



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**  
**NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS - NPDM**

**ROCHELLE PINHEIRO RIBEIRO**

**PRESENÇA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA PARAOXONASE  
HUMANA-1 E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM JOVENS COM  
DOENÇA CORONARIANA ATÉROSCLERÓTICA**

**FORTALEZA**

**2021**

ROCHELLE PINHEIRO RIBEIRO

**PRESENÇA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA PARAOXONASE HUMANA-1  
E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM JOVENS COM DOENÇA CORONARIANA  
ATEROSCLERÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica

**Orientadora:** Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro

FORTALEZA-CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R372p Ribeiro, Rochelle Pinheiro.  
Presença de Polimorfismos genéticos da Paraoxonase Humana 1 e alterações metabólicas em jovens com doença coronariana aterosclerótica. / Rochelle Pinheiro Ribeiro. – 2023.  
70 f.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.
1. Polimorfismo genético. 2. Aterosclerose. 3. Coronariopatia. I. Título.

CDD 615.1

---

ROCHELLE PINHEIRO RIBEIRO

PRESENÇA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA PARAOXONASE HUMANA-1  
E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM JOVENS COM DOENÇA CORONARIANA  
ATEROSCLERÓTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Rosa Quidute  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

Profa. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Aos meus filhos Davi, Bruno e Caio, presentes de Deus, que me fizeram entender o sentido da vida e que a cada dia me impulsionam a ser uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai criador de todas as coisas, que me permitiu aprender muito mais do que eu poderia supor sobre a vida. Agradeço cada dificuldade surgida neste caminho. Estou chegando aqui diferente, reconhecendo que não tenho o controle de nada e que limites devem ser respeitados para que possamos passar pela vida e de fato viver. Como nos alerta Luís Fernando Veríssimo, “quando pensamos que já sabemos todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas” ...

Aos meus pais Arnóbio e Hilsa. Se não houvesse a crença deles, que a única saída seria o estudo e não tivessem lutado para me proporcionar essa oportunidade, deixando como herança a imensa riqueza imaterial, não apenas do conhecimento intelectual, mas também a inestimável riqueza moral, este dia não estaria acontecendo.

Aos meus irmãos, Rozele, Roberto, Ricardo, Romulo e Rozane. Para mim sempre foram exemplos de “gente de verdade”. Como irmã caçula acabei tendo um desafio grandioso de tentar alcançá-los e por que não, ultrapassá-los. Confesso que a altura do sarrafo ficou muito grande e quase não consegui chegar lá, mas foram eles que também contribuíram para que eu tentasse chegar ao meu melhor.

Aos meus filhos, o pequeno Caio e os eternos pequenos Bruno e Davi, obrigada meus amores por todos os dias me lembrarem que a vida vale a pena, que é preciso seguir em frente e que temos muito a oferecer ao mundo. Vocês, filhos, me ensinam todos os dias a ser uma pessoa melhor, a querer fazer tudo certo, a não desistir e que ao nos tornarmos mães acabamos sendo seres mágicos, pluripotentes, e desenvolvemos a capacidade de fazer várias coisas ao mesmo tempo.

De maneira especial e carinhosa ao meu companheiro Klenilton, que com sua paciência e mansidão sempre me acalmou, foi meu porto seguro nos momentos em que as lágrimas não desistiam de rolar e que estive sempre ao meu lado, segurando na minha mão quando tudo parecia desmoronar. Ele me reconheceu no “meio do temporal”, quando até eu mesma não me reconhecia mais. Obrigada meu amor, por me esperar, obrigada por deixar eu voltar e permitir me reconhecer... Você não me deixou desistir... Eu voltei e hoje estou aqui!

E como acredito em anjos, a minha eterna gratidão à minha orientadora, Doutora Raquel Montenegro. Você acreditou em mim sem me conhecer, mesmo quando tantos não acreditaram. Você nunca desistiu de mim e ainda me conduziu e

orientou com toda a sensibilidade que somente as pessoas brilhantes são capazes de fazer. Você indiscutivelmente foi um anjo que Deus colocou no meu caminho para me ajudar na difícil jornada. E claro, devo agradecer respeitosamente ao Doutor Odorico Moraes, que abriu as portas do NPDM e me fez sentir parte de algo grandioso e importante. Grande mestre, exemplo de excelência na ciência e que se revelou demasiado humano, diante dos inesperados desafios a mim impostos.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, sempre dispostos a ajudar no que pudessem e por acreditarem em mim e neste trabalho. Neste momento agradeço em particular ao paciente M.J., falecido em 2018, aos 25 anos por insuficiência cardíaca refratária ao tratamento clínico, à espera de um milagre (transplante cardíaco). Foi o paciente mais jovem com síndrome coronariana aguda que eu atendi. Tinha apenas 21 anos, universitário, filho único, sem fatores de risco para doença cardiovascular. Era magro, ativo fisicamente, não usava drogas, e sua história clínica me motivou na procura incessante pela explicação da sua doença. Sempre que eu o atendia ele me indagava: "*Por que eu infartei doutora?*" Ele confiava muito em mim! Que Deus o tenha acolhido carinhosamente na morada eterna.

Aos funcionários do laboratório do Hospital do Coração de Messejana, Veranilda e Abreu por estarem sempre dispostos a me ajudar.

À minha querida cunhada-amiga-irmã Sílvia Helena, obrigada pelo companheirismo, pela generosidade e pela oferta de momentos de tranquilidade para o término deste trabalho. Você me ajudou sem eu pedir e como essa atitude é valiosa para mim.

À minha secretária "faz-tudo" Elisete de Sousa Silva, a Lili, pelo apoio na organização da minha casa, por cuidar dos meus filhos, por cuidar das minhas cadelas, por cuidar de mim. Muito obrigada!

E claro, eu não posso deixar de registrar o meu agradecimento aos colaboradores do Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN) do NPDM, a Professora Carol Aquino, a Luina, a Laís que sempre pacientemente me ajudaram a entender um pouco de um mundo muito distante do qual eu vivencio, foram elas que literalmente aproximaram a bancada da beira do leito.

E finalmente, ao aluno da Iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará (UFC), Carlos Eduardo Lopes Saraiva e as alunas da Iniciação Científica do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Caroline Lopes Aragão, Carmem Gracieli Oliveira e Débora Rabelo Magalhães Brasil, que me ajudaram no

atendimento aos pacientes e não permitiram que o trabalho fosse interrompido na minha ausência. Entenderam a minha fragilidade e me apoiaram.



“É o coração que sente Deus, não a  
razão”. (Pascal)

## RESUMO

**Introdução:** A doença arterial coronariana (DAC) aterosclerótica é a principal causa de morte em todo o mundo e vem ocorrendo na última década em faixas etárias cada vez mais jovens. Muitos destes indivíduos não possuem os fatores de risco classicamente conhecidos a partir do Estudo de Framingham para o desenvolvimento da doença. Sendo a DAC uma doença complexa, de etiologia multifatorial, entende-se que na sua evolução há uma interação pouco conhecida de fatores ambientais atuando em um indivíduo com características genéticas predisponentes à ocorrência precoce da doença. Como a anormalidade mais observada nesta população são os baixos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL-col), decidiu-se pelo estudo dos seus moduladores genéticos, especificamente a Paraoxonase humana 1. Essa enzima foi escolhida por estar presente em grande quantidade nas partículas de HDL-col e a quem são atribuídas as propriedades antiaterogênicas com consequente impacto na redução do risco cardiovascular. **Objetivos:** avaliar as associações dos polimorfismos dos genes da Paraoxonase1 (PON1) C108T e L55M com os fatores de risco clássicos para doença coronariana aterosclerótica prematura. **Metodologia:** estudo transversal, caso-controle, realizado de janeiro de 2016 a janeiro de 2019. Foram avaliados 113 indivíduos, sendo 81 casos com diagnóstico de DAC e 32 controles saudáveis, homens com idade menor que 45 anos e mulheres com idade menor que 55 anos. **Resultados:** as variáveis bioquímicas mais frequentes nos casos foram a dislipidemia, caracterizada por níveis elevados de colesterol total, LDL-col e HDL-col, assim como da glicemia em jejum e a hemoglobina glicada. Quanto às características clínicas observou-se de modo significativo níveis elevados de CA e do IMC. Na avaliação genotípica, os portadores do alelo T do gene C108T apresentaram associação significativa com dislipidemia ( $p < 0,042$ ) e os portadores do alelo M do gene L55M apresentaram significativamente maiores valores de IMC ( $p < 0,011$ ). O desequilíbrio de ligação dos haplótipos C108T e L55M esteve associado de modo significativo ao risco de doença coronariana ( $p < 0,013$ ). O genótipo MM esteve associado significativamente ao acometimento do território coronariano da artéria circunflexa (Cx) ( $p < 0,038$ ). O genótipo TT esteve associado a níveis mais elevados de TSH nos casos de DAC ( $p < 0,021$ ). Não foram encontradas associações significativas entre os genótipos e os demais fatores de risco para DAC em casos e controles. **Conclusão:** A presença dos polimorfismos da PON1 C108T e L55M,

isoladamente, não produz aumento significativo na ocorrência de doença coronariana aterosclerótica em jovens, contudo a elevação dos níveis do colesterol total e os baixos níveis de HDL produzem um risco maior que 3 ( $p < 0,033$ ) e 9 vezes ( $p < 0,021$ ) respectivamente na chance de ocorrer DAC prematura, estando a prevalência destes fatores de risco sob possível modulação genética.

**Palavras-chave:** Aterosclerose. Polimorfismos genéticos. Coronariopatia.

## ABSTRACT

### PRESENCE OF GENETIC POLYMORPHISMS OF HUMAN PARAOXONASE-1 AND METABOLIC ALTERATIONS IN YOUNG PEOPLE WITH ATHEROSCLEROTIC CORONARY DISEASE

**Introduction:** Atherosclerotic coronary artery disease (CAD) is the leading cause of death worldwide and has been occurring in the last decade in increasingly younger age groups. Many of these individuals do not have the risk factors classically known from the Framingham Study for the development of the disease. Since CAD is a complex disease, with a multifactorial etiology, it is understood that in its evolution there is a little-known interaction of environmental factors acting on an individual with genetic characteristics predisposing to the early occurrence of the disease. As the most common abnormality observed in this population is the low levels of high density lipoprotein (HDL-col), it was decided to study its genetic modulators, specifically human Paraoxonase 1. This enzyme was chosen because it is present in large quantities in the particles of HDL-col and to whom the anti-atherogenic properties are attributed with a consequent impact on the reduction of cardiovascular risk.

**Objectives:** to evaluate the associations of the polymorphisms of the Paraoxonase1 (PON1) genes C108T and L55M with the classic risk factors for premature atherosclerotic coronary disease. **Methodology:** cross-sectional, case-control study, carried out from January 2016 to January 2019. 113 individuals were evaluated, of which 81 were diagnosed with CAD and 32 were healthy, men under 45 years old and women under 55 years. **Results:** the most frequent biochemical variables in the cases were dyslipidemia, characterized by high levels of total cholesterol, LDL-col and HDL-col, as well as fasting blood glucose and glycated hemoglobin. Regarding the clinical characteristics, high levels of AC and BMI were significantly observed. In the genotypic evaluation, those with the T allele of the C108T gene had a significant association with dyslipidemia ( $p < 0.042$ ) and those with the M allele of the L55M gene had significantly higher BMI values ( $p < 0.011$ ). The linkage imbalance of the C108T and L55M haplotypes was significantly associated with the risk of coronary disease ( $p < 0.013$ ). The MM genotype was significantly associated with the involvement of the coronary territory of the circumflex artery (Cx) ( $p < 0.038$ ). The TT genotype was associated with

higher levels of TSH in CAD cases ( $p < 0.021$ ). No significant associations were found between genotypes and other risk factors for CAD in cases and controls. **Conclusion:** The presence of PON 1 polymorphisms C108T and L55M, alone, does not produce a significant increase in the occurrence of atherosclerotic coronary disease in young people, however the elevation of total cholesterol levels and low HDL levels produce a risk greater than 3 ( $p < 0.033$ ) and 9 times ( $p < 0.021$ ) respectively in the chance of premature CAD, with the prevalence of these risk factors under possible genetic modulation.

**Keywords:** Atherosclerosis. Coronary disease. Genetic polymorphisms.

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b>  | - Identificação de primers .....  | 38 |
| <b>Tabela 2</b>  | - Reagentes utilizados para técnica de genotipagem por PCR em tempo real .....  | 39 |
| <b>Tabela 3</b>  | - Características gerais da população estudada .....  | 42 |
| <b>Tabela 4</b>  | - Comparação de medidas e valores laboratoriais médios observados em jovens com DAC e controles sadios .....  | 44 |
| <b>Tabela 5</b>  | - Análise da distribuição genotípica e da frequência alélica entre casos e controles .....  | 45 |
| <b>Tabela 6</b>  | - Avaliação dos haplótipos de C108T e L55M da PON1 em jovens com e sem doença coronariana aterosclerótica .....   | 45 |
| <b>Tabela 7</b>  | - Associação dos fatores de risco com as características genotípicas de casos e controle .....  | 46 |
| <b>Tabela 8</b>  | - Distribuição genotípica de acordo com o padrão de acometimento arterial observado na coronariografia em indivíduos com doença coronariana aterosclerótica ..... | 47 |
| <b>Tabela 9</b>  | - Perfil bioquímico e sua relação com a distribuição genotípica e frequência alélica .....  | 48 |
| <b>Tabela 10</b> | - Avaliação do risco de apresentar DAC prematura .....  | 48 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |  |
|---------|--|
| ABCA1   | ATP-binding cassette transporter             |
| AE      | Angina estável                               |
| AI      | Angina estável                               |
| ANOVA   | Análise de variância                         |
| APOA5   | Apolipoproteína A5                           |
| APO-AI  | Apolipoproteína A-I                          |
| APO-B   | Apolipoproteína B                            |
| APOC-3  | Apolipoproteína C3                           |
| AS      | Aterosclerose                                |
| ATP     | Adenosine triphosphate                       |
| AVC     | Acidente Vascular Cerebral                   |
| CA      | Circunferência abdominal                     |
| CC      | Homozigoto para alelo C do gene da PON C108T |
| CD      | Artéria coronária direita                    |
| CDC     | Center Disease Control                       |
| CEP     | Conselho de Ética e Pesquisa                 |
| CETP    | <i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>    |
| Cr      | Creatinina                                   |
| CT      | Colesterol total                             |
| CX      | Artéria circunflexa                          |
| DA      | Artéria descendente anterior                 |
| DAC     | Doença Arterial coronariana                  |
| DCV     | Doença cardiovascular                        |
| DM      | Diabetes Mellitus                            |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                    |
| Dra     | Doutora                                      |
| EDTA    | Ácido etilenodiamino tetra-acético           |
| EMIC    | Espessamento Médio Intimal Carotídeo         |
| GBD     | Global Burden Disease                        |
| GI      | Glicemia em jejum                            |
| GPO-PAP | Glycerol phosphate oxidase                   |

|        |  |
|--------|--|
| HA     | Hipertensão arterial                                 |
| HAS    | Hipertensão Arterial Sistêmica                       |
| HbA1C  | Hemoglobina glicolisada                              |
| HDL    | <i>High Density Lipoprotein</i>                      |
| HIV    | Human Immunodeficiency Virus                         |
| HM     | Hospital de Messejana                                |
| IAM    | Infarto Agudo do Miocárdio                           |
| ICP    | Intervenção coronária percutânea                     |
| IM     | Infarto do miocárdio                                 |
| IMC    | Índice de Massa Corporal                             |
| LCAT   | <i>Lecitina cholesterol acypttransferase</i>         |
| LDL    | <i>Low Density Lipoprotein</i>                       |
| LDL-r  | <i>Low Density Lipoprotein receptor</i>              |
| LL     | Homozigoto para alelo L do gene da PON L55M          |
| LM     | Heterozigoto do gene da PON L55M                     |
| LXR    | Liver X receptor                                     |
| MM     | Homozigoto para alelo M do gene da PON L55M          |
| MS     | Ministério da Saúde                                  |
| MS     | Morte súbita   |
| NPDM   | Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos |
| OMS    | Organização Mundial de Saúde                         |
| PAD    | Pressão arterial diastólica                          |
| PAS    | Pressão arterial sistólica                           |
| PCR us | Proteína C reativa ultrasensível                     |
| PON 1  | Paraoxonase Humana 1                                 |
| Profa. | Professora   |
| RM     | Revascularização miocárdica cirúrgica                |
| SCA    | Síndrome Coronariana Aguda                           |
| SNP    | Polimorfismos de Nucleotídeo Único                   |
| SPSS   | Statistical Package of the Social Sciences           |
| TBG    | Tabagismo  |
| TC     | Tomograafia computadorizada                          |
| TCE    | Tronco da coronária esquerda                         |



