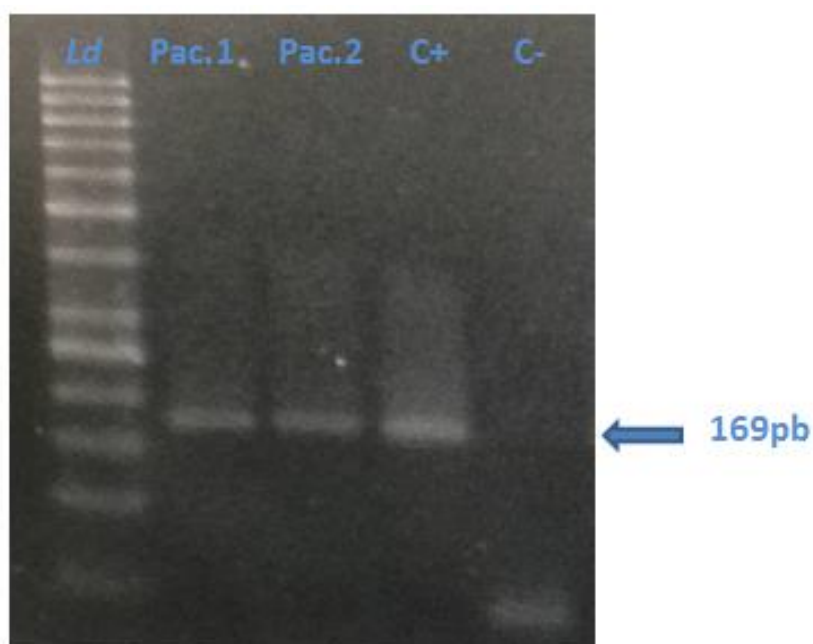


Figura 6 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*2 antes a digestão enzimática. O C+ (controle positivo) e os pacientes apresentaram uma banda de 169pd e o C- (controle negativo) apresentou ausência de banda. A identificação Ld contém o marcador de peso molecular 50-pb DNA ladder (Fermentas).

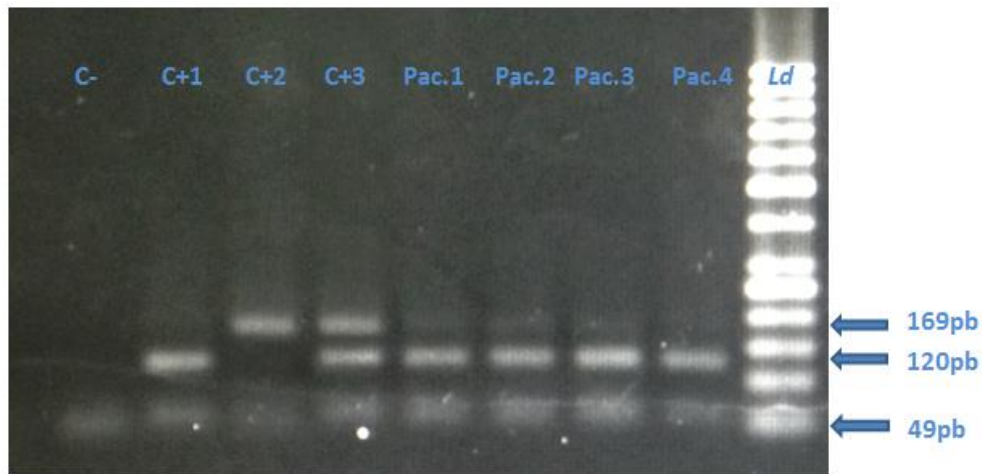


Figura 7 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*2. A identificação *Ld* contém o marcador de peso molecular 50-*pb DNA ladder* (Fermentas). O C- representa o controle negativo e C+1 (*2/*2), C+2 (*1/*1) e C+3 (*1/*2) representam os controles positivos após digestão enzimática.

As figuras 8 e 9 representam os géis contendo genótipos do polimorfismo CYP2C19*3 utilizando o protocolo PCR-RFLP, antes e após a digestão enzimática, respectivamente.

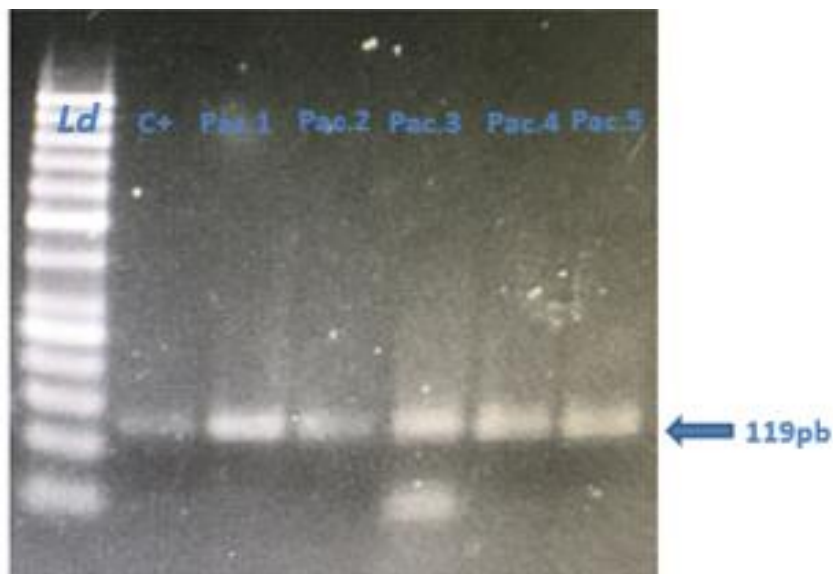


Figura 8 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*3 antes a digestão enzimática. O C+ (controle positivo) e os pacientes apresentaram uma banda de 119pd. A identificação *Ld* contém o marcador de peso molecular 50-*pb DNA ladder* (Fermentas).



Figura 9 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da PCR-RFLP para o polimorfismo CYP2C19*3. A identificação *Ld* contém o marcador de peso molecular 50-pb *DNA ladder* (Fermentas). Os Pac. 1 e 5 apresentaram o genótipo selvagem para o polimorfismo (*1/*1) e os Pac. 2, 3 e 4 o genótipo heterozigoto para o polimorfismo (*1/*3) após digestão enzimática.

O polimorfismo CYP2C19*17 está representado na figura 10, onde observa-se o genótipo heterozigoto (*1/*17) nos Pac. 1, 2 e 3.

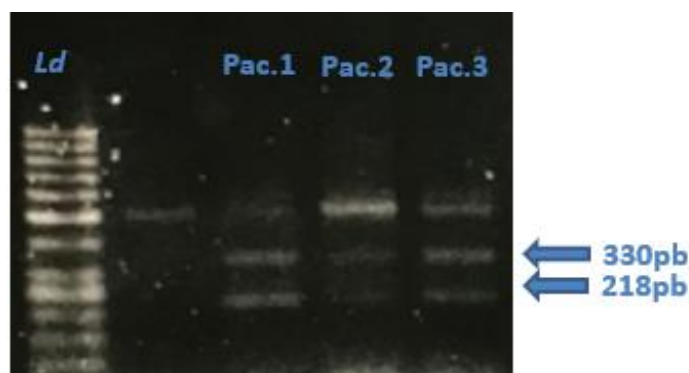


Figura 10 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo produto da ARMS-PCR para o polimorfismo CYP2C19*17. A identificação *Ld* contém o marcador de peso molecular 50-pb *DNA ladder* (Fermentas). Os Pac. 1, 2 e 3 o genótipo heterozigoto para o polimorfismo (*1/*17).

4.4 Análise estatística

Os resultados foram tabulados em planilhas excel, constituindo um banco de dados. A caracterização da idade, sexo, consumo de bebida alcoólica e fumo dos indivíduos com e sem aterosclerose foi feito por meio de média, desvio padrão, frequência absoluta e relativa. A normalidade dos dados foi testada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação da idade entre os grupos foi feita utilizando o teste de Mann-Whitney. A comparação das frequências genotípicas e combinações genotípicas entre os grupos foi realizada utilizando o teste do Qui-quadrado *Posthoc* aplicando-se a correção de Bonferroni a fim e evitar erro tipo I, conforme sugerido por MacDonald &

Gardner, (2000). Na avaliação das frequências alélicas foi realizado o teste do Qui-quadrado de Pearson e *Odds ratio*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS versão 19, utilizando um nível de significância de 5%.

4.5 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Goiás segundo o protocolo nº 35321614.3.0000.0037 (APÊNDICE III)

5. RESULTADOS

Dentre os pacientes estudados verificou-se que o grupo de indivíduos sem aterosclerose apresentou idade média de 50,36 anos com desvio padrão (DP) de $\pm 9,86$ anos, e o grupo controle com idade média de 61,19 anos e desvio padrão de $\pm 9,76$ anos ($p < 0,001$).

A tabela V demonstra a caracterização do estilo de vida dos grupos estudados. Verificou-se que 53,5% (53/99) dos pacientes sem aterosclerose eram do sexo masculino e 54,0% (108/200) dos que tinham aterosclerose eram do sexo feminino ($p = 0,22$).

Ao analisar o consumo de bebidas alcoólicas notou-se uma diferença significativa entre os grupos ($p = 0,01$). Onde 20,2% (20/99) dos pacientes sem aterosclerose consumiam bebidas alcoólicas, enquanto que no grupo com aterosclerose esse hábito era praticado por 9,5% (19/200) dos indivíduos.

Em relação ao tabagismo observou-se que 26,3% (26/99) dos pacientes sem aterosclerose eram tabagistas, enquanto 35,5% (71/200) dos indivíduos com aterosclerose também tinham esse hábito ($p = 0,11$).

Tabela V - Caracterização do estilo de vida dos pacientes com e sem a aterosclerose.

