

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE TRÊS POLIMORFISMOS (-786T>C,
894G>T E VNTR INTRON 4 a/b) NO GENE QUE SINTETIZA PARA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL E SÍNDROME
CORONARIANA AGUDA**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
celular e Molecular como
requisito para a obtenção
do grau de Doutor.

Autora

Jacqueline da Costa Escobar Piccoli

Orientador

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Carlos Bodanese

Porto Alegre, RS, maio de 2007.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P591e Piccoli, Jacqueline da Costa Escobar

Estudo associativo entre três polimorfismos (-786T>C, 894G>T e VNTR INTRON 4 a/b) no gene que sintetiza para óxido nítrico sintase endotelial e síndrome coronariana aguda / Jacqueline da Costa Escobar Piccoli; orient. Maurício Reis Bogo; co-orient. Luis Carlos Bodanese. Porto Alegre: PUCRS, 2007.

62f.: tab. Inclui um artigo científico

Tese(Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE. 2. ATROSCLEROSE CORONÁRIA. 3. ENDOTÉLIO VASCULAR. 4. POLIMORFISMO GENÉTICO. 5. FATORES DE RISCO. 6. CORONARIOPATIA. 7. ÓXIDO NITRICO. 8. FREQUÊNCIA DO GENE. 9. HAPLÓTIPOS. 10. GENÓTIPO. 11. DOENÇA AGUDA. 12. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES. I. Bogo, Maurício Reis. II. Bodanese, Luiz Carlos. III. Título.

C.D.D. 574.87

C.D.U. 548.33:616.127-005.8 (043.2)

N.L.M. QU 500

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

Dedido o presente trabalho
à memória de minha mãe
(*Valquíria T. E. Piccoli*)
que muito lutou para
que esse sonho se
tornasse real.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas surgiram na minha vida nesses quatro anos tão difíceis. Bom, para me ajudar nesses momentos, Graças a Deus (a Ele meu primeiro agradecimento), devo agradecer à seguintes pessoas:

Ao meu orientador Dr. Maurício Reis Bogo por ter me aceitado numa orientação, tipo: “no meio do caminho”, “meio atropelada”, mas especialmente, por sempre se mostrar confiante na minha capacidade.

À Dra. Alessandra Peres, que me ajudou no difícil momento de recomeçar o doutorado após a troca de orientação.

Ao Dr. Luiz Carlos Bodanese por acreditar nesse trabalho e na minha capacidade em executá-lo. Ao Dr. Euler Roberto Fernandes Manenti por ceder a população de casos desse estudo e por suas valiosas considerações durante a qualificação do projeto.

Ao Dr. José Artur Bogo Chies por sua pronta disponibilidade e pelo espaço cedido em seu Laboratório para a execução de experimentos, quando necessário.

Na execução devo muitos agradecimentos ao pessoal do Hospital São Lucas da PUCRS que me ajudaram no recrutamento dos controles: Guilherme Guaragna, Camila Albarrã, Enf^a Ellen Magedanz, Enf^a Loraine Salaberry da Silva, Enf^a Eliza Castanho, e a todos os voluntários que concordaram em participar do estudo.

Na execução do experimento em laboratório, agradeço muito aos queridos amigos: Ilan Maltz, Nicole, Josiane Bandinelli e Fernanda Hamester. Obrigada por toda dedicação e ao cultivo de nossa boa amizade. Hoje, saio dessa fase sabendo que ganhei bons amigos. Ainda, agradeço à Cladinara Roberts Sarturi, por sua disponibilidade ajudar nas questões técnicas do laboratório.

Agradeço à Rosa Mira Vieira Homem por toda a sua ajuda nos momentos mais duros e difíceis, por sua parceria que hoje me fazem ter certeza de que somos amigas.

Às queridas colegas de Santo Ângelo, sempre dispostas a segurar a onda na URI por mim...Especialmente à Briseidy Marchesan Soares, querida amiga para todas as horas; à Maria Lorete Flores, sempre disposta a dar um colinho, um bom conselho, uma boa risada e à Neusa Scheid por todo seu incentivo para que eu seguisse meu caminho no doutorado. Me orgulho de formar uma equipe com vocês! Bom, durante o ano que enfrentei a doença e morte da minha mãe, pude contar com todos que aqui citei, seja com uma palavra de conforto, apoio ou ânimo ou apenas com um abraço silencioso, sei que sem vocês eu não conseguiria! Obrigada!

Especiais agradecimentos: à minha amada e companheira mãe que acompanhou 3 anos desse doutorado, sempre me incentivando e me dando todo seu amor. Amor eterno!

Ao meu pai por ter me apoiado e por entender a minha ausência.

À Gisa, minha amadíssima irmã. Obrigada por tudo! Principalmente por estar seguindo o seu sonho e por dividir comigo essa felicidade.

Te admiro profundamente!

Ao Luciano, meu marido, parceiro para todas horas. Primeiro minhas desculpas, por que sei que esses 4 anos não foram fáceis, especialmente, pelas minhas ausências e loucuras. Agradeço pela paciência e pelo amor na hora certa.

Às amigas mais amadas do mundo (ordem alfabética): Fernanda Hamester, Josiane Bandinelli, Juliana Cordeiro da Costa, Roberta Lopes da Silva Trois e Simone Senna

Obrigada a todos que me ensinaram a arte de suportar o insuportável!

ÍNDICE

	Pg
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	10
A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	10
O PAPEL DO ENDOTÉLIO NO FUNCIONAMENTO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	13
GENES E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	17
GENE QUE CODIFICA PARA eNOS(NOS3).....	17
OBJETIVO GERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
CAPÍTULO 2 – ARTIGO	26
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	63

RESUMO

O óxido nítrico endotelial (NO) é um importante fator para a regulação do tônus vascular e foi sugerido que o mesmo está envolvido em muitos eventos de processos aterogênicos. A ruptura da placa endotelial pode representar o substrato patomorfológico da síndrome coronariana aguda (SCA). Os polimorfismos no gene que codifica para eNOS (NOS3) -786T>C (na região promotora), 894G>T (exon 7) e o VNTR no Intron 4, podem estar envolvidos com uma maior suscetibilidade a SCA. O presente estudo investigou a interação destes polimorfismos (frequências alélicas, genótípicas e haplótipos) e fatores de risco cardiovascular em 135 pacientes com SCA e 115 controles. Não encontramos associação estatística entre as frequências alélicas e genótípicas entre os grupos estudados. Encontramos associação para o genótipo TT (894G>T) comparado ao GT+GG (OR 1,4; IC 95% 1,0-1,8). Nenhuma interação significativa foi encontrada entre os fatores de risco cardiovascular e os polimorfismos -786T>C e VNTR intron 4 a/b. Indivíduos sem dislipidemia e com o genótipo intron 4 a/b apresentaram menores chances de desenvolver SCA. Indivíduos sem diabetes e com genótipo 894TT demonstraram maior risco para SCA (OR 1.64, IC 95% 1.18-2.26). Pacientes sem dislipidemia e com genótipo 894GG tiveram uma tendência a ser fator protetor para SCA (OR 0.77, IC 95% 0.59-1.00). Também, o genótipo 894GG foi fator protetor contra SCA no sexo feminino (OR 0.48, IC 95% 0.24-0.94). Os resultados sugerem que os polimorfismos de eNOS estudados não são fatores de risco independente, mas que eles atuam como um fator de risco adicional no desenvolvimento de SCA.

PALAVRAS-CHAVE: eNOS, Polimorfismos de óxido nítrico endotelial, fatores de risco cardiovascular, óxido nítrico

ABSTRACT

Endothelial nitric oxide (NO) is an important factor for the regulation of vascular tonus and it was suggested to be involved in many events of the atherogenic process. The endothelial rupture of coronary plaque can represent the pathomorphological substratum of the acute coronary syndrome (ACS). The polymorphisms in the gene that code the eNOS (NOS3) -786T>C (in the promoter region), 894G>T (exon 7) and intron 4 a/b VNTR, can be associated with a higher susceptibility to ACS. The present study investigated the interaction of these polymorphisms (allelic frequencies, genotypes and haplotypes) and cardiovascular risk factors in 135 patients with ACS and 115 control subjects. We did not find statistical association between genotypic and allelic frequencies between the studied groups. We did find association to TT genotype (894G>T) compared to GT+GG (OR 1,4; 95% ci 1,0-1,8). No significant interactions were found among cardiovascular risk factors and both -786T>C and intron 4 a/b polymorphisms. Subjects without dyslipidemia and Intron 4 a/b genotype presented a lower chance to ACS development. Subjects without diabetes and 894TT genotype showed higher risk to ACS (OR 1.64, 95% CI 1.18-2.26). Patients without dyslipidemia and 894GG genotype shows a tendency to act as a protector factor to ACS (OR 0.77, 95% CI 0.59-1.00). Also, the GG genotype was a protective factor against ACS in females (OR 0.48, 95% CI 0.24-0.94). Our results suggest that eNOS polymorphisms are not independent risk factor, but that act as an additional risk factor in development of ACS.

KEY-WORDS: eNOS, Endothelial nitric oxide polymorphisms, cardiovascular risk factors, nitric oxide

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A doença arterial coronariana (DAC) é a maior causa de morte em indivíduos de ambos os sexos na sociedade moderna. No Brasil, as doenças cardiovasculares vitimam cerca de 300.000 pessoas/ano e representam uma parcela significativa do total de gastos do Sistema Único de Saúde (Ministério da Saúde, 2003). A DAC deve hoje ser reconhecida como uma manifestação cardíaca de uma doença sistêmica generalizada, a aterosclerose (doença que acomete artérias de médio e grande calibre, afetando vários sítios vasculares) (Viles-Gonzalez et al., 2004).

Uma expressiva parcela da população de indivíduos que tiveram seu primeiro evento cardíaco súbito (Síndrome coronariana aguda e/ou morte súbita) não apresentou sintomas prévios, mostrando a complexidade destes eventos e a importância do diagnóstico precoce (Naghavi et al., 2003).

A aterosclerose é uma doença difusa, multissistêmica crônica e inflamatória, que envolve os sistemas vascular, metabólico e imune com manifestações tanto locais quanto difusas. Desde 1970 cientistas têm buscado identificar os mecanismos responsáveis pela

conversão da aterosclerose coronária crônica para doença arterial coronariana aguda (Naghavi et al., 2003).