|              |  |
|--------------|--|
| TG           | Triglicerídeos                               |
| TIMI         | <i>Thrombolysis in Myocardial Infarction</i> |
| TSH          | Hormônio tireoestimulante                    |
| TT           | Homozigoto para alelo T do gene da PON C108T |
| UECE         | Universidade Estadual do Ceará               |
| UFA          | Universidade Federal do Pará                 |
| UFC          | Universidade Federal do Ceará                |
| US           | Ultrassom                                    |
| UTI          | Unidade de Terapia Intensiva                 |
| $\beta$ -HDL | Beta High density lipoprotein                |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>18</b> |
| <b>1.1</b>   | <b>Epidemiologia da doença cardiovascular no Brasil e no Mundo</b> .....         | <b>18</b> |
| <b>1.2</b>   | <b>Definição e fisiopatologia da aterosclerose</b> .....                         | <b>19</b> |
| <b>1.3</b>   | <b>Aterosclerose prematura</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>1.4</b>   | <b>Fatores de risco para DAC</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>1.5</b>   | <b>Importância do LDL-col, formação da placa de ateroma</b> .....                | <b>23</b> |
| <b>1.6</b>   | <b>Importância do HDL-col: agente antioxidante e anti-inflamatório</b> ....      | <b>23</b> |
| <b>1.7</b>   | <b>Bases genéticas da DAC</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>1.8</b>   | <b>A Paraoxonase Humana-1</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>1.9</b>   | <b>Paraoxonase: importante mediadora de função antioxidante do HDL-col</b> ..... | <b>30</b> |
| <b>1.10</b>  | <b>Justificativa</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Objetivo Geral</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>Objetivos Específicos</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>3</b>     | <b>METODOLOGIA</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Hipótese do estudo</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Desenho do estudo</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>Natureza do estudo</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Local do estudo</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>3.5</b>   | <b>Critérios de inclusão</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>3.6</b>   | <b>Critérios de exclusão</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>3.7</b>   | <b>Avaliação clínica</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>3.7.1</b> | <b><i>História familiar da DAC precoce</i></b> .....                             | <b>36</b> |
| <b>3.7.2</b> | <b><i>Tabagismo</i></b> .....  | <b>36</b> |
| <b>3.7.3</b> | <b><i>Peso, altura e índice de massa corpórea (IMC)</i></b> .....                | <b>36</b> |
| <b>3.7.4</b> | <b><i>Aferição da circunferência abdominal e quadril</i></b> .....               | <b>37</b> |
| <b>3.7.5</b> | <b><i>Pressão arterial</i></b> .....   | <b>37</b> |
| <b>3.8</b>   | <b>Avaliação angiográfica</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>3.9</b>   | <b>Genotipagem</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.9.1</b> | <b><i>Extração de DNA</i></b> .....  | <b>38</b> |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.9.2  | <i>Desenho de primers e detecção</i> .....   | 38 |
| 3.9.3  | <i>Sistema Taqman® de discriminação alélica reação por PCR em tempo real</i> .....                               | 38 |
| 3.10   | <b>Coleta de dados laboratoriais</b> .....   | 39 |
| 3.10.1 | <i>Métodos laboratoriais</i> .....   | 39 |
| 3.10.2 | <i>Coleta de dados clínicos</i> .....  | 40 |
| 3.11   | <b>Aspectos éticos</b> .....   | 40 |
| 3.12   | <b>Análise estatística</b> .....   | 40 |
| 4      | <b>RESULTADOS</b> .....  | 42 |
| 4.1    | <b>Dados clínicos da amostra</b> .....   | 42 |
| 4.2    | <b>Avaliação bioquímica</b> .....  | 43 |
| 4.3    | <b>Caracterização genotípica e frequência alélica em pacientes e controles</b> .....                             | 44 |
| 4.4    | <b>Território coronariano acometido por doença aterosclerótica de acordo com a distribuição genotípica</b> ..... | 47 |
| 4.5    | <b>Perfil bioquímico e sua relação com a distribuição genotípica e frequência alélica</b> .....                  | 47 |
| 5      | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 49 |
| 6      | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 54 |
| 7      | <b>LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....   | 55 |
|        | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 57 |
|        | <b>ANEXOS</b> .....  | 65 |
|        | <b>ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....  | 65 |
|        | <b>ANEXO B – QUESTIONÁRIO</b> .....  | 68 |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia da doença cardiovascular no Brasil e no Mundo

A doença isquêmica coronariana constitui um importante problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morbimortalidade no mundo ocidental desde a primeira metade do século XX (HERRINGTON, 2016). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2002, ocorreram 16,7 milhões de óbitos, dos quais 7,2 milhões foram por doença arterial coronariana (DAC). Estima-se que esse número se eleve para 40 milhões em 2020.

A doença arterial coronariana (DAC) compreende um espectro de condições clínicas sintomáticas e assintomáticas tipicamente relacionadas à redução do fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco. A causa mais comum é a doença aterosclerótica das artérias coronárias, uma condição crônica de apresentação variável, que progride desde uma longa fase assintomática até angina estável (AE), infarto do miocárdio (IM) e angina instável (AI). A DAC é uma causa comum de insuficiência cardíaca, com fração de ejeção ventricular esquerda reduzida ou preservada, arritmias ventriculares e parada cardíaca súbita. A DAC foi também a principal causa de morte no Brasil na última década, para homens e mulheres. Devido ao seu amplo espectro de apresentação clínica, suas prevalências, incidência e mortalidade relatadas variam muito, dependendo da população e do contexto da atenção à saúde estudadas (OLIVEIRA *et al.*, 2020). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, em 2018, a doença cardiovascular foi responsável por mais de 250.000 mortes, correspondendo a 32% de todas as causas de óbito em nosso país; estando em primeiro lugar a doença isquêmica do miocárdio. De acordo com dados do *Global Burden Disease* (GBD) 2017, homens apresentaram maior prevalência em comparação a mulheres, 2,33% e 1,19%, respectivamente. Para adultos de 15-49 anos, a prevalência estimada de DAC foi 0,53%; para aqueles de 50-69 anos, 4,34%; e para aqueles >70 anos, 10,99%. A prevalência geral padronizada por idade de DAC foi 1,63% (1.564 por 100 mil habitantes), sendo 2,35% (2.229 por 100 mil habitantes) para homens e 1,05% (1.008 por 100 mil habitantes) para mulheres. Isso significa que pelo menos 3,3 milhões de pessoas viviam com DAC nas unidades federativas brasileiras em 2017. Em um estudo ecológico nacional incluindo indivíduos com 35-64 anos, de 1999 a 2001, a taxa de morte relacionada à DAC foi  $84 \pm 30$  por 100 mil

habitantes. Nesse estudo, a incidência de eventos relacionou-se diretamente à taxa de pobreza e ao menor nível educacional.

## **1.2 Definição e fisiopatologia da Aterosclerose**

Aterosclerose (AS) é uma doença das artérias elásticas, de grande e médio calibre e das artérias musculares, caracterizada sob o ponto de vista anatomopatológico por lesões com aspecto de placas de ateromas. AS é uma doença sistêmica, porém o acometimento é predominantemente focal e afeta preferencialmente as margens externas das bifurcações e ramificações arteriais, locais onde é maior a turbulência do fluxo sanguíneo e das forças de tensão. A lesão aterosclerótica é frequentemente encontrada nas artérias decorrente, inicialmente, de dois processos básicos: acúmulo de colesterol e a proliferação de células musculares lisas na túnica íntima, desenvolvendo-se, portanto, sob um substrato formado dessas células, leucócitos derivados do sangue, e de uma quantidade variável de tecido conectivo, formando uma placa fibrosa que se projeta para dentro do lúmen, modificando a túnica média e levando à uma série de complicações circulatórias (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005). As manifestações clínicas dessa doença são as mais variadas, devido aos diferentes territórios vasculares os quais ela pode acometer, como região cerebral, coronária e artérias da região periférica. As maiores consequências trazidas pela doença são: infarto do miocárdio, infarto cerebral, aneurisma aórtico e gangrena dos membros inferiores (CAMACHO; MELÍCIO; SOARES, 2007). Apesar da aterosclerose coronariana começar precocemente na vida, a ocorrência de IAM em adultos abaixo de 35 anos é excepcional. No passado, vários mecanismos foram estudados, tais como ruptura de placa vulnerável ou erosão de uma camada endotelial, estados de hipercoagulabilidade, espasmo coronariano e inflamação, permanecendo, porém, a aterosclerose como causa principal.

A doença aterosclerótica é a principal representante dos processos patológicos cardiovasculares ligados ao envelhecimento, uma vez que se manifesta em indivíduos adultos, cuja incidência aumenta exponencialmente a partir dos 45 anos de idade. No entanto, alguns estudos detectaram a prevalência de placas ateroscleróticas superior a 40% nas autópsias de adultos jovens, sugerindo que o processo aterosclerótico ocorra precocemente. Além disso, Palinski; Napoli (2002),

postulam que a aterosclerose pode iniciar na fase fetal, intrauterina (podendo ser potencializada por hipercolesterolemia materna), progredir lentamente na adolescência e apresentar manifestações clínicas na idade adulta.

Berenson e cols (1992), no *The Bogalusa Heart Study*, observaram que estrias gordurosas, precursoras das placas ateroscleróticas, aparecem na camada íntima da aorta aos três anos de idade e nas coronárias durante a adolescência. Neste estudo as lesões foram mais prevalentes no sexo masculino, tanto em aortas como em coronárias, e foram associadas com variáveis lipídicas, hipertensão arterial e IMC. A aterosclerose passou então, gradualmente, de um modelo de doença crônico-degenerativa e, exclusivamente de pacientes de idade avançada, para um modelo de doença inflamatória crônica subclínica, presente já na infância (SANTOS *et al.*, 2008). Em idades jovens, os fatores de risco mais investigados até o momento são: LDL-c elevado, HDL-c baixo, hipertensão arterial (HA), obesidade, diabetes *Mellitus*, intolerância à glicose, tabagismo, inatividade física, história familiar para alguns desses fatores e/ou para eventos cardiovasculares em idades mais jovens (BRANDÃO *et al.*, 2004). O diagnóstico precoce tem papel fundamental na resposta positiva da doença ao tratamento, que vai desde a adoção de hábitos de vida saudáveis (alimentação balanceada, com redução da ingestão de sal e gordura, e prática de exercícios físicos regularmente) até métodos invasivos como a intervenção coronária percutânea (ICP) ou a revascularização miocárdica cirúrgica (RM). Quando há diagnóstico de doenças cardiovasculares na família, é necessário um acompanhamento minucioso desde a adolescência, do contrário, é aconselhado fazer avaliações periódicas a partir dos 35 anos (SCHOENHAGEN; TUZCU, 2008).

As razões para esta rápida progressão da aterosclerose permanecem sob investigação. É uma doença complexa, de etiologia multifatorial e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas.

A resposta inflamatória na aterogênese é mediada através de mudanças funcionais em células endoteliais, linfócitos T macrófagos derivados de monócitos e células do músculo liso. A ativação destas células desencadeia a elaboração e interação de um extenso espectro de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, acúmulo de lípidos e proliferação de células do músculo liso. Adicionalmente, a resposta inflamatória pode ser induzida pelo estresse oxidativo, principalmente a oxidação da LDL-col. Muitos indivíduos, porém, desenvolvem a doença coronariana aterosclerótica na ausência de anormalidades no perfil de

lipoproteínas. Por isso, a viabilidade de efetivar terapias para a prevenção de doenças cardiovasculares e seus desfechos negativos e traduz-se em necessidade imperativa de identificar indivíduos de baixo, médio e alto risco, dentro de uma determinada população para a aplicação de intervenções eficazes, antes da manifestação dos problemas. Esta nova ideia a respeito do entendimento da patogênese da aterosclerose levanta questionamentos e abre oportunidades na prevenção e terapia desta doença.

### **1.3 Aterosclerose prematura**

Antes da segunda Guerra Mundial, a doença arterial coronariana em homens abaixo de 30 anos de idade era considerada rara, e em homens entre 30 e 40 anos de idade, era incomum. Entretanto, o IAM tem sido reconhecido mais frequentemente em grupos etários mais jovens nos últimos anos, principalmente na América Latina, com quase dez anos de antecipação nas manifestações clínicas da doença (PAGAN, 2017). A maioria das diretrizes define infarto agudo do miocárdio (IAM) precoce como evento que acomete homens com menos de 55 anos e mulheres com menos de 65 anos (LANAS, 2007). A DAC é responsável por um terço das mortes em indivíduos com idade maior que 35 anos e em jovens contribui com a ocorrência de 2 a 6% dos eventos coronarianos (AGGARWAL; SRIVASTAVA; VELMURUGAN, 2016). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostrou dados de prevalência de DAC no ano de 2010 de 1,2% no grupo etário de 18 a 44 anos, 7,1% no grupo de 45 a 64 anos e de 19,8% naqueles com mais de 65 anos sendo a aterosclerose das artérias coronárias a principal etiologia.

A média de idade do início da DAC em sul asiáticos parece ser de 53 anos quando comparados aos europeus que é de 63 anos. Sul-asiáticos, especialmente indianos, tem maior risco de desenvolver DAC precocemente, em torno de 5 a 10%, quando comparados a outros grupos étnicos, nestes a idade de acometimento precoce é evento pouco frequente, acometendo em média entre 1 a 2% da população.

### **1.4 Fatores de risco para DAC**

Os fatores de risco tradicionais não explicam completamente a vulnerabilidade para a ocorrência de aterosclerose precoce. A presença de fatores de

risco para DAC nos jovens, como níveis elevados de LDL-col e Lipoproteína A, hábitos dietéticos nocivos, sedentarismo e estilo de vida estressante, comuns com a rápida modernização, são frequentemente relatados na população urbana mais jovem, porém a presença dos fatores de risco clássicos para DAC parece ser menor que em faixas etárias mais avançadas, sendo a obesidade e o tabagismo os fatores com maior impacto na ocorrência e severidade da doença. Entretanto, a prevalência de DM e HAS parecem ser mais altas em pacientes jovens com DAC quando comparados a indivíduos saudáveis na mesma faixa etária. A prevalência de hipertensão é de 25% em jovens com DAC e de 13% naqueles sem manifestação da doença. Similarmente, a incidência de DM e pré-diabetes é de 14,3% e 7,6% naqueles com DAC precoce quando comparado a somente 5,4% e 4,3% em pacientes sem a doença (KANG *et al.*, 2012). Naquelas pessoas com idade inferior a 50 anos, além dos fatores de risco clássicos como hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo e dislipidemia, alguns estudos têm demonstrado a participação de outros fatores como glicemia em jejum alterada, dosagem elevada de lipoproteína A e hiper-homocisteinemia na ocorrência precoce e na progressão acelerada da aterosclerose (EMOTO *et al.*, 2016). Infecções crônicas bacterianas como por *H. pylori*; virais como na infecção por vírus da Hepatite C e alterações da microbiota intestinal são alguns exemplos de situações clínicas em que a inflamação vascular promove a aceleração do processo aterosclerótico sendo considerados fatores de risco emergentes de aterosclerose (HOFFMEISTER *et al.*, 2001).

Acrescenta-se ainda a ocorrência cada vez mais frequente de síndrome metabólica, que tem como substrato a resistência insulínica, a qual tem sido proposta para explicar as anormalidades lipídicas e inflamatórias que levam à predisposição dos indivíduos acometidos por doença arterial coronariana prematura.

Enquanto as características e o curso clínico das síndromes coronarianas agudas (SCA) em faixas etárias acima de 55 anos são intensamente abordados em diferentes consensos da prática clínica, a DAC que ocorre nos pacientes jovens é raramente estudada. Isto pode decorrer da baixa incidência da doença clínica em pessoas mais jovens (ZIMMERMAN *et al.*, 1995). Além disso, a variação nesta incidência depende da população avaliada, dos pontos de corte de idade para cada estudo e das particularidades étnicas e sociais.

Os pacientes com DAC precoce apresentam maior potencial de anos de vida perdidos e a sua sobrevivência após o primeiro evento determinará custos no



âmbito dos recursos de saúde e social. Ao adoecerem durante seus anos de maior produtividade, os indivíduos jovens sofrem consequências psicossociais e econômicas ainda mais graves (LESSA, 2002). Além disso, é importante salientar que embora as taxas de mortalidade por DAC estejam em declínio geral no mundo, elas apresentam uma menor queda nos indivíduos jovens, talvez decorrentes no retardo do reconhecimento por parte dos profissionais da saúde da síndrome coronariana aguda em faixa etária não usual.

Pacientes muito jovens com IAM admitidos com dor torácica são provavelmente atribuídos a outros diagnósticos e procuram atendimento médico mais tardiamente. Em adição, os profissionais da saúde também consideram a dor torácica como menos provável de origem cardíaca, resultando em falta, retardo ou tratamento inadequado.