	Aterosclerose n (%)		Total	<i>p</i>
	Não	Sim		
Sexo				
Feminino	46 (46,5)	108 (54,0)	154 (51,5)	0,22*
Masculino	53 (53,5)	92 (46,0)	145 (48,5)	
Consumo bebida alcoólica				
Não	79 (79,8)	181 (90,5)	260 (87,0)	0,01*
Sim	20 (20,2)	19 (9,5)	39 (13,0)	
Fuma				
Não	73 (73,7)	129 (64,5)	202 (67,6)	0,11*
Sim	26 (26,3)	71 (35,5)	97 (32,4)	

*Qui-quadrado de Pearson; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

Realizando a distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene CYP2C19 notou-se que 56,3% (225/400) dos pacientes com aterosclerose apresentavam o alelo 2, 44,1% (119/270) o alelo 3 e 36,8% (147/400) o alelo 17. Não sendo estas diferenças significativas (tabela VI).

Tabela VI - Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos CYP2C19*2, *3 e *17 nos grupos com e sem aterosclerose.

	Aterosclerose n (%)		OR (IC-95%)	p*
	Não	Sim		
CYP2C19*2				
*1	101 (51,0)	175 (43,7)	1,74 (0,53-1,05)	0,09
*2	97 (49,0)	225 (56,3)		
CYP2C19*3				
*1	49 (53,3)	151 (55,9)	1,11 (0,69-1,79)	0,65
*3	43 (46,7)	119 (44,1)		
CYP2C19*17				
*1	116 (58,6)	253 (63,2)	1,21 (0,85-1,72)	0,26
*17	82 (41,4)	147 (36,8)		

*Qui-quadrado de Pearson; OR = *odds ratio*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

Ao comparar os genótipos CYP2C19 notou-se que 38,0% (76/200) dos pacientes com aterosclerose apresentavam dois alelos polimórficos para o *2 ($p=0,03$). No *3 foi observado que 79,3% (107/200) dos pacientes com aterosclerose tinham um alelo polimórfico ($p=0,03$) e 4,4% (6/200) dois alelos polimórficos ($p=0,01$). Em relação ao *17 notou-se que 74,8% (74/99) dos indivíduos sem essa patologia apresentavam pelo menos um alelo polimórfico ($p=0,03$), sendo essas diferenças significativas (tabela VII).

Tabela VII - Comparação dos genótipos CYP2C19 nos grupos com e sem aterosclerose.

	Aterosclerose n (%)		Total	p*
	Não	Sim		
CYP2C19*2				
*1/*1	27 (27,3)	51 (25,5)	78 (26,1)	0,74
*1/*2	47 (47,5)	73 (36,5)	120 (40,1)	0,07
*2/*2	25 (25,2)	76 (38,0)	101 (33,8)	0,03
CYP2C19*3				
*1/*1	10 (21,7)	22 (16,3)	32 (17,7)	0,40
*1/*3	29 (63,1)	107 (79,3)	136 (75,1)	0,03
*3/*3	7 (15,2)	6 (4,4)	13 (7,2)	0,01
CYP2C19*17				
1/*1*	21 (21,2)	64 (32,0)	85 (28,4)	0,05
*1/*17	74 (74,8)	125 (62,5)	199 (66,6)	0,03
*17/*17	4 (4,0)	11 (5,5)	15 (5,0)	0,59

*Qui-quadrado *Posthoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

A tabela VIII mostra as combinações genóticas dos polimorfismos do gene CYP2C19 e a sua relação com o desenvolvimento da aterosclerose. Na combinação dos alelos 2 e 17 foi observado que 39,4% (39/99) dos indivíduos sem aterosclerose apresentavam o genótipo *1*2/*1*17 ($p<0,001$) e a presença de dois alelos polimórficos para o *2 foi observado em 15,0% (30/200) dos pacientes com aterosclerose ($p=0,03$).

Ao combinar o alelo 2 e 3 verificou-se que 40,1% (54/135) dos pacientes com aterosclerose apresentavam os dois alelos polimórficos para o *2 e um alelo polimórfico para o *3 ($p < 0,001$).

Em relação aos três polimorfismos (*2, *3 e *17) analisados notou-se que a combinação *2*2/*1*3/*1*1 estava presente em 17,1% (23/135) dos pacientes com aterosclerose ($p = 0,01$) e a combinação *2*2/*1*3/*1*17 em 20,1% (27/135) desses pacientes ($p = 0,01$). No grupo sem aterosclerose foi verificada uma maior prevalência da combinação *1*2/*1*3/*1*17, presente em 32,6% (15/46) desses indivíduos ($p = 0,01$).

Tabela VIII - Comparação das combinações genótípicas em relação a aterosclerose.

	Aterosclerose n (%)		Total	p*
	Não	Sim		
<i>CYP2C19*2/CYP2C19*17</i>				
MR (*1*1/*1*1)	8 (8,1)	11 (5,5)	19 (6,4)	0,39
MI (*1*2/*1*1)	7 (7,1)	23 (11,5)	30 (10,0)	0,23
MI (*1*2/*1*17)	39 (39,4)	43 (21,5)	82 (27,5)	<0,001
MI (*1*2/*17*17)	1 (1,0)	7 (3,5)	8 (2,7)	0,21
ML (*2*2/*1*1)	6 (6,1)	30 (15,0)	36 (12,0)	0,03
ML (*2*2/*1*17)	17 (17,1)	42 (21,0)	59 (19,7)	0,43
ML (*2*2/*17*17)	2 (2,0)	4 (2,0)	6 (2,0)	0,99
MU (*1*1/*1*17)	18 (18,2)	40 (20,0)	58 (19,4)	0,71
MU (*1*1*17*17)	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (0,3)	0,15
<i>CYP2C19*2/CYP2C19*3</i>				
MR (*1*1/*1*1*)	4 (8,7)	12 (8,9)	16 (8,8)	0,97
MI (*1*1/*1*3)	8 (17,4)	20 (14,8)	28 (15,4)	0,68
MI (*1*2/*1*1)	5 (10,9)	6 (4,4)	11 (6,1)	0,12
ML (*1*1/*3*3)	2 (4,3)	1 (0,7)	3 (1,6)	0,10
ML (*1*2/*1*3)	18 (39,2)	33 (24,4)	51 (28,2)	0,06
ML (*1*2/*3*3)	2 (4,3)	3 (2,2)	5 (2,8)	0,45
ML (*2*2/*1*1)	1 (2,2)	4 (3,0)	5 (2,8)	0,78
ML (*2*2/*1*3)	3 (6,5)	54 (40,1)	57 (31,5)	<0,001
ML (*2*2/*3*3)	3 (6,5)	2 (1,5)	5 (2,8)	0,07
<i>CYP2C19*2/CYP2C19*3/ CYP2C19*17</i>				
MR (*1*1/*1*1/*1*1)	0 (0,0)	1 (0,7)	1 (0,6)	0,56
MI (*1*1/*1*3/*1*1)	4 (8,7)	5 (3,7)	9 (5,0)	0,18
MI (*1*2/*1*1/*1*1)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (0,6)	0,09
MI (*1*1/*1*3/*1*17)	4 (8,7)	15 (11,1)	19 (10,5)	0,64
MI (*1*2/*1*1/*1*17)	4 (8,7)	5 (3,7)	9 (5,0)	0,18
MI (*1*2/*1*1/*17*17)	0 (0,0)	1 (0,7)	1 (0,6)	0,56
ML (*1*1/*3*3/*1*1)	1 (2,2)	1 (0,7)	2 (1,1)	0,42
ML (*1*2/*1*3/*1*1)	2 (4,3)	10 (7,4)	12 (6,6)	0,47
ML (*1*2/*3*3/*1*1)	0 (0,0)	2 (1,5)	2 (1,1)	0,41
ML (*2*2/*1*1/*1*1)	1 (2,2)	1 (0,7)	2 (1,1)	0,42
ML (*2*2/*1*3/*1*1)	1 (2,2)	23 (17,1)	24 (13,2)	0,01
ML (*1*1/*3*3/*1*17)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (0,6)	0,09
ML (*1*2/*1*3/*1*17)	15 (32,6)	21 (15,6)	36 (19,9)	0,01
ML (*1*2/*3*3/*1*17)	2 (4,3)	1 (0,7)	3 (1,6)	0,10
ML (*2*2/*1*1/*1*17)	0 (0,0)	3 (2,2)	3 (1,6)	0,31
ML (*2*2/*1*3/*1*17)	2 (4,3)	27 (20,1)	29 (16,0)	0,01
ML (*2*2/*3*3/*1*17)	2 (4,3)	2 (1,5)	4 (2,2)	0,25

ML (*1*2/*1*3/*17*17)	1 (2,2)	2 (1,5)	3 (1,6)	0,75
ML (*2*2/*1*3/*17*17)	0 (0,0)	4 (3,0)	4 (2,2)	0,24
ML (*2*2/*3*3/*17*17)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (0,6)	0,09
MU (*1*1/*1*1/*1*17)	3 (6,5)	11 (8,1)	14 (7,7)	0,72
MU (*1*1/*1*1/*17*17)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (0,6)	0,09

*Qui-quadrado *Posthoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa; MI = Metabolizador intermediário; ML = Metabolizador lento; MR = Metabolizador rápido; MU = Metabolizador ultrarrápido

Em relação a distribuição da frequência alélica dos polimorfismos do gene CYP2C19 e a sua influência no uso de *stent*, onde 54,6% (59/108) dos pacientes com *stent* apresentam o alelo 2, 37,0% (40/108) o alelo 3 e 36,1% (39/108) o alelo 17. Não sendo estas diferenças significativas (tabela IX).

Tabela IX - Resultado da distribuição da frequência alélica dos polimorfismos CYP2C19 e a sua influência no uso de *stent*.

