
Alexandre da Costa Pereira

**Estudo do polimorfismo genético C242T no gene da
p22phox e a incidência de eventos cardiovasculares
na doença arterial coronária**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Alexandre da Costa

Estudo do polimorfismo genético C242T no gene da p22phox e a incidência de eventos cardiovasculares na doença arterial coronária / Alexandre da Costa Pereira.

-- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Genética 2.Polimorfismo 3.Triagem genética 4.Doenças cardiovasculares 5.Coronariopatia 6.Marcadores genéticos 7.Fatores de risco

USP/FM/SBD-034/08

Dedicatória

À minha inseparável companheira Silvia, por seu apoio
incondicional, amor, carinho e companheirismo.

À nossa filha Beatriz, última a chegar e agora primeira
em tudo.

Aos meus pais Aparecido e Beatriz, primeiros e eternos professores, nos quais me espelho por suas capacidades, dedicação à família e honestidade como seres humanos. Vocês tornaram possível o alcance de todos os meus sonhos.

À minha irmã Fernanda pelo amor e carinho, pela sua cumplicidade, presença e determinação e por sempre me apoiar em todos os meus projetos de vida.

Ao meu cunhado Felipe que por seu exemplo me ensinou o valor do trabalho e seriedade.

Agradecimentos

Escrever uma tese está longe de ser um processo solitário, este trabalho não se realiza sem a contribuição de diversas pessoas e instituições. Algumas muito próximas, outras distantes em tempos remotos de nosso aprendizado...

Talvez seja injusto tentar nomear a todas, a memória nos trai, deixamos de fora pessoas importantes, que torceram e se esforçaram pelo trabalho. A estas deixo minhas sinceras desculpas...

Mas seria injusto deixar de mencionar e agradecer a alguns nomes...

Ao grande amigo e Professor José Eduardo Krieger por compartilhar comigo seu amor pela pesquisa e por me ensinar a importância e o respeito à Academia. Obrigado por todas as oportunidades!

Ao grande amigo e compadre José Xavier-Neto por me ensinar e acompanhar, no mais alto rigor que a Ciência tanto carece, desde o começo.

Às minhas amigas Glória Mota, Marcilene Floriano, Noely Ferreira, Débora Bergara e Daniela Jardim que sem o carinho, dedicação e expertise técnica esta tese não poderia

ter sido realizada. Poder contar com a ajuda de vocês foi uma grande sorte, alegria e motivo de tranqüilidade.

Aos amigos e colaboradores Prof. Whady Hueb, Prof. José Geraldo Mill, Prof. Eulógio Martinez, e Dra. Ayumi Miyakawa por confiarem em mim e permitirem que esse trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos do antigo Laboratório de Biologia Molecular que me ensinaram desde o início: Maúde, Renata, Ayumi, Gustavo, Silvana e Isabel Cristina.

Aos novos e antigos amigos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, é um privilégio ímpar poder participar deste grupo de pesquisa.

Aos amigos do Grupo de Genética do LGCM: Noely, Débora, Isolmar, Alessandra, Amanda, Diogo, Marisa, Samantha, Guilherme, Camila, Fábio, Luciana, Marcelo, e outros que foram e virão. Poder contar com o apoio e a amizade de vocês em nosso dia-a-dia é o que faz do trabalho um não-trabalho.

Aos Professores Isabela Benseñor e Paulo Lotufo por me acompanharem desde o início, sempre me apoiando em minhas decisões, sempre me proporcionando um “abrigo seguro”.

À amiga Profa. Júlia Pavan pela sempre calorosa acolhida em seus domínios, pela paciência em me ensinar uma nova “língua” e por me proporcionar a grande honra de ser um parceiro em diversas colaborações.

Ao amigo Dr. Luis Henrique Wolff Gowdak pelo carinho com que sempre me recebeu e pela contribuição sobremaneira para o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da minha Banca de Qualificação, Prof. Dr. Eulógio Martinez e Profa. Dra. Maria Cristina Izar que em muito contribuíram para a versão final deste trabalho.

À amiga Amanda Salem Brasil por me ajudar na formatação final deste trabalho.

Ao meu cunhado Samuel Titan Junior que com sabedoria e experiência ajudou a tornar esse trabalho mais acessível.

À secretaria da Pós-Graduação, Eva, Juliana e Neusa que com gentileza e disponibilidade proporcionaram tranquilidade e segurança por todo o trajeto do projeto.

Essa tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação; Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****SUMMARY**

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.....	2
1.2. IMPACTO ECONÔMICO E SOCIAL DA DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.....	3
1.3. IMPORTÂNCIA DE FATORES DE RISCO CLÁSSICOS NO DESENVOLVIMENTO DE DAC	4
1.4. HISTÓRIA FAMILIAR COMO FATOR DE RISCO PARA DAC	7
1.5. A IMPORTÂNCIA DE FATORES DE RISCO GENÉTICO.....	12
1.5.1. <i>Encontrando genes que modulem traços complexos</i>	12
1.5.2. <i>Avanços nas abordagens atuais</i>	14
1.5.3. <i>Determinantes genéticos da DAC e estudos de associação</i>	17
1.6. ESCOLHENDO UM ALVO: ESTRESSE OXIDATIVO E HOMEOSTASIA VASCULAR	20
1.7. OS SISTEMAS NADPH OXIDASE.....	22
1.8. O GENE DA P22PHOX COMO GENE CANDIDATO NO RISCO CARDIOVASCULAR.....	24
2. OBJETIVOS	28
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1. OBJETIVO 1	31
3.1.1. <i>Casuística e métodos</i>	31
3.1.2. <i>Pacientes estudados</i>	32
3.1.3. <i>Seleção de pacientes</i>	33
3.1.4. <i>Crítérios para a não-inclusão</i>	33
3.1.5. <i>Definição de critérios e procedimentos de investigação</i>	35
3.1.6. <i>Cateterismo cardíaco</i>	37
3.1.7. <i>Revascularização cirúrgica do miocárdio</i>	38
3.1.8. <i>Revascularização miocárdica percutânea</i>	38
3.1.9. <i>Coleta de dados demográficos</i>	39
3.1.10. <i>Extração do DNA</i>	40
3.1.11. <i>Determinação do genótipo do polimorfismo C242T do gene CYBA</i>	42
3.1.12. <i>Análise estatística</i>	43
3.1.13. <i>Considerações sobre o poder estatístico da abordagem proposta para o objetivo 1</i>	44
3.1.14. <i>Estudo de confirmação do objetivo 1</i>	45
3.1.14.1. <i>Pacientes selecionados</i>	45

3.2. OBJETIVO 2	46
3.2.1. <i>Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação e estrutura haplotípica do locus do gene da p22phox (CYBA)</i>	46
3.2.2. <i>População proveniente do estudo MONICA-Vitória</i>	48
3.2.3. <i>População utilizada para verificar associações com o grau de acometimento aterosclerótico coronário</i>	49
3.2.4. <i>Ensaio de quantificação de expressão gênica em veias safenas humanas</i>	51
3.2.4.1. <i>Obtenção e cultura das veias safenas humanas</i>	51
3.2.4.2. <i>Extração de RNA</i>	54
3.2.4.3. <i>Reação de Transcriptase Reversa (RT)</i>	55
3.2.4.4. <i>Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo-real</i>	55
3.2.4.5. <i>Análise da expressão gênica relativa utilizando PCR quantitativo por tempo-real</i>	58
3.3. OBJETIVO 3	60
4. RESULTADOS	63
4.1. OBJETIVO 1	63
4.1.1. <i>Características clínicas de entrada de acordo com o genótipo C242T do gene p22phox</i>	63
4.1.2. <i>Desfechos cardiovasculares e o genótipo C242T do gene p22phox</i>	65
4.1.3. <i>Estudo de confirmação da associação encontrada em população independente</i>	73
4.1.4. <i>Dados descritivos da amostra utilizada em estudo confirmatório</i>	73
4.1.5. <i>Desfechos cardiovasculares e o genótipo C242T do gene p22phox: Resultados em amostra de confirmação</i>	78
4.2. OBJETIVO 2	81
4.2.1. <i>Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação e Estrutura haplotípica do locus do gene da p22phox (CYBA)</i>	81
4.2.2. <i>Localização e estrutura genômica do gene da p22phox</i>	82
4.2.3. <i>Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação na região genômica selecionada</i>	84
4.2.4. <i>Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação na região genômica do gene da p22phox na população brasileira</i>	95
4.2.5. <i>Medidas de associação entre marcadores estudados e eventos cardiovasculares na população MASS II</i>	98
4.2.6. <i>Definindo hipóteses para explicar mecanismo molecular da associação encontrada</i>	101
4.2.7. <i>Teste de hipótese</i>	103
4.2.8. <i>Teste de hipótese</i>	107
4.2.9. <i>Teste de hipótese</i>	115

4.2.9.1 Existe associação entre o polimorfismo C242T e a expressão do gene CYBA (p22phox) em veias safenas humanas?	115
4.2.9.2. O polimorfismo C242T pode modular o padrão de expressão gênica em tecido vascular humano para genes associados à resposta inflamatória?	116
4.3. OBJETIVO 3	122
4.3.1. <i>Variáveis clínicas e demográficas preditoras do evento combinado morte + IAM incidente na população de indivíduos participantes do estudo MASS II</i>	122
4.3.2. <i>Adicionando informação genética ao modelo preditivo: existe ganho de acurácia?</i>	135
5. DISCUSSÃO	149
5.1. SUPERÓXIDO E DOENÇA VASCULAR.....	150
5.2. FATORES GENÉTICOS MODULANDO A PRODUÇÃO VASCULAR DE SUPERÓXIDO.....	153
5.3. DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS	155
5.4. ANÁLISE CRÍTICA SOBRE A ESTRATÉGIA ADOTADA PARA ABORDAR O PROBLEMA PROPOSTO NO OBJETIVO 1.....	161
5.5. VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES HUMANAS E A IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO DA ESTRUTURA POPULACIONAL NO LÓCUS ESTUDADO	163
5.6. EXPLICANDO O MECANISMO MOLECULAR DE ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS: A IMPORTÂNCIA E DIFICULDADE DE ESTUDOS FUNCIONAIS	168
5.7. SOB A CRIAÇÃO DE MODELOS DE PREDIÇÃO DE EVENTOS	174
5.8. ANÁLISE INTEGRADA: UTILIZANDO A COMPLEXIDADE DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E GENÔMICAS	179
5.9. PERSPECTIVAS EM DIREÇÃO A UMA ABORDAGEM INDIVIDUALIZADA.....	182
6. CONCLUSÕES.....	186
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189