### **1.5 Importância do LDL-col na formação da placa de ateroma**

Lesões ateroscleróticas contém acúmulo de macrófagos carregados com ésteres de colesterol, conhecidas como “*foam cells*” ou células espumosas. Em 1979, Goldstein *et al.* encontraram que a taxa de acúmulo das células espumosas foi significativamente aumentada pela captação de LDL acetilado, mais que pelo LDL não acetilado através dos receptores scavengers. Henriksen; Mahoney; Steinberg (1981) mais tarde demonstraram que células endoteliais incubadas em uma solução de iodo podem oxidar as partículas de LDL-col, as quais foram capazes de interagir com receptores scavengers levando à formação de células espumosas. O LDL oxidado foi encontrado em lesões ateroscleróticas *in vivo* e foi demonstrado que estas partículas promovem a produção endotelial de uma proteína quimioatrativa de monócitos e de fator estimulante de colônia de monócitos atuando desta forma como uma partícula pró- inflamatória. A formação de LDL-col oxidada *in vivo* provavelmente depende da atividade da lipoxigenase, mieloperoxidase e via da NADPH oxidase.

### **1.6 Importância do HDL-col como agente antioxidante e anti-inflamatório**

Níveis plasmáticos de colesterol de alta densidade (HDL-c) estão inversamente relacionados com o risco de doença cardiovascular aterosclerótica. De fato, entre pacientes com DCV prematura, baixos níveis de HDL é a anormalidade

lipídica mais comum. Nas últimas três décadas, extensas evidências têm sido publicadas as quais estabelecem claramente que níveis elevados de LDL colesterol são fatores de risco para doença arterial coronariana e outras doenças vasculares. Infelizmente, muitos indivíduos com LDL-col normal ou baixo permanecem ainda com um risco residual significativo para ocorrência de eventos cardiovasculares adversos apesar do tratamento com estatinas. Foi proposto que parte desse risco residual possa ser explicado pelos baixos níveis de HDL-colesterol. O Framingham Heart Study originalmente identificou a correlação entre baixo HDL e risco cardiovascular, e o Helsinki Heart Study levantou a hipótese de que medicações que elevariam os níveis de HDL-col poderiam ser efetivas na prevenção primária da doença cardiovascular. Entretanto, vários trials usando várias estratégias para aumentar os níveis de HDL-col, falharam em mostrar a redução esperada nos eventos cardiovasculares. Por causa desses achados conflitantes, o HDL persiste como um alvo potencial para modificar o risco cardiovascular. Muitas pesquisas mostraram o papel do HDL na aterosclerose modificando muitos aspectos envolvidos na patogênese da placa. Já está bem estabelecido o envolvimento do HDL no transporte reverso do colesterol sendo agora amplificado o olhar para outras funções do HDL na oxidação, inflamação, adesão celular e vasodilatação.

A mais importante função relatada do HDL é o seu papel no transporte reverso do colesterol. O transporte reverso do colesterol envolve o transporte do colesterol das células do tecido periférico de volta ao fígado para reprocessamento dentro de novas partículas ou para excreção através da bile. Deste modo, o HDL ajuda a remover o colesterol dos macrófagos espumosos presentes nas placas ateroscleróticas.

Na via clássica do transporte reverso do colesterol a APO A-I, pobre em lípidos é primeiramente sintetizada no fígado e intestino e circula como parte do HDL, como forma monomolecular. Esta forma aceita colesterol e fosfolípidos de células em um processo mediado por uma proteína transportadora ligada ao ATP (ABCA1) a qual é up regulada em células ricas em colesterol via ativação do receptor hepático X (LXR). Durante sua interação com a ABCA1, duas ou três moléculas de APO A-I, associados com o colesterol não esterificado e fosfolípidos, combinam para formar uma partícula de HDL de forma discoidal ou pré- $\beta$ -HDL. Estas partículas de HDL discoidal interagem com a enzima lecitina colesterol acyltransferase (LCAT), a qual esterifica o colesterol livre com as lipoproteínas para formar uma partícula de HDL

esférica, madura, que apresenta alfa-migração através da carga eletroforética. Este HDL “maduro”, uma vez criado, pode promover também diretamente o efluxo de colesterol dos macrófagos via transportador ABCA1. A interação do HDL com ABCA-1 também reverte a inibição da óxido nítrico-sintetase endotelial promovendo vasodilatação pela liberação de óxido nítrico originado pelo aumento da atividade da óxido nítrico sintetase. Em seguida, através da ação facilitadora da CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*), ésteres de colesterol associados com HDL são transferidos a LDL e em outras partículas contendo APOB, em troca por triglicerídios. *In vitro*, estas mudanças levam ao remodelamento do HDL em pequenas partículas. Os ésteres de colesterol associados a partículas contendo APO-B são depois transportadas aos receptores de LDL no fígado, via partículas de LDL, representando a maior via de remoção do colesterol pelo transporte reverso do colesterol.

Em 1991, Navab *et al.* mostrou que a adição do HDL a culturas de LDL com células endoteliais da aorta, resultavam em uma diminuição da transmigração de monócitos no espaço subendotelial. Este processo pode ser explicado pela capacidade do HDL em diminuir a adesão de moléculas tipo 1 em células vasculares diminuindo assim a adesão de monócitos. Foi vastamente demonstrado que o HDL e a APO A1 podem prevenir a formação de LDL oxidada em células endoteliais e estas partículas pequenas e densas de HDL-col são significativamente mais eficientes na prevenção da oxidação do LDL quando comparadas com as partículas maiores de HDL. Foi então hipotetizado que o HDL remove hidroperoxídeos do LDL e carrega essas “moléculas ligadoras” oxidadas para a depuração hepática. No HDL também foi encontrado muitas enzimas, as quais reduzem a oxidação de lipídeos diretamente, incluindo a paraoxonase, fator ativador plaquetário, acetilhidrolase e LCAT. Outros possíveis papéis que o HDL pode desempenhar na inflamação pode estar relacionado à resposta imune e sua capacidade de carrear fatores do complemento e proteínas de fase aguda. Pesquisas de Hamilton; Zhao; Sims (1993), demonstraram que o HDL se liga preferencialmente a células endoteliais expostas ao complemento e que a APO-A-1 e a APO-A-II podem inibir a incorporação do complemento C9 dentro do complexo de ataque a membrana. Estes autores sugerem que a limitação da ativação do complemento pode diminuir a injúria da parede endotelial e prevenir a ativação de vias pró-coagulantes. Através da prevenção da coagulação, o HDL funcional pode ser capaz de diminuir a formação de trombose aguda na DAC. Esses mecanismos anti-inflamatórios, antioxidantes e anticoagulantes do HDL podem

integrar uma teoria relativa de como o HDL se relaciona ao risco cardiovascular.

### 1.7 Bases genéticas da DAC

Sabe-se que a DAC constitui uma desordem poligênica e de etiologia multifatorial (MILLER *et al.*, 2007). Reconhece-se a importante influência que o meio ambiente exerce sobre um indivíduo com predisposição genética resultando muitas vezes na precocidade e gravidade da apresentação clínica, particularmente naqueles muito jovens e com história familiar de doença coronariana prematura (ROBERTS, 2014). Diversos estudos têm estabelecido a importância da história familiar positiva como um fator de risco independente para DAC (KANG *et al.*, 2012). A história familiar representa a integração dos riscos dentro de uma família, advindos da suscetibilidade genética e do convívio familiar, expressos através da exposição neste ambiente a medidas comportamentais do estilo de vida. É importante discutir que o risco cardiovascular relacionado à história familiar em um parente de primeiro grau é mais importante que uma história semelhante em um parente de segundo grau (avós, tios) ou terceiro grau (primos), além disso, o risco é proporcional ao número de membros da família acometidos por DAC (PODREZ, 2010). O terceiro fator é a idade na qual os membros da família desenvolveram a doença coronariana, pois quanto menor a idade de início, maior será o risco. Pessoas com história familiar positiva para DAC tendem a ter aterosclerose coronariana mais severas com forte possibilidade de eventos coronarianos futuros (KHERA *et al.*, 2016). O histórico familiar de doença cardiovascular antes dos 46 anos de idade pode apresentar herdabilidade estimada de 92% (GRUNDY, 1986).

O reconhecimento da existência de fatores de risco genéticos que possam estar envolvidos na patogênese da aterosclerose e do infarto do miocárdio nos motivou o estudo de fatores de risco genéticos que atuam por mecanismos ainda desconhecidos e que são independentes dos fatores de risco clássicos para DAC (BRUNHAM; HAYDEN, 2015; KAYASHREE; ARINDAM; VIJAY, 2015; IZAR *et al.*, 2003; SAYOLS-BAIXERAS *et al.*, 2014).

A progressiva descoberta de variantes de risco genético para DAC irá no futuro, permitir uma prevenção primária mais eficiente e espera-se uma redução na incidência e recorrência de síndromes coronarianas agudas e suas sequelas (GIBBONS *et al.*, 2004).

A elucidação das bases genéticas da DAC tem sido buscada principalmente na última década, a qual mostrou um progresso sem precedentes na medicina genômica dirigida pelas altas tecnologias e do grande poder computacional com a moderna bioinformática. Tais avanços carregam promessas de desenvolvimento em três grandes áreas da prática médica: a) predição do risco de DAC em nível individual; b) abordagens terapêuticas baseadas no conhecimento de novas fisiopatologias; c) melhor uso das terapias existentes através da farmacogenética (TADA *et al.*, 2015; THANASSOULIS; VASAN, 2010; TOMLINSON *et al.*, 2016; NIKPAY *et al.*, 2015). É a bancada aproximando-se da beira do leito, no mais simples conceito da medicina translacional em que a pesquisa básica está efetivamente e de forma rápida produzindo mudanças no manejo clínico e por sua vez, as observações clínicas fomentam a busca por respostas a nível molecular de manifestações complexas ainda pouco compreendidas (RAHMAN *et al.*, 2015). Até meados de 2005 ouvia-se das autoridades no estudo das doenças ateroscleróticas que a *“genômica nunca seria útil nas doenças arteriais”* (BEZERRA, 2017). Tal ceticismo foi ultrapassado quando, em 2007, surgiu a abordagem do GWAS, metodologia que busca os polimorfismos de nucleotídeo único utilizando-se de chips capazes de analisar o genoma humano para detectar *loci* associados com determinado fenótipo (VISSCHER *et al.*, 2017). Alguns estudos têm explorado a associação de variantes genéticas com desfechos cardiovasculares.

A suscetibilidade genética para DAC é largamente derivada da somação do efeito dos múltiplos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPS) cujo efeito isolado é muitas vezes pequeno. A identificação de múltiplos polimorfismos que podem estar envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose pode permitir a construção de escores de risco genético que ajudarão na predição do risco de DAC futura após o ajuste dos fatores de risco clássicos, principalmente, naqueles jovens com risco intermediário de DAC, pelos métodos usualmente utilizados de estratificação clínica (ANSARI *et al.*, 2017). Deste modo, permite-se identificar aqueles indivíduos que terão benefício da aplicação das abordagens preventivas precoces, como por exemplo, o uso de estatinas de alta potência, com possível redução da ocorrência de eventos coronarianos agudos e suas desastrosas sequelas (IRIBARREN *et al.*, 2016).

A maioria dos estudos descreve a presença de dislipidemia mista, hipercolesterolemia isolada, redução de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), hipertrigliceridemia isolada ou a coexistência de valores elevados de

triglicerídeos e concentrações reduzidas de HDL-colesterol nos indivíduos com DAC precoce (NISSEN *et al.*, 2005).

Apesar da importância genética da hipercolesterolemia familiar na DAC precoce e de origem familiar, 80% dos pacientes que desenvolvem DAC prematura têm concentrações de colesterol comparáveis aos de indivíduos sem DAC. Além disso, a forma mais clássica de hipercolesterolemia na população geral é de caráter poligênico e agravado por uma variedade de fatores ambientais. Mesmo considerando o incontestável papel do colesterol na aterogênese, há controvérsias sobre a participação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) na etiologia da DAC precoce. Diferentemente do LDL-colesterol e dos triglicerídeos, concentrações de HDL-colesterol estão inversamente relacionadas à DAC. Concentrações reduzidas de HDL-colesterol foram demonstradas em cerca de 1/3 dos indivíduos com DAC precoce na coorte de Framingham.

Estudos apontam que anormalidades do perfil lipídico caracterizadas tanto por níveis elevados de LDL colesterol, quanto por baixos níveis de HDL desempenham importante papel no desenvolvimento de placas ateroscleróticas e em um perfil pró-trombótico predisponente ao desenvolvimento de síndromes coronarianas agudas (ANDERSON *et al.*, 2016). A procura por variantes de risco genético que estejam envolvidas na inadequada relação dos níveis de LDL e HDL colesterol parece ser uma estratégia eficiente na busca de mecanismos restauradores da normalidade lipídica (GEORGIADIS *et al.*, 2006).

O Projeto *Myocardial Infarction Genetics Consortium Exome Sequencing* realizou o sequenciamento genético de todo exoma em 11.000 indivíduos (LIU; KRAJA; SMITH, 2016). As variantes codificadoras são limitadas a genes relevantes no metabolismo das lipoproteínas incluindo LDL-r, APOC3, APOA5 para os quais já se dispõe de grande quantidade de informações. Apesar do sucesso destas metodologias de sequenciamento, cerca de 80% da estimativa de hereditariedade para DAC, por meio da pesquisa de polimorfismos, ainda é desconhecida (MCPHERSON; TYBJAERG-HANSEN, 2016).

## **1.8 A Paraoxonase Humana-1**

As paraoxonases foram originalmente descobertas como enzimas que tem a capacidade da utilização do substrato paraoxon e hidrolisam compostos tóxicos

organofosforados (MACKNESS *et al.*, 1998; AVIRAN *et al.*, 1998). É uma esterase cálcio dependente, sintetizada no fígado e secretada na corrente sanguínea e que circula no plasma associada exclusivamente a partículas de HDL-col. (DANTOINE *et al.*, 2003; DRAGANOV; LA DU, 2004). Existem três membros da família das paraoxonases atualmente conhecidas (PON1, PON2 e PON3), as quais são codificadas por três genes separados no mesmo cromossomo 7q 21.3 humano. Estudos de atividade enzimática das paraoxonases revelaram atividade esterase e lactonase em adição à atividade organofosfatase (LITHINOV; MAHINI; GARELNABI, 2012).

Assim, a paraoxonase humana 1 (PON1) foi primeiramente identificada como barreira protetora contra envenenamento por organofosforados. É uma esterase que catalisa a hidrólise do organofosforado paraoxon e que hidrolisa lipídios, os quais estão envolvidos na iniciação e progressão da aterosclerose (AVIRAM *et al.*, 1998; ZANONI *et al.*, 2016; ABELLÓ *et al.*, 2014; BOUNAFAA *et al.*, 2015). Baseando-se em parâmetros cinéticos em direção a diferentes substratos, assume-se que as lactonas são provavelmente seu substrato fisiológico. A hidrólise da thiolactona homocisteína pela PON-1 é considerada como sendo protetora contra a doença coronariana. A atividade da PON1 é reconhecida como um fator de risco independente para doenças vasculares ateroscleróticas (MACKNESS; MACKNESS, 2015). PON1 é uma esterase associada ao HDL que parece contribuir para as atividades antioxidante e antiaterosclerótica do HDL. Mais de 95% da PON1 está associada com partículas de HDL na circulação (IKHLEF *et al.*, 2017). Estudos imuno-histoquímicos têm indicado a presença da PON-1 em uma grande variedade de tecidos de mamíferos. Se a sua presença nesses tecidos é devido à síntese local ou se a PON-1 está sendo transportada a estes tecidos pelo HDL, isto é incerto.

Em resumo, a PON1 metaboliza peróxidos lipídicos protegendo do acúmulo de LDL e inibindo a formação de “*foam cells*” (Mackess *et al.*, 1998) e exerce atividades anti-inflamatórias pela hidrolização de fosfolípidos oxidados, os quais são moduladores da inflamação e se acumulam nas lesões ateroscleróticas (LESNA *et al.*, 2018).

### 1.9 Paraoxonase como uma importante mediadora da função antioxidante do HDL-col.

A atividade antioxidante da lipoproteína de alta densidade (HDL) é em grande parte devido ao seu teor PON1. Vários estudos mostraram que alterações na concentração ou atividade da PON1 constituem um fator de risco para a doença arterial coronariana. Experimentos com paraoxonase transgênica em camundongos knock-out indicam o potencial para esta enzima para proteger contra a aterogênese. Provavelmente, isso é mediado por suas propriedades de oxidação em LDL e/ou em macrófagos (GUGLIUCCI; MENINI, 2015). Avanços significativos foram feitos na compreensão da função bioquímica básica do PON1 e na descoberta de possíveis moduladores de sua atividade. Estudos de caso e controle sobre a atividade da PON1 e doença cardíaca coronariana mostraram clara associação entre a DAC e sua baixa atividade sérica. Essa relação foi reforçada ainda mais pela publicação do primeiro estudo prospectivo mostrando baixa atividade sérica da PON1 como um preditor independente de novos eventos de DAC. A atividade PON1 pode ser um alvo para intervenção farmacológica.