A Síndrome Coronariana Aguda (SCA) é um termo que se aplica a um conjunto de sinais e sintomas clínicos que parecem refletir diferentes graus de isquemia miocárdica aguda. A SCA deve ser entendida como um momento de instabilização da placa aterosclerótica no qual se estabelece o fenômeno trombótico subjacente, com alto risco para a oclusão total ou sub-total de artérias coronárias (Fuster et al., 2003). Isso determina condições propícias ao estabelecimento de infarto agudo do miocárdio (IAM) fatal ou não-fatal, transformando essas condições desfavoráveis em desfechos clínicos de grande importância (Fuster et al., 2003). O IAM com ou sem elevação persistente do segmento ST, a angina instável (AI) e a morte súbita compõem o espectro de manifestações da SCA.

Pacientes com desconforto isquêmico podem apresentar ou não elevação do segmento ST no Eletrocardiograma (ECG). A maioria dos pacientes com elevação do segmento ST acabam desenvolvendo um infarto onda Q (IAM-Q) ou, menos freqüentemente, um infarto sem onda Q (IAM não Q). Já os pacientes sem elevação do segmento ST desenvolvem AI ou Infarto Agudo sem supradesnivelamento persistente do segmento ST (IAMSSST) (Braunwald et al., 2002a). Devido a inúmeras semelhanças observadas na fisiopatologia, no quadro clínico e na terapêutica, a AI e o IAMSSST são agrupados sob a denominação de síndrome

coronariana aguda sem supradesnivelamento do segmento ST (SCASSST) (Braunwald et al., 2000).

Tanto a AI quanto o IAMSSST são condições em que há um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio e suas principais causas são: (1) trombo não oclusivo em uma placa pré-existente, (2) obstrução dinâmica (vasoconstrição ou espasmo coronário), (3) obstrução mecânica progressiva, (4) inflamação e/ou infecção e (5) AI secundária. Sendo que, estas causas, não são exclusivas, podendo ocorrer mais de uma no mesmo paciente (Braunwald et al., 2002a). Na fisiopatogenia da SCASSST, normalmente, a aterosclerose é a principal causa associada ao desenvolvimento da doença arterial (Braunwald et al., 2000).

O conhecimento da fisiopatogenia da SCA permitiu identificar na trombose o evento central da AI. Paralelamente, se evidenciou que a inflamação é parte importante neste processo. A aterosclerose é, morfológicamente, uma doença inflamatória, sendo que achados histológicos demonstram que os locais de ruptura das placas ateroscleróticas coronarianas se caracterizam pela presença de macrófagos ativados e células musculares lisas.

A angina *pectoris* é caracterizada por dor torácica associada ao aporte insuficiente de oxigênio. A dor reflete, usualmente, um quadro obstrutivo ao fluxo sanguíneo, quer associado à redução do lúmen arterial por lesões ateroscleróticas quer associado a espasmo coronariano. A angina *pectoris* é denominada estável quando se prolonga por várias semanas ou até meses, sem clara deterioração. Passa a ser denominada instável quando os sintomas mudam de

padrão (intensidade, frequência e evento desencadeante), são de recente começo, progredem de maneira acelerada ou são desencadeadas em repouso (*Management of stable angina pectoris: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, 1997*).

A AI diferencia-se de IAM por ausência de alterações eletrocardiográficas evolutivas características, bem como por inalterações nos marcadores séricos de necrose miocárdica. Em específico, elevações séricas nos níveis de troponinas T e I que identificam a presença de necrose de células miocárdicas e, conseqüentemente, de IAM (Braunwald et al., 2002b).

Clinicamente, a transição de DAC estável para SCA coincide com o aumento nos níveis de marcadores séricos inflamatórios (como proteína C reativa, Amiloide A ou Interleucina-6), que sugerem que o mecanismo inflamatório local pode contribuir para a instabilidade da placa e o endotélio é o alvo principal dos mediadores inflamatórios (Fichtlscherer et al., 2004).

O PAPEL DO ENDOTÉLIO NO FUNCIONAMENTO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR

O endotélio recobre todos os vasos do organismo, desde o coração, grandes, médias e pequenas artérias, microartérias e capilares, bem como toda a árvore venosa, veias pós-capilares, pequenas, médias e grandes veias que conduzem o sangue de volta

ao coração e os vasos linfáticos (Nascimento et al., 2003). Para que ocorra um adequado suprimento de sangue aos tecidos é necessário que o endotélio esteja íntegro, sendo assim, em qualquer situação de rompimento na continuidade de suas células, as mesmas se reorganizam para refazer a conexão intercelular.

A célula endotelial é capaz de, através de uma extensa rede de transmissão de dados, detectar mínimas alterações na pressão arterial, no fluxo sanguíneo, no balanço oxidativo, na coagulação, no sinal de inflamação e na ativação do sistema imune (Nascimento et al., 2003). A necessidade de uma rede integrada se deve ao fato de que o principal produto liberado pelo endotélio, o óxido nítrico (NO), possui uma meia-vida menor do que 50 segundos e, portanto, não consegue atingir vários diâmetros celulares livremente pela circulação (Nascimento et al., 2003).

A perda da integridade endotelial é um dos critérios para considerar uma placa vulnerável e, conseqüentemente, um dos critérios para classificar um paciente como “vulnerável”. “Paciente Vulnerável” é um termo proposto para identificar pessoas com maior probabilidade de desenvolver eventos cardíacos em um curto período de tempo (Naghavi et al., 2003).

O NO é conhecido por sua importante capacidade vasodilatadora, mesmo não sendo essa sua exclusiva potencialidade (Laurindo et al., 2003a). A molécula de NO em estado gasoso é um radical livre, de fácil difusão e que cruza membranas celulares. Esta natureza confere ao NO uma capacidade de reagir com outros radicais livres ou com o oxigênio molecular (que é um di-radical).

Dentre os produtos de oxidação do NO, o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-) são seus principais metabólitos fisiológicos em meio aquoso e que podem ser mensurados como índices da produção de NO em um determinado sistema biológico (Laurindo et al., 2003a).

O NO é sintetizado por enzimas denominadas *óxido nítrico sintases* (NOS), as quais se apresentam em três diferentes isoformas: a isoforma NOS neuronal ou nNOS originalmente identificada no cérebro, a NOS induzível ou iNOS verificada em macrófagos e a eNOS presente nas células endoteliais (Laurindo et al., 2003b). Estas diferentes isoformas estão bem caracterizadas e são codificadas por genes distintos. A eNOS é responsável pela síntese de NO na circulação coronária em condições fisiológicas e apresenta o mecanismo de ativação mais elaborado entre as três isoformas, refletindo a complexidade do controle fisiológico dos diferentes leitos vasculares (Laurindo et al., 2003a). Além disso, o principal mecanismo pelo qual as células endoteliais enfrentam as doenças vasculares é através da síntese de eNOS que irá gerar o NO que é vasoprotetor (Förstermann & Münzel, 2006).

Evidências apontam que, desarranjos no metabolismo ou nas funções regulatórias do endotélio estão associados à fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares.

A função endotelial é dinamicamente regulada e suas propriedades, vasodilatadora, antiinflamatória e antitrombótica são reduzidas por uma série de doenças, incluindo aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, inflamação e envelhecimento (Willerson & Kereiakes, 2003). A disfunção endotelial coronária ou

vascular periférica constitui fator preditor independente de eventos cardiovasculares em pacientes com SCA (Fichtlscherer et al., 2004).

A disfunção endotelial é uma doença sistêmica que, além de representar um elemento crítico na patogênese e na progressão da aterosclerose, também prediz a recorrência da instabilidade em pacientes com SCA prévia. O fenótipo vascular parece refletir a persistente ativação inflamatória endotelial causada pela ruptura da placa e a persistência no aumento de marcadores inflamatórios é que acaba levando a recorrência da instabilidade da placa (Fichtlscherer et al., 2004).

Fatores de risco como tabagismo, hipertensão vascular, hiperglicemia ou dislipidemia podem levar o endotélio a uma geração excessiva de superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), que, envolvidos no estresse oxidativo, podem levar a um ciclo bioquímico “vicioso” gerando disfunção endotelial (Förstermann & Münzel, 2006). O $O_2^{\cdot-}$ reage avidamente com o NO vascular para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). O cofator BH_4 da eNOS é altamente sensível a oxidação pelo $ONOO^-$ e a redução nos níveis do cofator promove a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela eNOS. Esta transformação da eNOS de enzima protetora para enzima favorecedora do estresse oxidativo, tem sido observada em modelos *in vitro*, em modelos animais de doença cardiovascular, assim como em pacientes com fatores de risco cardiovascular (Förstermann & Münzel, 2006).

Desta forma, podemos considerar a disfunção endotelial como um exemplo de problema biológico complexo e multifatorial onde

diferentes fatores casuais, ambientais e genéticos contribuem para a expressão de um fenótipo vascular inflamado.

GENES E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Polimorfismos genéticos são comuns e poderiam representar fatores de risco quando em associação com fatores ambientais adicionais. Mesmo com a indiscutível importância dos fatores ambientais na gênese da DAC, hoje, admite-se que a herdabilidade de risco cardiovascular seja um importante componente para o desenvolvimento desta patologia. Assim, as complexas doenças coronarianas seriam resultantes da combinação de um ambiente inadequado e da suscetibilidade genética do indivíduo. Por isso, estudos que associem alterações em determinados genes e desenvolvimento de doenças são de grande importância.

GENE QUE CODIFICA PARA eNOS (*NOS3*)

O gene *NOS3* é responsável pela síntese da eNOS (Marsden et al., 1993). Alguns dos muitos polimorfismos descritos nesse gene são considerados “polimorfismos associados a risco” para o desenvolvimento de DAC. (Casas et al., 2006).

Além disso, estes polimorfismos, quando associados aos fatores de risco ambientais (estilo de vida) como, por exemplo,

colesterol alterado, obesidade, sedentarismo, estresse e tabagismo, poderiam atuar sinergicamente na patogênese de aterosclerose e DAC, que são doenças tipicamente multifatoriais (Navarro López, 2002).