Lista de Abreviatura e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AHA	American Heart Association
Ap-1	<i>Activator protein 1</i> – proteína de ativação1
Apo	Apolipoproteína
ATC	Angioplastia Transluminal Coronária
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AUC	<i>area under the curve</i> – área sob a curve
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
C	Citosina
°C	Grau Celsius
CA	Circunferência Abdominal
cDNA	DNA complementar
CEU	<i>Utah residents with ancestry from northern and western Europe</i>
CHB	<i>Han Chinese in Beijing</i>
cM	Centimorgan
Cyba	<i>Cytocrome b-245, alpha polypeptide</i> – peptídeo alpha do citocromo b-245
CPK	Creatinofosfoquinase
CT	Colesterol Total
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CXCL	<i>Chemokine ligand</i>
Cum	<i>Cumulative</i> - Cumulativa

DAC	Doença Arterial Coronária
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i> – Anos de Vida Ajustados por Incapacidade
dbSNP	<i>SNP database</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonato
DM	Diabetes melitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	ditiotreitól
DVC	Doença Cardiovascular
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ERO	espécie reactiva de oxigênio
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> – e outros
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
G	Guanina
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
h ²	Herdabilidade

HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido Clorídrico
HDL-c	<i>high density lipoprotein cholesterol</i> – lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Intervalo de confiança
IL	<i>Interleukin</i> – interleucina
IL1R	<i>Interleukin 1 receptor</i> – receptor de interleucina 1
IL1RA	<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i> – antagonista de receptor de interleucina 1
IMC	Índice de Massa Corpórea
Incor	Instituto do Coração
JPT	Japanese in Tokyo
Kbp	quilobase
KCl	Cloreto de potássio
LCAT	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i> – lipoproteína de baixa densidade
Lp	Lipoproteína
M	Molar
MASS	<i>Medicine, Angioplasty, Surgery Study</i>

Mbp	Megabase
MET	Equivalente metabólico
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
MONICA	<i>Monitoring of Trends and determinants in Cardiovascular Disease</i>
ms	milissegundo
MVD	difosfomevalonato decarboxilase
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH oxidase	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase</i>
NCEP	<i>US National Cholesterol Education Program</i> – Programa Nacional de Educação em Colesterol
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i> – fator nuclear kappa B
ng	nanograma
NH ₄ Cl	
NH ₄ HCO ₃	
NHANES	<i>National Health and Nutrition</i>

	<i>Examination Survey</i> – Pesquisa nacional sobre Saúde e Nutrição
nm	nanômetro
NO	<i>nitric oxide</i> – óxido nítrico
OR	<i>odds ratio</i> – razão de chances
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i> – inibidor do ativador do plasminogênio
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – reação de Polimerase em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
phox	<i>phagocytic oxidase</i> – oxidase fagocítica
PMA	4 β -phorbol 12-myristate 12-acetate
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i> – locus de traço quantitativo
R\$	Reais
rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RCM	Revascularização Cirúrgica do Miocárdio
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	deoxiribunuclease
mRNA	RNA mensageiro

ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
rpm	Rotações por minuto
RR	Risco relativo
RT-PCR	Real-Time PCR – PCR em tempo real
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNAI 3	<i>snail homolog 3</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – polimorfismo de base única
TAE	Tris-acetato EDTA
TE	Tris-EDTA
TE	teste ergométrico
TG	Triglicérides
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> – Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris-HCl	cloridrato tris-hidroximetil-aminometano
μ l	microlitro
YLL	<i>Years of Life Lost</i> – Anos de Vida Perdidos
YRI	<i>Yoruba in Ibadan</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
UI	Unidades Internacional
USP	Universidade de São Paulo
US\$	Dólares Americanos
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> – lipoproteína de peso muito baixo

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA EX VIVO DE CULTURA DE VASO..... 53

FIGURA 2- INCIDÊNCIA DE EVENTOS CARDIOVASCULARES DE ACORDO COM GENÓTIPO C242T DO GENE P22PHOX 68

FIGURA 3 - INCIDÊNCIA DE MORTALIDADE GERAL E/OU INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO C242T DO GENE DA P22PHOX..... 68

FIGURA 4 - INCIDÊNCIA DE MORTALIDADE GERAL E/OU INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO INCIDENTE EM RELAÇÃO À PRESENÇA DO ALELO 242T DO GENE DA P22PHOX..... 70

FIGURA 5 - CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA MORTALIDADE DE ACORDO COM GENÓTIPO DO POLIMORFISMO C242T DO GENE DA P22PHOX 79

FIGURA 6 - ESTRUTURA GENÔMICA DO GENE CYBA (P22PHOX) E SNPS GENOTIPADOS PELO PROJETO HAPMAP PARA O LÓCUS 83

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA DISPOSIÇÃO GÊNICA EXISTENTE NO CROMOSSOMO 16 FLANQUEANDO O GENE CYBA (P22PHOX) 84

FIGURA 8 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM REGIÃO GENÔMICA CONTENDO O GENE DA P22PHOX NA POPULAÇÃO CEU..... 85

FIGURA 9 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DA REGIÃO 3' DO MARCADOR RS4673 OBTIDA A PARTIR DE DADOS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO CEU..... 86

FIGURA 10 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DA REGIÃO 5' DO MARCADOR RS4673 OBTIDA A PARTIR DE DADOS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO CEU..... 87

FIGURA 11 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM REGIÃO GENÔMICA CONTENDO O GENE DA P22PHOX DA POPULAÇÃO YRI 88

FIGURA 12 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DA REGIÃO 3' DO MARCADOR RS4673 OBTIDA A PARTIR DE DADOS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO YRI 90

FIGURA 13 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DA REGIÃO 5' DO MARCADOR RS4673 OBTIDA A PARTIR DE DADOS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO YRI	91
FIGURA 14 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM REGIÃO GENÔMICA CONTENDO O GENE DA P22PHOX DA POPULAÇÃO JAPONESA (JPN) E CHINESA (CHN)	92
FIGURA 15 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DA REGIÃO 3' DO MARCADOR RS4673 OBTIDA A PARTIR DE DADOS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO JPN+CHN	93
FIGURA 16 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DA REGIÃO 5' DO MARCADOR RS4673 OBTIDA A PARTIR DE DADOS PROVENIENTES DA POPULAÇÃO JPN+CHN	94
FIGURA 17 - DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA DOS MARCADORES SELECIONADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DO GENE P22PHOX NA POPULAÇÃO BRASILEIRA	96
FIGURA 18 - ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DO GENE DA P22PHOX NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	97
FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO RELATIVA DO NÚMERO DE ARTÉRIAS EPICÁRDICAS COM OBSTRUÇÃO LUMINAL MAIOR QUE 50%	108
FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE LESÕES EPICÁRDICAS EM TODOS OS SEGMENTOS ESTUDADOS	109
FIGURA 21 - RELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E NÚMERO MÉDIO DE ARTÉRIAS EPICÁRDICAS ACOMETIDAS DE ACORDO COM GRUPO GENOTÍPICO.	113
FIGURA 22 - COMPARAÇÃO ENTRE VALORES DE ΔCT PARA O GENE CYBA DE ACORDO COM GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO C242T.....	116
FIGURA 23 - PONTOS MÉDIOS DE 3 REPLICATAS PARA VALORES DELTACT NORMALIZADOS POR 28S PARA CADA VASO ESTUDADO DE ACORDO COM GRUPO GENOTÍPICO DO POLIMORFISMO C242T PARA 10 GENES INFLAMATÓRIOS.....	121

FIGURA 24 - CURVA ROC CONSIDERANDO A IDADE EM ANOS COMO VARIÁVEL CONTÍNUA E SUA RESPECTIVA AUC PARA A PREDIÇÃO DE MORTE + IAM INCIDENTE.....	125
FIGURA 25 - CURVA ROC CONSIDERANDO IAM PRÉVIO E SUA RESPECTIVA AUC PARA A PREDIÇÃO DE MORTE + IAM INCIDENTE.....	126
FIGURA 26 - CURVA ROC CONSIDERANDO HAS E SUA RESPECTIVA AUC PARA A PREDIÇÃO DE MORTE + IAM INCIDENTE.....	127
FIGURA 27 - ÁRVORE DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZANDO COMO VARIÁVEL DEPENDENTE A OCORRÊNCIA OU NÃO DE EVENTO MORTE OU IAM INCIDENTE E VARIÁVEL INDEPENDENTE IDADE EM ANOS.....	129
FIGURA 28 - ÁRVORE DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZANDO COMO VARIÁVEL DEPENDENTE A OCORRÊNCIA OU NÃO DE EVENTO MORTE OU IAM INCIDENTE E VARIÁVEL INDEPENDENTE HISTÓRIA DE IAM PRÉVIO.....	130
FIGURA 29 - ÁRVORE DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZANDO COMO VARIÁVEL DEPENDENTE A OCORRÊNCIA OU NÃO DE EVENTO MORTE OU IAM INCIDENTE E VARIÁVEL INDEPENDENTE HISTÓRIA DE HAS.....	130
FIGURA 30 - HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DA PROBABILIDADE PREDITA DE EVENTO DE ACORDO COM MODELO LOGÍSTICO EMPIRICAMENTE OBSERVADO	132
FIGURA 31 - CURVA ROC CONSIDERANDO IDADE, IAM PRÉVIO E HAS E AUC PARA A PREDIÇÃO DE MORTE + IAM INCIDENTE.....	133
FIGURA 32 - CURVA ROC CONSIDERANDO IDADE, IAM PRÉVIO E HAS E SUA RESPECTIVA AUC PARA A PREDIÇÃO DE MORTE + IAM INCIDENTE.....	134
FIGURA 33 - CURVAS ROC PARA O MODELO UTILIZANDO APENAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E MODELO UTILIZANDO VARIÁVEIS CLÍNICAS E GENÉTICAS.....	138
FIGURA 34 - ÁRVORE DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZANDO VARIÁVEIS CLÍNICAS E GENÉTICA.....	140
FIGURA 35 - ÁRVORE DE CLASSIFICAÇÃO DO MODELO CLÍNICO DEFININDO 4 DIFERENTES NÓS E CURVA DE MORTALIDADE REPRESENTANDO TEMPO PARA ÓBITO NOS 4 NÓS PREVIAMENTE DEFINIDOS.....	142