Existem mais de 200 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) relacionados a PON1. Os polimorfismos mais estudados estão localizados na região codificadora do gene, o L55M e o Q192R, e são responsáveis pela alteração da estabilidade da enzima e pela origem da aloenzima substrato-dependente, respectivamente (COSTA *et al.*, 2005). Outro importante polimorfismo está localizado na região promotora C108T e exerce efeito significativo sobre a atividade sérica e expressão gênica (Suehiro, 2000), pois atua em um local de transcrição (DEAKIN *et al.*, 2003; SCHRODER; RIMBACH, 2011). A presença do alelo C resulta em concentração da PON 1 até duas vezes superior àquela observada na presença do alelo T (BROPHY *et al.*, 2001; DEAKIN *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2016).

A atividade da PON sofre influência de diversos fatores e estes podem atuar estimulando sua ação ou expressão. Foi observada uma variabilidade de 10 a 40 vezes quando comparados indivíduos de diferentes etnias (CATAÑO *et al.*, 2006; ELKIRAN *et al.*, 2007; EOM *et al.*, 2011). Na literatura há relatos de que a atividade da PON1 sofre alterações em decorrência de doenças que envolvam estresse oxidativo, como doença cardiovascular (Gupta *et al.*, 2011), diabetes *Mellitus* (Flekac *et al.*, 2008;) e câncer (STEVENS *et al.*, 2006; ELKIRAN *et al.*, 2007).



Mesmo em indivíduos saudáveis a enzima pode estar alterada (Ferreira, 2007, Parra *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2011) podendo estar relacionada ao tabagismo, menopausa e dietas aterogênicas (FAGGIONI, 2003; HOLLAND *et al.*, 2006; PRAKASH *et al.*, 2007; TSAKARS *et al.*, 2009).

Polimorfismos genéticos que afetam a PON1 podem ser fatores de risco predisponentes tanto na toxicologia ambiental quanto nas doenças cardiovasculares (MEDINA-DÍAZ *et al.*, 2017).

Indivíduos apresentando polimorfismos da PON1 L55M com genótipos MM são considerados como menos protegidos contra a oxidação da LDL, enquanto LL são mais resistentes ao estresse oxidativo. LL tem maior atividade hidrolítica paraoxon, enquanto MM tem menor atividade paraoxonase (SEN-BANERJEE; SILES; CAMPOS, 2000). Segundo trabalhos de Durrington e Mackness, a capacidade de proteção efetuada pela enzima em relação à oxidação das LDL é oposta à sua atividade hidrolítica em relação ao paraoxon. Assim, a enzima pode ser mais ativa ao hidrolisar o paraoxon e menos ativa na proteção da oxidação das LDL. Não existe muita informação na literatura relacionando polimorfismos da região promotora, atividade da PON1 e risco de DAC. Gupta *et al.* (2011), encontraram que a atividade da PON foi significativamente maior em indivíduos com o polimorfismo C108T com genótipo CC. Observaram que o aumento da atividade da enzima foi crescente de acordo com o padrão genotípico, apresentando os homozigotos selvagens (CC) maior atividade paraoxonase quando comparados aos heterozigotos e os homozigotos mutados (TT), estes últimos apresentando a mais baixa atividade paraoxonase.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) da PON1 têm mostrado ligação com um número de outras doenças incluindo complicações diabéticas, vários tipos de câncer, como o de mama, infecção por HIV, doenças renais e hepáticas e degeneração macular. Infelizmente, a vasta maioria destes estudos inclui somente um pequeno número de sujeitos e são muito propensos a erros estatísticos. Existe uma necessidade urgente de grandes estudos clínico-epidemiológicos para confirmar as relações de polimorfismos da PON1 e doenças diversas (HUSSEIN *et al.*, 2011).

A distribuição de polimorfismos da PON1 varia com a etnia. O alelo 55M da PON1 é menos frequente em populações orientais e em negros americanos (MALLINCKRODT *et al.*, 1983). Estas diferenças étnicas na distribuição dos SNP's podem levar à uma grande diferença de atividade da PON entre as populações e como

consequência produzindo ampla variação de fenótipos caracterizados por diferenças na probabilidade de acometimento por doenças cardiovasculares.

### **1.10 Justificativa**

A observação do aumento progressivo de casos de doença coronariana no ambulatório de cardiologia de um hospital público terciário, em indivíduos cada vez mais jovens nos últimos anos, motivou a procura por fatores de risco que possam ser precocemente identificados e controlados, e assim, retardar a manifestação da doença. O acometimento por DAC nesta faixa etária pode trazer sequelas graves e perda de valiosos anos produtivos com impacto social, econômico e na qualidade de vida destes indivíduos. Nem sempre encontramos neste subgrupo etário os fatores de risco clássicos para DAC, porém em muitos deles é observado o relato de uma história familiar em parentes de primeiro grau, indicando que há um componente genético talvez modulado por fatores ambientais. Além disso, a observação de que a maioria destes jovens, apresentaram alteração do perfil lipídico caracterizado por níveis muito baixos de HDL colesterol, gerou interrogações sobre os possíveis moduladores da função dessa lipoproteína a qual se atribui um importante papel protetor na ocorrência de aterosclerose. Procuramos então conhecer a estrutura do HDL e encontramos que a PON1 atuava como enzima responsável pelos grandes benefícios atribuídos ao HDL na prevenção da doença aterosclerótica. Encontramos informações na literatura que esta enzima apresentava grande variabilidade na sua concentração e atividade de acordo com o grupo populacional estudado e fomos apresentados a um vasto número de trabalhos com resultados conflitantes e contraditórios. Atribui-se a isso a variabilidade genética causada pela grande quantidade de SNPs a ela associadas.

Dados de distribuição de frequência de genótipos PON1 e o risco de doenças cardiovasculares (DCV) têm sido relatados em várias populações ao redor do mundo. Entretanto, não encontramos estudos que tenham investigado sua prevalência na população brasileira, nordestina e em faixas etárias mais jovens, onde a DAC está se tornando uma causa significativa de morbimortalidade prematuras.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a prevalência de polimorfismos genéticos da Paraoxonase Humana 1 (PON1) e de anormalidades metabólicas em indivíduos jovens com doença coronariana aterosclerótica.

### **2.2 Objetivos específicos**

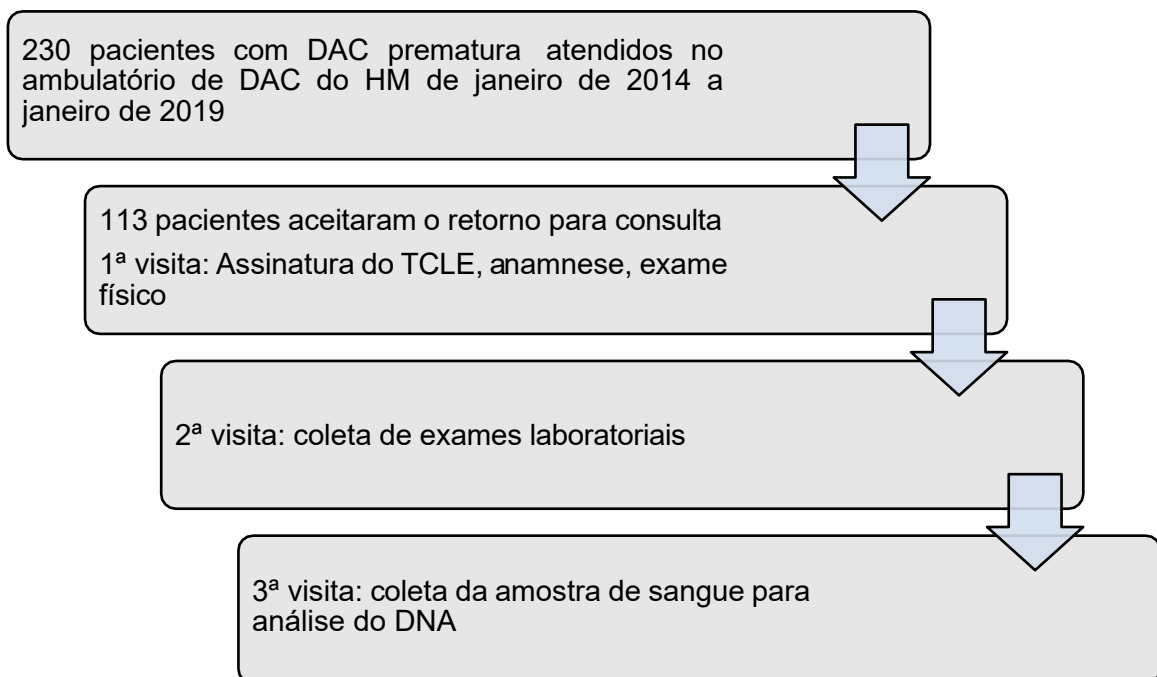
- Avaliar a associação de polimorfismos da Paraoxonase Humana 1 com os fatores de risco clássicos para DAC em jovens com doença coronariana aterosclerótica.
- Avaliar a associação de polimorfismos da Paraoxonase Humana 1 com o perfil laboratorial dos indivíduos com doença coronariana e comparar com controles normais.
- Associar os polimorfismos C108T e L 55 M da Paraoxonase Humana 1 com a extensão da aterosclerose e o território coronariano acometido em jovens com doença aterosclerótica.
- Sugerir genes de referência para investigação em pacientes jovens e seus familiares.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Hipótese do estudo

Os polimorfismos genéticos C108T e L 55 M da Paraoxonase Humana1 PON1 estariam relacionados com a ocorrência prematura de DAC em indivíduos jovens independente da influência dos fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de DAC.

#### 3.2 Desenho do estudo



#### 3.3 Natureza do estudo

Trata-se de um estudo tipo transversal, caso-controle, que avalia o perfil clínico, metabólico e a presença de polimorfismos genéticos da PON-1, C108T e L55M em 113 indivíduos jovens (homens com idade menor que 45 anos e mulheres com idade menor que 55 anos) com diagnóstico de doença coronariana aterosclerótica. O grupo de comparação foi formado por 32 indivíduos jovens, pareados por sexo e idade, assintomáticos, sem história familiar de DAC precoce.

### 3.4 Local do estudo

Os indivíduos envolvidos na pesquisa foram avaliados no ambulatório de cardiologia do Hospital do Coração de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, situado na cidade de Fortaleza, Ceará, que é uma unidade terciária especializada no diagnóstico e tratamento de doenças cardíacas e pulmonares. A instituição assiste pacientes de 184 municípios do Ceará e das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Caracteriza-se pelo atendimento prioritário de procedimentos de alta complexidade, incluindo cirurgia cardiovascular, transplantes cardíacos e angioplastia transluminal percutânea. Possui 303 leitos, sendo 47 destes de UTI. A instituição atua ainda como Centro de Ensino e Pesquisa.

A análise genotípica foi realizada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) que é uma estrutura multidisciplinar de estudos científicos, prestação de serviços, desenvolvimento tecnológico, inovação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de novos medicamentos na indústria. O NPDM é vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) por meio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. O Núcleo foi inaugurado no dia 2 de fevereiro de 2015 e é coordenado pelo Prof. Dr. Odorico Moraes.

### 3.5 Critérios de inclusão

Foram incluídos no grupo caso, indivíduos de ambos os sexos, homens com idade menor que 45 anos e mulheres com idade menor que 55 anos com diagnóstico de doença coronariana aterosclerótica, acompanhados no Ambulatório do Hospital de Messejana, no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2019.

Em virtude da baixa prevalência da doença coronariana em jovens, não foi realizado cálculo amostral, sendo determinado que os pacientes objetos do estudo fossem provenientes de encaminhamentos feitos por profissionais médicos que os atendiam em outros departamentos deste hospital e recrutados ativamente por obtenção de dados no setor de hemodinâmico e posterior contato por telefone, solicitando seu comparecimento no ambulatório de doença coronariana.

O grupo controle é representado por 32 indivíduos, homens com idade inferior a 45 anos e mulheres com idade inferior a 55 anos, pareados por sexo e idade,

sem histórico familiar de DAC precoce, sendo recrutados a partir de voluntários sadios que constavam no banco de dados do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

### **3.6 Critérios de exclusão**

Foram excluídos indivíduos portadores de doenças tireoidianas, doenças do colágeno, insuficiência cardíaca congestiva em grau avançado (classe funcional grau III e IV), gravidez, neoplasias, doenças renais, distúrbios do cálcio, hipertensão descontrolada, alergia a contraste iodado, usuários de drogas ilícitas, pacientes com suspeita de hipercolesterolemia familiar I, indivíduos com anomalia de coronárias ou portadores de doença coronariana não aterosclerótica à cineangiocoronariografia.

### **3.7 Avaliação clínica**

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

#### ***3.7.1 História familiar de DAC precoce***

Foi considerado antecedente familiar de DAC precoce parente de primeiro grau homem com manifestação de doença coronária com menos de 55 anos ou mulher com menos de 65 anos.

#### ***3.7.2 Tabagismo***

Consideramos tabagista, indivíduo que fumou um ou mais cigarros nos últimos 180 dias, e ex-tabagista os indivíduos que fumaram há mais de 180 dias.

#### ***3.7.3 Peso, altura e índice de massa corpórea (IMC)***

Peso e altura foram aferidos em balança antropométrica; o IMC foi calculado pela fórmula: peso dividido por altura elevada ao quadrado.

### **3.7.4 Aferição de circunferência abdominal e quadril**

Com o uso de fita métrica inelástica, foram medidas as circunferências: abdominal. na altura do ponto médio da distância entre a crista ilíaca ântero-superior e o rebordo inferior do arco costal (cintura) e do quadril, na crista ilíaca ântero-superior (quadril), com o indivíduo em posição ereta e o abdome relaxado.

### **3.7.5 Pressão arterial**

A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) braquial foram medidas com um esfigmomanômetro aneróide, após 15 minutos de descanso, na posição sentada, consideradas fases I e V de sons de *Korotkoff* como PAS e PAD em mmHg, respectivamente, e usada média de duas medidas com até cinco minutos de intervalo.

- a) Hipertensão Arterial Sistêmica: foram considerados hipertensos, pacientes em uso de anti-hipertensivo e aqueles com PAS acima de 140 mmHg e/ou PAD acima de 90 mmHg.
- b) Diabetes *Mellitus*: foram considerados diabéticos aqueles que fazem uso prévio de antidiabético oral e ou insulina, ou com duas dosagens de glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL.
- c) Dislipidemia: o diagnóstico de dislipidemia foi estabelecido segundo critérios da V Diretriz Brasileira de Dislipidemias.

## **3.8 Avaliação angiográfica**

A análise da coronariografia foi realizada por médicos hemodinamicistas certificados pela Sociedade Brasileira de Hemodinâmica. A classificação cineangio-coronariográfica foi de acordo com o percentual de obstrução da luz da artéria coronária. As lesões obstrutivas foram classificadas em não críticas, se apresentarem obstrução  $< 50\%$  da luz arterial; críticas, se apresentarem obstrução de  $50\%$  ou mais da luz arterial e oclusivas; com obstrução total, sem fluxo através da artéria definido como TIMI (*Thrombolysis in Myocardial Infarction*) zero. Os indivíduos com apenas uma lesão  $> 50\%$  foram classificados como uniarteriais e diante de mais de uma lesão  $> 50\%$ , como multiarteriais.

### 3.9 Genotipagem

#### 3.9.1 Extração de DNA

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com EDTA, em seguida foram extraídas usando o kit PureLink® Genomic DNA (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com instruções do fabricante.

Após o isolamento do material genômico, as amostras foram armazenadas em freezer -20° até a etapa de análise dos polimorfismos pela técnica realizada por PCR em tempo real.

#### 3.9.2 Desenho de primers e detecção

As sequências de polimorfismos do gene PON1: rs705379 e rs854563, e do gene da  $\beta$ -actina que foram usadas como controle endógeno, (Tabela 1) foram enviados à empresa *Thermo Fisher Scientific* (São Paulo, Brasil) para desenho e síntese de primers com sondas. O método de detecção foi o sistema *TaqMan® SNP Genotyping assays* (*Applied Biosystems*).