	Uso de <i>stent</i> n (%)		OR (IC-95%)	p*
	Não	Sim		
CYP2C19*2				
*1	126 (43,2)	49 (45,4)	0,91 (0,58 - 1,41)	0,69
*2	166 (56,8)	59 (54,6)		
CYP2C19*3				
*1	83 (51,2)	68 (63,0)	0,62 (0,37 - 1,01)	0,06
*3	79 (48,8)	40 (37,0)		
CYP2C19*17				
*1	184 (63,0)	69 (63,9)	0,96 (0,60 - 1,52)	0,87
*17	108 (37,0)	39 (36,1)		

*Qui-quadrado de Pearson; OR = *odds ratio*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

Analisando os indivíduos com aterosclerose que possuem *stent*, foi verificado que 37,0% (20/54) apresentavam os dois alelos polimórficos para o *2 ($p=0,86$), 3,7% (2/54) os alelos polimórficos *3 ($p=0,73$) e 5,6% (3/54) os alelos polimórficos *17 ($p=0,98$). Não sendo estas diferenças significativas. A presença dos alelos selvagens para o *3 estava em 7,4% (6/81) dos pacientes ateroscleróticos sem *stent* e 87,7% (71/81) desses pacientes apresentavam um alelo polimórfico para o *3 ($p<0,001$) (tabela X).

Tabela X - Influência dos genótipos dos polimorfismos CYP2C19 no uso de *stent*.

	Uso de <i>stent</i> n (%)		Total	p*
	Não	Sim		
<i>CYP2C19</i> *2				
*1/*1	36 (24,6)	15 (27,8)	51 (25,5)	0,65
*1/*2	54 (37,0)	19 (35,2)	73 (36,5)	0,81
*2/*2	56 (38,4)	20 (37,0)	76 (38,0)	0,86
<i>CYP2C19</i> *3				
*1/*1	6 (7,4)	16 (29,6)	22 (16,3)	<0,001
*1/*3	71 (87,7)	36 (66,7)	107 (79,3)	<0,001
*3/*3	4 (4,9)	2 (3,7)	6 (4,4)	0,73
<i>CYP2C19</i> *17				
1*/1*	46 (31,5)	18 (33,3)	64 (32,0)	0,81
*1/*17	92 (63,0)	33 (61,1)	125 (62,5)	0,81
*17/*17	8 (5,5)	3 (5,6)	11 (5,5)	0,98

*Qui-quadrado *Posthoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

Realizando a combinação dos diferentes genótipos para os polimorfismos CYP2C19 e a sua influencia no uso de *stent*, foi observado que 11,1% (6/54) dos pacientes que tinham *stent* possuíam um alelo polimórfico para o alelo 2 e os dois alelos selvagens para o alelo 3 ($p < 0,001$). Combinando os três alelos observou-se que 9,2% (5/54) dos pacientes com *stent* tinham os genótipos *1*17/*1*2/*1*1 ($p = 0,01$) e 11,1% (6/54) desses pacientes tinham os genótipos *1*17/*2*2/*1*3 ($p = 0,04$), para os alelos 17, 2 e 3 respectivamente (tabela XI).

Tabela XI - Combinações genotípicas dos polimorfismos CYP2C19 em pacientes com aterosclerose e a sua influência no uso de *stent*.

	Uso de <i>stent</i> n (%)		Total	p*
	Não	Sim		
<i>CYP2C19</i> *2/ <i>CYP2C19</i> *17				
MR (*1*1/*1*1)	8 (5,5)	3 (5,5)	11 (5,5)	0,98
MI (*1*2/*1*1)	19 (13,0)	4 (7,4)	23 (11,5)	0,27
MI (*1*2/*1*17)	30 (20,5)	13 (24,1)	43 (21,5)	0,59
MI (*1*2/*17*17)	5 (3,4)	2 (3,7)	7 (3,5)	0,92
ML (*2*2/*1*1)	19 (13,0)	11 (20,4)	30 (15,0)	0,20
ML (*2*2/*1*17)	34 (23,3)	8 (14,8)	42 (21,0)	0,19
ML (*2*2/*17*17)	3 (2,1)	1 (1,9)	4 (2,0)	0,93
MU (*1*1/*1*17)	28 (19,2)	12 (22,2)	40 (20,0)	0,63
<i>CYP2C19</i> *2/ <i>CYP2C19</i> *3				
MR (*1*1/1*1*)	5 (6,2)	7 (13,0)	12 (8,9)	0,17
MI (*1*1/*1*3)	13 (16,0)	7 (13,0)	20 (14,8)	0,62
MI (*1*2/*1*1)	0 (0,0)	6 (11,1)	6 (4,4)	<0,001
ML (*1*1/*3*3)	0 (0,0)	1 (1,8)	1 (0,7)	0,22
ML (*1*2/*1*3)	21 (25,9)	12 (22,2)	33 (24,4)	0,62
ML (*1*2/*3*3)	2 (2,5)	1 (1,8)	3 (2,2)	0,81
ML (*2*2/*1*1)	1 (1,2)	3 (5,6)	4 (3,0)	0,15
ML (*2*2/*1*3)	37 (45,7)	17 (31,5)	54 (40,1)	0,10
ML (*2*2/*3*3)	2 (2,5)	0 (0,0)	2 (1,5)	0,24
<i>CYP2C19</i> *2/ <i>CYP2C19</i> *3/ <i>CYP2C19</i> *17				
MR (*1*1/*1*1/*1*1)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (0,7)	0,22

MI (*1*1/*1*3/*1*1)	4 (4,9)	1 (1,9)	5 (3,7)	0,35
MI (*1*1/*1*3/*1*17)	9 (11,1)	6 (11,1)	15 (11,1)	1,00
MI (*1*2/*1*1/*1*17)	0 (0,0)	5 (9,2)	5 (3,7)	0,01
MI (*1*2/*1*1/*1*17*17)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (0,7)	0,22
ML (*1*1/*3*3/*1*1)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (0,7)	0,22
ML (*1*2/*1*3/*1*1)	7 (8,6)	3 (5,5)	10 (7,4)	0,50
ML (*1*2/*3*3/*1*1)	1 (1,2)	1 (1,9)	2 (1,5)	0,77
ML (*2*2/*1*1/*1*1)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (0,7)	0,22
ML (*2*2/*1*3/*1*1)	13 (16,1)	10 (18,4)	23 (17,1)	0,71
ML (*1*2/*1*3/*1*17)	13 (16,1)	8 (14,7)	21 (15,6)	0,85
ML (*1*2/*3*3/*1*17)	1 (1,2)	0 (0,0)	1 (0,7)	0,41
ML (*2*2/*1*1/*1*17)	1 (1,2)	2 (3,7)	3 (2,2)	0,34
ML (*2*2/*1*3/*1*17)	21 (26,0)	6 (11,1)	27 (20,1)	0,04
ML (*2*2/*3*3/*1*17)	2 (2,5)	0 (0,0)	2 (1,5)	0,24
ML (*1*2/*1*3/*17*17)	1 (1,2)	1 (1,9)	2 (1,5)	0,77
ML (*2*2/*1*3/*17*17)	3 (3,7)	1 (1,9)	4 (3,0)	0,53
MU (*1*1/*1*1/*1*17)	5 (6,2)	6 (11,1)	11 (8,1)	0,30

*Qui-quadrado *Posthoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa; MI = Metabolizador intermediário; ML = Metabolizador lento; MR = Metabolizador rápido; MU = Metabolizador ultrarrápido

Na tabela XII observou-se que 51,9% (28/54) dos pacientes com reestenose apresentavam o alelo 2, 38,9% (21/54) o alelo 3 e 35,2% o alelo17, não sendo estas diferenças significativas.

Tabela XII - Resultado da comparação da frequência alélica do CYP2C19 com a reestenose em pacientes ateroscleróticos.

	Reestenose n (%)		OR (IC-95%)	p*
	Não	Sim		
CYP2C19*2				
*1	23 (42,6)	26 (48,1)	0,80 (0,37 - 1,70)	0,56
*2	31 (57,4)	28 (51,9)		
CYP2C19*3				
*1	35 (64,8)	33 (61,1)	1,17 (0,53 - 2,56)	0,69
*3	19 (35,2)	21 (38,9)		
CYP2C19*17				
*1	34 (63,0)	35 (64,8)	0,92 (0,42 - 2,02)	0,84
*17	20 (37,0)	19 (35,2)		

*Qui-quadrado de Pearson; OR = *odds ratio*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

A tabela XIII mostra a influência dos polimorfismos CYP2C19*2, *3 e *17 no desenvolvimento de reestenose pós angioplastia. Ao analisar os alelos 2 e 17 verificou-se 26,0% (7/27) dos pacientes que não tiveram reestenose apresentavam os alelos selvagens para o *2 e um alelo polimórfico para o *17 ($p=0,51$). Combinando o *2 e *3 notou-se que 33,4% (9/27) dos pacientes que tiveram reestenose apresentavam um alelo polimórfico para cada um desses genes ($p=0,05$). Ao combinar o *2, *3 e *17 foi observado que 26,0% (7/27) dos pacientes com reestenose tinham um alelo polimórfico de cada ($p=0,02$).

Tabela XIII - Influência das combinações genotípicas do gene CYP2C19 na reestenose.