A capacidade de conter o estresse oxidativo gerado no próprio endotélio e a integridade da função endotelial pode depender do funcionamento adequado da eNOS, que é responsável pela síntese de NO que será disponibilizado ao endotélio (Navarro López, 2002; Fatini et al., 2004a). Além disso, o endotélio mantém, através da produção de NO, o balanço oxidativo, contendo a ação de radicais livres de oxigênio (ânions superóxido, O_2^-) liberados durante o metabolismo do tecido. Em condições normais, a produção de NO predomina sobre a geração de ânions superóxido mantendo o balanço sob controle. Se a produção de NO for insuficiente ou a geração de radicais livres de oxigênio for excessiva, este balanço pode ser quebrado e predominar o fenômeno oxidativo que induz a disfunção endotelial (Patterson, 2001). Assim, propõe-se que o gene que codifica a eNOS possa estar intimamente relacionado com o desenvolvimento e progressão de DAC, já que polimorfismos em *NOS3*, podem causar disfunção endotelial.

O gene *NOS3* que codifica para eNOS está localizado no cromossomo 7 (7q35-36), mede 4.4Kb de DNA genômico, compreende 26 exons que codificam uma proteína de 1203 aminoácidos com 135 kD (Marsden et al., 1993). As variações no gene *NOS3* mais comumente estudadas incluem diversas substituições de único nucleotídeo (SNPs) encontrados tanto nas

regiões regulatórias quanto na região codificadora e também repetições variáveis em tandem (VNTR) (Casas et al., 2006).

As variantes polimórficas $-786T>C$, $894G>T$ e o VNTR no intron 4 a/b têm sido tentativamente associadas com DAC em muitos estudos, embora os resultados sejam conflitantes. Além disso, existem poucos trabalhos relacionando essas variantes da eNOS entre si (estudos envolvendo os haplótipos), bem como com os fatores de estilo de vida, que sabidamente, correspondem a fatores de risco para desenvolvimento de DAC. A maioria das investigações tem como foco a abordagem de um “gene candidato” ou um “polimorfismo candidato” (Casas et al., 2006). O conhecimento de haplótipos e de padrões de desequilíbrio de ligação no gene *NOS3* deve representar uma linha de investigação mais representativa do papel de *NOS3* no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Além disso, os estudos associativos realizados com estes polimorfismos ainda são feitos em grupos étnicos restritos (envolvendo populações de países da Ásia e da Europa), sendo insipiente ainda a publicação de resultados obtidos em países latinos, como o Brasil onde a população apresenta grande miscigenação.

A variante polimórfica $-786T>C$ é uma SNP, localizada na região promotora do gene *NOS3*, de uma timina (T) para uma citosina (C) na base -786 (Nakayama et al., 1999). Esse polimorfismo resulta numa significativa redução na atividade promotora do gene *eNOS* (Nakayama et al., 1999) que leva a redução na síntese de NO circulante e, conseqüentemente, a

disfunção endotelial (Kim et al., 2007). Os primeiros estudos correlacionaram este SNP ao vasoespasm (Fatini et al., 2004a; Erbs et al., 2003). Além disso, diversos grupos buscaram demonstrar a relação entre a SNP -786T>C e DAC. Em estudo realizado com 1225 sujeitos o alelo -786C se mostrou fator de risco para DAC, especialmente para lesões em múltiplos vasos (Rossi et al, 2003). Ainda, em um trabalho que visou verificar a eficácia de um treinamento físico na melhora de pacientes com DAC e a associação com o polimorfismo na região promotora do gene *eNOS*, verificou-se que os menos favorecidos na melhora da função endotelial foram os que apresentavam -786C (Erbs et al., 2003). Existem evidências de diferenças referentes à etnia dos grupos estudados, tanto na frequência genotípica de homozigotos -786CC (1,10% em asiáticos X 15,36% em não-asiáticos; $P < 0,0001$) quanto na frequência do alelo -786C (10,7% em asiáticos X 39,1% em não-asiáticos; $P < 0,0001$), além disso, parece não haver consenso nos resultados obtidos por diferentes trabalhos, embora existam diferenças quanto ao modelo probabilístico (Casas et al., 2004).

A variante polimórfica 894G>T é uma SNP, dentro do éxon 7 do gene *NOS3*, de uma guanina (G) para uma timina (T) na base 894 que leva à modificação do resíduo conservado de ácido glutâmico para um ácido aspártico no aminoácido 298 da seqüência protéica (Glu298Asp) do domínio da estrutura extracelular do *NOS3* (Hingorani, et al., 1999). O genótipo 894TT (298Asp) de 894G>T tem sido associado com baixa disponibilidade de NO, causada, principalmente, por uma redução basal na produção de NO (Veldman

et al., 2002). A eNOS 298Asp está sujeita a clivagem proteolítica nas células endoteliais e nos tecidos vasculares, o que pode levar a uma menor geração de NO vascular (Tesauro et al., 2000).

Os estudos de prevalência deste polimorfismo em pacientes com DAC ainda apresentam resultados conflitantes. Casas e colaboradores (2004) relataram em uma meta-análise envolvendo 6036 pacientes com cardiopatia isquêmica e 6106 controles, de diferentes estudos publicados, diferenças étnicas, tanto na frequência de homozigotos 894TT, quanto na frequência do alelo 894T. No entanto, não encontraram associação entre portadores de pelo menos um alelo 894T e risco de doença arterial isquêmica. Quando um modelo de codominância foi utilizado (AspAsp X GluGlu) a comparação foi estatisticamente significativa enquanto que a heterozigose (GluAsp X GluGlu) não foi diferente (Casas et al., 2004). Em meta-análise mais recente, os autores demonstraram que há um risco aditivo do alelo raro 894T (298Asp) para DAC (Casas et al. 2006). Cam et al. (2005), investigaram uma população da Turquia e encontraram que o genótipo 894TT estava associado com maior risco de chance de desenvolvimento de DAC prematura, e que, 894GG era fator protetor. A análise multivariada, nesse caso, demonstrou associação de 894G>T independente de outros fatores de risco para desenvolvimento de DAC.

Em pacientes que necessitaram de tratamento vasoconstritor durante cirurgia cardíaca, foi confirmada que a vasopressão em resposta a fenilefrina (estimulação alfa adrenérgica) é mais intensa em portadores do alelo 894T (tanto 894TT, quanto 894GT) do que

em homozigotos 894GG, o que indica que a capacidade vasodilatadora é deprimida pela redução de NO (Navarro López, 2002). Em dados publicados do The Bogalusa Heart Study (estudo populacional da história natural da aterosclerose em crianças e jovens adultos de uma comunidade semi-rural, bi-étnica – 65% caucasóides; 35% afro-americanos - de Bogalusa, Louisiana) (Chen et al., 2004), também foi verificada diferença estatisticamente significativa relativa à frequência do alelo 894T e etnia, sendo esta menor entre afro-americanos do que em caucasóides. Além disso, afro-americanos portadores do alelo 894T também tiveram menor pressão sistólica o que não ocorreu entre os caucasóides. O polimorfismo *894G>T* também esteve associado com medidas de rigidez da parede arterial em afro-americanos (Chen et al., 2004). Ainda, em outros estudos, *894G>T* também esteve associado a: espasmo coronário difuso (Chang et al., 2003), risco de IAM e morte um ano após colocação de stent (Gorchakova et al., 2003), reestenose em stent (Gomma et al., 2002), ao potencial aterogênico em pacientes com diabetes (Zhang et al., 2006). Contudo, alguns trabalhos não encontraram a mesma associação com desenvolvimento de DAC (Fatini et al., 2004a; Erbs et al., 2003; Nassar et al., 2001).

A variante polimórfica VNTR intron 4 a/b é caracterizado por 27 pares de bases (pb) repetidos no intron 4 do gene *NOS3*. Apresentará quatro repetições quando for Intron 4 a/a e cinco repetições quando for Intron 4 b/b (Yoon et al., 2000). O genótipo Intron a/a foi relacionado com predisposição a SCA, em particular,

de IAM e foi fator de risco independente do tabagismo para desenvolvimento de DAC em uma população na Itália (Fatini et al., 2004a). Apesar de algumas evidências positivas, os resultados ainda são conflitantes. Matyar e colaboradores (2005) demonstraram que o alelo Intron 4a não foi preditor independente para DAC e que a presença de risco só é verificada quando associado aos fatores de risco clássicos (FRC) para DAC, como gênero, HAS, DM, idade e tabagismo.

Estudos associativos envolvendo DAC e duas ou as três variantes polimórficas do gene da eNOS (-786T>C, 894G>T e o VNTR no intron 4 a/b) têm sido também descritas na literatura. Fatini e colaboradores (2004a) demonstraram que -786T>C apresenta interações com o VNTR intron 4 a/b. No referente estudo, o genótipo -786CC modulou a suscetibilidade a SCA em homozigotos Intron 4 a/a em pacientes com hiperhomocisteinemia. Em recente estudo com brasileiros da região sul, Rios et al. (2005), demonstraram que -786T>C foi associado com DAC severa tanto em nível de alelo (-786C) quanto nos haplótipos analisados. Ainda assim, em outro trabalho (Fatini et al. 2004b) não demonstram a mesma relação e -786T>C não constituiu risco associado a desenvolvimento de DAC e o alelo -786C não foi preditor de aterosclerose ou SCA, particularmente em caucasóides.

Em outro estudo, com objetivo de verificar o papel dos polimorfismos da eNOS (-786T>C, 894G>T, VNTR intron 4 a/b) nos níveis de nitrito e nitrato plasmáticos (NOx) de afro-americanos, foi demonstrada uma associação positiva entre os níveis de NOx no

plasma e pressão arterial entre normotensos dessa população que portavam, pelo menos, um alelo Intron 4a. A frequência do alelo Intron 4a foi significativamente maior em afro-americanos do que em outros grupos étnicos e este dado pode ajudar no entendimento da maior suscetibilidade genética desse grupo à hipertensão (Li et al., 2004).

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar o papel dos três polimorfismos (-786T>C, 894G>T e VNTR intron 4 a/b) do gene NOS3 como fator de predisposição a SCA e avaliar a interação destes com os FRC da doença.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar os pacientes quanto aos polimorfismos -786T>C, 894G>T e VNTR intron 4 a/b do gene NOS3.
- Descrever as frequências alélicas e genotípicas dos mesmos.
- Verificar se há associação entre as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados e SCA.
- Fazer a análise de haplótipos e a associação com o risco de desenvolvimento de SCA.
- Associar os polimorfismos estudados com os principais fatores de risco cardiovasculares clássicos (dislipidemia, tabagismo, gênero, obesidade, hipertensão, diabetes e história familiar de doenças cardiovasculares).
- Analisar se há interação entre os alelos de risco C (-786T>C), T (894G>T) e 4a (VNTR Intron 4 a/b) com desenvolvimento de SCA.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

INTERACTION BETWEEN ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE POLYMORPHISMS (-786T>C, 894G>T and Intron 4 a/b) AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN ACUTE CORONARY SYNDROMES

Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^a, Fernanda Hamester^a, Josiane Bettim Bandinelli^a, Ilan Maltz Turkienicz^a, José Artur Bogo Chies^b, Alessandra Peres^c, Luiz Carlos Bodanese^d, Euler Roberto Fernandes Manenti^d, Maurício Reis Bogo^a.