FIGURA 36 - ÁRVORE DE CLASSIFICAÇÃO DO MODELO GENÉTICO DEFININDO 6 DIFERENTES NÓS E CURVA DE MORTALIDADE REPRESENTANDO TEMPO PARA ÓBITO NOS 6 NÓS PREVIAMENTE DEFINIDOS 143

FIGURA 37 - FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS CLASSIFICADOS COMO DE RISCO BAIXO, INTERMEDIÁRIO OU ALTO NOS DOIS MODELOS PROPOSTOS..... 178

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENSAIOS DE GENOTIPAGEM DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	48
TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO-REAL	56
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE ACORDO COM A PRESENÇA OU NÃO DO ALELO T	65
TABELA 4 - INCIDÊNCIA DE DESFECHOS CARDIOVASCULARES APÓS 5 ANOS DE SEGUIMENTO DE ACORDO COM GENÓTIPO C242T	66
TABELA 5 - MODELO DE RISCOS PROPORCIONAIS DE COX PARA DESFECHO COMBINADO (ÓBITO + IAM)	72
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICO E DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA NA FASE CONFIRMATÓRIA.....	75
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICO E DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA NA FASE CONFIRMATÓRIA DE ACORDO COM GENÓTIPO.....	77
TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES POLIMÓRFICOS TESTADOS NA REGIÃO GENÔMICA DE P22PHOX E ÓBITO+IAM.....	99
TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO URBANA DA CIDADE DE VITÓRIA.....	104
TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO URBANA DA CIDADE DE VITÓRIA.....	106
TABELA 11 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE ACORDO COM O NÚMERO TOTAL DE LESÕES (TERCIL).....	110
TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO C242T DO GENE DA P22PHOX DE ACORDO COM O TERCIL DO NÚMERO TOTAL DE LESÕES EPICÁRDICAS OBSERVADAS AO EXAME CINEANGIOGRÁFICO	111
TABELA 13 - GRAU DE ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E NÚMERO DE ARTÉRIAS EPICÁRDICAS ACOMETIDAS POR GRUPO GENOTÍPICO	112

TABELA 14 - EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES INFLAMATÓRIOS DE ACORDO COM GENÓTIPO DO POLIMORFISMO C242T EM VEIAS SAFENAS HUMANAS	118
TABELA 15 - VARIÁVEIS CONSIDERADAS NA CRIAÇÃO DE MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA PARA MORTE + IAM	123
TABELA 16 - VARIÁVEIS NO MODELO LOGÍSTICO FINAL.....	124
TABELA 17 - SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS NA PREDIÇÃO DO DESFECHO ÓBITO + IAM INCIDENTE EM 5 ANOS DE SEGUIMENTO	128
TABELA 18 - VARIÁVEIS NO MODELO LOGÍSTICO FINAL	136
TABELA 19 - SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS NA PREDIÇÃO DO DESFECHO ÓBITO + IAM INCIDENTE EM 5 ANOS DE SEGUIMENTO	139
TABELA 20 - DIFERENÇAS ENTRE CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA NÓS DEFINIDOS NO MODELO CLÍNICO	145
TABELA 21 - DIFERENÇAS ENTRE CURVAS DE KAPLAN-MEIER PARA NÓS DEFINIDOS NO MODELO GENÉTICO	146

Resumo

Resumo

Identificação de alvos genéticos com potencial diagnóstico e prognóstico em doença arterial coronária

Pereira, A.C.; Krieger, J. E.;

Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo.

O desenvolvimento de uma abordagem de estratificação de risco para a doença arterial coronária é certamente uma ferramenta de grande utilidade para o cardiologista clínico ou clínico geral, assim como para o planejamento de saúde pública e organização de ações de saúde pública mais eficazes. No entanto, esse conhecimento deve ser discutido dentro de um cenário de custo-efetividade e de acordo com seu potencial como objeto de valor econômico.

O presente estudo tem como objetivo a identificação de fatores de risco genético de eventos cardiovasculares na população brasileira e o desenvolvimento de um algoritmo preditor que utilize essas informações para o diagnóstico.

Esse trabalho encontra-se expositivamente dividido em dois módulos. No primeiro, procuramos exemplificar através de um estudo de associação genética nossa capacidade atual de encontrar e caracterizar variantes genéticas com poder de estratificação populacional com relação ao risco cardiovascular. Utilizamos dados obtidos a partir de pacientes com doença coronária multiarterial, analisando a relevância do polimorfismo C242T do gene da p22phox, subunidade protéica da NADPH oxidase, na predição de mortalidade desta população. Nossos dados permitem não apenas associar

esse marcador genético a um risco aumentado de mortalidade nessa população, mas também fornecem informações a respeito do provável mecanismo molecular através do qual esse marcador genético age.

No segundo módulo, procuramos detalhar as limitações da abordagem previamente exemplificada, avaliando a informação gerada para o paciente individual. Aqui propomos uma nova abordagem de estratificação de risco desta população, capaz de fornecer de maneira individualizada uma estimativa de risco com maior sensibilidade, especificidade e, conseqüentemente, acurácia. Através de uma abordagem analítica de redução de dimensionalidade obtivemos um algoritmo preditor com acurácia maior do que aquela encontrada utilizando-se apenas os fatores de risco clássicos ou fatores de risco genéticos analisados individualmente.

O entendimento das bases genéticas do desenvolvimento de doenças cardiovasculares facilitará não apenas o diagnóstico precoce, possibilitando o surgimento de abordagens terapêuticas mais específicas e desenhadas a atender suscetibilidades individuais, mas também poderá levar à identificação de novas vias eficazes de intervenção.

Descritores: 1. Genética; 2. Polimorfismo; 3. Triagem genética; 4. Doenças cardiovasculares; 5. Coronariopatia; 6. Marcadores genéticos; 7. Fatores de risco

Summary

Summary

Identification of genetic markers with diagnosis and prognosis potential in coronary artery disease

Pereira, A.C.; Krieger, J. E.;

Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo.

The development of risk stratification approaches in coronary artery disease is certainly an important tool for the clinical cardiologist or internist. It also helps in the planning of public health policies and in the development of effective disease management algorithms. Nevertheless, these tools necessarily have to be developed in a cost-effective scenario and in close relationship with its intrinsic economic value.

The present research project aims at the identification of genetic risk factors for cardiovascular events in the Brazilian population and the development of an algorithm with high predictive value for the diagnosis of these events.

This thesis is, didactically, divided into 2 modules. Firstly, we have exemplified the used paradigm through the development of a genetic association study conducted in the Brazilian population. Here, we were able to describe and characterize genetic variants with the capacity of risk stratify populations into high and low risk groups. This section was possible with the use of data derived from patients with multi-vessel coronary artery disease and the analysis of the C242T gene variant of the p22phox gene, a subunit of the NADPH oxidase protein complex. Our data show not only a major signal of association between this genetic variant and overall mortality in this

population, but also shed light on the potential molecular mechanism of this finding.

Secondly, we have described the potential limitations of this approach analyzing information derived for the individual patient. Here, we propose a new risk stratification algorithm for this population with the capacity to provide individual risk with increased sensitivity and specificity. Through the use of a dimensionality reduction analytical approach we were able to find a predictive algorithm with higher accuracy than the one derived with the use of only classical cardiovascular risk factors and no genetic information.

The understanding of the genetic basis for cardiovascular disease will improve not only the early diagnosis of these disorders, facilitating the rise of therapeutic approaches more specific and tailored to one's particular genetic susceptibility, but also lead to the identification of new pathways for effective intervention.

Descriptors: 1. Genetics; 2. Polymorphism; 3. Genetic Screening; 4. Cardiovascular disease; 5. Coronary disease; 6. Genetic markers; 7. Risk factors

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Arterial Coronária

A doença arterial coronária (DAC) é uma doença complexa com predisposição genética clara e participação importante de fatores ambientais (Wang 2005). O estudo dos determinantes ambientais de risco para o desenvolvimento da DAC proporcionou avanços não apenas para o entendimento de aspectos fundamentais da fisiopatologia da doença, mas também na forma como a diagnosticamos, prevenimos e tratamos (Peyser 1997). No entanto, apesar do conhecimento de uma série de fatores de risco ambientais para a doença, esta ainda continua a ser a principal causa de mortalidade em países desenvolvidos, sendo responsável não apenas por uma parcela significativa dos gastos de saúde destes países, mas também

por uma perda significativa de anos de vida produtiva nos indivíduos acometidos (Russell, Huse et al. 1998).

A despeito da conhecida participação de fatores genéticos no desenvolvimento e manifestação clínica da DAC, poucos marcadores deste tipo de risco são atualmente conhecidos (Ganesh and Nabel 2005; Morgan, Krumholz et al. 2007). Neste cenário, diversas iniciativas em todo o mundo têm objetivado identificar determinantes genéticos da doença, a fim de revelar aspectos desconhecidos da aterogênese, novas formas de estratificação de risco, prevenção e tratamento (Ganesh, Skelding et al. 2004; Miller, Ridker et al. 2007).