Tabela 1 – Identificação de primers

| Gene            | TaqMan® Assay ID |
|-----------------|------------------|
| PON1- rs 705379 | C 11708905_10    |
| PON1- rs 854563 | C 8952841_10     |
| $\beta$ -actina | NM_001101.2      |

#### 3.9.3 Sistema Taqman® de discriminação alélica reação por PCR em tempo real

A detecção dos polimorfismos genéticos (SNPs) do gene PON1 citados acima foi realizada por PCR em tempo real utilizando o aparelho QuantStudio® 5 (*Applied Biosystems®*) e kit comercial *TaqMan® Genotyping Master Mix* (*ThermoFisher Scientific*).

A genotipagem de SNPs por PCR em tempo real é uma técnica extremamente sensível que permite a discriminação alélica mesmo quando pequenas



quantidades de DNA são disponíveis. Esta técnica utiliza sondas Taqman® que diferem em relação ao nucleotídeo a ser pesquisado com emissão de fluorescências distintas, de acordo com a clivagem da sonda do alelo amplificado.

A identificação dos diferentes genótipos é feita pela disposição dos mesmos em um *software* presente no equipamento, que faz a discriminação alélica e pela localização em gráfico, classifica as amostras como homozigotas para o alelo normal, homozigotas para o alelo mutado ou heterozigotas (*ThermoFisher Scientific*). O protocolo da reação utiliza as quantidades de reagentes descritas na Tabela 2, totalizando uma reação de 25µL. O protocolo de amplificação da reação constituiu-se da seguinte ciclagem: 50°C/2 min, 95°C/10 min e 50 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/ 1 min.

**Tabela 2** – Reagentes utilizados para técnica de genotipagem por PCR em tempo real.

| Reagentes  | µL   |
|--|------|
| Água deionizada                                      | 9,25 |
| Tampão ( <i>TaqMan® gene expression master Mix</i> ) | 12,5 |
| <i>TaqMan® genotyping assay</i>                      | 1,25 |
| cDNA   | 2    |
|  | 25µL |

### 3.10 Coleta de dados laboratoriais

Todos os pacientes realizaram os seguintes exames: glicemia jejum, hemoglobina glicada, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, TSH, creatinina.

Todas as amostras de sangue, devidamente identificadas, foram colhidas após jejum de 12 horas, seguindo-se à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos para separação do soro do plasma. Todas as amostras foram processadas no laboratório do Hospital de Messejana.

#### 3.10.1 Métodos laboratoriais

As determinações sanguíneas de colesterol total e HDL-colesterol foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico (aparelho HITACHI 917 – Roche®).

A dosagem de triglicerídeos foi realizada pelo método GPO-PAP (aparelho HITACHI 917- Roche®). A dosagem de glicose foi realizada pelo método PAP colorimétrico (aparelho HITACHI 917 – Roche®). O LDL-colesterol foi calculado pela fórmula de Friedewald para valores < 400 mg/dl de triglicerídeos.

O TSH foi determinado por meio de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência. Este ensaio de terceira geração foi realizado no aparelho modular Analytics E170- Roche®

### **3.10.2 Coleta de dados clínicos**

Todos os dados clínicos foram coletados exclusivamente pelo autor da pesquisa. As informações foram registradas em prontuário específico para o estudo e consta de anamnese clássica e exame físico completo com aferição da pressão arterial, medida da circunferência abdominal e cálculo do índice de massa corpórea. O questionário utilizado nesse estudo encontra-se no Apêndice.

### **3.11 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – CEP/UFC/PROPESQ, sob número 2.206.472 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes sob o número 2.217.472, instituição coparticipante, estando os pesquisadores cientes da obediência aos preceitos éticos de pesquisa, pautados na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Os indivíduos do grupo caso foram informados de maneira clara, sobre os objetivos e importância da pesquisa desenvolvida neste trabalho. Todos os envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme a resolução número 196, de 13 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

### **3.12 Análise Estatística**

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média e desvio padrão e comparados por meio dos testes t de Student e ANOVA/Bonferroni. Os dados categóricos foram

expressos em forma de frequência absoluta e percentual e comparados por meio do teste qui-quadrado de Pearson (dados clínicos) ou teste de McNemar (análise entre as sondas). Todas as análises foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20,0 para Windows, adotando uma confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados clínicos da amostra

Na tabela 3, apresentamos as características epidemiológicas e clínicas dos casos. Participaram 55 homens (48,7%) e 24 mulheres (30,4%). A média de idade do diagnóstico da doença coronariana foi de  $39,7 \pm 5,0$  nos homens e de  $43,4 \pm 5,2$  nas mulheres.

Aproximadamente 43% dos casos eram fumantes e 46,0% eram sedentários. A presença de história familiar positiva para DAC foi encontrada em 46,8% dos casos. Em 59,5% dos indivíduos do grupo caso observou-se acometimento aterosclerótico em apenas um território coronariano. Quanto à presença de comorbidades, 68,4% eram diabéticos, 54,4% eram hipertensos e 46,2% eram portadores de alterações no perfil lipídico. A maioria apresentava um baixo nível de escolaridade (56,4%) caracterizado pela não conclusão do ensino fundamental e/ou médio. Ao exame físico, observamos que em ambos os sexos todos apresentavam tanto um IMC elevado (média de  $27,8 \pm 2,8$ ) quanto a presença de obesidade abdominal, constatada pela média da circunferência abdominal de  $97,0 \pm 9,3$  cm nos homens e  $93,7 \pm 7,1$  cm nas mulheres.

**Tabela 3** – Características gerais da população estudada.

|                                  | Total          |
|----------------------------------|----------------|
| <b>SEXO</b>                      |                |
| Feminino                         | 24 (30,4%)     |
| Masculino                        | 55 (48,7%)     |
| <b>IDADE</b>                     |                |
| Homens e mulheres                | $40,8 \pm 5,4$ |
| Homens                           | $39,7 \pm 5,0$ |
| Mulheres                         | $43,4 \pm 5,2$ |
| <b>Nº DE ARTÉRIAS ACOMETIDAS</b> |                |
| Uniarterial                      | 47 (59,5%)     |
| Multiarterial                    | 32 (40,5%)     |
| <b>TABAGISMO</b>                 |                |
| Não                              | 45 (57,0%)     |
| Sim                              | 34 (43,0%)     |
| <b>SEDENTARISMO</b>              |                |
| Sim                              | 52 (46,0%)     |
| Não                              | 27 (23,9%)     |

| <b>HISTÓRIA FAMILIAR</b>                                  |            |
|---|------------|
| Sim   | 37 (46,8%) |
| Não   | 42 (53,2%) |
| <b>Diabetes Mellitus</b>                                  |            |
| Sim   | 54 (68,4%) |
| Não   | 25 (31,6%) |
| <b>Dislipidemia</b>                                       |            |
| Sim   | 36 (46,2%) |
| Não   | 42 (53,8%) |
| <b>Hipertensão arterial</b>                               |            |
| Sim   | 43 (54,4%) |
| Não   | 36 (45,6%) |
| <b>IMC</b>  |            |
| Homens e mulheres   | 27,8 ± 2,8 |
| Homens  | 28,1 ± 3,1 |
| Mulheres  | 27,3 ± 1,7 |
| <b>CA</b>   |            |
| Homens e mulheres   | 96,0 ± 8,8 |
| Homens  | 97,0 ± 9,3 |
| Mulheres  | 93,7 ± 7,1 |
| <b>Escolaridade</b>                                       |            |
| - Analfabetos e ensino fundamental incompleto             | 17 (21,8%) |
| - Ensino fundamental completo até ensino médio incompleto | 27 (34,6%) |
| - Ensino médio completo                                   | 24 (30,8%) |
| - Ensino superior completo                                | 10 (12,8%) |

n, %. IMC (índice de massa corporal); CA (circunferência abdominal)

## 4.2 Avaliação Bioquímica

O resultado dos exames laboratoriais e da análise bioquímica comparativa entre os grupos está descrita na tabela 4. Não se observou diferenças significativas entre os grupos em relação aos valores médios de triglicerídios, creatinina e TSH.

Os valores de colesterol total, HDL, LDL-col eram mais baixos de forma significativa nos casos ( $p < 0,001$ ). Nestes, os valores de glicemia em jejum e hemoglobina glicada eram significativamente mais elevados ( $p < 0,014$ ), observando-se valores médios de  $106.01 \pm 40.10$  e  $5.85 \pm 1.30$ , respectivamente. Os valores médios de LDL-col foram mais baixos no grupo caso ( $89,98$  mg/dl) em relação ao grupo controle ( $120.26 \pm 30.63$ ), devendo-se informar que todos os casos estavam sob uso de estatinas.

**Tabela 4** - Comparação de medidas e valores laboratoriais médios observados em jovens com DAC e controles sadios.

|       | Grupo          |                | p-Valor          |
|-------|----------------|----------------|------------------|
|       | Controle       | Caso           |                  |
| CT    | 198.35 ± 34.07 | 164.81 ± 40.21 | <b>&lt;0,001</b> |
| HDL   | 47.39 ± 9.98   | 35.14 ± 6.96   | <b>&lt;0,001</b> |
| LDL   | 120.26 ± 30.63 | 89.98 ± 32.47  | <b>&lt;0,001</b> |
| TG    | 144.94 ± 65.52 | 153.42 ± 86.53 | 0,623            |
| GJ    | 87.77 ± 7.26   | 106.01 ± 40.10 | <b>0,014</b>     |
| HBA1C | 5.26 ± 0.33    | 5.85 ± 1.30    | <b>0,014</b>     |
| TSH   | 2.61 ± 1.11    | 2.54 ± 1.20    | 0,767            |
| Cr    | 0.86 ± 0.17    | 0.92 ± 0.17    | 0,086            |

\*p<0,05, teste t de Student (média ± DP).

CT: colesterol total; HDL: High density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; TG: Triglicerídios; GJ: Glicemia em jejum; HBA1C: Hemoglobina glicosilada; TSH : hormônio estimulante da tireoide; Cr: creatinina

### 4.3 Caracterização genotípica e frequência alélica em pacientes e controles

Os genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo C108T e L55M nos indivíduos da amostra estudada estão apresentados na tabela 5, onde observamos, em relação ao polimorfismo da PON1 L55M, que a prevalência do genótipo LL foi observado em 61,6% dos casos sendo esta diferença significativa em relação aos controles ( $p < 0,032$ , IC 95% = 0,17 – 0,93). O genótipo MM foi encontrado em 6,7% da amostra. Em relação ao polimorfismo da PON1 C108T não houve diferença significativa nos grupos, sendo o genótipo TT observado em 27,7% dos casos.

Em relação aos alelos L e M, observou-se uma diferença significativa na prevalência do alelo M nos controles em relação aos casos ( $p < 0,032$ , IC 95% = 0,17-0,93). Em relação à frequência dos alelos T e C não foi observada diferença significativa entre casos e controles.

**Tabela 5** – Análise da distribuição genotípica e da frequência alélica entre casos e controles.

| <b>Grupo</b>                |              |                 |             |                |                         |
|-----------------------------|--------------|-----------------|-------------|----------------|-------------------------|
|                             | <b>Total</b> | <b>Controle</b> | <b>Caso</b> | <b>p-Valor</b> | <b>OR (IC95%)</b>       |
| <b>C108T</b>                |              |                 |             |                |                         |
| TT                          | 23 (24,5%)   | 5 (17,2%)       | 18 (27,7%)  | 0,355          | 1.44 (0.42 - 4.94)      |
| CT                          | 36 (38,3%)   | 14 (48,3%)      | 22 (33,8%)  |                | 0.63 (0.24 - 1.70)      |
| CC                          | 35 (37,2%)   | 10 (34,5%)      | 25 (38,5%)  |                | 1                       |
| <b>C108T</b>                |              |                 |             |                |                         |
| CC                          | 35 (37,2%)   | 10 (34,5%)      | 25 (38,5%)  | 0,712          | 0,84 (0,34 - 2,10)      |
| TT/CT*                      | 59 (62,8%)   | 19 (65,5%)      | 40 (61,5%)  |                | 1                       |
| <b>Frequência alélica T</b> |              |                 |             |                |                         |
| T                           | 59 (62,8%)   | 19 (65,5%)      | 40 (61,5%)  | 0,712          | 0,84 (0,33 - 2,10)      |
| C                           | 71 (75,5%)   | 24 (82,8%)      | 47 (72,3%)  | 0,313          | 0,54 (0,18 - 1,64)      |
| <b>L55M</b>                 |              |                 |             |                |                         |
| MM                          | 7 (6,7%)     | 3 (9,7%)        | 4 (5,5%)    | 0,098          | 0,36 (0,07 - 1,81)      |
| LM                          | 40 (38,5%)   | 16 (51,6%)      | 24 (32,9%)  |                | 0,40 (0,16 - 0,98)      |
| LL                          | 57 (54,8%)   | 12 (38,7%)      | 45 (61,6%)  |                | 1                       |
| <b>L55M</b>                 |              |                 |             |                |                         |
| LL                          | 57 (54,8%)   | 12 (38,7%)      | 45 (61,6%)* | <b>0,032</b>   | <b>0,39 (0,17-0,93)</b> |
| MM/LM                       | 47 (45,2%)   | 19 (61,3%) *    | 28 (38,4%)  |                | 1                       |
| <b>Frequência alélica M</b> |              |                 |             |                |                         |
| M                           | 47 (45,2%)   | 19 (61,3%) *    | 28 (38,4%)  | <b>0,032</b>   | <b>0,39 (0,17-0,93)</b> |
| L                           | 97 (93,3%)   | 28 (90,3%)      | 69 (94,5%)  | 0,423          | 1,84 (0,39-8,80)        |

\*p<0,05, teste qui-quadrado de Pearson (n, %)

De acordo com a tabela 6, nos casos ocorre um desbalanceio nos haplótipos que parece estar associado de forma importante ao risco de doença ( $p < 0,013$ ). Ou seja, indivíduos homocigotos para o polimorfismo C108T não serão obrigatoriamente homocigotos para o polimorfismo L55M. No grupo controle, porém, existe uma associação entre os haplótipos, ou seja, o indivíduo que é heterocigoto para o polimorfismo C108T é também heterocigoto para o polimorfismo L55M.

**Tabela 6** – Avaliação dos haplótipos de C108T e L55M da PON1 em jovens com e sem doença coronariana aterosclerótica

| <b>Genótipo</b> |            |               |                |
|-----------------|------------|---------------|----------------|
|                 | <b>CC</b>  | <b>TT/CT*</b> | <b>p-Valor</b> |
| <b>Controle</b> |            |               |                |
| LL              | 7 (70,0%)  | 5 (26,3%)     | 0,727          |
| MM/LM           | 3 (30,0%)  | 14 (73,7%)    |                |
| <b>Casos</b>    |            |               |                |
| LL              | 18 (72,0%) | 21 (52,5%)    | <b>0,013</b>   |
| MM/LM           | 7 (28,0%)  | 19 (47,5%)    |                |

\*p<0,05, teste de McNemar (n, %).

Na tabela 7, observamos que os portadores do alelo T apresentam de forma significativa o diagnóstico de dislipidemia ( $p < 0,042$ ), enquanto os indivíduos portadores do alelo M apresentam significativamente valores maiores de IMC ( $p < 0,011$ ). Não foi observada diferença significativa na associação dos demais fatores de risco com os genótipos de casos e controles.