**INTERACTION BETWEEN ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE
POLYMORPHISMS (-786T>C, 894G>T and Intron 4 a/b) AND
CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN ACUTE CORONARY SYNDROMES**

Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^a, Fernanda Irma Remus Hamester^a, Josiane Bettim Bandinelli^a, Ilan Maltz Turkienicz^a, José Artur Bogo Chies^b, Alessandra Peres^c, Luiz Carlos Bodanese^d, Euler Roberto Fernandes Manenti^d, Maurício Reis Bogo^a.

^a Centro de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av Ipiranga 6681/172. Partenon, Porto Alegre-RS, Brasil.

^b Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Campus do Vale. Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323 Porto Alegre-RS, Brasil.

^c Centro Universitário IPA Metodista. Rua Cel Joaquim Pedro Salgado, 60. Bairro Rio Branco. Porto Alegre-RS, Brasil.

^d Serviço de Cardiologia, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av Ipiranga 6690. Jardim Botânico, Porto Alegre-RS, Brasil.

Corresponding author:

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12C - Sala 172

Partenon. CEP 90619-900 - Porto Alegre, RS - Brasil - Caixa-Postal: 1429

Tel.: +55 51 3320-3500 4726, fax: +55 51 3320-3568

E-mail address: mbogo@pucri.br (M. R. Bogo)

ABSTRACT

Endothelial nitric oxide (NO) is an important factor for the regulation of vascular tonus and it was suggested to be involved in many events of the atherogenic process. The endothelial rupture of coronary plaque can represent the pathomorphological substratum of the acute coronary syndrome (ACS). Polymorphisms in the *NOS3* gene that code the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) -786T>C (in the promoter region), 894G>T (exon 7) and *intron 4 a/b* VNTR, can be associated with a higher susceptibility to ACS. The present study investigated the interaction of these polymorphisms (allelic frequencies, genotypes and haplotypes) and cardiovascular risk factors in 135 patients with ACS and 115 control subjects. Although we did not find statistical association between genotypic and allelic frequencies between the studied groups an association between the TT genotype (894G>T), compared to GT+GG (OR 1,4; 95% CI 1,0-1,8), and ACS was observed. No significant interactions were found among cardiovascular risk factors and both -786T>C and *intron 4 a/b* polymorphisms. Subjects without dyslipidemia and *Intron 4 a/b* genotype presented a lower chance to ACS development. Subjects without diabetes and 894TT genotype showed higher risk to ACS (OR 1.7; 95% CI 1.2 - 2.3). In patients without dyslipidemia the 894GG genotype presented a tendency to act as a protector factor to ACS (OR 0.8; 95% CI 0.6-1.0). Also, the GG genotype was a protective factor against ACS in females (OR 0.5; CI 95% 0.2 - 0.9). Our results suggest that the studied eNOS polymorphisms can act as an additional risk factors in development of ACS.

KEY-WORDS: eNOS, Endothelial nitric oxide polymorphisms, cardiovascular risk factors, nitric oxide

INTRODUCTION

The vascular endothelium plays an important role in the development of cardiovascular diseases. An increased understanding of the mechanisms underlying endothelial dysfunction, nitric oxide (NO) and its interaction with cardiovascular diseases is essential in order to improve management strategies directed to this disease. NO is a gas with a half-life of several seconds that is considered an important atheroprotective mediator. Its generation is regulated through alterations both in the expression as well as in the activity of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) itself (due to genetic variability) or through alterations in the availability of activating cofactors or endogenous inhibitor molecules [1,2,3]. eNOS requirements for proper function include tetrahydrobiopterin (BH₄), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide, and flavin mononucleotide [1,4].

Nitric oxide has also a central role in vascular homeostasis. It plays a protective role by suppressing abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) following various pathological situations including atherosclerosis [1,5]. Many other vasoactive endogenous compounds like prostacyclin, thromboxane, endothelin, angiotensin, endothelium-derived hyperpolarizing factor, reactive oxygen species (ROS) and other free radicals, and bradykinin are also formed in endothelial and circulating blood cells in order to control the functions of VSMCs. This complex system is extremely vulnerable and its equilibrium may be disturbed by numerous endogenous and exogenous factors [1,4,5].

The NOS3 gene was localized to chromosome 7q35-36 [6] and the eNOS protein synthesizes NO constitutively via a reaction including the conversion of L-arginine to L-citrulline, which involves the transfer of five electrons provided by

NADPH [7]. NO is not stored but rather released upon its synthesis. NO from the endothelium is considered an important atheroprotective mediator [8].

Several polymorphisms were identified in the eNOS gene. Much attention has been focused on putatively functional variants: -786T>C (rs2070744), 894G>T (Glu298Asp) (rs1799983) and intron 4 a/b VNTR (27-bp repeat) [9]. A single nucleotide polymorphism (SNP), -786T>C, was identified in the 5' flanking region of the eNOS involving a substitution of thymine (T) to cytosine (C) at a locus 786 base pairs upstream of the eNOS [10]. This variant, which results in a significant reduction in the eNOS gene promoter activity, has been associated with an increased risk for coronary spasm in a Japanese population [10] and was associated with severe cardiovascular arterial disease (CAD) in patients from Porto Alegre (Southern from Brazil) [11]. Another common variation of the eNOS that leads to an amino acid substitution in the mature protein is the 894G>T or Glu298Asp variant, in which a guanine/thymine substitution at exon 7 leads to a glutamate/aspartate substitution at position 298 [12]. This variant has been associated with CAD [12] but not all studies have confirmed this data. The intron 4 a/b variant corresponds to a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the eNOS gene. The two commonest alleles contain four (allele a) and five (allele b) repeats [13]. In some studies the eNOS intron 4 a/b VNTR polymorphism was also associated with altered plasma NO levels and responsible for variations in the genetic control of plasma nitrite and nitrate levels and enzyme production [14]. Recent evidence indicates a transcriptional effect for the VNTR in intron 4 [15]. However, the relationship between this polymorphism and CAD remain unclear.

Casas et al [16] addressed the association of eNOS polymorphisms with cardiovascular disease in a large meta-analysis. The results showed per-allele odds ratios (OR) of 1.2 (95% CI 1.07-1.28) for -786T>C, OR 1.2 (95% CI 1.07-

1.28) for 894G>T, and 1.1 (95% CI 1.01-1.24) for intron 4 a/b. However, few studies investigating gene-gene, gene-environment or gene-cardiovascular risk factors interactions have been described. Therefore, association among NOS3 polymorphisms with hypertension, preeclampsia, stroke, and diabetes remain to be elucidated [17]. Interestingly, some recent studies suggest the association of different eNOS haplotypes with diabetes, hypertension [17], hyperhomocysteinemia [18] and acute coronary syndromes [11].

In this context the present study investigated the interactions among the -786T>C, 894G>T and intron 4 a/b eNOS polymorphisms (genotypes and haplotypes) and cardiovascular risk factors in setting of acute coronary syndromes.

METHODS

Design and Subjects

A case-control study was performed in Rio Grande do Sul (RS), the southernmost state of Brazil. The Ethics Committee of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), approved the study protocol. The informed consent was obtained from all individuals whose data was collected prospectively. The study was structured considering the checklist for reporting and appraising of gene diseases associations proposed by Little et al. [19].

We excluded first or second-degree relatives of subjects to avoid genetic frequency bias. Alves-Silva et al. [20] and Parra et al. [21] studying ethnic ancestry of the South-Brazilian population emphasized that massive inter-ethnic crosses occurred during the 500 years of Brazilian history, and underline that large urban areas, such as Porto Alegre do not present significant isolated ethnical groups. Thus, according to Prado-Lima et al. [22] our patients were from a single population, and no stratification is presented here.

One hundred thirty five patients were recruited from São Lucas Hospital (SLH), Brazil, with acute coronary syndrome (ACS) and one hundred fifteen control subjects from community. Minimal and maximal ages were 35 and 89 years old, respectively. The sample consisted in 145 males (58.7%) and 102 females (41.3%). Previous history of cardiovascular disease was an exclusion criteria to the control group. Therefore, subjects with classical cardiovascular risk were included in the study. The recruitment period, sample collection, and analysis occurred between 2001 April and December 2005. Clinical and laboratory

staff were blind to genotype and clinical condition respectively, during all experimental procedures. All subjects filled an interview including demographic characteristics (age, gender) and were examined to clinical and previous history of cardiovascular risk factors presence.

Biological and cardiovascular risk factor variables

The body mass index was calculated dividing weight (kg) by height squared (m²) [23]. We used standard desk mercury sphygmomanometers and stethoscopes to assess the blood pressure measurement (BP) (III Consenso Brasileiro de Hipertensão, 1998) [24].

Cardiovascular risk factors

a) Diabetes mellitus (DM): individuals with glycemic levels above 126 mg/dL and those in use of medicines to lower glucose were considered diabetics; b) obesity: those with body mass index ≥ 30 were considered obese; c) sedentarism: those who performed physical activity less than three times a week; d) tabagism: tobacco use was assessed by related history and the individuals were classified in smokers or non-smokers; e) dyslipidemia: subjects with total cholesterol (≥ 240 mg/dL), LDL-c (≥ 160 mg/dL) or elevated TG (≥ 200 mg/dL) were considered dyslipidemic as well as those who used drugs to lower cholesterol (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Diretriz de Prevenção da aterosclerose) [25]; f) hypertension: systolic blood pressure levels ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure levels ≥ 90 mmHg, or both, were considered hypertensive.

Molecular variables

Blood samples of a peripheral vein were withdrawn according to the venoclysis system with a disposable vacuum device (Vacutainer) and stored in tubes with 0.1% EDTA (final volume at the concentration of 1 mg/dL). After this,

the material collected was maintained at 4°C until DNA extraction for over 24 hours. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a GFX Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences Inc., Co.) kit.