O presente estudo objetiva a caracterização de marcador genético com potencial diagnóstico e prognóstico a ser utilizado em indivíduos da população brasileira para a identificação de pessoas com risco aumentado de desenvolvimento de eventos cardiovasculares.

1.2. Impacto econômico e social da Doença Arterial Coronária

A DAC é a principal causa de morte no Brasil e na maioria dos países industrializados do mundo (Cutler, Thom et al. 2006). Nos Estados Unidos, mais de 14 milhões de indivíduos são acometidos pela doença, a um custo médico e social que ultrapassa 90 bilhões de dólares por ano. Aproximadamente 10% dos eventos coronários ocorrem em indivíduos com menos de 50 anos de idade (Thom, Haase et al. 2006; Rosamond, Flegal et al. 2007).

No Brasil, as doenças do aparelho circulatório são responsáveis por 10% das internações hospitalares (1.163.808 pacientes), ficando em 3º lugar, atrás de parto e problemas relacionados (22,6%) e doenças do aparelho respiratório (15,5%).

O total aproximado de gastos anuais com saúde no país é de R\$ 142 bilhões e o mercado de saúde privada no Brasil é estimado em R\$ 78,1 bilhões. Grande parte deste valor é direta ou indiretamente ligado à prevalência e à incidência da doença cardiovascular em nosso meio.

1.3. Importância de Fatores de Risco Clássicos no desenvolvimento de DAC

Fatores de risco ambientais são amplamente aceitos no modelo de desenvolvimento de DAC. Estes incluem fatores de risco maiores (que conferem aumento independente de risco) e menores (sem evidência definitiva de conferir aumento independente de risco). Historicamente, os fatores de risco maiores (também denominados clássicos) são o tabagismo, a dislipidemia e a hipertensão arterial, e os fatores de risco menores incluem o sedentarismo, a obesidade, o diabetes mellitus, fatores psicossociais e a resistência à insulina. Na última década, a *American Heart Association* elevou o sedentarismo, a obesidade e o diabetes à qualidade de fatores de risco maior, baseada em evidências epidemiológicas acumuladas por meio de diversos estudos prospectivos populacionais (2001; Smith, Allen et al. 2006).

As inter-relações entre tais fatores de risco têm sido amplamente estudadas e constituem a base de programas de prevenção primária e secundária para DAC (Smith, Allen et al. 2006). No entanto, recentemente, diversas evidências têm demonstrado que estes fatores de risco clássicos apresentam por sua vez grandes componentes de determinação genética.

Entretanto, ainda não está claro em que proporção a variabilidade genética é suficiente para disparar o processo de desenvolvimento de DAC independentemente dos fatores de risco clássicos, como dislipidemia, hipertensão ou tabagismo ou em que medida ela atuaria através da modulação do risco conferido pelos fatores clássicos.

Desta maneira, fatores de risco genéticos poderiam não apenas definir diretamente o risco de desenvolvimento de DAC, mas também determinar em grande parte, por via indireta, este risco, modulando um risco aumentado de desenvolvimento de condições ou patologias que aumentam o risco de desenvolvimento da doença (como, por exemplo, diabetes e hipertensão arterial).

De fato, uma série de estudos demonstrou e quantificou o papel de fatores genéticos na variabilidade individual dos diversos fatores de risco clássicos associados ao desenvolvimento de DAC. O *Northern Manhattan Family Study* avaliando 803 pacientes de 89 famílias hipânico-caribenhas determinou a herdabilidade (h^2) de vários fatores de risco cardiovascular: 46% para circunferência abdominal, 24% para glicemia de jejum, 47% para triglicérides, 60% para HDL colesterol, 16% para pressão arterial sistólica, 21% para pressão arterial diastólica e 30% para hipertensão arterial (Lin,

Boden-Albala et al. 2005). O *San Antonio Family Heart Study* foi realizado com 1.250 indivíduos de 40 famílias de indivíduos mexicanos residentes no Texas. Para a maioria dos fenótipos relacionados aos lípides e lipoproteínas, a proporção da variância atribuída aos genes foi no mínimo três vezes superior à atribuída aos fatores ambientais mensuráveis. Os efeitos genéticos e de ambiente familiar, analisados conjuntamente, foram responsáveis por 50 a 60% do total da variabilidade fenotípica para lípides/lipoproteínas, pressão arterial e medidas antropométricas e por 30 a 50% para mensurações relacionadas à glicemia. Os valores de herdabilidade obtidos foram todos significativos: colesterol total (39,2%), HDL-c (45,5%), LDL-c (40,1%), triglicérides (39,6%), apoAI (43,1%), apoAII (34,1%), apoB (30,8%), apoE (33,3%), LpAI (36,0%), Lp[a] (69,0%), atividade de LCAT (20,6%), glicemia de jejum e 2h após sobrecarga de glicose (18,3% e 15,9%, respectivamente), insulina de jejum e 2 horas após sobrecarga (34,8% e 12,9%, respectivamente), pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica (17,8% e 28,3%, respectivamente) e índice de massa corpórea (42,4%) (Mitchell, Kammerer et al. 1996).

Ademais, há evidências epidemiológicas e experimentais de que o risco conferido por fatores de risco clássicos parece ser modulado pela idade, definindo desta maneira sub-populações em que a presença de um destes fatores de risco parece desempenhar papel ainda mais relevante. Por exemplo, a presença de tabagismo parece ser um fator de risco para DAC mais importante em indivíduos jovens do que em indivíduos mais idosos (Nascetti, Elosua et al. 2001).

Tais fatos indicam ainda a necessidade de que estudos de identificação de fatores de risco genéticos para o desenvolvimento de DAC incorporem a seu desenho e forma de análise as diversas inter-relações e modulações entre fatores de risco ambientais, entre os determinantes genéticos de fatores de risco ambientais e outras variáveis de risco genético que atuem de maneira outra que não via fatores de risco clássicos (Wallace 2006; Kraft, Yen et al. 2007).

Do ponto de vista operacional, o estudo de fatores de risco clássico pode contribuir na identificação de covariáveis que apresentem efeitos marginais ou modulem o efeito de outra variável, definindo uma relação de pleiotropismo ou epistasia. O presente estudo pretende trabalhar com este problema de duas maneiras diferentes: primeiro, pela análise estratificada por subgrupos identificáveis; segundo, por modelos de regressão que permitam o ajuste para covariáveis que modulem o efeito final. Ambas as abordagens serão desenvolvidas no decorrer do estudo e irão permitir aumentar a homogeneidade do efeito genético e explorar as complexas relações existentes entre fatores de riscos genéticos e ambientais na determinação do risco de desenvolver DAC.

1.4. História familiar como fator de risco para DAC

O papel da história familiar como fator de risco independente para doença coronária já foi claramente definido através de vários estudos prospectivos. Mantém-se como fator independente de risco após ajuste para

outros fatores de risco clássicos como lípides, pressão arterial, obesidade, diabetes, classe social, tabagismo, consumo de álcool e dieta (Watkins and Farrall 2006).

A história familiar provê informação útil na definição do risco cardiovascular individual (Sorensen, Nielsen et al. 1988; Crouch and Gramling 2005) e numerosos estudos já foram realizados confirmando a agregação de casos de doença coronária em famílias. Por exemplo, dados do estudo de Framingham mostram que pessoas com história familiar positiva apresentaram um risco cardiovascular 29% maior que o de indivíduos sem história familiar (Myers, Kiely et al. 1990). Do mesmo modo, programas voltados à prevenção de doenças cardiovasculares, como o Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP) americano, consideram história familiar de doença cardiovascular precoce como fator de risco e utilizam este dado na definição do status de risco de determinado indivíduo (2001).

Vários estudos estimaram o risco relativo de desenvolvimento de DAC precoce em irmãos de pacientes com DAC precoce entre 1.5 e 12.1, dependendo da idade de aparecimento do caso índice (probando) na família.

Marenberg e col. investigaram o risco de DAC precoce em 3298 gêmeos monozigóticos e 5964 gêmeos dizigóticos masculinos e 4012 gêmeas monozigóticas e 7730 gêmeas dizigóticas. Para homens, o risco relativo de morte por DAC antes dos 55 anos foi 8.1 para gêmeos monozigóticos e 3.8 para gêmeos dizigóticos quando o caso-índice havia falecido em decorrência de DAC com idade inferior a de 55 anos, em

comparação com aqueles em que o irmão não havia falecido até os 55 anos. Para mulheres, os riscos relativos correspondentes para morte em decorrência de DAC antes da idade de 65 anos foram de 15.0 para gêmeas monozigóticas e 2.6 para gêmeas dizigóticas (Marenberg, Risch et al. 1994). Neste sentido, existem evidências que fatores herdados podem explicar parte do risco de determinado indivíduo desenvolver DAC. No entanto, tais estudos não contribuem de forma significativa para a identificação destes fatores.

A possibilidade de que a história familiar positiva pudesse ser uma variável contaminada com hábitos familiares culturais de risco e não representar diretamente uma inferência de que fatores biológicos hereditários sejam os causadores de risco aumentado também já foi abordada através de estudos com irmãos adotivos (Sorensen, Holst et al. 1998; Osler, Holst et al. 2001). Um dos estudos mais detalhados foi realizado através do seguimento de crianças nascidas entre os anos de 1924 e 1926 que foram subsequenteiramente adotadas por famílias que não eram biologicamente relacionadas às crianças adotadas. Neste estudo foram acompanhadas 960 famílias até 1982. O objetivo era o de comparar a taxa de mortalidade de adotados, cujos pais biológicos haviam falecido antes dos 50 ou antes dos 70 anos de idade, com a taxa de mortalidade daqueles que ainda tinham seus pais biológicos vivos nestas duas idades. Uma comparação similar foi realizada com relação aos pais adotivos. Assim, pessoas adotadas que tiveram pelo menos um de seus pais biológicos falecido antes dos 50 ou dos 70 anos de idade apresentaram um risco

relativo 1,7 e 1,8, respectivamente, maior para doença coronária do que aquelas cujos pais biológicos ainda estavam vivos nestas idades. Ainda, a morte de um dos pais biológicos por causas cardiovasculares antes dos 50 anos de idade esteve relacionada a um aumento de 4,5 vezes no risco de mortalidade pela mesma causa na pessoa adotada. A morte de pais adotivos por causas cardiovasculares com idade inferior a 50 anos também esteve associada a uma tendência de aumento da mortalidade da pessoa adotada, mas este aumento de risco não se mostrou significativo nesta série. A maior implicação deste estudo foi a observação de que fatores genéticos têm influência sobre o desenvolvimento de doença cardiovascular em idade precoce, sendo que esta importância relativa diminui com o progredir da idade (Evans, Van Baal et al. 2003).