	Reestenose n (%)		Total	p*
	Não	Sim		
<i>CYP2C19*2/CYP2C19*17</i>				
MR (*1*1/*1*1)	1 (3,7)	2 (7,4)	3 (5,5)	0,55
MI (*1*2/*1*1)	2 (7,4)	2 (7,4)	4 (7,4)	1,00
MI (*1*2/*1*17)	4 (14,8)	9 (33,4)	13 (24,1)	0,11
MI (*1*2/*17*17)	1 (3,7)	1 (3,7)	2 (3,7)	1,00
ML (*2*2/*1*1)	6 (22,2)	5 (18,5)	11 (20,4)	0,74
ML (*2*2/*1*17)	5 (18,5)	3 (11,1)	8 (14,8)	0,44
ML (*2*2/*17*17)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (1,9)	0,31
MU (*1*1/*1*17)	7 (26,0)	5 (18,5)	12 (22,2)	0,51
<i>CYP2C19*2/CYP2C19*3</i>				
MR (*1*1/1*1*)	4 (14,8)	3 (11,1)	7 (13,0)	0,69
MI (*1*1/*1*3)	3 (11,1)	4 (14,8)	7 (13,0)	0,69
MI (*1*2/*1*1)	4 (14,8)	2 (7,4)	6 (11,1)	0,39
ML (*1*1/*3*3)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (1,8)	0,31
ML (*1*2/*1*3)	3 (11,1)	9 (33,4)	12 (22,2)	0,05
ML (*1*2/*3*3)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,8)	0,31
ML (*2*2/*1*1)	1 (3,7)	2 (7,4)	3 (5,6)	0,55
ML (*2*2/*1*3)	11 (40,8)	6 (22,2)	17 (31,5)	0,14
<i>CYP2C19*2/CYP2C19*3/ CYP2C19*17</i>				
MR (*1*1/*1*1/*1*1)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,9)	0,31
MI (*1*1/*1*3/*1*1)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,9)	0,31
MI (*1*1/*1*3/*1*17)	3 (11,1)	3 (11,1)	6 (11,1)	1,00
MI (*1*2/*1*1/*1*17)	3 (11,1)	2 (7,4)	5 (9,2)	0,64
MI (*1*2/*1*1/*17*17)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (1,9)	0,31
ML (*1*1/*3*3/*1*1)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (1,9)	0,31
ML (*1*2/*1*3/*1*1)	2 (7,4)	1 (3,7)	3 (5,5)	0,55
ML (*1*2/*3*3/*1*1)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,9)	0,31
ML (*2*2/*1*1/*1*1)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,9)	0,31
ML (*2*2/*1*3/*1*1)	6 (22,3)	4 (14,8)	10 (18,4)	0,48
ML (*1*2/*1*3/*1*17)	1 (3,7)	7 (26,0)	8 (14,7)	0,02
ML (*2*2/*1*1/*1*17)	1 (3,7)	1 (3,7)	2 (3,7)	1,00
ML (*2*2/*1*3/*1*17)	4 (14,8)	2 (7,4)	6 (11,1)	0,39
ML (*1*2/*1*3/*17*17)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,9)	0,31
ML (*2*2/*1*3/*17*17)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (1,9)	0,31
MU (*1*1/*1*1/*1*17)	4 (14,8)	2 (7,4)	6 (11,1)	0,39

*Qui-quadrado *Posthoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa; MI = Metabolizador intermediário; ML = Metabolizador lento; MR = Metabolizador rápido; MU = Metabolizador ultrarrápido

Não foi verificada influência dos fenótipos de metabolização do clopidogrel e o desenvolvimento de reestenose, onde 29,6% (8/27) dos metabolizadores lentos para os alelos 2 e 17 apresentaram reestenose ($p=0,26$). Ao analisar os alelos 2 e 3, e os alelos 2, 3 e 17 observou-se que 66,7% (18/27) dos metabolizadores lentos tiveram reestenose ($p=0,57$) (tabela XIV). Ao analisar a influência do tabagismo, o fenótipo de metabolização do clopidogrel e a presença da reestenose, verificou-se que 64,3% dos pacientes não fumantes e metabolizadores lentos, não desenvolveram reestenose ($p=0,03$).

Tabela XIV - Influência dos fenótipos de metabolização do clopidogrel e o desenvolvimento da reestenose.

	Reestenose n (%)		Total	p*
	Não	Sim		
CYP2C19*2/ CYP2C19*17				
Metabolizador lento	12 (44,5)	8 (29,6)	20 (37,0)	0,26
Metabolizador intermediário	7 (25,9)	12 (44,5)	19 (35,2)	0,15
Metabolizador rápido	1 (3,7)	2 (7,4)	3 (5,6)	0,55
Metabolizador ultrarrápido	7 (25,9)	5 (18,5)	12 (22,2)	0,51
CYP2C19*2/CYP2C19*3				
Metabolizador lento	16 (59,3)	18 (66,7)	34 (63,0)	0,57
Metabolizador intermediário	7 (25,9)	6 (22,2)	13 (24,1)	0,75
Metabolizador rápido	4 (14,8)	3 (11,1)	7 (12,9)	0,69
CYP2C19*2/CYP2C19*3/ CYP2C19*17				
Metabolizador lento	16 (59,3)	18 (66,7)	34 (63,0)	0,57
Metabolizador intermediário	7 (25,9)	6 (22,2)	13 (24,1)	0,75
Metabolizador rápido	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (1,8)	0,31
Metabolizador ultrarrápido	4 (14,8)	2 (7,4)	6 (11,1)	0,39

*Qui-quadrado *Posthoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

6. DISCUSSÃO

Ao contrário do que muitos acreditam o processo de aterogênese pode se iniciar na infância e progredir até a vida adulta, momento em que as manifestações clínicas aparecerão (Hong, 2010). Devido a esse caráter a ELSA-Brasil (*The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health*) realiza pesquisas de coorte em 6 cidades brasileiras, com indivíduos de 35 a 74 anos. Em uma pesquisa sobre as Associações do Tabagismo com Inflamação Subclínica e Aterosclerose incluiu pacientes de 42,8 a 60,6 anos, faixa estaria semelhante ao grupo de pacientes sem aterosclerose da presente pesquisa, onde a idade variou de 40,5 a 60,2 anos (Kianoush *et al.*, 2017).

Embora a aterosclerose apresente um aspecto multifatorial, o sexo do indivíduo pode influenciar no seu desenvolvimento. De um modo geral o sexo masculino é mais susceptível às DCV, isso ocorre pelo estrogênio apresentar um caráter protetor para as mulheres. Após a menopausa, quando os níveis desse hormônio diminuíram nas mulheres o risco passa a ser igual ao do homem (Santos *et al.*, 2011). Devido as mulheres com aterosclerose da pesquisa apresentarem idade superior a 50 anos, não foi encontrada diferença da sua distribuição em relação ao sexo.

Estudos tem buscado verificar a correlação entre o consumo de bebidas alcoólicas e DCV, porém esse assunto é controverso e muito discutido. O presente estudo observou que o consumo de bebidas alcoólicas foi maior no grupo de indivíduos sem aterosclerose, mas para afirmar que o álcool estaria funcionando como fator de proteção para essa patologia seria necessário avaliar o tipo de bebida alcoólica e a sua quantidade.

Em uma publicação recente a Organização Mundial de Saúde (OMS) ressalta que não existe um volume seguro de álcool a ser consumido, uma vez que se trata de uma substância tóxica para o organismo humano (OMS, 2019). Por outro lado estudos realizados por Chiva e colaboradores (2013 e 2015), e por Huang e colaboradores (2017) verificou que seu consumo leve a moderado está associado a um reduzido risco cardiovascular e o consumo excessivo representa um risco elevado. Embora o mecanismo de proteção das DCV e o consumo moderado de álcool seja desconhecido, a principal teoria é sobre seu efeito sobre as lipoproteínas.

Em seu trabalho Huang e colaboradores (2017) compararam 31 artigos sobre o consumo moderado de álcool e a aterosclerose, onde concluíram que seu consumo moderado diminuíram os níveis de LDL, interleucina 6 e fibrinogênio e aumentou os níveis

de HDL e ApoA-I. Sugerindo bebidas alcoólicas ingeridas moderadamente estejam associadas a diminuição do risco de aterosclerose.

Chiva e colaboradores (2013) em um estudo randomizado comparou três grupos. Um grupo de indivíduos que ingeriram vinho tinto por 4 semanas, outro grupo vinho sem álcool e outro gin pelo mesmo período. Nesse trabalho eles verificaram que a fração não alcoólica do vinho tinto apresentou um efeito benéfico na resistência à insulina e que o vinho apresentou maiores efeitos protetores às DCV que as bebidas destiladas.

Outro trabalho também realizado por Chiva e colaboradores (2015) estudaram os efeitos dos componentes não alcoólicos da cerveja. Verificou que os compostos fenólicos obtidos da casca da cevada e do lúpulo reduzem as moléculas de adesão leucocitária e os biomarcadores inflamatórios. O álcool influencia no perfil lipídico e reduz os biomarcadores inflamatórios associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Concluindo que ingestão moderada de cerveja alcoólica e não alcoólica conferiram mais efeitos protetores ao sistema cardiovascular do que as bebidas destiladas. Esse resultado provavelmente ocorreu devido ao conteúdo polifenólico das cervejas.

Atualmente o tabaco é responsável por aproximadamente 6,2 milhões de mortes no mundo e 200 mil no Brasil (Kianoush *et al.*, 2017). De acordo com a OMS o tabagismo é responsável por 10% dos casos de DCV. As substâncias químicas presentes no cigarro agredem as células endoteliais promovendo a diminuição da disponibilidade de óxido nítrico e o aumento das moléculas de adesão, favorecendo o processo de aterogênese. (Messner & Bernhard, 2014).

Embora não tenha sido significativa a diferença entre os grupos de pacientes fumante e não fumantes com aterosclerose, verificou-se mais fumantes no grupo aterosclerótico. Esses resultados corroboram com outro estudo realizado no Brasil por Kianoush e colaboradores (2017). Nele foi demonstrado que o hábito de fumar, assim como a sua quantidade de cigarros, estão associados aos níveis aumentados de biomarcadores inflamatórios associados ao desenvolvimento da aterosclerose.

A superfamília das enzimas citocromo P450 são responsáveis pela metabolização de substratos endógenos como o estradiol, colesterol, vitamina D e neurotransmissores, e substratos exógenos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e várias drogas. Algumas das substâncias produzidas pela ação das enzimas CYP estão envolvidas no processo de aterogênese, enquanto outras são responsáveis por prevenir ou regredir a aterosclerose (Elfaki *et al.*, 2018).