Genotype determination

Genotypes for the -786T>C polymorphism in the 5'-flanking region of eNOS were determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification using the primers 5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3' (sense) and 5'-GCCTCCACCCCCAC CCTGTC-3' (antisense) and PCR conditions previously described by González-Ordóñez et al. [26] The amplified products (180 pb) were digested with MspI for at least 3h, at 37 °C, producing fragments of 140 and 40 bp for the wild type allele (T allele), or 90, 50, and 40 bp in the case of a polymorphic variant (C allele). For the detection of the 894G>T polymorphism in exon 7, the primers 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATG-3' (sense) and 5'-TCCCTTTGGTGCTACGT -3' (antisense), and PCR conditions previously described by Gilerott et al. [27] were used. The resulting 258 bp fragment was digested with the enzyme Mbol I for 16 h, at 37 °C, producing fragments of 248pb (G allele) and 158pb and 90pb (T allele). -786T>C and 894G>T fragments were separated by electrophoresis in 3% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. Genotypes for the polymorphic VNTR in intron 4 a/b were determined by PCR using the 5'-AGGCCCTATGGTAGTGC-3' (sense) and 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGT-3'(antisense), and PCR conditions the previously described by Li et al. [28]. The genotypes were determined by visualization in 6% polyacrylamide gel. A fragment of 420 bp determined the genotype 4 b/b; fragments of 420 and 393 bp, genotype 4 a/b; and a fragment of 393 bp, genotype 4 a/a.

Statistical Analysis

The allelic and genotypic frequencies were tested to equilibrium by the Hardy–Weinberg law. The significance of allele frequency or genotype distribution among controls with different smoking habits was examined by non-parametric chi-square test or Fischer’s exact test (two-tailed). Multivariate analyses, including gender and age effects, were conducted with multiple logistic regression methods and estimates of conditional relative risk and 95% confidence interval (CI). Statistical analyses were performed by means of the SPSS/PC Statistical Package Version 11.5 (SPSS, Inc., IL). All P-values were two-tailed. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. To test intervenient factors we performed a multivariate analysis using the Forward Wald logistic regression.

RESULTS

From the 250 subjects included in this study, case (135) and control (115), mean ages were 61.3 ± 12.2 years and 61.8 ± 10.7 years, respectively. The patients group presented 47.4% (64) males and 52.7% (71) females, and in the control group the frequency of males was 72.3% (81) and females was 27.7% (31). ACS group showed significant higher prevalence of classical cardiovascular risk factors than control group, except for smoking habit (Table 1).

Table 1 here

Allelic frequencies for the -786T>C polymorphism were 0.36 and 0.64 (for C and T allele respectively) among the patients and 0.32 and 0.68 among controls ($p=0.52$). For polymorphism 894G>T, allelic frequencies were 0.38 and 0.62 (alleles T and G, respectively) among patients and 0.25 and 0.75 among controls ($p=0.08$). In the intronic polymorphism studied, frequencies for the 4a allele were 0.38 and 0.25 respectively among patients and controls. We did not find a significant statistical association between these allelic frequencies and ACS.

Comparison of the eNOS gene -786T>C, 894G>T and intron 4 a/b polymorphism genotypic frequencies in patients and controls were performed and the results are shown in Table 2. When we assumed a recessive model of inheritance, a significant association between the homozygosity for the T variant of 894G>T and ACS was found [TT x (GT+GG)] (OR 1,4; 95% CI 1.1-1.8).

Table 2 here

Additional analysis comparing haplotypes between groups were performed (Table 3) and the results did not show significant association to ACS.

Table 3 here

Interaction between the eNOS polymorphisms studied and five considered classical cardiovascular risk factors (gender, hypertension, diabetes, dyslipidemia and obesity) were evaluated. Since the informations about smoking habit and cardiovascular family history were incomplete, they were not included in the analysis.

No significant interaction was found when cardiovascular risk factors and -786T>C or Intron 4 a/b polymorphisms were tested (data not shown). Interestingly, patients without dyslipidemia and with intron 4 a/b genotype presented lower probability to develop ACS. However, when the same approach was used to test 894G>T polymorphism, significant interactions with gender, diabetes and dyslipidemia (Table 4) were observed. Patients Without diabetes and with TT genotype presented a higher risk to ACS than diabetic TT patients (OR 1.6; 95% CI 1.2 - 2.3).

Subjects without dyslipidemia and GG genotype in presented a tendency to be a significant protector factor (OR 0.8; 95% CI 0.6 - 1.0). Also, females with GG genotype showed a protective factor to ACS (OR 0.5; 95% CI 0.2 - 0.9).

Table 4 here

Additionally, we analyzed the interaction between eNOS haplotypes and cardiovascular risk factor. In this analyses we considered the H1 (T-G-B) haplotype and H2 (T-G-A) + H3 (T-T-B) + H5 (C-G-B) haplotypes and H4 (T-T-A) + H6 (C-G-A) + H7 (C-T-B) +H8 (C+T+A). The odds ratio presented in Table 5 showed that in the three groups (H1 / H2 +H3+ H5 / H4 +H6 + H7 +H8) and ACS association were significant related to classical cardiovascular risk. In other words, subjects with diabetes, hypertension and obesity showed higher chance to present ACS in all haplotypes groups.

Table 5 here

Even when subjects with cardiovascular risks were excluded from the control group, we did not find positive association between eNOS polymorphism and ACS. Surprisingly, in the analyses performed females presented more chance to develop ACS than males. Another interesting point is a possible additive effect of haplotypes considering diabetes, because had occurred an increase in the chance to develop ACS from 4.4 to 6.4 when the subjects have wildtype haplotypes or at least two variant alleles (Table 5).

Logistic regression confirmed the results obtained suggesting that risk and protective factor observed in univariate analysis were strongly influenced by classical risk factors and eNOS polymorphism.

DISCUSSION

We analyzed here the interaction between eNOS polymorphisms (allelic, genotypic and haplotypic frequencies) and classical cardiovascular risk factors associated to ACS in a South-Brazilian population. The results suggested that the polymorphic variants studied (-786T>C, 894G>T and intron 4 a/b) are not independent risk factors to develop ACS.

Polymorphisms in the eNOS gene are well characterized and much attention has been focused on three of them -786T>C, 894G>T [Glu298Asp] and intron 4 a/b. Kim et al. [29] recently studied 147 Korean patients with coronary artery disease and 222 control subjects. The authors demonstrated that eNOS polymorphisms -786T>C and Intron 4 a/b are only associated with coronary artery disease after adjustments for cardiovascular risk factors. Therefore, like our study, it was suggested that eNOS polymorphisms -786T>C, 894G>T and intron 4 a/b are not independent ACS risk factors. Erbs et al. [30] investigating Germany coronary artery diseases patients also suggested that both -786T>C and 894G>T contribute to a deterioration of endothelial function in the presence of typical cardiovascular risk factor.

When a recessive model of inheritance was assumed to 894G>T (TT X GT+GG), a significant association between the homozygosity for the variant T of 894G>T polymorphism and ACS was found (Table 2). This result can be indicative of an important functional role of this genotype in the synthesis of the eNO and in the setting of SCA. Furthermore, the genotype 894TT was independently associated with cardiovascular diseases in a Turkish population [31].

Studies describing a protective activity associated with wildtype genotypes were also published. Sandrim et al. [32] performed a genetic investigation in a

South-Brazilian population and observed that C-G-B haplotype was associated with a lower risk of developing hypertension. In our study we also found that, considering the 894G>T polymorphism, the GG genotype presented a protective activity in women. However, in the haplotypes and logistic regression analysis these results are not confirmed.

Casas et al. [16] performed a review about endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular diseases considering the three polymorphisms studied here. Physiological, biochemical and molecular investigations suggest that the mutated variants are associated with low plasma nitric oxide concentrations and reduced vascular reactivity. However, the authors comment that there are difficulties in measuring those phenotypes. For this reason, the functional role of these polymorphisms remains unclear. The meta-analysis of NOS3 polymorphisms in coronary heart disease including studies in all languages published until February 2006, revealed per-allele OR 1.2 (95% CI 1.1 - 1.3) for 894G>T, OR 1.2 (95% CI 1.1 -1.3) for -786T>C, and OR 1.1 (95% CI 1.0 -1.2) for intron 4 a/b. On the other hand, associations of eNOS polymorphisms with hypertension, preeclampsia, stroke, and diabetes remain uncertain.

Established cardiovascular risk factors, including dyslipidemia, smoking, hypertension and diabetes mellitus, have been incorporated into algorithms for risk assessment in the general population [33] but these characteristics do not fully explain cardiovascular risk. There is substantial interest in the use of new biomarkers to identify persons who are at risk for the development of cardiovascular disease and who could be targeted for preventive measures [34]. Many individual biomarkers have been related to cardiovascular risk in ambulatory persons, including inflammatory markers and genetic polymorphisms. Nevertheless, the use of such biomarkers adds only moderately to standard risk

factors for risk assessment of individual persons. Wang et al, [35] evaluated the usefulness of 10 biomarkers as predictors of death and major cardiovascular events in a large, community-based cohort. They concluded that the studied biomarkers add only moderate risk to standard risk factors. Studies with genetics polymorphisms demonstrated the same relation. Pereira et al. [36] studied a relationship between plasma cholesterol and blood pressure in eNOS gene variant (894G>T). This study shows that NO metabolism plays a significant role in the mechanistic interaction between hypercholesterolemia and hypertension.

Taking into account these results and other studies such as Heltianu et al. [37], several authors suggest that eNOS gene polymorphisms may act as an additional risk factor in the development of major vascular complications characteristic for these afflictions. Our data corroborated this hypothesis and also suggest that control population inclusion must be accurately selected to avoid bias in the result interpretations. Additionally, as comment by Casas et al. (2006) [16] more investigations need to be performed since these authors found a tendency of positive eNOS polymorphism association with cardiovascular diseases in small studies.

It is important to comment that the results obtained here and in other investigations corroborated the importance of classical cardiovascular risk factors in the ACS development. However, few investigations analyze the interactions between eNOS polymorphisms and environmental protective risk factors such as physical activity and nutrition and gene-gene interactions.

Our results suggest that the eNOS polymorphisms studied are not independent risk factor to develop ACS. One possible limitation associated to the study performed here is related to little information about life style factors (including for example nutrition, physical activity, stress and smoking habit) of

patients and controls. However, we believe that the results described contribute to elucidate the role of eNOS genetic variation in cardiovascular disease.