Percebe-se, assim, que uma grande variedade de observações convergentes sugere que variáveis genéticas têm relevância na fisiopatologia da DAC. Além do valor preditivo de uma história familiar positiva para DAC precoce e da verificação da agregação de casos familiares de DAC, fenótipos intermediários para DAC têm sido descritos com maior frequência e incidência em filhos de pacientes com DAC (Rutter, Meigs et al. 2005). Desta maneira, uma prevalência maior de aterosclerose carotídea, defeitos de perfusão miocárdica, índices de disfunção endotelial e alterações eletrocardiográficas tem sido descrita em familiares de primeiro-grau de indivíduos afetados por DAC, sendo que estas associações também persistem mesmo após ajuste para fatores de risco cardiovascular clássicos

(Haapanen, Koskenvuo et al. 1989; Giannini, Diament et al. 1998; Margaglione, Cappucci et al. 2000).

Ao mesmo tempo, através da análise destes estudos fica clara a dificuldade de quantificação do valor da história familiar na definição do risco cardiovascular de um indivíduo, mesmo que este tenha uma história familiar positiva. Este fato coloca um claro obstáculo ao uso clínico deste tipo de informação.

Novos fatores de risco cardiovascular são, pelo menos em parte, geneticamente determinados, como, por exemplo, a concentração sérica de lipoproteínas, de proteína-C reativa ou homocisteína plasmática. A identificação destes novos fatores de risco, assim como o maior conhecimento da hereditariedade dos fatores de risco clássicos, aponta para uma mudança significativa no entendimento do risco cardiovascular “hereditário”. Este conhecimento passa cada vez mais a ser associado a componentes mais mensuráveis.

No entanto, a identificação bioquímica de variáveis de risco cardiovascular, que poderia ser utilizada como potencial marcador intermediário do risco hereditário, é limitada quanto ao seu significado e abrangência. De um lado, pode significar não apenas componente do risco hereditário, mas espelhar também alterações fisiopatológicas subclínicas vigentes em um indivíduo com risco aumentado (infecção crônica ou um estado de ativação pró-inflamatório, por exemplo), não contribuindo, desta forma, para explicar por completo o componente de risco hereditário de um indivíduo. Por outro lado, os métodos de detecção de alterações séricas

podem não ser sensíveis o suficiente para detectar alterações de homeostase protéica que ocorram na intimidade da placa aterosclerótica. Finalmente, a detecção de marcadores séricos de risco, apesar de sucesso comprovado como preditor do risco cardiovascular de um indivíduo, somente pode ocorrer a partir do momento que alterações protéicas já existem. Uma vez que variáveis de risco hereditário existem a partir do momento da concepção, marcadores deste risco, intrinsecamente relacionados à constituição genética do indivíduo, poderiam ser diagnosticados já no momento do nascimento, aumentando de maneira significativa o tempo para que abordagens de prevenção sejam instituídas.

1.5. A importância de fatores de risco genético

Uma vez estabelecida a existência e a importância relativa de fatores de risco genético na determinação do risco cardiovascular de determinado indivíduo, torna-se necessário identificar e validar o uso destes fatores de risco em nossa população.

1.5.1. Encontrando genes que modulem traços complexos

Organismos apresentam variabilidade em todos os aspectos biológicos, incluindo morfologia, comportamento, fisiologia, desenvolvimento e suscetibilidade a doenças complexas. Muitos destes fenótipos são controlados por múltiplos genes, sendo denominados poligênicos ou traços

complexos, em com os fenótipos que são controlados por um único gene (traços monogênicos ou mendelianos). O fato de que a maioria, senão todos, os traços mendelianos possam ser modificados pelo “pano de fundo” genético sugere que poucos são os fenótipos puramente monogênicos (Glazier, Nadeau et al. 2002).

Muitos genes que controlam traços mendelianos foram descritos nas últimas duas décadas, em contraste com os poucos descritos para a modulação dos traços complexos. Genes que contribuem para traços complexos quantitativos (denominados em inglês de QTL, para *Quantitative Trait Loci*), apresentam características específicas que tornam sua identificação muito mais trabalhosa e difícil. Tais características incluem heterogeneidade genética, epistasia, penetrância baixa, expressividade variável, pleiotropia e importância relativa pequena na explicação da variabilidade total do fenótipo de interesse. Apesar destes problemas, a perspectiva futura de sucesso tem sido muito otimista, principalmente devido ao recente desenvolvimento de um extenso arsenal de recursos advindos dos estudos de genomas e de importantes avanços em biotecnologia.

Em traços e doenças mendelianas, o primeiro passo na descoberta de genes causadores envolve o mapeamento preciso e inquestionável deste gene a uma pequena região genômica. Este processo é realizado por meio do estudo de grandes famílias nucleares que apresentam segregação dicotômica da doença, ou traço de interesse, e do uso de painéis de marcadores genéticos polimórficos espalhados de maneira a construir um mapa genético de todos os indivíduos, afetados ou não-afetados, da família.

O objetivo desse tipo de estudo, denominado estudo de ligação, é o de encontrar uma região genômica compartilhada por todos os indivíduos afetados, mas não compartilhada pelos indivíduos não-afetados. Tipicamente, devido à forte relação existente entre genótipo e fenótipo nestes casos, um único indivíduo recombinante para a região em estudo pode ser suficiente para definir o intervalo mínimo que contém o gene causador da doença para pequenas regiões genômicas, muitas vezes com menos de 1cM. Como resultante, a descoberta da seqüência variante (a alteração causadora da doença) pode ser realizada muitas vezes através do rastreamento de apenas alguns poucos genes candidatos.

As mesmas certezas não se aplicam aos traços geneticamente complexos. Nesta situação, uma série de outras variáveis entra em questão, complicando a análise da correlação genótipo-fenótipo. Não se espera, agora, que exista correlação total entre determinado marcador genético e o traço estudado, mas sim uma associação deste com o fenótipo. Não se define mais variante causadora da doença, mas sim, variante que aumenta o risco da mesma. Não se espera que uma única alteração de DNA explique a existência ou não da doença, mas sim, um conjunto de marcadores, que interagem entre si e com fatores ambientais.

1.5.2. Avanços nas abordagens atuais

Exposto o cenário, atualmente se propõe que a busca de variáveis que modulam doenças complexas se dê em diversas etapas.

O desenvolvimento da estatística genética no século XX pode ser dividido em 3 fases não totalmente independentes: (1) desenvolvimento teórico de métodos estatísticos, (2) avanços tecnológicos levando a aplicação prática destes métodos a dados reais e (3) desenvolvimento de desenhos de estudo mais sofisticados e voltados para situações específicas.

Na primeira fase, a base teórica para a segregação de informação genética foi elucidada e algoritmos estatísticos foram propostos para o mapeamento de genes através da utilização de técnicas de análise de ligação e desequilíbrio de ligação. Praticamente toda a abordagem estatística utilizada atualmente foi concebida na primeira metade do século XX. A segunda fase, a era tecnológica, iniciou-se com o desenvolvimento de programas para análises de ligação, no final da década de 1950, e com o desenvolvimento de conjuntos de marcadores moleculares polimórficos espalhados por todo o genoma. Avanços em computação e biologia molecular revolucionaram o mapeamento genético.

Cabe, neste momento, uma breve discussão sobre a terminologia genética utilizada no restante deste projeto. A recente revolução na biologia molecular e o aumento do entendimento de processos fundamentais em biologia levaram ao equacionamento de conceitos advindos da genética clássica com fenômenos moleculares recentemente descritos que parecem explicar tais conceitos, pelo menos em algumas situações. Ao mesmo tempo, este processo levou a certa confusão e inconsistência da terminologia utilizada, uma vez que a sinonímia dos termos geralmente não

é completa. Muitos termos cunhados por geneticistas clássicos têm significados mais gerais do que os utilizados atualmente.

O termo polimorfismo deriva do grego *poly* (muitas) e *morphe* (forma), devendo assim referir-se a algo que exista em duas ou mais formas distintas, em nosso caso um *locus* que tenha dois ou mais alelos na população. Historicamente o termo polimorfismo tem sido definido como um *locus* que tenha pelo menos dois alelos com frequência maior que 1% na população. No entanto, este tipo de restrição não parece ser particularmente útil, uma vez que muitos *loci* que predisõem a doenças não seriam considerados polimórficos por esta definição e muitas variantes gênicas analisadas como *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) não seriam, tecnicamente, polimorfismos. Ainda, um determinado sítio, considerado como polimorfismo quando estudado em uma população, pode não se qualificar como tal em outra população, e um *locus* que tenha 200 alelos igualmente freqüentes não seria nunca considerado um polimorfismo, a despeito do fato de que a maioria dos indivíduos iria apresentar dois diferentes alelos em seus dois cromossomos neste mesmo *locus*. Parece, então, mais apropriado chamar de polimorfismo qualquer entidade com dois ou mais alelos, independente de suas freqüências populacionais.