Devido a distribuição dos polimorfismos da superfamília CYP ser diferente de acordo com as etnias, vários estudos tem o objetivo de identificar a sua prevalência em diferentes populações. Alguns estudos realizados no Brasil buscaram verificar a presença dos polimorfismos CYP2C19 em diferentes regiões e populações (Perini *et al.*, 2009; dos Santos *et al.*, 2011; Vargens *et al.*, 2012; Kohlrausch *et al.*, 2014).

A presente pesquisa verificou que as frequências dos alelos 2, 3 e 17 foram semelhantes entres os grupos de pacientes com e sem aterosclerose, porém maior que os a maioria dos trabalhos supracitados. No ano de 2014, Kohlrausch e colaboradores, realizaram uma pesquisa com brasileiros, da região sul, saudáveis de descendência europeia e africana para verificar a distribuição do CYP2C19*2. Ao final foi observada uma frequência do alelo 2 bastante parecida entre os grupos, assim como a distribuição dos genótipos, comprovando o resultado encontrado na presente pesquisa.

Um trabalho desenvolvido no Paraná no ano de 2012, comparou a população ameríndia Guaraní, com outras populações ameríndias e a brasileira em relação aos polimorfismos CYP2C19. Foi verificada uma frequência do alelo 2 semelhante a um estudo realizado em Guaranis e Tupinikins, e outro com Inuit; e menor que a frequência observada em indígenas nativos do Canadá e da população brasileira. Em relação ao alelo 3 não foi observado em nenhuma população ameríndia. No alelo 17 a frequência foi bem menor que a encontrada nos Guaranis e Tupinikins, e na população brasileira (Vargens *et al.*, 2012).

Dos Santos e colaboradores em 2011, realizaram uma pesquisa bastante abrangente, incluindo 72 cidades de 5 regiões do Brasil. Nela os participantes se auto definiam como descendentes de caucasianos, de africanos ou mulatos, além de populações ameríndias. Ao avaliar os alelos 2 e 17 foi observada uma frequência menor nos ameríndios e uma frequência maior nos descendentes de africanos. Em relação aos genótipos os resultados foram semelhantes, com menor frequência dos polimorfismos nos ameríndios e maior nos descendentes de africanos.

Perini e colaboradores (2009), compararam grupos de indivíduos japoneses, descendentes de primeira geração de japoneses e brasileiros não japoneses para verificar a distribuição dos polimorfismos CYP2C19*2 e *3. Nessa pesquisa ele constatou que as frequências dos alelos 2 e 3 foram semelhantes nos grupos de japoneses e dos descendentes, porém com frequências muito maiores que os brasileiros não descendentes de japoneses. Ao avaliar as combinações genotípicas, os genótipos polimórficos estavam mais presentes nos grupos de japoneses e de descendentes de japoneses, do que na

população brasileira como um todo. Comprovando que essas distribuições variam de acordo com a etnia estudada.

Uma pesquisa desenvolvida na Arábia Saudita com indivíduos saudáveis buscou verificar a prevalência dos alelos 2, 3 e 17 do gene CYP2C19. Verificando uma frequência do alelo 2 bastante inferior aos encontrados nos trabalhos realizados no Brasil. Não encontraram o alelo 3 nos indivíduos estudados. Em relação ao alelo 17 ele estava mais prevalente no trabalho realizado na Arábia Saudita que nos realizados no Brasil (Al-Jenoobi *et al.*, 2013).

Fricke-Galindo e colaboradores (2016) realizou uma grande pesquisa comparando a frequência alélica e os fenótipos de metabolização do CYP2C19 previstos pelo genótipo e medidos posteriormente *in vivo*. Essa pesquisa incluiu indivíduos saudáveis da África, América, Ásia, Europa, Oceania e Oriente Médio, através do levantamento de 138 artigos originais. Sendo encontrados os alelos *2 e *3 mais frequentes em população nativa da Oceania (61,3% e 14,4% respectivamente), seguido do Leste-Asiático (30,3% e 6,9% respectivamente). O alelo 17* foi mais frequente nos Europeus do Sul do Mediterrâneo (42,0%), seguido do Oriente Médio (24,9%). O fenótipo metabolizador lento foi mais frequente entre os Asiáticos em relação aos Europeus, sendo comprovada a entre o fenótipo de metabolização prevista e a medida. Ao final foi observado que a Oceania apresentou uma frequência maior do *2 que o presente trabalho, assim como o alelo 17 foi parecida com o da população de Europeus do Sul do Mediterrâneo.

Em relação aos fenótipos de metabolização, a presente pesquisa mostrou uma distribuição semelhante do perfil metabólico entre o grupo de pacientes com e sem aterosclerose, com maior prevalência de pacientes metabolizadores lentos. Vale ressaltar que o fenótipo *2/*3 estava 6,2 vezes maior no grupo de pacientes com aterosclerose do que no grupo sem aterosclerose. Esse resultado é semelhante ao encontrado em um estudo realizado por Guerra, Flores e Izaguirre (2012) na Venezuela, que verificou uma distribuição dos fenótipos de metabolização parecido em diferentes regiões. Porém diferente do presente estudo o fenótipo metabolizador rápido foi o mais prevalente na Venezuela.

Em relação aos polimorfismos CYP2C19 e o desenvolvimento de DCC, foi verificada uma maior frequência dos dois alelos polimórficos para o *2 em pacientes com aterosclerose, esse resultado corrobora com o estudo realizado por Zhang em colaboradores (2019), na China. Onde 68,8% dos portadores do polimorfismo CYP2C19*2 tinham DCC, sendo essa diferença significativa. Confirmando a influência

desse polimorfismo no desenvolvimento da aterosclerose. Em relação ao *3 os resultados foram conflitantes, no presente estudo foi observado que a presença de um alelo polimórfico para o *3 pode ter influenciado no desenvolvimento da aterosclerose. Na pesquisa realizada por Zhan e colaboradores (2019) esse polimorfismo não influenciou no desenvolvimento da aterosclerose. Em relação ao *17, a presença de um alelo mutado funcionou como fator de proteção contra o desenvolvimento desta patologia. Foi observado também que a presença de um *17 conseguiu suprir a deficiência de um *2 ou *3 funcionando como fator de proteção contra a aterosclerose. A presença dos dois alelos *2 mutados, assim como a presença do *3, influenciaram no desenvolvimento da aterosclerose, mesmo quando o *17 estava presente.

O clopidogrel é um importante antiagregante plaquetário usado em pacientes submetidos a intervenção coronariana percutânea, como a implantação de *stents*. Os polimorfismos CYP2C19 influenciam sua eficácia terapêutica, uma vez que sua ativação depende da ação dessas enzimas (Ruedlinge *et al.*, 2017).

Embora vários estudos, como o realizados por Verschuren e colaboradores (2012), tenham sugerido que a identificação dos polimorfismos CYP2C19, em especial o *2, em pacientes tratados com clopidogrel seja muito importante. Alguns pesquisadores acreditam que essa triagem não seja útil na escolha terapêutica, recomendando que a escolha seja baseada apenas em evidências clínicas (Bhopalwala *et al.*, 2015). Mesmo com essas divergências as Agências Reguladoras (FDA e a Agencia Europeia de Medicamentos) reconhecem o CYP2C19 como biomarcador farmacogenético para 16 drogas. Assim como o Consórcio de Farmacogenética Clínica recomenda a terapêutica do Clopidogrel e da Amitriptilina baseado no genótipo do paciente (Fricke-Galindo *et al.*, 2016).

Na presente pesquisa foi verificada uma maior prevalência do fenótipo metabolizador lento, tanto no grupo de pacientes com reestenose quanto sem reestenose. Esse resultado vai de encontro ao trabalho de Zhan e colaboradores (2019), que além de verificarem a associação dos polimorfismos CYP2C19*2 e *3 no desenvolvimento da aterosclerose, eles verificaram a presença de eventos coronarianos pós angiografia. Sendo observada uma maior frequência desses eventos em pacientes com o polimorfismo CYP2C19*2.

Zhu e colaboradores (2016), em outro trabalho realizado na Ásia, classificou os pacientes que apresentavam perda de função dos alelos 2 e 3 como apresentando fatores de risco para o prognóstico de pacientes submetidos a implante de *stent* na artéria carótida.

Ao final de 1 ano eles observaram que os portadores desses alelos que tinham sido submetidos a colocação de *stent* eram mais propensos a terem eventos isquêmicos durante a terapia do Clopidogrel. Sugerindo a utilização de outros medicamentos em estudos futuros. Ao analisar o perfil de biotransformação do clopidogrel, combinando os polimorfismos CYP2C19*2 e *3, verificou uma maior prevalência do fenótipo metabolizador intermediário.

Na presente pesquisa ao analisar a influência do polimorfismo CYP2C19*2 e o desenvolvimento de reestenose pós angioplastia, foi observado que a presença do alelo mutado *2 foi mais prevalente no grupo que não teve reestenose, contudo essa diferença também não foi significativa. Resultado semelhante ao encontrado no estudo de Ruedlinge e colaboradores (2017), que verificou uma maior proporção de alelos mutados em pacientes sem reestenose intra-stent, porém essa diferença também não foi significativa. Outro fato observado nesse trabalho foi que o número de pacientes com reestenose foi maior no grupo que tinha *stent* convencional, quando comparado ao que tinha *stent* medicamentosos.

Outra pesquisa que também corroborou com o presente trabalho foi realizada na Rússia por Rytkin e colaboradores (2017). Nela foi verificada que as presenças dos alelos 2 e 17 do gene CYP2C19 não influenciaram no desenvolvimento de complicações pós implantação de *stent*.