ACKNOWLEDGMENT

J.C.E.P. was a recipient of fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

TABLES AND FIGURES

Table 1 Cardiovascular risk factors comparison between ACS and control groups of study participants

Variables	ACS group (n=135)	Controls (n=115)	<i>p</i>
Hypertension (%)	115 (85.2)	53 (46.1)	< 0.001
Diabetes (%)	46 (34.1)	9 (7.8)	< 0.001
Dyslipidemia (%)	82 (60.7)	25 (21.7)	< 0.001
Smoking habit (%)	2 (1.5)	15 (13)	< 0.001
Familiar history (%)	59 (43.7)	1 (0.9)	< 0.001
BMI (Kg/m ²) *	30 (± 4.0)	27 (±4.4)	0.005

* BMI: Body mass index ;data are expressed as mean ±SD.

Table 2 eNOS polymorphism genotype frequencies comparison between ACS and control groups.

	Genotype	Group		<i>p</i>
		ACS n(%)	Controls n(%)	
-786T>C	CC	16 (12.1)	12 (10.5)	
	TC	63 (48.7)	52 (45.6)	
	TT	53 (40.1)	50 (43.8)	0.82
	CC x (CT+TT)			0.72
	(CC+CT) x TT			0.65
894G>T	894TT	18 (14.1)	7 (6.2)	
	894GT	52 (40.6)	44 (38.9)	
	894GG	58 (45.3)	62 (54.9)	0.09
	TT x (GT+GG)			0.05
	(TT+GT) x GG			0.24
Intron 4 a/b	4 a/a	14 (10.6)	6 (5,5)	
	4 a/b	31 (23,5)	34 (31,5)	
	4 b/b	87 (66.0)	68 (63.0)	0.19
	AA x (AB+BB)			0.13
	(AA+AB) x BB			0.89

Table 3 Estimated haplotypes frequencies in ACS and control groups.

	Haplotypes			Groups	
	-786T>C	894G>T	<i>Intron 4 a/b</i>	ACS	Control
H1	T	G	B	34.9	41.1
H2	T	G	A	9.5	9.8
H3	T	T	B	16.3	13.6
H4	T	T	A	2.4	1.4
H5	C	G	B	14.3	13.6
H6	C	G	A	6.7	8.4
H7	C	T	B	11.9	10.7
H8	C	T	A	4.0	1.4
p					0.57
χ^2					5.67

Value of P and χ^2 compared with control group.

Table 4 894G>T polymorphism and cardiovascular risk factors interaction on acute coronary syndrome (ACS).

Variables		894G>T Polymorphism					
		Groups					
		ACS n (%)			Control n (%)		
		GG	GT	TT	GG	GT	TT
Sex	Male	28 (46.7)	23 (38.3)	9 (15.0)	41 (51.3)	34 (42.5)	5 (6.3)
	Female	30 (44.1)	29 (42.6)	9 (13.2)	21 (70.0)*	8 (26.7)	1 (3.3)
		<i>p</i> 0.23					
Hypertension	HT	49 (44.5)	43 (39.1)	18 (16.4)	26 (51.0)	22 (43.1)	3 (5.9)
	No-HT	9 (50.0)	9 (50.0)	0 (0.0)	36 (58.1)	22 (35.5)	4 (6.5)
		<i>p</i> 0.18					
Diabetes	DM	16 (38.1)	24 (57.1)	2 (4.8)	6 (66.7)	3 (33.3)	0 (0.0)
	No-DM	42 (48.8)	28 (32.6)	16 (18.6)*	56 (53.8)	41 (39.4)	7 (6.7)
		<i>p</i> =0.27					
Dyslipidemia	Dys	39 (50.0)	26 (33.3)	13 (16.7)	10 (41.7)	12 (50.0)	2 (8.3)
	No-Dys	19 (38.0)*	26 (52.0)	5 (10.0)	52 (58.4)	32 (36.0)	5 (5.6)
		<i>p</i> =0.28					
Obesity	Obese	18 (45.0)	16 (40.0)	6 (15.0)	6 (46.2)	6 (46.2)	1 (7.7)
	No-obese	40 (45.5)	36 (40.9)	12 (13.6)	56 (56.0)	38 (38.0)	6 (6.0)
		<i>p</i> =0.78					
		<i>p</i> =0.14					

Data are expressed as genotypes frequencies n(%). HT: hypertension; No-HT: no hypertension; DM: diabetes mellitus; No-DM: no diabetes mellitus; Dys: dyslipidemia; No-Dys: no dyslipidemia; Ob: obesity; No-Ob: no obesity. * *p* significant.

Table 5 Odds ratio (Confidence Interval 95%) to developed ACS associated to cardiovascular risk factor and haplotypes with 0, 1 and >2 mutate eNOS alleles.

Sex		H1 (T-G-B)							
		Hypertension		Diabetes		Dyslipidemia		Obesity	
Male	Female	HT	No-HT	DM	No-DM	Dys	No-Dys	Ob	No-Ob
0.7(0.5-0.9)	1.5(1.1-2.2)	1.9(1.5-2.5)	0.3(0.2-0.5)	4.4(2.0-9.4)	0.7(0.6-0.8)	2.4(1.6-3.6)	0.5(0.4-0.7)	4.0 (1.7-8.0)	0.7(0.7-0.9)
Sex		H2 (T-G-A) + H3 (T-T-B) + H5 (C-G-B)							
		HT	No-HT	DM	No-DM	Dys	No-Dys	Ob	No-Ob
0.5(0.4-0.7)	3.4(1.9-5.7)	2.0(1.6-2.6)	0.2(0.09-0.3)	2.9(1.5-5.9)	0.8(0.6-0.9)	3.9(2.5-6.4)	0.3(0.2-0.5)	3.6(1.7-7.3)	0.7(0.6-0.9)
Sex		H4 (T-T-A) + H6 (C-G-A) + H7 (C-T-B) +H8 (C+T+A)							
		HT	No-HT	DM	No-DM	Dys	No-Dys	Ob	No-Ob
0.6(0.5-0.8)	2.2(1.2-4.1)	1.6(1.2-2.2)	0.3(0.1-0.6)	6.4(1.6-25.8)	0.7(0.6-0.9)	2.5(1.3-4.8)	0.6(0.5-0.8)	1.7(0.8-3.6)	0.8(0.7-1.0)

Data are expressed as Odds Ratio and Confidence Interval 95%. H1: wild haplotype; H2, H3 and H5: grouped haplotypes with one mutated allele; H4, H6, H7 and H8: >2 mutated allele. HT: hypertension; No-HT: no hypertension; DM: diabetes mellitus; No-DM: no diabetes mellitus; Dys: dyslipidemia; No-Dys: no dyslipidemia; Ob: obesity; No-Ob: no obesity.

REFERENCES

- [1] C. Napoli, F. de Nigris, S. Williams-Ignarro, O. Pignalosa, V. Sica, L. J. Ignarro, Nitric oxide and atherosclerosis: An update, *Nitric Oxide* 15 (2006) 265–279.
- [2] I.G. Charles, C.A. Scorer, M.A. Moro, C. Fernandez, A. Chubb, J. Dawson, N. Foxwell, R.G. Knowles, S.A. Baylis, Expression of human nitric oxide synthase isozymes, *Methods Enzymol.* 268 (1996) 449-460.
- [3] P. Vallance, A. Leone, A. Calver, J. Collier, S. Moncada, Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 (1992) S60-S62.
- [4] K.M. Naseem, The role of nitric oxide in cardiovascular disease, *Molecular Aspects of Medicine* 26 (2005) 33-65.
- [5] P. Libby, Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868-874.
- [6] P.A Marsden, H.H. Heng, S.W. Scherer, R.J. Stewart, A.V. Hall, X.M. Shi, L.C. Tsui, K.T. Schappert, Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 17478–17488.
- [7] B. Mayer, B. Hemmens, Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997) 477–481.
- [8] S. Moncada, A. Higgs, The L-arginine-nitric oxide pathway, *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 2002–2012.
- [9] D.J. Stuehr, Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37 (1997) 339-359.
- [10] M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, K. Kugiyama, K. H. Ogawa, T. Motoyama, Y. Saito, Y. Ogawa, Y. Miyamoto, K. Nakao, T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm, *Circulation* 99 (1999) 2864–2870.

- [11] D.L.S. Rios, S.M. Callegari-Jacques, M.H. Hutz, Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta* 362 (2005) 138–146.
- [12] A. D. Hingorani, C. F. Liang, J. Fatibene; A.Lyon, S. Monteith, A. Parsons, S. Haydock, R.V. Hopper, N. G. Stephens, K.M. O’Shaughnessy, M. J. Brown, A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu²⁹⁸→Asp) Is a Major Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK, *Circulation* 100 (1999) 1515-1520.
- [13] Y. Yoon, J. Song, H.S. Hong, J.Q. Kim, Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1626–1630.
- [14] X.L. Wang, M.C. Mahaney, A. S. Sim, J. Wang, I. Wang, J. Blangero, L. Almasy, R. B. Badenhop, D. E. L. Wilcken. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (1997) 3147–3153.
- [15] H. Ou, Y. H. Shen, B. Utama, J. Wang, X. Wang, J. Coselli, X. L. Wang, Effect of nuclear actin on endothelial nitric oxide synthase expression, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 2509–2514.
- [16] J.P. Casas, G.L. Cavalleri, L.E. Bautista, L. Smeeth, S.E. Humphries, A.D. Hingorani, Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A HuGE Review, *American Journal of Epidemiology* 164 (2006) 921-935.
- [17] V.C. Sandrim, R.W.C. Syllos, H.R.K. Lisboa, G.S. Tres, J.E. Tanus-Santos, Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients, *Nitric Oxide* 16 (2007) 348-355.
- [18] C. Fatini, F. Sofi, E. Sticchi, F. Gensini, A.M. Gori, S. Fedi, Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and

hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes, *American Heart Journal* 147 (2004) 516-521.

[19] J. Little, L. Bradley, M.S. Bray, M. Clyne, J. Dorman, D. L. Ellsworth, J. Hanson, M. Khoury, J. Lau, T. R. O'Brien, N. Rothman, D. Stroup, E. Taioli, D. Thomas, H. Vainio, S. Wacholder, C. Weinberg, Reporting appraising and integrating data on genotype prevalence and gene–disease associations, *Am. J. Epidemiol.* 156 (2002) 300-310.