Curiosamente, um outro uso vernacular da palavra surge quando se questiona a participação funcional de determinada variante gênica: é um polimorfismo ou mutação? O uso da palavra polimorfismo nesta situação tenta indicar um alelo fenotipicamente silencioso; mutação, por sua vez, significaria um alelo causador de doença. A palavra mutação deriva do latim

mutatio (mudança) e se refere ao processo através do qual uma seqüência de DNA pode ser alterada. Apesar de tais alterações levarem à criação de novos alelos, parece inadequado o uso da palavra mutação para a qualificação dos efeitos fenotípicos do mesmo. Também deveríamos evitar o uso da palavra polimorfismo quando na verdade estamos nos referindo a um alelo. Desta maneira, parece mais adequado, ao invés da dicotômica divisão polimorfismo versus mutação, o uso dos termos alelo silencioso, ou neutro, versus alelo causador ou que predispõe à doença (ou fenótipo).

1.5.3. Determinantes genéticos da DAC e estudos de associação:

Vários estudos vêm sendo realizados no sentido de identificar marcadores genéticos de risco para DAC. Nestes, diferentes desenhos experimentais têm sido contemplados e diferentes fenótipos escolhidos como alvo. Apesar do grande esforço destas abordagens, os resultados ainda não são conclusivos e esta permanece uma área de intensos esforços elucidativos (Nabel 2003).

Com o objetivo de determinar variantes genéticas que aumentem o risco de infarto do miocárdio, Yamada e colaboradores examinaram a prevalência de 112 polimorfismos em 71 genes candidatos em pacientes com infarto do miocárdio e indivíduos controle no Japão. Esta análise revelou uma associação estatisticamente significativa em homens (um polimorfismo citosina para timina no nucleotídeo 1019 do gene da conexina 37) e duas em mulheres (a inserção G na posição -668 do promotor do gene

PAI-I e a inserção de uma adenina na posição -1171 no gene da estromelina-1). Estes resultados sugerem que, nesta população, tais polimorfismos podem conferir suscetibilidade direta à ocorrência de infarto do miocárdio (Yamada, Izawa et al. 2002).

O estudo *GeneQuest* investigou 62 genes candidatos em pacientes e familiares em primeiro grau com infarto do miocárdio precoce (homens com menos de 45 anos e mulheres com menos de 50 anos). Neste estudo, com um desenho tipo caso-controle comparando as sequências genômicas de 72 polimorfismos entre casos e controles, identificaram-se três variantes nos genes codificando trombospondina-4, trombospondina-2 e trombospondina-1 associadas estatisticamente a DAC precoce. O mecanismo biológico através do qual estas variantes podem levar a um infarto do miocárdio precoce ainda não foi totalmente esclarecido (McCarthy, Parker et al. 2004).

Pesquisadores envolvidos em vários estudos epidemiológicos, como o estudo de Framingham, têm coletado um grande número de amostras biológicas, incluindo DNA, de indivíduos participantes, além de um conjunto enorme de informações demográficas, clínicas e laboratoriais. Os desenvolvimentos tecnológicos atuais permitem agora o teste em larga escala de várias centenas de variantes genéticas, o que pode fornecer ferramenta adequada de cobertura de quase todo o genoma humano.

As tecnologias disponíveis para este empreendimento também têm se expandido rapidamente. A análise por *microarray* foi primeiramente apresentada conceitualmente em 1994 e o primeiro manuscrito publicado utilizando-se a metodologia ocorreu em 1995. Atualmente, o genoma inteiro

pode ser amostrado em um único *microarray* (ou *chip* de DNA). Esses *chips* permitem que polimorfismos gênicos do genoma de indivíduos participantes de determinado estudo sejam avaliados, sendo que os métodos de genotipagem atuais através dessa tecnologia podem amostrar até 1.000.000 de variantes genéticas simultaneamente.

A associação dessa miríade de dados genotípicos com informações clínicas bem caracterizadas pode fornecer ao investigador as variáveis necessárias para o desenvolvimento de uma equação preditora com alta acurácia.

Assim como com qualquer novo método, é importante ressaltar em que cenário este tipo de abordagem pode transformar-se em importante ferramenta ao investigador. Primeiramente, as populações em estudo devem ser cuidadosamente caracterizadas no sentido de propiciar a seleção de indivíduos com probabilidade elevada de compartilhar uma mesma “causa” genética para seu fenótipo. Em segundo lugar, um número grande de casos e controles deve ser utilizado de modo a fornecer ao estudo um poder estatístico adequado para identificar os marcadores de interesse. Finalmente, a grande quantidade de dados gerada necessita de capacidade computacional adequada para sua manipulação e análise.

Os fatores de risco genéticos identificados através de estudos de associação genômicos provavelmente estarão associados a riscos moderados (assim como é de fato o caso para a grande maioria dos fatores de risco ambientais já caracterizados), ao contrário de valores de risco extremamente altos encontrados nas doenças monogênicas. No entanto, se

este fator de risco for relativamente freqüente numa dada população, ele pode responder por uma parcela significativa do risco populacional atribuído para aquele fenótipo e ser de relevância no desenvolvimento de algoritmos diagnósticos para esta doença nesta população.

Para o médico, antecipa-se que o resultado destes estudos será similar ao de avaliação e desenvolvimento de qualquer nova tecnologia médica. Os primeiros resultados deverão ser confirmados em populações similares. Em seguida, a utilidade clínica das novas variantes identificadas dependerá de sua capacidade de melhorar a acurácia de algoritmos diagnósticos já existentes.

O entendimento das bases genéticas do desenvolvimento de DAC facilitará não apenas o diagnóstico precoce de suscetibilidade genética (podendo assim delimitar abordagens terapêuticas individualizadas), mas também poderá levar à identificação de novas vias para intervenção terapêutica.

1.6. Escolhendo um alvo: estresse oxidativo e homeostasia vascular

Estresse oxidativo é definido como um desbalanço do estado redox no qual substâncias pró-oxidantes sobrepõem-se à capacidade oxidante, resultando na produção aumentada de espécies reativas de oxigênio. Espécies reativas de oxigênio (EROs) já foram associadas à patogênese de virtualmente todo estágio vascular durante o desenrolar do processo aterosclerótico (Fortuno, Jose et al. 2005).

Tradicionalmente, os macrófagos foram considerados a fonte da maior parte das EROs presentes na parede vascular, desempenhando importante papel na patologia vascular (Cathcart 2004). No entanto, um número cada vez maior de evidências indica que praticamente todos os tipos celulares presentes na parede vascular (células endoteliais, musculares lisas e da adventícia) produzem espécies reativas de oxigênio em quantidades variáveis e em resposta a diversos estímulos, podendo participar de vias autócrinas ou parácrinas com o objetivo de modular a função celular (Griendling and Harrison 1999).

As espécies reativas de oxigênio têm um papel fisiológico na parede vascular, participando como segundos mensageiros na modulação da função endotelial, no crescimento de células musculares lisas e endoteliais e no remodelamento da parede vascular (Taniyama and Griendling 2003). Cada uma dessas respostas, quando não balanceada, contribui para o desenvolvimento de doenças vasculares. A principal espécie reativa de oxigênio presente no tecido vascular é o ânion superóxido, que inativa o óxido nítrico (NO), o principal fator de relaxamento vascular (Kojda and Harrison 1999). A dismutação do ânion superóxido pela superóxido dismutase produz peróxido de hidrogênio, uma forma mais estável de espécie reativa de oxigênio que é convertida em água pela catalase e glutathiona peroxidase. O peróxido de hidrogênio e outros peróxidos são importantes na regulação da sinalização de crescimento em células musculares lisas e na resposta inflamatória de lesões vasculares. Altos níveis de superóxido, com o conseqüente acúmulo de peróxido de

hidrogênio e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico têm um importante papel na modulação do remodelamento vascular (Irani 2000). Finalmente, o produto da reação entre superóxido e óxido nítrico, o peroxinitrito, constitui uma importante molécula oxidante, com a capacidade de oxidar proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, também modulando o processo de lesão vascular (Beckman and Koppenol 1996).

A produção intra- e extra-celular de EROs e a conseqüente ativação de vias de sinalização específicas coordenam várias respostas fisiológicas integradas em tecidos do sistema vascular. Um grande número de estudos demonstrou que EROs influenciam processos celulares no remodelamento vascular através da ativação de várias vias de sinalização intra-celular. EROs ativam potentemente quinases reguladas por sinais extra-celulares; proteínas quinase ativadas por mitógenos importantes para o crescimento e diferenciação celular; tirosinas quinase importantes em processos de remodelamento e lesão vascular; e proteínas tirosino fosfatases e fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B, que induzem a expressão de genes pró-inflamatórios importantes no processo de inflamação vascular associado a hipertensão e aterosclerose (Cai 2005).

1.7. Os sistemas NADPH oxidase

Alterações relacionadas ao estresse oxidativo têm importante participação na patogênese da aterosclerose e conseqüentemente da doença arterial coronária. Uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio

é uma característica de estados patológicos vasculares. Vias de sinalização sensíveis ao estresse oxidativo modulam a estabilidade de placas ateroscleróticas e o remodelamento vascular.

Fontes potenciais da produção de superóxido vascular incluem NADPH oxidases, xantina oxidases, ciclo-oxigenases, óxido nítrico sintases ou oxidases mitocondriais. Em particular, NADPH oxidases, que são a principal fonte produtora de radicais superóxido no tecido vascular, estão presentes em artérias coronárias humanas, e a expressão de suas subunidades está correlacionada tanto com a gravidade do acometimento coronário, quanto com características de estabilidade em placas de aterosclerose em artérias coronárias humanas (Mueller, Laude et al. 2005).

A NADPH mais bem caracterizada é encontrada em fagócitos, onde ocorre a maior fonte de produção de superóxido, com papel fundamental na proteção imune graças a sua atividade bactericida. A oxidase em fagócitos consiste de um citocromo associado à membrana que compreende uma subunidade grande, a gp91phox (o radical phox sendo derivado de *phagocytic oxidase*), e uma subunidade pequena, a p22phox. Além destas, existem ao menos três subunidades citosólicas (p47phox, p67phox e p40phox) e uma proteína G de baixo peso molecular (rac2). Todas as subunidades presentes na NADPH oxidase fagocítica também foram identificadas em células vasculares, assim como os homólogos de p47phox, p67phox e gp91phox (nox2): nox1, nox4 e nox5 (Lassegue and Clempus 2003).