Embora existam controvérsias sobre a influência dos polimorfismos CYP2C19 e os efeitos adversos pós implantação de *stent*. A presente pesquisa observou que pacientes com *stent* e com a presença de um *2, um *3 e um *17 polimórficos apresentavam maior chance de ter reestenose, pois nesse caso o *17 não conseguiu reverter a perda de função da enzima. Esse resultado confirma uma meta-análise realizada na população asiática, que mostrou a importância da sua investigação genética, principalmente nessa população aonde ocorre uma grande prevalência de perda de função dessas enzimas. Essa perda de função pode levar a um maior risco de eventos cardiovasculares adversos e um menor risco de sangramento em comparação aos não portadores (Xi *et al.*, 2019).

O trabalho realizado por Lee e colaboradores (2018) confirma a importância da genotipagem do CYP2C19 na escolha do antiagregante plaquetário, onde salienta que os alelos de perda de função (*2 e *3) estão associados a desfechos cardiovasculares adversos associados ao uso do clopidogrel. Nesse caso a genotipagem auxiliaria na escolha dos inibidores P2Y12 em paciente que foram submetidos a intervenção coronária percutânea.

7. CONCLUSÃO

Atualmente vários fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose são conhecidos. Dentre os fatores podemos destacar o sexo do indivíduo, o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo, além dos polimorfismos genéticos. Na presente pesquisa o sexo do indivíduo, assim como o hábito de fumar não influenciaram na gênese a aterosclerose. Embora tenha sido verificado um maior número de indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas no grupo de pacientes sem aterosclerose, seria necessário saber o tipo de bebida e a sua quantidade para afirmar que ela teria funcionado como um fator de proteção contra aterosclerose.

Alguns dos genótipos dos polimorfismos de perda de função CYP2C19*2 e *3 influenciaram no processo de aterogênese, onde indivíduos com os genótipos *2/*2 e *1/*3 foram mais prevalentes no grupo de pacientes com aterosclerose. Em relação ao *17 foi verificada uma maior prevalência no grupo sem aterosclerose, funcionando assim como um fator de proteção contra a doença.

Ao avaliar os genótipos dos polimorfismos CYP2C19 e sua associação com a progressão da doença e a necessidade da implantação de *stent*, geraram resultados um pouco contraditórios. Foi observada uma maior prevalências do genótipo selvagem (*1/*1) e das combinações *1*2/*1*1 e *1*2/*1*1/*1/*17 nos pacientes que necessitaram colocar *stent*, quando comparados aos que não tinham *stent*. No grupo de pacientes sem *stent* os genótipos mais prevalentes foram *1/*3 e *2*2/*1*3/*1*17, quando comparados aos com *stent*.

Em relação a resposta ao clopidogrel e as combinações dos polimorfismos CYP2C19, verificamos que a combinação *1*2/*1*3/*1/*17 (metabolizador lento) foi significativamente maior no grupo de pacientes com reestenose do que no grupo sem reestenose. Refletindo a falta ativação do clopidogrel pela enzima CYP.

Ao realizar diversas combinações dos polimorfismos CYP2C19*2, *3 e *17 e sua classificação em relação ao fenótipo de metabolização do clopidogrel, não verificamos influencia no desenvolvimento de complicações como a reestenose.

Apesar de existirem estudos contraditórios em relação a resposta ao clopidogrel em pacientes portadores dos polimorfismos de perda de função para o gene CYP2C19, verificamos que o alelo 2 além de influenciar no processo de aterogênese, também influência na resposta ao clopidogrel.

8. BIBLIOGRAFIA

Al-Jenoobi F.I., Alkharfy K.M., Alghamdi A.M., Bagulb K.M., Al-Mohizea A.M., Al-Muhsen S., Halwani R., Parvez M.K., Al-Dosari M.S. CYP2C19 Genetic Polymorphism in Saudi Arabians. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013;112(1):50–54.

Allabi A.C., Gala J., Desager J., Heusterspreute M., Horsmans Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2003;56(6):653–657.

Barbieri, E. Biodiversidade: a variedade de vida no planeta terra. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. 2003:1–16.

Bhopalwala A.M., Hong R.A., Khan Z.R., Valentin M.R., Badawi R.A. Routine Screening for CYP2C19 Polymorphisms for Patients being Treated with Clopidogrel is not Recommended. *Hawai'i journal of medicine & public health*. 2015;74(1):16-20.

Brasileiro Filho, B. & Bogliolo, G. Patologia. Guanabara Koogan. 9ª Ed. 2016.

Campedelli, F.L. Polimorfismo do gene eNOS G894T (GLU298ASP) em pacientes sintomáticos para aterosclerose [Dissertação]. Goiânia: Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás; 2016.

Chaudhry, A.S.; Kochhar, R.; Kohli, K.K. Importance of CYP2C19 genetic polymorphism in the eradication of *Helicobacter pylori* in north Indians. *Indian J Med Res*. 2009 Oct;130(4):437-43.

Chiva-Blanch G., Magraner E., Condines X., Valderas-Martinez P., Roth I., Arranz S., Casas R., Navarro M., Hervas A., Sisó A., Martínez-Huélamo M., Vallverdú-Queralt A., Quifer-Rada P., Lamuela-Raventos R.M., Estruch R. Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: a randomized feeding trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25(1):36–45.

Chiva-Blanch G., Urpi-Sarda M., Ros E., Valderas-Martinez P., Casas R., Arranz S., Guillénc M., Lamuela-Raventós R.M., Llorach R., Andres-Lacueva C., Estruch R. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: arandomizedclinical trial. *ClinNutr*. 2013;32(2):200–6.

Collet C.A., Costa Jr R., Sousa A.G.M.R., Feres F., Moreira A., Costa R., Staico R., Almeida A., Siqueira D., Cano M., Maldonado G., Abizaid A., Sousa J.E. Stents Farmacológicos vs. Stents Não-Farmacológicos no Tratamento de Enxertos de Veia Safena. *Rev. Bras. Cardiol. Invasiva* . 2011;19(2);122–130.

Conforto A.B., Leite C.C., Nomura C.H., Bor-Seng-Shu E., Santos R.D.. Is there a consistent association between coronary heart disease and ischemic stroke caused by intracranial atherosclerosis? *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2013;71(6):320–326.

Corrêa-Camacho C.R., Dias-Melicio L.A., Soares A.M.V.C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc*. 2007;14(1):41–48.

Cuisset T., Loosveld M., Morange P.E., Quilici J., Moro P.J., Saut N., Gaborit B., Castelli C., Beguin S., Grosdidier C., Fourcade L., Bonnet J.L., Alessi M.C. CYP2C19 *2 and *17 alleles have a significant impact on platelet response and bleeding risk in patients treated with prasugrel after acute coronary syndrome. *JACC Cardiovasc Interv*. 2012;5: 1280–1287

Dai X., Wiernek S., Evans J.P., Runge MS. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*. 2016;8(1):1–23.

de Morais S.M.F., Wilkinson G.R., Blaisdell J., Nakamura K., Meyer U.A., Goldstein J.A.. The major genetic defect responsible for the polymorphisms of S-mephenytoin metabolism in humans. *J. Biol. Chem*. 1994;269(22):15419–15422..

Department of Health & Human Services. CYP2C19 gene cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19. *Genetics Home Reference*. 2017:1–5.

Elfaki I., Mir R., Almutairi F.M., Duhier F.M.A. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2018;19:2057-70

Fricke-Galindo I., Céspedes-Garro C., Rodrigues-Soares F., Naranjo M.E.G., Delgado Á., de Andrés F., López-López M., Peñas-Lledó E., LLerena A. Interethnic variation of CYP2C19 alleles, ‘predicted’ phenotypes and ‘measured’ metabolic phenotypes across world populations. *The Pharmacogenomics Journal*. 2016;16:113–123.

Gimbrone Jr M.A. & García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb;118(4):620–636.

Godsland I.F., Crook D., Simpson R., Proudler T., Felton C., Lees B., Anyaoku V., Devenport M., Wynn V. The effects formulation of oral contraceptive on lipid and carbohydrate metabolism. *The New England Journal of Medicine*. 1990;323(20):1375–81.

Goldstein, J. A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2001;52(4):349–355.

Guerra D.C., Flores S., Izaguirre M.H. Distribution of CYP2C19*2 and CYP2C19*3 polymorphisms in Venezuelan populations with different admixture. *Annals of Human Biology*. 2013 Mar;40(2):197-200

Hong Y.M. Atherosclerotic Cardiovascular Disease Beginning in Childhood. *Korean Circ J*. 2010 Jan;40(1):1-9.

Huang Y., Li Y., Zheng S., Yang X., Wang T., Zeng J. Moderate alcohol consumption and atherosclerosis. Meta-analysis of effects on lipids and inflammation. *The Central European Journal of Medicine*. 2017 Nov;129(21-22):835-843

Ianni, A. M. Z. Biodiversidade e Saúde Pública: fronteiras do biológico e do social. Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde/SP. 2004:1-17.

IBGE (BRASIL/Goiás/Goiânia). 2017 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/goiania/pesquisa/17/15752?tipo=ranking&indicador=15765>. Acessado em: 25/07/2019.

Ikebuchi J., Yamada M., Ogura Y., Yamamoto Y., Nishimura A., Nishi K., Yamada K., Irizawa Y. Individual difference in drug metabolism and disposition: Toxicological significance of genotypes and phenotypes of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) *Int Congress Series*. 2003;1239:589–592.

Jia D.M., Chen Z.B., Zhang M.J., Yang W.J., Jin J.L., Xia Y.Q., Zhang C.L., Shao Y., Chen C., Xu Y. CYP2C19 polymorphisms and antiplatelet effects of clopidogrel in acute ischemic stroke in China. *Stroke*. 2013;44(6):1717–1719.