**Tabela 7** – Associação dos fatores de risco com as características genóticas de casos e controles

|                          | C108T      |             | p-Valor      | L55M       |            | p-Valor      |
|--------------------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|
|                          | CC         | TT/CT       |              | LL         | MM/LM      |              |
| <b>Sexo</b>              |            |             |              |            |            |              |
| Feminino                 | 7 (28,0%)  | 12 (30,0%)  | 0,863        | 10 (22,2%) | 12 (42,9%) | 0,062        |
| Masculino                | 18 (72,0%) | 28 (70,0%)  |              | 35 (77,8%) | 16 (57,1%) |              |
| <b>Idade</b>             |            |             |              |            |            |              |
| Homens e mulheres        | 39,2 ± 6,0 | 40,6 ± 4,7  | 0,296        | 40,3 ± 5,0 | 41,2 ± 6,0 | 0,473        |
| Homens                   | 37,6 ± 5,3 | 40,2 ± 4,8  | 0,082        | 39,6 ± 4,9 | 39,6 ± 5,8 | 0,998        |
| Mulheres                 | 43,6 ± 5,6 | 41,6 ± 4,8  | 0,418        | 42,7 ± 4,8 | 43,4 ± 5,9 | 0,761        |
| <b>Tabagismo</b>         |            |             |              |            |            |              |
| Não                      | 16 (64,0%) | 18 (45,0%)  | 0,136        | 25 (55,6%) | 16 (57,1%) | 0,894        |
| Sim                      | 9 (36,0%)  | 22 (55,0%)  |              | 20 (44,4%) | 12 (42,9%) |              |
| <b>Sedentarismo</b>      |            |             |              |            |            |              |
| Sim                      | 15 (60,0%) | 27 (67,5%)  | 0,538        | 29 (64,4%) | 19 (67,9%) | 0,765        |
| Não                      | 10 (40,0%) | 13 (32,5%)  |              | 16 (35,6%) | 9 (32,1%)  |              |
| <b>História familiar</b> |            |             |              |            |            |              |
| Sim                      | 11 (44,0%) | 20 (50,0%)  | 0,638        | 19 (42,2%) | 14 (50,0%) | 0,516        |
| Não                      | 14 (56,0%) | 20 (50,0%)  |              | 26 (57,8%) | 14 (50,0%) |              |
| <b>DM2</b>               |            |             |              |            |            |              |
| Sim                      | 19 (76,0%) | 27 (67,5%)  | 0,464        | 30 (66,7%) | 21 (75,0%) | 0,451        |
| Não                      | 6 (24,0%)  | 13 (32,5%)  |              | 15 (33,3%) | 7 (25,0%)  |              |
| <b>DLP</b>               |            |             |              |            |            |              |
| Sim                      | 7 (28,0%)  | 21(53,8%)*  | <b>0,042</b> | 20 (44,4%) | 12 (44,4%) | 1,000        |
| Não                      | 18(72,0%)* | 18 (46,2%)  |              | 25 (55,6%) | 15 (55,6%) |              |
| <b>HAS</b>               |            |             |              |            |            |              |
| Sim                      | 14 (56,0%) | 24 (60,0%)  | 0,750        | 26 (57,8%) | 16 (57,1%) | 0,957        |
| Não                      | 11 (44,0%) | 16 (40,0%)  |              | 19 (42,2%) | 12 (42,9%) |              |
| <b>IMC</b>               |            |             |              |            |            |              |
| Homens e mulheres        | 27,7 ± 2,0 | 27,9 ± 3,2  | 0,732        | 27,3 ± 2,7 | 29,0 ± 2,7 | <b>0,011</b> |
| Homens                   | 27,8 ± 2,4 | 28,1 ± 3,5  | 0,745        | 27,4 ± 3,0 | 29,8 ± 2,9 | <b>0,009</b> |
| Mulheres                 | 27,4 ± 0,5 | 27,5 ± 2,2  | 0,947        | 26,9 ± 1,4 | 27,9 ± 1,9 | 0,206        |
| <b>CA</b>                |            |             |              |            |            |              |
| Homens e mulheres        | 94,8 ± 6,3 | 97,1 ± 9,7  | 0,299        | 95,6 ± 8,8 | 97,6 ± 8,9 | 0,346        |
| Homens                   | 96,2 ± 6,8 | 98,5 ± 10,4 | 0,409        | 96,7 ± 9,1 | 99,8 ± 9,5 | 0,280        |
| Mulheres                 | 91,0 ± 2,1 | 93,6 ± 7,0  | 0,256        | 91,4 ± 6,7 | 94,7 ± 7,6 | 0,302        |



#### 4.4 Território coronariano acometido por doença aterosclerótica de acordo com a distribuição genotípica

Observamos na tabela 8 que 100% dos jovens com genótipo MM apresentaram acometimento aterosclerótico no território da artéria Circunflexa (Cx). Não houve diferença significativa entre outros padrões genotípicos e o acometimento dos demais territórios coronarianos.

**Tabela 8** – Distribuição genotípica de acordo com o padrão de acometimento arterial observado na coronariografia em indivíduos com doença coronariana aterosclerótica

|                  | C108T rs (705379) |               |                |               | p-Valor | L55M (rs 854563) |               |               |               | p-Valor |
|------------------|-------------------|---------------|----------------|---------------|---------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
|                  | Total             | TT            | CT             | CC            |         | Total            | MM            | LM            | LL            |         |
| <b>Lesão DA</b>  |                   |               |                |               |         |                  |               |               |               |         |
| Sim              | 48<br>(73.8%)     | 14<br>(77.8%) | 17<br>(77.3%)  | 17<br>(68.0%) | 0,698   | 55<br>(75.3%)    | 3<br>(75.0%)  | 21<br>(87.5%) | 31<br>(68.9%) | 0,907   |
| Não              | 17<br>(26.2%)     | 4<br>(22.2%)  | 5<br>(22.7%)   | 8<br>(32.0%)  |         | 18<br>(24.7%)    | 1<br>(25.0%)  | 3<br>(12.5%)  | 14<br>(31.1%) |         |
| <b>Lesão CD</b>  |                   |               |                |               |         |                  |               |               |               |         |
| Sim              | 29<br>(44.6%)     | 6<br>(33.3%)  | 10<br>(45.5%)  | 13<br>(52.0%) | 0,476   | 31<br>(42.5%)    | 2<br>(50.0%)  | 7<br>(29.2%)  | 22<br>(48.9%) | 0,274   |
| Não              | 36<br>(55.4%)     | 12<br>(66.7%) | 12<br>(54.5%)  | 12<br>(48.0%) |         | 42<br>(57.5%)    | 2<br>(50.0%)  | 17<br>(70.8%) | 23<br>(51.1%) |         |
| <b>Lesão CX</b>  |                   |               |                |               |         |                  |               |               |               |         |
| Sim              | 23<br>(35.4%)     | 8<br>(44.4%)  | 8<br>(36.4%)   | 7<br>(28.0%)  | 0,535   | 29<br>(39.7%)    | 4<br>(100.0%) | 8<br>(33.3%)  | 17<br>(37.8%) | 0,038   |
| Não              | 42<br>(64.6%)     | 10<br>(55.6%) | 14<br>(63.6%)  | 18<br>(72.0%) |         | 44<br>(60.3%)    | 0<br>(0.0%)   | 16<br>(66.7%) | 28<br>(62.2%) |         |
| <b>Lesão TCE</b> |                   |               |                |               |         |                  |               |               |               |         |
| Sim              | 4<br>(6.2%)       | 1<br>(5.6%)   | 0<br>(0.0%)    | 3<br>(12.0%)  | 0,231   | 5<br>(6.8%)      | 0<br>(0.0%)   | 3<br>(12.5%)  | 2<br>(4.4%)   | 0,386   |
| Não              | 61<br>(93.8%)     | 17<br>(94.4%) | 22<br>(100.0%) | 22<br>(88.0%) |         | 68<br>(93.2%)    | 4<br>(100.0%) | 21<br>(87.5%) | 43<br>(95.6%) |         |

\*p<0,05, teste qui-quadrado de Pearson (n, %)

DA: Artéria Descendente anterior; CD: Artéria Coronária direita; Cx: Artéria Circunflexa, TCE : Tronco da coronária esquerda

#### 4.5 Perfil bioquímico e sua relação com a distribuição genotípica e frequência alélica

Na tabela 9, podemos observar uma diferença significativa nos valores de TSH ( $p < 0,021$ ) com médias mais baixas de TSH nos casos que apresentavam genótipo CC para o polimorfismo C108T da PON1. Não foi observada diferença significativa nos valores dos demais parâmetros laboratoriais em relação às características genotípicas avaliadas.

**Tabela 9** – Análise da distribuição genotípica dos Polimorfismos da PON-1 com os parâmetros laboratoriais em indivíduos com e sem doença coronariana aterosclerótica

|                 | C108T          |                |                 | p-Valor      | MM             | L55M            |                | p-Valor |
|-----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|----------------|-----------------|----------------|---------|
|                 | TT             | TC             | CC              |              |                | LM              | LL             |         |
| <b>Controle</b> |                |                |                 |              |                |                 |                |         |
| CT              | 196.60 ± 44.21 | 198.07 ± 37.32 | 196.20 ± 23.87  | 0,991        | 209.33 ± 54.50 | 202.69 ± 34.13  | 189.83 ± 29.97 | 0,532   |
| HDL             | 48.00 ± 8.72   | 47.36 ± 11.39  | 45.00 ± 8.43    | 0,809        | 51.33 ± 5.03   | 46.25 ± 10.57   | 47.92 ± 10.40  | 0,715   |
| LDL             | 120.64 ± 39.21 | 123.89 ± 35.52 | 114.74 ± 17.82  | 0,780        | 122.40 ± 37.12 | 124.74 ± 31.36  | 113.75 ± 29.84 | 0,653   |
| TG              | 186.80 ± 75.25 | 137.57 ± 61.88 | 147.20 ± 64.98  | 0,361        | 128.33 ± 52.58 | 158.19 ± 72.29  | 131.42 ± 59.58 | 0,523   |
| GJ              | 94.00 ± 9.30   | 86.43 ± 4.45   | 86.20 ± 8.04    | 0,088        | 91.67 ± 6.51   | 87.25 ± 7.85    | 87.50 ± 6.87   | 0,633   |
| HBA1C           | 5.44 ± 0.27    | 5.24 ± 0.39    | 5.17 ± 0.30     | 0,360        | 5.40 ± 0.26    | 5.33 ± 0.36     | 5.13 ± 0.29    | 0,203   |
| TSH             | 2.78 ± 1.25    | 2.73 ± 0.96    | 2.41 ± 1.26     | 0,748        | 2.42 ± 1.27    | 2.95 ± 1.02     | 2.20 ± 1.14    | 0,204   |
| Cr              | 0.93 ± 0.13    | 0.83 ± 0.15    | 0.89 ± 0.20     | 0,457        | 0.83 ± 0.16    | 0.89 ± 0.14     | 0.82 ± 0.20    | 0,561   |
| <b>Caso</b>     |                |                |                 |              |                |                 |                |         |
| CT              | 158.44 ± 43.25 | 168.36 ± 41.12 | 172.96 ± 41.97  | 0,534        | 150.75 ± 41.12 | 166.71 ± 37.45  | 167.71 ± 43.00 | 0,733   |
| HDL             | 34.89 ± 6.69   | 33.68 ± 6.79   | 37.08 ± 6.12    | 0,201        | 36.25 ± 7.68   | 36.88 ± 5.12    | 34.64 ± 7.84   | 0,449   |
| LDL             | 72.33 ± 40.77  | 97.37 ± 33.70  | 96.76 ± 28.97   | 0,156        | 71.50 ± 48.79  | 90.31 ± 32.33   | 91.07 ± 34.67  | 0,738   |
| TG              | 130.06 ± 56.64 | 171.32 ± 87.30 | 159.52 ± 105.25 | 0,329        | 155.00 ± 66.19 | 171.54 ± 102.81 | 149.84 ± 82.86 | 0,633   |
| GJ              | 114.17 ± 52.71 | 114.59 ± 53.51 | 96.40 ± 15.74   | 0,263        | 124.75 ± 53.66 | 104.83 ± 44.47  | 106.36 ± 39.16 | 0,672   |
| HBA1C           | 6.08 ± 1.55    | 6.06 ± 1.70    | 5.55 ± 0.58     | 0,318        | 6.80 ± 2.44    | 5.80 ± 1.09     | 5.85 ± 1.35    | 0,372   |
| TSH             | 2.73 ± 1.00    | 2.03 ± 0.74*   | 2.99 ± 1.53     | <b>0,021</b> | 3.01 ± 1.01    | 2.53 ± 1.42     | 2.50 ± 1.14    | 0,738   |
| Cr              | 0.92 ± 0.19    | 0.96 ± 0.17    | 0.90 ± 0.15     | 0,446        | 0.77 ± 0.07    | 0.91 ± 0.20     | 0.94 ± 0.17    | 0,137   |

\*p<0,05 versus demais genótipos, teste ANOVA/Bonferroni (média ± DP).

E, finalmente, na tabela 10, através da análise por regressão logística multinomial, observamos que a presença de elevação dos níveis de colesterol total e a redução dos níveis de HDL colesterol produzem um aumento superior a três ( $p < 0,033$ ) e nove vezes ( $p < 0,001$ ) no risco de doença aterosclerótica coronariana, respectivamente. A presença isoladamente dos polimorfismos da PON não produz aumento significativo no risco de DAC prematura.

**Tabela 10** – Avaliação do risco de apresentar DAC prematura

|              | OR ajustada  | IC95%       | p-Valor      |
|--------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>Casos</b> |              |             |              |
| CT (+)       | <b>*3,93</b> | <b>1,12</b> | <b>13,83</b> |
| HDL (-)      | <b>*9,37</b> | <b>3,21</b> | <b>27,30</b> |
| TG (+)       | 1,76         | 0,50        | 6,26         |
| C108T        | 0,71         | 0,23        | 2,21         |
| L55M         | 0,42         | 0,14        | 1,32         |

\*p<0,05, regressão logística multinomial; OR = *odd ratio*; IC95% = intervalo de confiança 95% da OR ajustada. CT: Colesterol Total; HDL: *High Density Lipoprotein*; TG: Triglicerídeos.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado um acometimento por doença coronariana aterosclerótica em homens jovens de 48,7%, com a média de idade das manifestações clínicas de 39,7 anos. Observou-se que a maioria eram indivíduos sedentários, com sobrepeso e obesidade visceral, sem história familiar de DAC prematura e com níveis elevados de glicemia em jejum, hemoglobina glicada e baixos níveis de HDL-colesterol. Na coronariografia realizada não foram observadas diferenças na extensão do acometimento da doença coronariana, sendo semelhante o número de uniarteriais e multiarteriais. Da mesma forma, não houve acometimento predominante de nenhum território coronariano.

A predominância de casos do sexo masculino está de acordo com diversos estudos que confirmam que os homens são mais acometidos por DAC precoce (MALLINCKRODT *et al.*, 1983). Esse fato está relacionado à proteção hormonal que as mulheres apresentam enquanto não entram no climatério, sendo o estrogênio um potente ateroprotetor (BARRETT-CONNOR, 1991). Não foi encontrada a clássica associação do fumo, já que 57% dos pacientes analisados não eram tabagistas. Está bem estabelecido que o tabagismo favorece a ocorrência de doença coronariana por promover o desenvolvimento de um perfil inflamatório e trombogênico, produzindo redução dos níveis de prostaciclina e óxido nítrico e aumentando níveis de tromboxano, favorecendo a ocorrência de disfunção endotelial, vasoespasmo e trombose (STALLONES, 2015). Foi também observado que 53% dos pacientes não relataram história familiar de DAC prematura em parentes do 1º grau. Isto está em desacordo com o trabalho de Zarich *et al.* (2006), que avaliaram 165 pacientes norte-americanos com IAM em idade inferior a 45 anos onde foi observado que 70% eram tabagistas e 70% apresentavam história familiar de DAC precoce.

No que se refere ao perfil lipídico, os pacientes apresentaram similaridade ao que se observa na maioria dos estudos que descrevem os baixos níveis de HDL-col como a alteração lipídica mais encontrada em indivíduos com DAC precoce (SALEHEEN *et al.*, 2015).

Estes estudos ressaltam que níveis de HDL-col abaixo de 35 mg/dl, temos aumento do risco de ocorrência de DAC em pelo menos 4 vezes, e inversamente, aumento de 2mg/dl de HDL-col confere uma redução do risco de novos eventos e menor incidência de intervenções coronarianas percutâneas (STONE *et al.*, 2014).

Apesar da existência de evidências epidemiológicas consistentes que atribuem à diminuição do HDL-col um importante fator de risco aterosclerótico, seu papel exato na patogênese da DAC não está claro. No entanto, vários estudos mostraram que não somente a gravidade de lesões angiográficas, mas também o risco de eventos cardiovasculares relacionados a baixas concentrações de HDL-col são decorrentes de uma ineficaz mobilização do colesterol das artérias e tecidos periféricos caracterizando um transporte reverso de colesterol ineficaz (FERENCE *et al.*, 2015). Acredita-se que neste contexto, a presença de alterações genéticas, caracterizadas por polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's), reforçam esse papel ineficaz e podem favorecer isoladamente, ou ainda ser enaltecidos pela presença de fatores de risco como o sobrepeso e a obesidade abdominal que atuariam como fatores epigenéticos (RANKINEN *et al.*, 2015).

Também foi observada uma diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de hemoglobina glicada. A literatura mostra que um perfil glicêmico alterado, previamente ao diagnóstico de diabetes, gera um ambiente propício ao desenvolvimento de dano cardiovascular (CLEMMONS, 2015). É importante ressaltar que a maioria dos casos desconhecia qualquer alteração do perfil glicêmico previamente ao diagnóstico da sua doença.

Quanto à extensão do acometimento coronariano, diversos autores discutem como sendo incomum a doença coronariana multiarterial em indivíduos com DAC precoce (BIBBINS-DOMINGO *et al.*, 2007). Embora estudos prévios relatem que o acometimento coronariano em jovens seja principalmente uniarterial e de menor extensão, este estudo não demonstrou uma predominância significativa quanto ao padrão de envolvimento coronariano uni ou multiarterial. Até o presente momento não identificamos estudos que correlacionem a presença de alterações genotípicas com o predomínio do acometimento de territórios coronarianos específicos. Alguns estudos apontam a possibilidade de que pacientes com características genotípicas específicas poderiam apresentar uma maior severidade na extensão do território coronariano.