A expressão de subunidades da NADPH oxidase, principalmente p22phox e nox2, é regulada positivamente em indivíduos portadores de doença arterial

coronária (Azumi, Inoue et al. 1999). A subunidade p22phox é uma proteína ligada à membrana citoplasmática celular e é expressa em células com função de fagocitose, células endoteliais e células musculares lisas (Griendling, Sorescu et al. 2000).

1.8. O gene da p22phox como gene candidato no risco cardiovascular

Vários polimorfismos gênicos já foram descritos no gene que codifica a subunidade p22phox (denominado *CYBA*), sendo que uma variante polimórfica tem sido muito estudada por sua associação com fenótipos cardiovasculares. O polimorfismo C242T encontra-se localizado em um sítio com capacidade de ligação a grupos heme (Dinauer, Pierce et al. 1990; Wyche, Wang et al. 2004). Este polimorfismo é caracterizado por uma única alteração nucleotídica (citosina por timina na posição número 242 do RNA mensageiro do gene), que leva à substituição de histidina por tirosina na posição 72 da proteína codificada.

A observação inicial foi de que a prevalência do alelo 242T estaria aumentada em indivíduos sem doença arterial coronária (Inoue, Kawashima et al. 1998). Este achado inicial não encontrou suporte na análise de dados angiográficos do estudo prospectivo LCAS (*Lipoprotein and Coronary Artery Study*), o qual sugeriu uma associação entre o alelo 242T e uma maior progressão de doença coronária (Cahilly, Ballantyne et al. 2000). Outros estudos do tipo caso-controle foram inconsistentes na descrição de

associações entre este polimorfismo e doença vascular (Hayaishi-Okano, Yamasaki et al. 2003; Corsetti, Ryan et al. 2007; He, Cheng et al. 2007).

Neste mesmo cenário, vários estudos funcionais objetivaram descrever as possíveis associações entre polimorfismos no gene da p22phox e função vascular medida através de fenótipos quantitativos intermediários. Desta maneira, através da medida da produção vascular de superóxido *in vitro* de segmentos de veias safenas humanas de 110 pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio, Guzik *et al.* observaram uma produção significativamente menor de superóxido em veias de pacientes com o alelo 242T (Guzik, West et al. 2000). Ainda, uma associação entre um menor *burst* oxidativo neutrofílico e o genótipo TT foi descrita em indivíduos jovens, sem história de DAC e com uma baixa prevalência de fatores de risco cardiovascular (Wyche, Wang et al. 2004).

De maneira inversa, outros autores observaram uma associação entre a presença do alelo 242T e aumento da atividade de NADPH oxidase. Shimo-Nakanishi *et al.*, através de estudo de transfecção celular de cDNA do gene da p22phox com o alelo 242C e 242T, observaram uma produção de superóxido significativamente maior em células transfectadas com cDNA contendo o alelo 242T da p22phox. Ainda, estes autores observaram em neutrófilos extraídos de sangue periférico uma produção significativamente maior de ânion superóxido nos neutrófilos estimulados com PMA derivados de indivíduos portadores do alelo 242T (Shimo-Nakanishi, Hasebe et al. 2004).

Nakano *et al.*, com o objetivo de avaliar a influência do polimorfismo C242T da p22phox e a concentração sérica de marcadores do estado redox,

avaliaram amostras de soro de 134 pacientes diabéticos. Estes autores observaram uma associação significativa entre a presença do alelo 242T e níveis reduzidos de HDL oxidada e níveis aumentados de LDL oxidada (Nakano, Matsunaga et al. 2003)

É claro, portanto, que a associação entre o genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox e a ocorrência de eventos cardiovasculares ainda não foi totalmente esclarecida.

2 . Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo a identificação de fatores de risco genético ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares na população brasileira e o desenvolvimento de um algoritmo preditor com alta acurácia para esse diagnóstico.

Especificamente, trata-se de:

1. investigar a associação entre o polimorfismo C242T no gene codificante da subunidade p22phox da NADPH oxidase humana e eventos cardiovasculares em pacientes portadores de doença arterial coronária multiarterial seguidos por 5 anos;

2. investigar o potencial mecanismo molecular de ação do polimorfismo estudado na modulação do risco cardiovascular em humanos;

3. avaliar se a informação clínica advinda do marcador molecular estudado pode ser associada a algoritmos clínicos de predição do risco cardiovascular.

3 . Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Uma vez que o presente estudo utilizou-se de uma série de diferentes ferramentas epidemiológicas, laboratoriais e analíticas para abordar cada um dos três objetivos específicos, apresenta-se a descrição metodológica de cada uma das ferramentas utilizadas em seções destinadas a cada um dos objetivos específicos propostos.

3.1. Objetivo 1

3.1.1. Casuística e métodos

A abordagem analítica escolhida para explorar o objetivo específico 1 foi a de um estudo de associação genética utilizando uma amostra de indivíduos portadores de doença coronária multiarterial seguidos

prospectivamente no Instituto do Coração por um período de 5 anos. A hipótese aqui testada foi a de que o conhecimento sobre o genótipo do polimorfismo C242T no gene codificante da p22phox teria o poder de estratificar duas populações de pacientes com relação ao risco de eventos cardiovasculares incidentes durante um período de 5 anos de seguimento. Seguem-se descrições sobre a casuística, métodos de recrutamento, variáveis coletadas, método laboratorial de determinação genotípica e abordagem analítica utilizada para testar a hipótese referente ao objetivo específico 1.

3.1.2. Pacientes estudados:

Este estudo avaliou fatores de risco genético em pacientes selecionados como participantes do projeto MASS II (The Medicine, Angioplasty and Surgery Study II).

O projeto MASS II consiste de um estudo unicêntrico, aleatorizado, prospectivo e multidisciplinar que compara as opções terapêuticas: tratamento clínico, revascularização cirúrgica do miocárdio e angioplastia transluminal coronária em pacientes com doença arterial coronária de característica multiarterial, apresentando angina estável e função ventricular preservada. O projeto MASS vem sendo desenvolvido no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, envolvendo a Unidade Clínica de Coronariopatia Crônica, o Serviço de Métodos Gráficos, o Laboratório de Pesquisas

Clínicas, o Serviço de Hemodinâmica, a Divisão de Cirurgia e o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, com aprovação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o no. 264/94/11.

3.1.3. Seleção de pacientes

A população considerada para a inclusão no projeto MASS II compreende pacientes com DAC multiarterial, portadores de angina estável e/ou isquemia miocárdica esforço-induzida, com diagnóstico através de estudo cinecoronariográfico revelador de estenoses coronárias significativas (>70%) em dois ou mais ramos arteriais. As cinecoronariografias foram realizadas em até dois meses antes do procedimento, sendo analisadas por um cardiologista clínico, um cardiologista intervencionista e um cirurgião cardiovascular, havendo necessidade para a randomização de uma tríplice concordância para a indicação do tipo de intervenção de revascularização do miocárdio isquêmico (ATC e RCM)

3.1.4. Critérios para a não-inclusão

Foram considerados critérios de exclusão no estudo MASS II os seguintes:

- Idade (<35 ou >75 anos);

- Doenças cardíacas associadas (congenita, valvar, miocardiopatia não-isquêmica, pericárdica);
- Cinecoronariografia de definição insatisfatória;
- FEVE < 35% (calculada pela fórmula de Dodge);
- Aneurisma de ventrículo esquerdo;
- Revascularização prévia do miocárdio (RCM ou ATC);
- Angina instável ou IAM nas últimas quatro semanas;
- Lesão do tronco da artéria coronária esquerda > 50%;
- Extensa calcificação de aorta ascendente ou espasmo coronário primário;
- Acidente Vascular Encefálico ou Ataque Isquêmico Transitório nos últimos seis meses;
- Anatomia coronária inacessível para ATC ou RCM (de acordo com o consenso dos cardiologistas: o clínico, o intervencionista e o cirurgião);
- Expectativa de vida limitada a doença grave associada (neoplasia, insuficiência renal ou hepática, doenças hematológicas ou discrasias sanguíneas);
- Gravidez (suspeita, diagnosticada ou planejada);
- Outras morbidades que contra-indicassem ATC ou RCM.

3.1.5. Definição de critérios e procedimentos de investigação

Os pacientes participantes do projeto MASS II, foram aleatorizados para RCM ou ATC e submetidos aos respectivos procedimentos de revascularização do miocárdio isquêmico, com intervalo, quando possível, de até quatro semanas após a aleatorização.

Assim, foram selecionados pacientes de maneira equivalente e consecutiva, de acordo com o número de artérias envolvidas, com a localização das lesões coronárias e ainda indicações semelhantes para ambos os procedimentos de revascularização do miocárdio.

A angina foi considerada de acordo com a classificação funcional da *Canadian Cardiovascular Society* (Campeau 1976), entendendo-se como refratária quando os pacientes tratados com terapia anti-isquêmica tríplice (betabloqueador e/ou bloqueador de canais de cálcio, nitrato e aspirina) não obtiveram sucesso.

O infarto agudo do miocárdio foi assim definido:

1 – surgimento de novas ondas Q em pelo menos duas derivações eletrocardiográficas contíguas; ou

2- sintomas compatíveis com infarto agudo do miocárdio, associados à elevação da fração MB da enzima creatinofosfoquinase (CPK) maior que três vezes o limite superior ao normal, não sendo considerado diagnóstico para o grupo ATC quando esta elevação ocorresse dentro de 96 horas após o procedimento de revascularização (Chaitman, Rosen et al. 1997).

A revascularização do miocárdio anatomicamente completa foi definida, angiograficamente, como a ausência de lesão coronária residual importante (>70%) em todos os ramos epicárdicos considerados passíveis de receber o tratamento através da ATC ou de acordo com o número de anastomoses distais realizadas em todos os vasos considerados doentes na mesma condição (Bourassa, Yeh et al. 1998).