Katzung B.G. & Trevor A.J. *Farmacologia Básica e Clínica*. Amgh Editora. 13ª Ed. 2017.

Kianoush S., Yakoob M.Y., Al-Rifai M., Defilippis A.P., Bittencourt M.S., Duncan B.B., Bensenor I.M., Bhatnagar A., Lotufo P.A., Blaha M.J. Associations of Cigarette Smoking With Subclinical Inflammation and Atherosclerosis: ELSA-Brasil (The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health). *Journal of the American Heart Association*. 2017 Jun 24;6(6):1-15.

Kohlrausch F.B., Carracedo A., Hutz M.H. Characterization of CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms in South Brazilians. *Mol Biol Rep*. 2014;41:1453–1460.

Lee C.R., Sriramoju V.B., Cervantes A., Howell L.A., Varunok N., Madan S., Hamrick K., Polasek M.J., Lee J.A., Clarke M., Cicci J.D., Weck K.E., Stouffer G.A. Clinical Outcomes and Sustainability of Using CYP2C19 Genotype–Guided Antiplatelet Therapy After Percutaneous Coronary Intervention. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11:1-12.

Lwanga S.K. & Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva, World Health Organization. 1991:1-22.

Macdonald P.L. & Gardner R.C. Type I error rate comparisons of *post hoc* procedures for Ij Chi-Square tables. *Educational and Psychological Measurement*. 2000;60(5):735-754.

Mansuy D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450 1. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1998 Nov;121(1-3):5-14.

Marinković N., Pasalić D., Potocki S. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. *Biochemia medica*. 2013;23(3):255–65.

Marques e Sá A.C. O papel dos polimorfismos genéticos na doença cardíaca isquémica [Dissertação]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar Universidade do Porto; 2011.

Mega J.L., Close S.L., Wiviott S.D., Shen L., Hockett R.D., Brandt J.T., Walker J.R., Antman E.M., Macias W., Braunwald E., Sabatine M.S. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *Society*. 2009;360(4):1–9.

Mega J.L., Hochholzer W., Frelinger A.L., Kluk M.J., Angiolillo D.J., Kereiakes D.J., Isserman S., Rogers W.J., Ruff C.T., Contant C., Pencina M.J., Scirica B.M., Longtine J.A., Michelson A.D., Sabatine M.S. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;306(20):2221–2228.

Messner B., & Bernhard D. (2014). Smoking and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014;34:509–515.

Miners J.O., Birkett D.J. Cytochrome P450C9: An enzyme of major importance in human drug metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1998;45(6):525–538.

Ministério da Saúde (BR). Cooperação internacional. Brasil se compromete com o combate ao AVC e altos níveis de colesterol. Brasília (DF); 2018. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2018/08/brasil-se-compromete-com-o-combate-ao-avc-e-altos-niveis-de-colesterol>. Acesso em: 14 jan. 2019.

Ministério da Saúde (BR). Dia mundial do coração. Doenças cardiovasculares são principal causa de morte no mundo. Brasília (DF); 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/09/doencas-cardiovasculares-sao-principal-cao-de-morte-no-mundo>. Acesso em: 26 jun. 2019.

Ministério da Saúde (BR) CONITEC-SUS. Stent Farmacológico para o tratamento da doença arterial coronariana (DAC). Brasília (DF); 2014.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ideograma do Cromossomo 10. Acesso em: 20 mar. 2017.

Nussbaum R.L., Mcinnes R.R., Willard H.F. Thompson & Thompson Genética Médica. Elsevier. 8ª Ed. Rio de Janeiro 2016.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Entenda os riscos do consumo de bebida alcoólica. Brasília (DF); 2019. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/promocao-da-saude/53786-entenda-os-riscos-do-consumo-de-bebida-alcoolica>.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS Brasil). OPAS/OMS apresenta

ações custo-efetivas para prevenir doenças crônicas, em encontro internacional. Brasília (DF); 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5730:opas-oms-apresenta-aco-es-custo-efetivas-para-prevenir-doencas-cronicas-em-encontro-internacional&Itemid=839. Acesso em: 25 jun. 2019.

Perini J.A., Vargens D.D., Santana I.S.C., Moriguchi E.H., Ribeiro-dos-Santos A.K.C., Tsutsumi M., Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetic polymorphisms in Brazilian-born, first-generation Japanese descendants. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(12):1179-1184.

Robbins S.L, Cotran R., Abbas A., Aster J.C.V. *Patologia - Bases patológicas das doenças* Cap11 eBook. Elsevier. 9ª Ed. Rio de Janeiro 2016.

Ross R. & Glomset J. A. The Pathogenesis of Atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine.* 1976;295(7):369–377.

Ruedlinger J., Prado Y., Zambrano T., Saavedra N., Bobadilla B., Potthoff M., Pérez L., Lanas F., Salazar L.A. CYP2C19*2 Polymorphism in Chilean Patients with In-Stent Restenosis Development and Controls. *BioMed Research International.* 2017;2017: 5783719.

Rytkin E., Mirzaev K.B., Grishina E.A., Smirnov V.V., Ryzhikova K.A., Sozaeva Z.A., Giliarov M.I., Andreev D.A., Sychev D.A. Do CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients? *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* 2017;10:243–245.

Sambrook J., Maccallum P., Russell D. W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

dos Santos M.C.B., Vieira M.J.A., César B.N., Novaes M.R.C.G. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. *Com. Ciências Saúde.* 2011;22(3):247–256.

Santos P.C.J.L., Soares R.A.G., Santos D.B.G., Nascimento R.M., Coelho G.L.L.M., Nicolau J.C., Mill J.G., Krieger J.E., Pereira A.C. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general

population. *BMC Medical Genetics*. 2011;12(13):1-7.

Santos Filho E.G., Abdo G.L., Orel M., Gun C. Prevention of restenosis after coronary angioplasty : myth or reality? *Revista Medica USP*. 2002;81(1/4):31–41.

Secretaria Estadual de Saúde (GO). Plano Estadual de Saúde 2016-2019. Goiânia (GO); 2016. Disponível em: <http://www.saude.go.gov.br/wp-content/uploads/2017/06/p.s.-2016-2019.pdf>. Acessado em: 25/07/2019.

Silva J.A.S. Projeto Diretrizes. Evidências Científicas sobre Tabagismo para Subsídio ao Poder Judiciário. *Associação Médica Brasileira*. 2013:1–71.

Sim S.C., Risinger C., Dahl M.L., Aklillu E., Christensen M., Bertilsson L., Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;79(1):103–113.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. 2017;109(2):1-62.

Stedman T. *Dicionário Médico, ilustrado em cores*. Guanabara Koogan. V. 27, 2003.

Steinberg D. & Wilzturn J. Lipoproteins Current Atherogenesis. *Jama*. 1990;264(23):3047–3052.

Türkanoglu A., Can D.B., Demirkaya S., Bek S., Adali O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *Neurological Sciences*. 2010;31(6):727–734.

Vargens D.D., Petzl-Erlar M.L., Suarez-Kurtz G. Distribution of CYP2C Polymorphisms in an Amerindian Population of Brazil. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012;110:396–400.

Verschuren J.J.W, Trompet S., Wessels J.A.M., Guchelaar H., de Maat M.P.M., Simoons M.L., JUKEMA J.W. A systematic review on pharmacogenetics in cardiovascular disease: is it ready for clinical application? *European Heart Journal*. 2012;3:165–175.

Xi Z., Fang F., Wang J., Alhelal J., Zhou Y., Liu W. CYP2C19 genotype and adverse

cardiovascular outcomes after stent implantation in clopidogrel-treated Asian populations: A systematic review and meta-analysis. *Platelets*. 2019;30(2):229-240.

Zhang Y., Zhou X., Ji W., Liu T., Ma J., Zhang Y., Li Y. Association between CYP2C19*2/*3 Polymorphisms and Coronary Heart Disease. *Current Medical Science*. 2019;39(1):44-51

Zhu W., Zhao T., Xiong X., Li J., Wang L., Zhou Y., Gong Z., Cheng S., Liu Y., Shuai J., Yang Q. Association of CYP2C19 Polymorphisms with the Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting in Asia. *Scientific Reports*. 2016 May 3;6:25478.

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. *Molecular Biology Reports*. 2014;41(2):1157–1164.

APÊNDICE I

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 () ANGIOTOMOGRÁFIA() 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:

APÊNDICE II

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA.

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 Verolla 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 aterosclerose (acúmulo de placas de gordura nos vasos sanguíneos) 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 variações genéticas que podem estar relacionados a alterações vasculares.

III. O objetivo da pesquisa é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico coletadas serão analisadas para verificar a presença das variações genéticas. Os critérios de inclusão são: pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares como a angioplastia e o cateterismo, que aceitem responder ao

questionário e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os de exclusão são: pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para alguma variação genética, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com aterosclerose. 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, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam 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 serão descartados.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio 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 e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que 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 Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, 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

Assinatura do responsável pelo estudo

_____/_____/_____

Data Assinatura

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO CONTROLE

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), deste projeto de pesquisa sob o título POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA.

Meu nome é _____, sou o pesquisador (a) responsável pelo projeto. 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 o (a) pesquisador (a) responsável Dra. Katia Karina Verolla 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 esta sob consulta sem diagnostico de aterosclerose baseado em resultados de exames que procuraram o consultório medico para outros tipos de consulta, como varizes, onde foi informado da pesquisa e 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 analise de diferentes variações genéticas que podem estar relacionados com alterações vasculares.