Uma das hipóteses levantadas nesse estudo foi de que a presença de polimorfismos genéticos da PON-1, principal enzima constituinte das partículas de HDL e a ela atribuída às propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e atuante no transporte reverso do colesterol, promoveria alterações na sua concentração e ou atividade, propiciando por conseguinte, um ambiente favorável à ocorrência de

aterosclerose de forma independente da presença de outros fatores de risco, classicamente conhecidos na gênese da doença. Essas alterações genéticas tornariam o indivíduo predisponente a desenvolver aterosclerose precocemente mesmo na ausência de níveis elevados de LDL colesterol e poderiam intensificar o papel de outros fatores de risco como os baixos níveis de HDL colesterol, disglucemia, sobrepeso e obesidade abdominal. Poucos estudos foram realizados para analisar a associação do polimorfismo L55M com doença coronariana e desses, muitos apresentaram resultados inconsistentes. Blatter *et al.* (1993); Mackness; Durrington; Mackness (2004), encontraram que o polimorfismo da PON-1 L55M tem um efeito significativo na sua atividade de modo independente e Schmidt *et al.* (1998) também observou uma associação independente de DAC com este polimorfismo em indivíduos austríacos. Garin; Moren; James (2006), investigaram o polimorfismo da região promotora da PON1 C108T em pacientes com cardiopatia isquêmica e seus resultados mostraram que os indivíduos com genótipo CC tinham níveis significativamente mais elevados de HDL colesterol que os heterozigotos. Em contraste, não foi observada diferença significativa nos níveis de LDL e HDL para os polimorfismos da PON1 L55M (GARIN; MOREN; JAMES, 2006). No presente estudo, foi encontrada uma prevalência do genótipo LL para o polimorfismo L55M da PON1 2.54 vezes maior nos casos que nos controles. Observou-se uma maior frequência alélica de M nos jovens saudáveis. Este achado está em desacordo com o trabalho de Bounafaa *et al.* (2015), que mostrou em uma amostra de 305 indivíduos norte-africanos que aqueles portadores de genótipo PON1 55MM apresentaram um risco mais elevado de doença coronariana que os portadores de genótipo 55LL. Entretanto, observamos diversas contradições nos estudos disponíveis. Em uma revisão feita por Litvinov *et al.*, em 2012 este relatou que a atividade antioxidante da PON1 diminui de forma sequencial nos genótipos MM > LM > LL, apresentando os homozigotos selvagens (LL) cerca da metade da atividade da enzima paraoxonase em relação aos homozigotos mutados (MM). É enorme a frequência da variação alélica entre as populações. A frequência do alelo mutado M é maior em brancos que em pretos. Uma menor frequência do alelo M tem sido relatada na população chinesa (IMAI *et al.*, 2000).

Quanto ao polimorfismo C108T, não foi encontrada diferença significativa na presença entre casos e controles, observando-se um equilíbrio na frequência alélica. O genótipo CC é o responsável pela maior atividade da PON1, já o genótipo

TT se relaciona com a baixa expressão gênica e a uma reduzida atividade sérica da enzima (KIM *et al.*, 2012).

Najafi *et al.* (2009) demonstrou uma associação entre o polimorfismo C108T e DAC. Leviev; James (2000) observaram que portadores de genótipo 108 CC foram protegidos do acometimento por DAC em idade inferior a 60 anos, mas não em indivíduos mais velhos. No estudo de Gupta *et al.* (2011), não foi observada associação do polimorfismo C108T com DAC após ajuste com os fatores de risco tradicionais (GUPTA *et al.*, 2011).

Quando foram analisado os genótipos de casos e controles de forma conjunta, ou seja, como análise de haplótipos, observou-se que nos casos ocorreram desbalanceio nos haplótipos ou desequilíbrio de ligação que parece estar associado de forma importante ao risco de doença. Esta observação é corroborada por Gupta *et al.* (2011), que salienta que a determinação de haplótipos está ganhando cada vez mais atenção pela constatação de que múltiplos SNP's associados apresentam um maior potencial para promover doença do que quando são analisados isoladamente. Falta muita informação em relação aos haplótipos da PON1 e o risco de DAC. Leviev; James (2000) também mostraram um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos C108T e L55M entre os portadores de DAC.

Uma observação interessante no presente estudo é que foi encontrada uma diferença significativa nos valores de TSH nos casos com genótipo CT ou TT para o polimorfismo C108T, apesar de os valores de TSH estarem dentro do valor de referência do método. Deve-se salientar que até este momento não é do nosso conhecimento a existência de estudos que avaliaram a relação da atividade ou concentração da paraoxonase humana 1 com a função tireoidiana e suas consequências no desenvolvimento da DAC precoce. Diversos estudos reconhecem a relação entre valores de TSH mais elevados, mesmo dentro de um valor de referência normal e o risco cardiovascular, mas em geral correlacionam este achado ao fato destes valores de TSH estarem associados com diagnóstico de SM (LEE *et al.*, 2011). É possível que esta observação esteja em acordo com as ações dos hormônios tireoidianos no sistema cardiovascular. Sabe-se que o miocárdio e o tecido vascular endotelial têm receptores para tais hormônios e são sensíveis a mudanças nas concentrações séricas dos mesmos, ainda que em mínimas variações (MOUROUZIS, 2012). Essas observações levam à discussão se os valores séricos

de TSH na presença de polimorfismos da PON1 contribuem para um ambiente de maior risco cardiovascular.

E, finalmente, neste estudo observamos através da análise multinomial por regressão logística que independente da presença dos polimorfismos da PON1 aqui avaliados, a intensidade do risco de ocorrer doença coronariana sintomática em idade precoce é três vezes maior naqueles indivíduos portadores de colesterol total elevado e cerca de 9 vezes se apresentarem baixos níveis de HDL colesterol. A presença da mutação alélica vai interferir indiretamente no risco de desenvolvimento de doença ao promover um ambiente propício como sobrepeso e obesidade visceral que concorrem para a ocorrência de alterações metabólicas principalmente no perfil glicídico e lipídico e de caráter aterogênico.

Quem apresenta genótipo TT ou CT para o polimorfismo PON1 C108T deverá acompanhar agressivamente os níveis de LDL e HDL colesterol, e naqueles com genótipo MM ou LM da PON1 L55M deverão ter um controle agressivo do seu IMC.

## 6 CONCLUSÃO

Os principais achados deste estudo foram:

- Elevada prevalência de fatores de risco clássicos para doença coronariana como o sedentarismo, a obesidade visceral, alterações da glicemia em jejum e hemoglobina glicada em jovens com doença aterosclerótica.
- Presença de níveis elevados de LDL colesterol e reduzidos de HDL colesterol nos jovens com doença coronariana aterosclerótica prematura.
- A presença de desequilíbrio de ligação nos polimorfismos estudados está associada de forma importante ao risco de doença.
- Uma maior associação do genótipo TT com dislipidemia.
- Uma maior associação do alelo M com o diagnóstico de sobrepeso.
- A característica genotípica associada à presença de um ambiente metabólico desfavorável pode facilitar o desenvolvimento precoce da aterosclerose.



## 7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A procura por marcadores de risco genético tem trazido amplo conhecimento sobre novas vias fisiopatológicas e suas interações na ocorrência e gravidade da DAC. Esses novos fenômenos têm motivado a identificação do maior número possível de SNP's associados principalmente a alteração do perfil lipídico e promotores de um perfil aterotrombótico. Estes marcadores genéticos seriam capazes de estratificar de maneira precoce, indivíduos sob risco de eventos coronarianos e talvez até predizer a resposta farmacológica ao uso de antiagregantes plaquetários e estatinas. A identificação destes indivíduos sob risco ocorreria a partir daqueles que apresentam uma história familiar precoce de DAC, apresentam um perfil lipídico anormal e mesmo assim persistem considerados pelos métodos clínicos de estratificação tradicionais como no máximo, sendo de risco intermediário. Esses indivíduos, de acordo com as diretrizes clínicas em vigência não são selecionados para intervenções farmacológicas precoces e potentes.

Grandes foram os obstáculos enfrentados durante a elaboração deste estudo. Não existia prontuário eletrônico no Hospital de Messejana, dificultando em demasia a obtenção de dados referentes aos exames laboratoriais e coronariografia realizados nos jovens pacientes. Além disso, os registros do senso do serviço de hemodinâmica trazem informações incompletas, o que, por sua vez traz prejuízo à busca ativa dos pacientes. Portanto, provavelmente deixamos de avaliar muitos pacientes com doença coronariana precoce neste período. Houve interrupção do acompanhamento ambulatorial dos pacientes entre março de 2018 e janeiro de 2019, com perda de seguimento de muitos deles por adoecimento por cardiopatia grave da pesquisadora. Ao retornar ao acompanhamento foi necessário recomeçar nova busca de pacientes. Acrescentou-se a ocorrência sem precedentes da pandemia por COVID-19, iniciada em março de 2019, que dificultou durante 5 meses o prosseguimento dos estudos tanto pela necessidade de isolamento social, como pelo impacto psicológico causado pelas perdas pessoais ocorridas. Houve falta de insumos laboratoriais, de modo imprevisível para as análises bioquímicas no laboratório do Hospital de Messejana, o que não permitiu a obtenção de 100% dos dados bioquímicos, bem como a análise de outros marcadores de risco para DAC precoce e que foram inicialmente propostos como a dosagem da Lipoproteína-A, Apolipoproteína B, PCR-US e homocisteína. Houve ainda, uma enorme dificuldade

na seleção dos pacientes do grupo-controle, pois a condição da participação destes seria além da ausência de manifestações clínicas de DAC e a normalidade dos parâmetros laboratoriais para o perfil lipídico e glicídico, pois não dispunhamos da possibilidade de avaliação de aterosclerose subclínica por meio de obtenção do escore de cálcio na tomografia de tórax. Após atendimento de 80 pacientes e análise laboratorial de quase 1000 pacientes selecionados em um banco de dados existente no Departamento de análises clínicas da faculdade de farmácia, sendo estes voluntários sadios para pesquisas clínicas, somente 32 controles apresentaram critérios de inclusão compatíveis com os critérios do presente estudo, respeitando o pareamento por sexo e idade. Apesar destas limitações, consideramos que este primeiro estudo envolvendo pesquisa de polimorfismo genéticos na gênese da doença cardiovascular no nosso estado, apresentou resultados relevantes no que consiste na associação do perfil lipídico anormal, especificamente baixos níveis de HDL-colesterol e a observação da ocorrência do desequilíbrio de ligação entre os haplótipos dos polimorfismos da PON-1 C108T e L55M, como importantes na gênese da doença coronariana prematura. É o início da pesquisa genética na gênese das doenças cardiovasculares.

Este estudo nos faz vislumbrar a existência de outras vias patogênicas diferentes das já reconhecidas e promovidas pelos fatores de risco clássicos envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, além do importante papel dos fatores ambientais como moduladores do perfil genético.

## REFERÊNCIAS

- ABELLÓ, D.; SANCHO, E.; CAMPS, J.; JOVEN, J. Exploring the role of Paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease. A Systematic Review. **International Journal of molecular Sciences**, v.15, p.20997-21010, 2014.
- AGGARWAL, A.; SRIVASTAVA, S.; VELMURUGAN, M. Newer perspectives of coronary artery disease in young. **World Journal of Cardiology**, v.8, n.12, p.728, 2016.
- ANDERSON, T.J. *et al.* Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. **Canadian Journal of Cardiology**, v.32, n.11, p.1263-1282, 2016.
- ANSARI, W.M. *et al.* Effect of Coronary Artery Disease risk SNPs on serum cytokine levels and cytokine imbalance in Premature Coronary Artery Disease. **Cytokine**, v.122, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28705542/>. Acesso em 3 Mai 2020.
- AVIRAM, M. *et al.* Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.8, p.1581, 1998.
- BARRETT-CONNOR, E. *et al.* Estrogen and coronary heart disease in women. **Jama**, v.265, n.14, p.1861-1867, 1991.
- BERENSON, G.S. *et al.* Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). **Am J Cardiol**, v.70, p.851-858, 1992.
- BEZERRA, I.M.P. Translational medicine and its contribution to public health. **Journal of Human Growth and Development**, v.27, n.1, p.6-9, 2017.
- BIBBINS-DOMINGO, K. *et al.* Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. **New England Journal of medicine**, v.357, n.23, p.2371-2379, 2007.
- BLATTER, M.C. *et al.* Identificação de uma subespécie de lipoproteína de alta densidade humana distinta definida por uma proteína associada à lipoproteína, K-45: Identidade de K-45 com paraoxonase. **Jornal europeu de bioquímica**, v.211, n.3, p.871-879, 1993.
- BOUNAFEE, A. *et al.* Association between Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms and the risk of acute coronary syndrome in a north African population. **PloS one**, v.10, n.8, p.e0133719, 2015.
- BRANDÃO, A.A. *et al.* Prevenção da doença cardiovascular: a aterosclerose se inicia na infância? **Adolescência e Saúde**, v.1, n.4, p.11-19, 2004.

BROPHY, V.H. *et al.* Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **Am J Hum Genet.** v.68, p.1428-1436, 2001.

BRUNHAM, L.R.; HAYDEN, M.R. Human genetics of HDL. Insight into particle metabolism and function *Progress in Lipid Research*. **Research**, v.58, p.14-25, 2015.

CORRÊA-CAMACHO, C.R.; DIAS-MELICIO, L.A.; SOARES, A.M.V.C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde**, v.14, n.1, p.41-48, 2007.

CATAÑO, H.C. *et al.* Distribution of paraoxonase-1 gene polymorphisms and enzyme activity in a Peruvian population. **Environmental and molecular mutagenesis**, v.47, n.9, p.699-709, 2006.

CLEMMONS, D.R. Role of Dysglycemia in Atherosclerosis. *In*: PATTERSON, C.; WANG, H. **Atherosclerosis: Risks, Mechanisms, and Therapies**. Nova Jersey: Wiley, p.15-26, 2015.

COSTA, L.G.; VITALONE, A.; COLE, T.B.; FURLONG, C.E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochem Pharmacol.**, v.69, p.541-50, 2005.

DANTOINE, T.; DEBORD, J.; MERLE, L.; CHARMES, J.P. De l'intoxication par les composés organophosphorés à l'athérosclérose: rôles de la paraoxonase 1. **Rev. Med. Int.**, v.24, p.436-442, 2003.

DEAKIN, S. *et al.* Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic. **Biochem J**, v.1, p. 643-9, Jun, 2003.

DRAGANOV, D.I.; LA DU, B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.369, p.78-88, 2004.

ELKIRAN, E.T. *et al.* Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. **BMC câncer**, v. 7, n.1, p.48, 2007.

EMOTO, T. *et al.* Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v.23, n.8, p.908-921, 2016.

EOM, S.Y. *et al.* Effects of intronic and exonic polymorphisms of paraoxonase 1 (PON1) gene on serum PON1 activity in a Korean population. **Journal of Korean medical Science**, v.16, n.6, p.720-725, 2011.

FAGGIONI, T. **O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em uma população humana**. 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

ERENCE, B.A. *et al.* Effect of naturally random allocation to lower low-density lipoprotein cholesterol on the risk of coronary heart disease mediated by polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or both: a 2× 2 factorial Mendelian randomization study. **Journal of the American College of Cardiology**, v.65, n.15,

p.1552-1561, 2015.

FERREIRA, P.R.S. **Frequência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e A148G no gene da paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens étnicas.** 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 2007.

FLEKAC, M. *et al.* Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus. **Physiological Res.**, v.57, p.717-26, 2008.

GARIN, M.C.B.; MOREN, X.; JAMES, R.W. Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. **J Lipid Res.**, v.47, n.3, p.515-520, 2006. Doi: 10.1194/JLR.M500281-JLR200

GEORGIADIS, A.N. *et al.* Atherogenic lipid profile is a feature characteristic of patients with early rheumatoid arthritis: effect of early treatment a prospective, controlled study. **Arthritis research & therapy**, v.8, n.3, p.R82, 2006.

GIBBONS, G.H. *et al.* Genetic markers: progress and potential for cardiovascular disease. **Circulation**, v.109, n.25 suppl 1, p. 47-58, 2004.

GOLDSTEIN, J.L. *et al.* Local de ligação em macrófagos que medeia a captação e a degradação da lipoproteína acetilada de baixa densidade, produzindo deposição maciça de colesterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, n.1, p.333-337, jan. 1979.

GOTTLIEB, M.G.V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E.H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Médica**, Porto Alegre: PUCRS, v.15, n.3, p.203-207, jul/set. 2005.

GRUNDY, S.M. Colesterol e Doença Cardíaca Coronária: Uma Nova Era. **JAMA**, v.256, n.20, p.2849-2858, 1986.