[20] J. Alves-Silva, M.S. Santos, P.E.M. Guimarães, A.C.S. Ferreira, H.J. Bandelt, S.D.J. Pena, V.F. Prado, The ancestry of Brazilian mtDNA lineages, *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 444-461.

[21] F.C. Parra, R.C. Amado, J.R. Lambertucci, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D. Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians, *PNAS* 100 (2003) 177-182.

[22] P.A.S. do Prado-Lima, J.M. Chatkin, M. Taufer, G. Oliveira, E. Silveira, C.A. Neto, F. Haggstram, L.C. Bodanese, I.B.M. da Cruz, Polymorphism of 5HT2A Serotonin Receptor Gene Is Implicated in Smoking Addiction, *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 90 (2004) 90-93.

[23] World Health Organization, Obesity: preventing and managing the global epidemic (report of a WHO consultation on obesity), World Health Organization (1997).

[24] Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Nefrologia, III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial, *Revista Brasileira de Cardiologia*, 1 (1998) 92-133.

[25] III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 7 (2001) 1-48.

[26] A.J. Gonzáles Ordóñez, J.M. Fernández Carreira, A. González Franco, L. Martín Sánchez, M.V. Alvarez, E. Coto Garcia, Two Expressive Polymorphisms on the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene (intron4, 27 pb repeat and -

786T/C) and the Venous Thromboembolism, *Thrombosis Research* 99 (2000) 563-566.

[27] G. Gillerot, H. Debaix, O. Devuyst, Genotyping: a new application for the spent dialysate in peritoneal dialysis, *Nephrology Dialysis Transplantation* 19 (2004) 1298-1301.

[28] R. Li, D. Lyn, R. Lapu-Bula, A. Oduwole, P. Igho-Pemu, B. Lankford, J. Morgan, S. Nkemdechi, G. Liu, C. Pack, N. Silvestrov, D. A. von Deutsch, Q. Song, I. K. Abukhalaf, E. Ofili, Relation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene to Plasma Nitric Oxide Level, Endothelial Function, and Blood Pressure in African Americans, *American Journal of Hypertension* 17 (2004) 560-567.

[29] I.J. Kim, J. Bae, S. W. Lim, D. H. Cha, H.J. Cho, S. Kim, D. H. Yang, S. G. Hwang, D. Oh, N.K. Kim, Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* 119 (2007) 579-585.

[30] S. Erbs, S. Möbius-Winkler, A. Linke, V. Adams, N. Doll, S. Gielen, J.F. Gummert, F. W. Mohr, G. Schuler, R. Hambrecht, Both T-786C and G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affect in-vitro endothelium-dependent relaxation of internal mammary artery rings from patients with coronary artery disease, *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 13 (2006) 826-831.

[31] S.F. Cam, C. Sekuri, I. Engiz, E. Ercam, A. Sagcan, M. Akin, A. Berdeli, The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population, *Thrombosis Research* 116 (2005) 287-292.

[32] V. C. Sandrim, R.W.C. Syllos, H.R.K. Lisboa, G.S. Tres, J.E. Tanus-Santos, Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus, *Atherosclerosis* 189 (2006) 241-246.

[33] P.W. Wilson, R.B. D'Agostino, D. Levy, A.M. Belanger, H. Silbershatz, W.B. Kannel, Prediction of coronary heart disease using risk factor categories, *Circulation* 97 (1998) 1837-1847.

[34] P.M. Ridker, N.J. Brown, D.E. Vaughan, D.G. Harrison, J.L. Mehta, Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events, *Circulation* 109 (2004) IV6-IV19.

[35] T. J. Wang, P. Gona, M. G. Larson, G. H. Tofler, D. Levy, C. Newton-Cheh, P. F. Jacques, N. Rifai, J. Selhub, S. J. Robins, E. J. Benjamin, R. B. D'Agostino, R. S. Vasan, Multiple Biomarkers for the Prediction of First Major Cardiovascular Events and Death, *The new england journal of medicine* 355 (2006) 2631-2639.

[36] A.C. Pereira, A.C. Sposito, G.F. Mota, R.S. Cunha, F.L. Herkenhoff, J.G. Mill, J.E. Krieger, Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: New evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure, *Atherosclerosis* 184 (2006) 193-200.

[37] C. Heltianu, G. Costache, A. Gafencu, M. Diaconu, M. Bodeanu, C. Cristea, K. Azibi, L. Poenaru, M. Simionescu, Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 135-142.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um considerável número de estudos epidemiológicos avaliando os polimorfismos da eNOS e DAC têm sido descritos na literatura, mas somente alguns poucos tentaram relacionar essas variantes polimórficas com SCASSST. Em ambos os casos, os resultados têm sido controversos. Muito provavelmente, essas discrepâncias possam, pelo menos em parte, ser explicadas por diferentes graus de exposição aos fatores de risco, por diferenças étnicas ou ainda por diferenças nos métodos de amostragem.

Embora em alguns casos, o desenvolvimento de DAC possa ser consequência de alteração em um único gene, na maioria dos casos, existe uma base genética multifatorial, envolvendo um número de genes e fatores ambientais que interagem para que o indivíduo desenvolva ou não a doença cardiovascular. Nestes casos, o efeito da presença de uma variante polimórfica deve ser pequeno, mas a soma de alelos “desfavoráveis” em polimorfismos de genes relacionados não.

Não houve diferença entre os grupos (SCA e controles) quanto aos genótipos e alelos estudados. A única exceção foi verificada quanto ao SNP $894G>T$ e o genótipo 894TT relacionado à SCA ($P=0,05$). Outros estudos demonstraram a mesma relação. O genótipo 894TT quando considerado isoladamente contra os demais genótipos de $894G>T$ (GG+GT) parece ser importante fator associado a DAC,

tanto em asiáticos quanto em caucasóides. Cam et al. (2005) consideraram 894TT fator de risco independente de outros FRC para DAC em uma população da Turquia. Shimasaki et al. (1998), reportaram que 894TT foi significativamente maior entre pacientes que sofreram IAM do que entre os controles em uma população japonesa. Além disso, em pacientes do Reino Unido, Hingorani e colaboradores (1999), também demonstraram a mesma associação entre o polimorfismo 894G>T e IAM. Interessantemente, Fatini e colaboradores (2004a) encontraram associação entre os modelos de herança recessiva dos polimorfismos 894G>T, -786T>C e VNTR Intron 4 a/b e SCA, mas quando esses modelos foram colocados na análise multivariada com os FRC, apenas o VNTR Intron 4 a/a foi considerado fator de risco independente. Os genótipos de risco 894TT e -786CC não foram independentes dos FRC (Fatini et al., 2004a).

Entretanto os genótipos isolados e demais modelos de recessividade ou dominância não demonstraram associação com SCA e estão em concordância com outros estudos que não verificam associação entre estes polimorfismos da eNOS e DAC ou fatores associados a ela (Cam et al., 2005; Matyar et al., 2005; Sandrim et al., 2006; Sandrim et al., 2007; Heltianu et al., 2005; Szolnoki et al., 2005).

A análise de haplótipos foi bastante interessante ao demonstrar o possível fator aditivo de cada variante estudada na presença de zero, um ou mais de um alelo de risco (-786T, 894C ou VNTR intron 4a). Foi verificada a tendência do aumento de risco

para desenvolvimento de SCA. É importante salientar que para o cálculo de incremento de risco seria necessário um número amostral maior. Desta forma, análises posteriores podem ser importantes no esclarecimento desse mecanismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Brasil. Ministério da Saúde. DATA SUS. Indicadores de mortalidade. [capturado em 2003 Jan 19]. Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2003/c08.def>

Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J.* 2004; 25:1197-207.

Naghavi M, Libby P, Flak E, Casscells W, Litovsky S, Rumberger J et al. From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient. A Call For New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I. *Circulation.* 2003;108: 1664-1672.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 1992;326:242-50.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction – summary articles: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina) – Full Text *J Am Coll Cardiol* 2002a;40:1-96.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. *Circulation.* 2000;102:1193-209.

Management of stable angina pectoris: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 1997;18:394-413.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction – summary articles: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina) *J Am Coll Cardiol* 2002b;40:1366-74.

Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher A. Prognostic Value of Systemic Endothelial Dysfunction in Patients With Acute Coronary Syndromes. Further Evidence for the Existence of the “Vulnerable” Patient. *Circulation*. 2004; 110:1926-1932.

Nascimento CA, Patriarca G, Heimann JC. Estrutura Orgânica do Endotélio Vascular. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio & Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p 1- 16.

Laurindo FRM, Liberman M, Leite PF. Substâncias Vasodilatadoras Produzidas pelo Endotélio. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio & Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003a. p. 33-42.

Laurindo FRM, Leite PF. Mecanismos de Síntese do Óxido Nítrico. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio & Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003b. p. 43-51.

Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease – From Marvel to Menace. *Circulation*. 2006; 113:1708-1714.

Willerson JT, Kereiakes DJ. Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2003; 108:2060.

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem*. 1993; 3268: 17478–88.

Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries S, Hingorani AD. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. 2006; 1-15.

Navarro López F. Genes e Coronary Heart Disease. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55(4): 413-31.

Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *American Heart Journal.* 2004a; 147:516-21.

Patterson C. Temas actuales de biología vascular: puesta al día para el siglo XXI. *Rev Esp Cardiol.* 2001; 54: 635-42.

Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999;99: 2864– 70.

Kim IJ, Bae J, Lim SW, Cha DH, Cho HJ, Kim S et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (T-786C, 4a4b, 894GNT) in Korean patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* 2007; 119, 579-85.

Erbs S, Baither Y, Linke A, Adams V, Shu Y, Lenk K et al. Promoter but Not Exon 7 Polymorphism of Endothelial Nitric Oxide Synthase Affects Trainin-Induced Correction of Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;33:1814-1819.

Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L et al. The T-786C Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype Is a Novel Risk Factor for Coronary Artery Disease in Caucasian Patients of the GENICA Study. *Journal of American College of Cardiology.* 2003;41:930-937.

Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease. Meta-Analysis of 26 Studies Involving 23 028 Subjects. *Circulation.* 2004; 109: 1359-1365.

Hingorani AD, Liand CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parson A et al. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu298→Asp) Is a Major Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. *Circulation* 1999; 100:1515-1520.

Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, et al. The Glu298Asp polymorphisms of the NOS3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 2002;20:2023–7.

Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:2832–35.

Cam SF, Sekuri C, engiz I, Ercam E, Sagcan A, Akin M et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thrombosis Research* 2005; 116:287-92.

Chen W, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Urbina EM, Li S et al. Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (G894T) Influences Arterial Stiffness in Adults – The Bogalusa Heart Study. *American Journal of Hypertension*. 2004;17:553-559)

Chang K, Baek SH, Seung KB, Pum-Joon K, Ihm SH, Chae JS et al. The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm. *Coronary Artery Disease*. 2003; 14:293-299.

Gorchakova O, Koch W, Beckerath NV, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A. Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement. *European Heart Journal*. 2003; 24:820-827.

Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM, Humphries SE. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms

are associated with coronary in-stent restenosis. *European Heart Journal*. 2002;23:1955-1962.

Zhang C, Lopez-Ridaura R, Hunter DJ, Rifai N, Hu FB. Common Variants of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and the Risk of Coronary Heart Disease Among U.S. Diabetic Men. *Diabetes* 2006; 55:2140–47.

Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata IR, Kirkland SA et al. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *American Heart Journal*. 2001;142:586-9.

Yoon Y, Song J, Hong HS, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin. Chem*. 2000; 46:1626–30.

Matyar S, Attila G, Acartürk E, Akpinar O, Inal T. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. *Clinica Chimica Acta* 2005; 354: 153-58.

Rios DLS, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 2005;362:138-46.

Fatini C, Sofi F, Gensini F, Sticchi E, Lari B, Pratesi G, et al. Influence of eNOS gene polymorphisms on carotid atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004b;27:540–4.

Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igbo-Pemu P, Lankford B et al. Relation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene to Plasma Nitric Oxide Level, Endothelial Function, and Blood Pressure in African Americans. *American Journal of Hypertension*. 2004;560-567.

Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1506-10.

Sandrim VC, Syllos RWC, Lisboa HRK, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2006;189: 241–46.

Sandrim VC, Syllos RWC, Lisboa HRK, Tres GS, Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide* 2007;16:348-55.

Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, et al. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 135-42.

Szolnoki Z, Havasi V, Bene J, Komlósi K, Szöke D, Somogyvári F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2005; 111: 29–33.

ANEXOS

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa:

ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE TRÊS POLIMORFISMOS NO GENE QUE CODIFICA PARA A ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) E SÍNDROME CORONARIANA AGUDA (SCA)

As coronárias, que são vasos que levam o sangue para o seu coração, muitas vezes podem ter algum grau de entupimento. Esta obstrução não permite que o sangue passe, causando dor no peito e, às vezes, infarto do miocárdio. Para entendermos melhor este tipo de doença, estamos estudando alguns fatores genéticos que podem estar relacionados com esta doença. Nosso objetivo é verificar se estes fatores presentes em uma pessoa podem ser afetar ou não o desenvolvimento ou início da doença cardíaca.

Os fatores genéticos que pretendemos estudar incluem modificações que podem ocorrer em um “pedaço” (segmento) do DNA e que podem influenciar a liberação no sangue de uma substância chamada óxido nítrico e que é responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos. Ter uma destas alterações não significa, necessariamente, que você ficará doente, por isso, se for acaso, hábitos saudáveis de estilo de vida devem ser sugeridos para evitar problemas futuros. Os pesquisadores estarão dispostos a fazer este aconselhamento, se for o seu caso, sem custos adicionais ao senhor (a).

Para realização deste trabalho precisaremos coletar uma pequena quantidade de sangue, através de uma seringa com agulha em uma veia do seu braço. As amostras de sangue (soro) serão congeladas e armazenadas para que, posteriormente, sejam realizados os testes laboratoriais. Precisaremos, ainda, de uma autorização de sua parte para análise de seus genes a partir de DNA (material genético) que será extraído de uma pequena quantidade de sangue coletado e que, também, ficará armazenado (congelado) no Centro de Biologia Genômica e Molecular – Faculdade de Biociências - PUCRS. Além de seu DNA, também vamos obter, a partir do sangue coletado, uma amostra de soro para realização de exames que auxiliarão nos diagnósticos que pretendemos fazer. Todo seu material biológico estocado (soro e DNA) será mantido sob anonimato, apenas identificado por numeração.

A coleta da amostra de sangue será efetuada com uma agulha e uma seringa. No momento da coleta, você sentirá dor no local aonde for colocada a agulha. Após a coleta, o local da picada ficará vermelho por algumas horas. No local aonde o sangue foi retirado poderá haver a

formação de uma mancha roxa (equimose), que desaparecerá sozinha ao longo de algumas horas ou dias. A quantidade de sangue retirada, por ser muito pequena, não afetará sua saúde.

Os exames que serão realizados com o seu sangue permitirão uma melhor compreensão dos pesquisadores frente às doenças cardíacas, que nos dias de hoje vitimam tantas pessoas e, a busca pela identificação mais precoce possível desta doença para que o tratamento se dê de maneira eficiente.

Os pesquisadores envolvidos no projeto garantem ao(a) senhor(a) o direito a qualquer pergunta e/ou esclarecimento mais específicos dos procedimentos realizados, e/ou interpretação dos resultados obtidos nos exames.

O(a) senhor(a) tem a liberdade de abandonar a pesquisa, sem que isto leve a qualquer prejuízo posterior. Os pesquisadores garantem sigilo e privacidade em relação aos resultados dos exames, já que um número de protocolo passará a identificá-lo(a) na pesquisa e **não o seu nome**.

O seu DNA (material genético) permanecerá estocado sob a tutela e total responsabilidade do Dr. Maurício Reis Bogo no Centro de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da PUCRS e será utilizado para os fins deste projeto de pesquisa e, futuramente, também poderá servir para outros estudos complementares. Este material poderá ser destruído a qualquer momento que o(a) senhor(a) desejar, sem que isto lhe acarrete qualquer prejuízo.

Eu,.....fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do exame a ser realizado e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar. Os pesquisadores Jacqueline da C. E. Piccoli e Dr. Maurício Reis Bogo certificaram-me que todos os resultados dos exames serão confidenciais e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Concordo com o armazenamento de meu material biológico (soro e DNA), sob anonimato, para estudos futuros, mas deverei ser previamente consultado e informado a respeito, podendo autorizar ou não o uso do mesmo.

Fui informado que, caso existam danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelecido em lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar a Pesquisadora Jacqueline ou o Dr. Luiz Carlos Bodanese no telefone (051) 3339.7366 (Serviço de Cardiologia da PUCRS). Ainda, posso solicitar esclarecimentos sobre esta pesquisa junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS através de seu coordenador Dr. Délio José Kipper no telefone (051) 3320.3000 (Ramal 3345).

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome: _____

Assinatura do Voluntário

Data...../...../.....

Nome: _____

Assinatura do Pesquisador

Data...../...../.....

Este formulário foi lido para.....em...../...../.....

por.....

Nome: _____

Assinatura da testemunha

Data...../...../.....

ANEXO 2 – PROTOCOLO DE PESQUISA (CONTROLES)



NÚMERO: _____ INICIAIS: _____
PROTOCOLO AVALIAÇÃO

I - IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Endereço: _____
Contato: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Cor: _____
Etnia: _____ Data da entrevista: ____/____/____

II FATORES DE RISCO CORONARIANOS

- Sem fatores de risco
- HAS (diagnóstico médico e/ou uso de medicação com objetivo de reduzir PA)
- Diabete mellitus (diagnóstico médico e/ou dieta e/ou droga hipoglicemiante)
- Tabagismo () Passado () Fumou no último ano
- História familiar (Homem <55 e/ou Mulher <65 e/ou RM)
- Obesidade (último peso:..... altura:.....)
- Dislipidemia (diagnóstico médico/uso dieta e/ou hipolipemiante)
- Sedentarismo

III HISTÓRIA PREGRESSA DO PACIENTE

- 1ª manifestação – Angina de recente começo
- Angina estável prévia
- IAM prévio
- Revascularização miocárdica prévia
- ACTP prévia
- Insuficiência cardíaca
- Doença arterial periférica
- AVE/ AIT prévio
- Neoplasia (sítio: _____)
- Doença reumatológica (qual: _____)
- Doença Auto-imune (qual: _____)
- Infecção ativa
- IRC (Cr>2)

Costuma consumir vinho? () sim () não
() Tinto () branco
Frequência? () eventualmente () 1x sem () 1x dia () 2x dia () + 2x dia
Quantidade? () 1 cálice () 2 cálices
() + 2 cálices
Costuma consumir suco de uva?
() sim () não / () Natural () Processado/caixa
Frequência? () eventualmente () 1x sem () 1x dia () 2x dia () + 2x dia
Quantidade? () 1 copo (300ml) () 2 copos (300ml) () + 2 copos

IV MEDICAÇÕES EM USO PRÉVIO

- AAS
- Beta Bloqueador
- Nitrato
- Bloqueador Ca
- IECA
- Antiarrítmicos
- Diuréticos
- Digital
- Ticlopidina () Clopidogrel
- Estatina () Fibrato

V EXAMES COMPLEMENTARES

Glicemia: _____ CT: _____ LDL: _____ HDL: _____
Triglicerídeos: _____

ANEXO 3 – CARTA DE SUMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

-----Mensagem original-----

De: NOX (ELS) [mailto:nox@elsevier.com]

Enviada em: sexta-feira, 18 de maio de 2007 15:57

Para: Mauricio Bogo

Assunto: Nitric Oxide: Biology and Chemistry Submission: Manuscript Number Assigned

Ms. No.: NOX-07-52

Title: Interaction between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (-786T>C, 894G>T and Intron 4 a/b) and Cardiovascular Risk Factors in Acute Coronary Syndromes

Corresponding Author: Ph.D Maurício Reis Bogo

Authors: Jacqueline Piccoli; Fernanda Hamester; Josiane Bandinelli; Ilan Turkienicz; José Chies; Alessandra Peres; Luiz Bodanese; Euler Manenti;

Dear Ph.D Bogo,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: NOX-07-52

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/nox/>

Your username is: xxxxx

Your password is: xxxxx

Thank you for submitting your work to Nitric Oxide: Biology and Chemistry.

Kind regards,

Steve Person

Nitric Oxide: Biology and Chemistry, Editorial Office

Elsevier

525 B Street, Suite 1900

San Diego, CA 92101-4495

USA

E-mail: nox@elsevier.com