III. O objetivo do estudo é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico do grupo controle coletadas serão submetidas a testes de sangue, para verificar a ausência das variações genéticas. Para o grupo controle os critérios de inclusão serão idade superior a38 anos, e que não apresentem diagnóstico de doença aterosclerótica baseados em resultados de exames de imagem. Os de exclusão são os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar

dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado á Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

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 aterosclerose. 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, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressalvando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames serão descartados.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio 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. Fica 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 você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que 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 Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do

estudo, 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 do responsável pelo estudo

___/___/___

Data

APÊNDICE III

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

The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' web interface. At the top, there is a navigation bar with the 'Saúde' logo and 'Ministério da Saúde' text. Below this, the 'Plataforma Brasil' logo is visible, along with user navigation options: 'principal' and 'sair'. A menu bar contains 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The user is identified as 'Iasmim Ribeiro da Costa - Pesquisador | V3.0' with a session expiration of '39min 30'. The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains a section for 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA'. The project details are as follows:

- Título da Pesquisa:** Análise de polimorfismos genético em aterosclerose
- Pesquisador Responsável:** KATIA KARINA VEROLLA DE OLIVEIRA MOURA
- Área Temática:**
- Versão:** 6
- CAAE:** 35321614.3.0000.0037
- Submetido em:** 06/06/2015
- 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

A circular stamp with the text 'COORDENADOR' is visible on the right side of the project details. At the bottom right, there is a 'Comprovante de Recepção' icon and the file name 'PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_349146'.

APÊNDICE IV

ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

1. COSTA, I.R.; SANTOS, T.R.; BENTO, I.A.; SIQUEIRA, B.O.; BARBOSA, A.M.; Silva, K.S.F.; LAGARES, M.H.; MARTINS, J.V.M.; RODRIGUES, D.A.; MORAIS, M.P.; CAMPEDELLE, F.L.; MOURA, K.K.V.O. Research Article RFLP-PCR is more efficient than ARMS-PCR for identifying CYP2C19*2 polymorphism in atherosclerotic patients. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.18, p.1 - 5, 2019.

2. NETO, O.S. DIAS; SILVA, K.S.F. E; BARBOSA, A.M.; RODRIGUES, D.A.; LAGARES, M.H.; DA COSTA, I.R.; MOURA, K.K.V.O. Research Article GSTT1 null genotype in sickle cell anemia and blood transfusion recurrence - a case report. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.18, p.1 - 5, 2019.

3. MORAES, M.P.; SILVA, K.S.F. E; LAGARES, M.H.; BARBOSA, A.M.; MARTINS, J.V.M.; CAMPEDELLI, F.L.; DA COSTA, I.R.; RODRIGUES, D.A.; MOURA, K.K.V.O. Research Article Polymorphisms of the genes eNOS, GSTT1 and GSTM1 are significantly associated with atherosclerotic disease in hypertensive patients. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.18, p.1 - 8, 2019.

4. BENTO, I.A.; SILVA, K.S.F. E; MOURA, K.K.V.O.; JÚNIOR, C.L. RIBEIRO; DA COSTA, I.R. Research Article CYP2C19*3 polymorphism in patients with endometriosis. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.18, p.1 - 6, 2019.

5. OLIVEIRA, F.R.B.; CORRÊA, J.F.; Silva, K.S.F.; COSTA, I.A.; Mascarenhas, R.S.; BARBOSA, A.M.; LAGARES, M.H.; CAMPEDELLI, F.L.; MOURA, K.K.V.O. Research Article The eNOS T786C polymorphism is not related to atherosclerosis and cofactors in a Brazilian population. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.18, p.1 - 9, 2019.

6. BARBOSA, A M; ASSUNÇÃO LP; OLIVEIRA LN; MORAES D; ARAÚJO DS; DE CURCIO JS; SILVA MG; SANTOS TG; COSTA IR; SILVA CTX; SILVA, KSFE.

Therapeutic Design of Peptide Modulators of the Interaction Between eNOS and p53 in Atherosclerosis. JOURNAL OF INTEGRATIVE CARDIOLOGY OPEN ACCESS. v.2, p.1 - 9, 2019.

7. MIRANDA, C. O. P.; SANTOS, T. R.; COSTA, I. R. Panorama da sífilis em Goiânia segundo levantamento realizado no Laboratório Clínico da PUC Goiás entre 2010 e 2014. Revista Estudos- Zootecnia, v.45, p.66 - 70, 2018.

8. FERREIRA, FÁBIO CASTRO; COSTA, SÉRGIO HENRIQUE NASCENTE; COSTA, IASMIM RIBEIRO DA. Prevalence of thyroid dysfunctions in patients attended at the Clinical Laboratory of the Military Police Hospital of the Goiás State in the period from 2015 to 2016. Revista Brasileira de Análises Clínicas. v.50, p.1 - 1, 2018.

9. SANTOS, T. R.; E SILVA, K. S. F.; SILVA, R. C. P. C. E.; MOURA, K. K. V. O.; GUILLO, L. A.; RIBEIRO JUNIOR, C. L.; COSTA, I. R. Research Article Infertility caused by an association between Arg72Pro polymorphism of the p53 gene and Glu298Asp of the eNOS gene in patients with endometriosis. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.17, p.1 - 8, 2018.

10. BARBOSA, A.M.; DE SILVA, K.S.F.; LAGARES, M.H.; RODRIGUES, D.A.; MARTINS, J.V.M.; DA COSTA, I.R.; MOURA, K.K.V.O. Research Article Scientometric analysis: Five years of genetic polymorphisms. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.17, p.1 - 7, 2018.

11. 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. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.16, p.1 - 9, 2017.

12. BARBOSA, A.M.; E SILVA, K.S.F.; LAGARES, M.H.; RODRIGUES, D.A.; COSTA, I.R.; MORAIS, M.P.; MARTINS, J.V.M.; Mascarenhas, R.S.; CAMPEDELLI, F.L.; MOURA, K.K.V.O. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.16, p.1 - 9, 2017.

13. RODRIGUES, D.A.; MARTINS, J.V.M.; SILVA, K.S.F.; COSTA, I. R.; LAGARES,

M. H.; CAMPEDELLI, F.L.; BARBOSA A. M.; MORAIS, M. P.; MOURA, K. K. V. O. GSTM1 polymorphism in patients with clinical manifestations of atherosclerosis. Genetics and Molecular Research. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.16, p.1 - 9, 2017.

14. MARTINS, J.V.M.; RODRIGUES, D.A.; I.R. DA COSTA; LAGARES, M. H.; Barbosa A. M.; MORAIS, M. P.; CAMPEDELLI, F.L.; MOURA, K. K. V. O. Molecular analysis of the GSTT1 gene polymorphism in patients with clinical manifestation of atherosclerosis. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto(2015 JCR): 0,7640, v.16, p.1 - 11, 2017.

15. CAMPEDELLI, F.L.; SILVA, K.S.F.; RODRIGUES, D.A.; MARTINS, J.V.M.; I.R. DA COSTA; LAGARES, M. H.; BARBOSA A. M.; MORAIS, M. P.; MOURA, K. K. V. O. Polymorphism of the eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.16, p.1 - 13, 2017.

16. MASCARENHAS, R S; RODRIGUES, D A; MARTINS, J V M; MORAIS, M P DE; CAMPEDELLI, F L; LAGARES, M H; BARBOSA, A M; COSTA, I R; SILVA, K S F E; CORREA, J F; OLIVEIRA, F R B; MOURA, E K K V O Polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes in symptomatic atherosclerotic patients with hypertension and/or type 2 diabetes mellitus. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.16, p.1 - 6, 2017.

17. COSTA, I.R.; MASCARENHAS, R.S.; CORRÊA, J.F.; OLIVEIRA, F.R.B.; FERNANDES, S.G.; SOUZA, F.O.; DOS REIS, G.M.; DE P.R. JÚNIOR, A.; RODRIGUES, D.A.; MARTINS, J.V.M.; E SILVA, K.S.F.; MOURA, K.K.V.O. Analysis of the prevalence of polymorphisms in the glutathione S transferase gene (GST) in cataract patients from Goiânia. Genetics and Molecular Research. Fator de Impacto(2015 JCR): 0,7640, v.15, p.1 - 7, 2016.

18. BARBOSA, A.M.; DE SOUZA, S.R.; FRARE, A.B.; COSTA E SILVA, R.C.; DA COSTA, I.R.; FREITAS E SILVA, K.S.; RIBEIRO JÚNIOR, C.L.; BORDIN, B.M.; MOURA, K.K.V.O. Association of CYP1A1 (cytochrome P450) MspI polymorphism in women with endometriosis. Genetics and Molecular Research. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.15, p.1 - 7, 2016.

19. DE P.R. JÚNIOR, A.; DOS REIS, G.M.; E SILVA, K.S.F.; RODRIGUES, D.A.; GOMES, M.C.S.; MARTINS, J.V.M.; DA COSTA, I.R.; FREITAS, G.A.; MOURA, K.K.V.O. Analysis of the GSTM1-null polymorphism in patients with pterygium from Goiânia, Goiás Brazil. Genetics and Molecular Research. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.14, p.6173 - 6181, 2015.
20. SANTOS, T. R.; BENTO, I. A.; MOURA, K. K. V. O.; COSTA, I. R. Influência do Polimorfismo CYP2C19 na Terapia do Clopidogrel. Revista Eletrônica de Farmácia. v.XII, p.33 - 37, 2015.
21. RODRIGUES, D.A.; COSTA, I.R.; MARTINS, J.V.M.; E SILVA, K.S.F.; MOURA, K.K.V.O. Polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and p53 in Goiânia, Goiás. Genetics and Molecular Research. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.14, p.17358 - 17365, 2015.
22. DOS REIS, G.M.; DE P.R. JÚNIOR, A.; E SILVA, K.S.F.; RODRIGUES, D.A.; GOMES, M.C.S.; MARTINS, J.V.M.; DA COSTA, I.R.; FREITAS, G.A.; MOURA, K.K.O. Pterygium in patients from Goiânia, Goiás, Brazil. Genetics and Molecular Research. Fator de Impacto (2015 JCR): 0,7640, v.14, p.6182 - 6188, 2015.