GRUPTA, N. *et al.* Paraoxonase 1 ( PON1) Polymorphisms, Haplotypes and Activity in Predicting CAD Risk in North-West Indian Punjabis. **Plos ONE**, v.6, Issue 5, p.e17805, May 2011.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. **Clinica Chimica Acta**, v.439, p.5-13, 2015.

HAMILTON, K.K.; ZHAO, J.; SIMS, P.J. Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement. Affinity of the apoproteins for polymeric C9. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, Issue 5, p.3632-3638, 1993.

HENRIKSEN, T.; MAHONEY, E.M.; STEINBERG, D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. **Medical Sciences**, v.78, n.10, p.6499-6650, 1981.

HERRINGTON, W. *et al.* Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. **Circulation research**, v.118, n.4, p.535-546, 2016.

HOFFMEISTER, A. *et al.* Current infection with *Helicobacter pylori*, but not seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* or cytomegalovirus, is associated with an atherogenic, modified lipid profile. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.21, n.3, p.427-432, 2001.

HOLLAND, N. *et al.* Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in latino mothers and newborns. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.7, p.985-991, 2006.

HUSSEIN, Y.M. *et al.* Association of L55M and Q192R polymorphisms in paraoxonase 1 (PON1) gene with breast cancer risk and their clinical significance. **Molecular and cellular biochemistry**, v.351, n.1-2, p.117-123, 2011.

IKHLEF, S. *et al.* Human paraoxonase 1 overexpression in mice stimulates HDL cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **PloS one**, v.12, n.3, p.e0173385, 2017.

IMAI, Y. *et al.* Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. **Atherosclerosis**, v.149, n.2, p.435-442, 2000.

IRIBARREN, C. *et al.* Clinical utility of multimarker genetic risk scores for prediction of incident coronary heart disease: a cohort study among over 51 000 individuals of European ancestry. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v.9, n.6, p.531-540, 2016.

IZAR, M.C. *et al.* Fatores de risco, marcadores bioquímicos e polimorfismos genéticos na doença arterial coronariana prematura. **Arq Bras Cardiol**, v.80, n.4, p.379-87, 2003.

KANG, M.K. *et al.* Prevalence and determinants of coronary artery disease in first-degree relatives of premature coronary artery disease. **Coronary artery disease**, v.23, n.3, p.167-173, 2012.

KAYASHREE, S.; ARINDAM, M.; VIJAY, K.V. Genetic epidemiology of coronary artery disease: an Asian Indian perspective. **Journal of genetics**, v.94, n.3, p.539-549, 2015.

KHERA, A.V. *et al.* Genetic risk, adherence to a healthy lifestyle, and coronary disease. **New England Journal of medicine**, v.375, n.24, p.2349-2358, 2016.

KIM, D.S. *et al.* Dietary cholesterol increases paraoxonase1 enzyme activity. **J Lipid Res**, v.53, p.2450-8, 2012.

LESNA, I.K. *et al.* Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link? **European journal of preventive cardiology**, v.25, n.3, p.328-334, Feb. 2018.

LANAS, F. *et al.* Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. **Circulation**, v.115, n.9, p.1067-1074, 2007.

LEE, Y.K. *et al.* Serum TSH Level in Healthy Koreans and the Association of TSH with Serum Lipid Concentration and Metabolic Syndrome. **Korean J Intern Med**. v.26, n.4, p.432-439, 2011.

LESSA, I. Tendência dos anos produtivos de vida perdidos por mortalidade precoce por doença arterial coronariana. **Arq Bras Cardiol**, v.79, n.6, p.611-616, 2002.

LEVIEV, I.; JAMES, R.W. Promoter Polymorphisms of Human Paraoxonase PON1 Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concentrations. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.20, n.2, p.516-521, Feb. 2000.

LITHINOV, D.; MAHINI, H.; GARELNABI, M. Papel antioxidante e anti-inflamatório da paraoxonase 1: implicação em doenças arteriosclerose. **N Am J Med Sci**, v.4, n.11, p.523-532, 2012.

LIU C.; KRAJA, A.T.; SMITH, J.A. Myocardial Infarction Genetics and Cardiogram Exome Consortia; CKDGen Consortium. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. **Nat Genet**, v.48, p.1162-1170, 2016.

MACKNESS, B. *et al.* Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. **FEBS letters**, v.423, n.1, p.57-60, 1998.

MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B. O papel da atividade da paraoxonase 1 na doença cardiovascular. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v.4, n.4, p.211-217, 2004.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, v.567, n.1, p.12-21, 2015.

MALLINCKRODT, M.G.V. *et al.* A study of the polymorphism and ethnic distribution differences of human serum paraoxonase. **American journal of physical anthropology**, v.62, n.3, p.235-241, 1983.

MCPHERSON, R.; TYBJAERG-HANSEN, A. Genetics of coronary artery disease. **Circulation research**, v.118, n.4, p.564-578, 2016.

MEDINA-DÍAZ, I.M. *et al.* Downregulation of human paraoxonase 1 (PON1) by organophosphate pesticides in HepG2 cells. **Environmental toxicology**, v.32, n.2, p.490-500, 2017.

MILLER, D.T.; RIDKER, P.M.; LIBBY, P.; KWIATKOWSKY, D.J. Atherosclerosis, The Path from Genomics to therapeutics. **Journal of the American College of Cardiology**, v.49, n.15, p.1589-99, 2007.

- MOUROUZIS, I. *et al.* Dose-dependent effects of thyroid hormone on post-ischemic cardiac performance: potential involvement of Akt and ERK signalings. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.363, n.1, p.235–243, 2012.
- NAJAFI, M.; GOHARI, L.H.; FIROOZRAI, M. Os polimorfismos do promotor do gene da paraoxonase 1 estão associados à extensão da estenose nas artérias coronárias. **Pesquisa de trombose**, v.123, n.3, p.503-510, 2009.
- NAVAB, M. *et al.* A transmigração de monócitos induzida pela modificação da lipoproteína de baixa densidade em culturas de células da parede aórtica humana é devida à indução da síntese de proteína 1 quimiotática de monócitos e é abolida pela lipoproteína de alta densidade. **The Journal of Clinical Research**, v.88, n.6, p.2039-2046, 1991.
- NIKPAY, M. *et al.* A comprehensive 1000 Genomes–based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. **Nature genetics**, v.47, n.10, p.1121, 2015.
- NISSEN, S.E. *et al.* Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, v.352, n.1, p.29-38, 2005.
- OLIVEIRA, G.M.M. *et al.* Estatística Cardiovascular – Brasil 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.115, n.3, p.308-439, 2020.
- PAGAN, E. *et al.* Comparison of trends in mortality from coronary heart and cerebrovascular diseases in north and South America: 1980 to 2013. **American journal of cardiology**, v.119, n.6, p.862-871, 2017.
- PALINSKI, W.; NAPOLI, C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. **FASEB J**, v.16, p.1348-60, 2002.
- PARRA, S. *et al.* Methodological constraints in interpreting serum paraoxonase-1 activity measurements: an example from a study in HIV-infected patients. **Lipids in health and disease**, v.9, n.1, p.32, 2010.
- PODREZ, E. Anti-oxidant properties of high density lipoprotein and atherosclerosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.37, n.7, p.719-725, 2010.
- PRAKASH, M. *et al.* Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease. **Clínica química acta**, v.378, n.1, p.232-234, 2007.
- RAHMAN, M.F.A. *et al.* Addressing the link between paraoxonase-1 gene variants and the incidence of early onset myocardial infarction. **Archives of medical science: AMS**, v.11, n.3, p.513, 2015.
- RANKINEN, T. *et al.* Are there genetic paths common to obesity, cardiovascular disease outcomes, and cardiovascular risk factors? **Circulation research**, v.116, n.5, p.909-922, 2015.



ROBERTS, R. Genetics of Coronary Artery Disease. **Circulation Research Compendium on Acute Coronary Syndromes**, v.6, p.1890-1903, 2014.

SALEHEEN, D. *et al.* Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v.3, n.7, p.507-513, 2015.

SANTOS, M.G. *et al.* Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, n.4, p.301-308, 2008.

SANTOS, F. *et al.* The effect of the paraoxonase 1(PON1) T(-107)C polymorphism on serum PON1 activity in women is dependent on fatty acid intake. **Nutrition Research**, v.36, n.1, p.9-15, 2016.

SAYOLS-BAIXERAS, S. *et al.* Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. **Appl Clin Genet**, v.7, p.15-32, 2014.

SCHMIDT, H. *et al.* O polimorfismo leu-Met54 da paraoxonase PON1 está associado à aterosclerose carotídea: resultados do estudo austríaco de prevenção de derrame. **Stroke**, v.29, n.10, p.2043-2048, 1998.

SCHOENHAGEN, P.; TUZCU, E.M. Atherosclerosis imaging in progression/regression trials: surrogate marker or direct window into the atherosclerotic disease process? **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.91, n.6, p.418-431, 2008.

SCHRODER, C.; RIMBACH, G. Determinantes do Status da Praoxonase 1: Genes, Drogas e Nutrição. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, n.36, p.5624-5643, 2011.

SEN-BANERJEE, S.; SILES, X.; CAMPOS, H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.20, n.9, p.2120-2126, 2000.

SINGH, S.*et al.* Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Toxicology and applied pharmacology**, v.252, n.2, p.130-137, 2011.

STALLONES, R.A. The association between tobacco smoking and coronary heart disease. **International journal of epidemiology**, v.44, n.3, p.735-743, 2015.

STEVENS, V. L.; RODRIGUEZ, C.; PAVLUCK, A.L.; THUN, M.J.; CALLE, E.E. Association of polymorphisms in the paraoxonase 1 gene with breast cancer incidence in the CPS-II Nutrition Cohort. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v.15, n.6, p.1226-1228, 2006.

STONE, N.J. *et al.* ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v.63, n.25 Part B, p.2889-2934, 2014.

SUEHIRO, T. *et al.* A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. **Atherosclerosis**, v.150, p.295-8, 2000.

TADA, H. *et al.* Risk prediction by genetic risk scores for coronary heart disease is independent of self-reported family history. **European Heart Journal**, v.37, n.6, p.561-567, 2015.

THANASSOULIS, G.; VASAN, R.S. Genetic cardiovascular risk prediction: will we get there? **Circulation**, v.122, n.22, p.2323-2334, 2010.

TOMLINSON, B. *et al.* Current status of personalized medicine based on pharmacogenetics in cardiovascular medicine. **Expert Review of Precision Medicine and Drug Development**, v.1, n.1, p.5-8, 2016.

TSAKIRIS, S. *et al.* Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals. **European journal of clinical nutrition**, v.63, n.2, p.215, 2009.

VISSCHER, P.M. *et al.* 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. **The American Journal of Human Genetics**, v.101, n.1, p.5-22, 2017.

ZANONI, P. *et al.* Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. **Science**, v.351, n.6278, p.1166-1171, 2016.

ZARICH, S.; LUCIANO, C.; HULFORD, J.; ABDULLAH, A. Prevalence of metabolic syndrome in young patients with acute MI: does the Framingham Risk Score underestimate cardiovascular risk in this population? **Diabetes and Vascular Disease Research**, v.3, n.2, p.103-107, Set. 2006.

ZIMMERMAN, F.H.; CAMERON, A.; FISHER, L.D.; GRACE, N. Myocardial infarction in Young adults: Angiographic characterization, risk factors and prognosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v.26, n.3, p.654-61, 1995.

## ANEXOS

### ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a ser participante da pesquisa intitulada “Associação de Polimorfismos genéticos da Paraoxonase 1 (PON 1) com síndrome coronariana aguda em jovens”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Você foi selecionado porque você apresentou um infarto do coração em idade muito jovem. Sabemos que o infarto é uma doença de pessoas de mais idade, por isso, preocupados com este diagnóstico iniciamos esta pesquisa para estudar fatores de risco relacionados com a ocorrência de doenças do coração em pessoas mais jovens. Esta pesquisa é muito importante, pois você será consultado por um médico cardiologista que o examinará e fará uma avaliação do seu estado de saúde e lhe orientará sobre medidas de prevenção ou tratamento sobre as doenças do coração.

Não haverá qualquer tipo de envio de material ao exterior ou armazenamento de seu sangue para outros estudos. Tudo o que for estudado no seu sangue será trabalhado com sigilo e você terá acesso a todos os resultados, com a opção de tomar ou não conhecimento destas informações.

Todo o acompanhamento clínico não implicará em custos financeiros para você, sendo ofertado por mim.

Não será testada nenhuma medicação em você. Serão realizados exames de sangue para analisar o estado de gordura no sangue (colesterol), açúcar e inflamação e também a análise de alterações genéticas de uma substância, chamada Paraoxonase humana -1, que é responsável pela formação do bom colesterol (HDL) no nosso organismo. Todos estes exames não implicam em risco para você, pois são de natureza não invasiva. Você poderá apresentar uma discreta mancha roxa no local da coleta de sangue ou pequena dor, como uma picada. Será também realizado um exame de ultrassom das carótidas, que são vasos sanguíneos localizados na região do pescoço, exame totalmente indolor e que não traz nenhum desconforto.

Entretanto, a sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, no caso eu, Dra Rochelle Pinheiro ou com o Hospital de Messejana, ou seja, mesmo que você desista de participar da pesquisa o seu acompanhamento no ambulatório será mantido, todos os retornos e todos os exames que você necessite realizar serão realizados normalmente independentemente de você estar participando ou não desta pesquisa.

Se você tiver dúvidas, pode me perguntar e eu lhe explicarei com detalhes tudo o que você quiser saber sobre este estudo.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Você receberá uma cópia desse termo onde consta o meu telefone e o endereço do meu local de trabalho, assim como do Comitê de Ética em Pesquisa, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

**INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS:**

Pesquisador Responsável: Dra. Rochelle Pinheiro Ribeiro

Celular (85) 999829750

E-mail: [rochellepinheioribeiro@yahoo.com.br](mailto:rochellepinheioribeiro@yahoo.com.br)

Endereço do Hospital de Messejana: Av. Frei Cirilo, 3480 Cidade: Fortaleza – Ceará CEP 60.864-190

Telefones: (85) 3101.4161 ou 3101.4075

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

|                                  |      |            |
|----------------------------------|------|------------|
| Nome do participante da pesquisa | Data | Assinatura |
|----------------------------------|------|------------|

|                     |      |            |
|---------------------|------|------------|
| Nome do pesquisador | Data | Assinatura |
|---------------------|------|------------|

**ANEXO B – QUESTIONÁRIO**

1. Número do questionário / Prontuário:
  - 1.1) Data da Consulta
  - 1.2) Data de nascimento
2. Nome
3. Classificação do paciente: 1 - caso 2 – controle
4. Extensão da doença coronariana 1 – uniarterial 2 – multiarterial
5. Sexo: 1 – feminino 2 – masculino
6. Peso
7. Altura
8. IMC
9. CA
10. Tabagismo: 1- nunca 2 - atual 3 - ex-fumante
11. Etilismo: 1- sim 2- não
12. Sedentarismo: 1- sim 2- não
13. História familiar de DAC prematura 1- sim 2- não
14. Se História familiar positiva, qual o parentesco e qual a idade de acometimento do familiar?
15. Uso de drogas ilícitas: 1- sim 2- não
16. DM2: 1- não 2 - sim 3 - pre- DM
17. DLP: 1- sim 2- não
18. HAS: 1- não 2- sim
19. AVC: 1- não 2- sim
20. Trombose venosa ou arterial: 1- não 2- sim
21. Classificação eletrocardiográfica do Infarto: 1- CSST 2-SSST
22. Revascularização miocárdica: 1- Percutânea 2- Cirúrgica 3- Tratamento Clínico
23. Coronariografia: Artérias acometidas
24. Lesão DA 1-sim 2- não
25. Lesão CD 1-sim 2- não
26. Lesão CX 1- sim 2- não
27. Lesão TCE 1- sim 2- não
28. CT:

29. HDL:
30. LDL:
31. TG:
32. PCR-us
33. TGP
34. GJ
35. HbA1c:
36. TSH
37. Ácido úrico
38. 25-Hidroxi-vitamina D
39. Creatinina
40. Estatina 1- sim 2- não
41. BB 1- sim 2- não
42. AAS 1- sim 2 – Não
43. IECA/BRA 1- sim 2- não

IMC  $\text{Peso}/\text{Altura}^2 =$

| <b>Classificação</b> | <b>IMC kg/m<sup>2</sup></b> | <b>Risco de comorbidades</b> |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Baixo peso           | < 18,5                      | Baixo                        |
| Peso normal          | 18,5-24,9                   | Médio                        |
| Sobrepeso            | 25-29,9                     | Aumentado                    |
| Obeso I              | 30-34,9                     | Moderado                     |
| Obeso II             | 35-39,9                     | Grave                        |
| Obeso III            | ≥40,0                       | Muito grave                  |