Os eventos cardíacos passaram a ser analisados após a respectiva alta dos pacientes sobreviventes aos procedimentos de revascularização do miocárdio.

A avaliação clínica foi realizada trimestralmente durante os cinco primeiros anos após a intervenção, enquanto que a avaliação funcional foi realizada através do teste ergométrico (TE) em esteira, de acordo com o protocolo Bruce modificado em condições basais ao final de cada ano de seguimento até completar o 5º ano após a intervenção.

O teste ergométrico foi considerado ineficaz quando o paciente não conseguiu atingir 5 METs (equivalente metabólico) ou FC máxima < 80%.

Exceto quando contra-indicado, todos os pacientes receberam aspirina, nitratos, inibidores da HMG-CoA reductase, inibidores da ECA, betabloqueadores e/ou bloqueadores do canal de cálcio. Exames de rotina incluíram ECG de repouso, ecocardiograma e rotina laboratorial a cada seis meses.

Os pacientes do grupo ATC foram submetidos à angiografia coronária, de rotina, no 6º mês pós-procedimento.

3.1.6. Cateterismo cardíaco

Todos os pacientes foram submetidos à cinecoronariografia em aparelho Philips modelo Integris 3000, incluindo coronariografia e ventriculografia esquerda pela técnica de Sones ou Seldinger, com registro de pelo menos quatro projeções ortogonais para a avaliação da artéria coronária esquerda e duas projeções para a artéria coronária direita, bem como para os enxertos arteriais ou venosos, quando presentes no grupo RCM submetido à cineangiocoronariografia de controle (Sones 1962). A fração de ejeção foi calculada pela fórmula proposta por Dodge *et al.* (Dodge, Sandler *et al.* 1966).

Dois observadores experientes quantificaram visualmente as obstruções (considerando significativas aquelas $\geq 50\%$), bem como a presença de circulação colateral. A classificação das lesões coronárias foi baseada na sua localização, gravidade, extensão e angulação conforme proposto por Ryan *et al.* (Ryan, Bauman *et al.* 1993).

A doença aterosclerótica coronária multiarterial foi caracterizada quando encontrada estenose $\geq 50\%$ em mais de uma artéria coronária ou um de seus ramos, considerando-se apenas vasos com diâmetro luminal superior a 1,5 mm.

3.1.7. Revascularização cirúrgica do miocárdio

A RCM foi realizada utilizando técnica cirúrgica padronizada, sob hipotermia e uso de solução cardioplégica (Kirklin, Frye et al. 1991). O cirurgião cardiovascular foi estimulado a intervir em todas as artérias abordáveis, incluindo aquelas com estenose $\leq 50\%$. Dessa forma, a estratégia cirúrgica foi determinada pelo cirurgião com o objetivo de obter RM completa, utilizando enxertos venosos ou condutos arteriais, sempre que possível.

Os pacientes foram submetidos ao procedimento após a definição da estratégia terapêutica, tendo sido medicados com betabloqueadores e drogas anti-plaquetárias, quando necessário em todo o período peri-operatório.

3.1.8. Revascularização miocárdica percutânea

A angioplastia transluminal coronária (ATC) foi realizada conforme técnica convencional, incluindo a administração oral de aspirina ou ticlodipina nas 24 horas precedentes (Safian, Feldman et al. 2001); heparina endovenosa (10000 UI) e nitroglicerina foram infundidas imediatamente antes e durante o procedimento.

Os cardiologistas intervencionistas foram estimulados a intervir em todas as artérias que pudessem estar contribuindo para a isquemia miocárdica e/ou demonstrassem obstrução $\geq 70\%$. Além disso, todas as

opções técnicas baseadas em cateteres estavam disponíveis, incluindo cateter-balão, stent, “laser”, aterectomia direcional e/ou rotacional, de tal modo que a estratégia foi planejada para permitir a revascularização funcional completa, iniciando pelo tratamento da lesão “culpada”, seguida do tratamento dos outros vasos. Quando necessária, a ATC foi planejada e realizada em mais de uma sessão.

No caso de oclusão aguda do vaso tratado durante a ATC, o cardiologista intervencionista e o cardiologista clínico tinham a opção de indicar a cirurgia de revascularização do miocárdio, de emergência.

Em todos os procedimentos percutâneos havia uma equipe de cirurgia cardíaca disponível para os casos de emergência.

O resultado foi considerado como sucesso quando a obstrução residual foi inferior a 50%, ou foi reduzida em pelo menos 20% do valor inicial.

3.1.9. Coleta de dados demográficos

Os dados clínicos, demográficos, laboratoriais e imagenológicos coletados foram:

- Idade;
- Sexo;
- Etnia;
- Resultados de angiografias;
- História de eventos coronários prévios;

- História de hipertensão;
- História de diabetes mellitus;
- Grau de gravidade da angina;
- Condição de fumante presente ou ausente;
- Peso;
- Altura;
- Glicose sérica em jejum;
- Valor sérico de colesterol total, HDL, LDL;
- Valor sérico de triglicerídeos;
- Cateterismo cardíaco;
- Alocação para grupo de tratamento;
- DNA genômico.

3.1.10. Extração do DNA

O DNA foi extraído de sangue colhido com EDTA. O experimento foi realizado segundo o protocolo descrito abaixo.

Oito (8) ml de sangue foram transferidos para um tubo de 50ml e o volume completado para 30ml com tampão A (1mM NH_4HCO_3 + 144mM NH_4Cl). A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e deixada a 4°C por 10 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima. O sedimento leucocitário foi finalmente ressuspenso em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8 + 400 mM NaCl +

2 mM Na₂EDTA pH 8) + 200 µl de SDS 10% + 500 µl de tampão C (50 µl de SDS 10% + 2µl de Na₂EDTA 0,5 M pH 8 + 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 µl de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e deixado a 37 °C por aproximadamente 12-18 horas.

A segunda parte do protocolo começa com a adição de 1 mL de solução D (NaCl 6 M), vigorosamente agitada em vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugada a 4 °C por 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL e a ele foi adicionado 10 mL de etanol absoluto gelado. Com uma leve agitação já se nota a precipitação do DNA que pode ser “pescado” e transferido para um eppendorf de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O eppendorf foi então centrifugado a 4 °C por 15 minutos a 13500 rpm, o etanol descartado e o sedimento (DNA) deixado a temperatura ambiente até ser totalmente seco.

Em seguida, este pellet é ressuspenso em 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8).

Após a completa diluição, a determinação da concentração do DNA foi realizada diluindo-se 20 µl do material em 980 µl de TE e em seguida a mistura foi submetida à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A concentração final foi corrigida para 100 ng/µl.

3.1.11. Determinação do genótipo do polimorfismo C242T do gene CYBA

Após extração de DNA genômico, os genótipos do polimorfismo C242T do gene CYBA foram determinados através de análise de restrição alelo-específica, como previamente descrito na literatura.

Resumidamente, o genótipo do polimorfismo C242T foi determinado através da avaliação do nucleotídeo C ou T na posição 242 da seqüência codificante do gene CYBA através de reação de polimerase em cadeia seguida de reação de digestão por endonuclease de restrição utilizando oligonucleotídeos específicos flanqueando a seqüência polimórfica. A reação de polimerase em cadeia foi realizada após etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos caracterizados pelas seguintes temperaturas: 95°C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos utilizou-se 7 minutos de extensão a 72°C. Após amplificação digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição *RsaI* foi realizada no material amplificado. O genótipo na posição C242T foi identificado através da observação de padrão de digestão específico para cada genótipo em gel de agarose na concentração de 2.5%, corado em brometo de etídio na concentração de 50µg/mL.

3.1.12. Análise estatística

Pacientes foram divididos de acordo com a presença ou não do alelo 242T em dois grupos: indivíduos com o genótipo CT ou TT e indivíduos com o genótipo CC. Os dados são apresentados na seção resultados como médias \pm desvio padrão para variáveis contínuas e como frequências para variáveis categóricas. Diferenças entre os grupos genotípicos com relação às características ao início do estudo foram analisadas através do uso do teste t de Student para variáveis contínuas e através do teste do Qui-quadrado para variáveis categóricas. Curvas de sobrevida livre de eventos foram calculadas através do método de Kaplan-Meier e diferenças entre as curvas foram avaliadas através da estatística de log-rank. No presente estudo nós acessamos a relação entre as variáveis de risco e os desfechos de mortalidade total, infarto agudo do miocárdio incidente, acidente vascular cerebral incidente e angina refratária levando a novo procedimento de revascularização através de modelo de sobrevida proporcional de Cox. Razão de chance (OR) e risco relativo (RR) com intervalos de confiança de 95% foram as medidas de associação de risco escolhidas para descrição dos resultados. As análises estatísticas apresentadas nesta seção foram realizadas com o auxílio estatístico dos programas StatView para Windows, versão 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, EUA) e SPSS versão 13.0.

3.1.13. Considerações sobre o poder estatístico da abordagem proposta para o objetivo 1

Calculamos o poder estatístico do teste de associação proposto no objetivo 1 analisando a possível ausência de associação entre a incidência de eventos cardiovasculares na população testada e genótipos do polimorfismo C242T do gene CYBA.

De acordo com a frequência de eventos cardiovasculares observada no estudo MASS II e o tempo de acompanhamento realizado (5 anos), as frequências genótípicas observadas na população brasileira e o número de pacientes incluídos no estudo, pudemos antecipar um poder estatístico de 0.8 para demonstrar um aumento no risco de até 36% na predição de eventos cardiovasculares combinados ou um aumento no risco de até 37% na predição de mortalidade. Isso significa que o estudo proposto tem até 80% de chance de observar uma diferença estatisticamente significativa se o genótipo estudado conferir uma diferença relativa igual ou maior do que 37% na chance de um indivíduo morrer durante o período de 5 anos de seguimento.

3.1.14. Estudo de confirmação do objetivo 1

3.1.14.1. Pacientes selecionados

Com o objetivo de confirmar nosso achado inicial, realizamos estudo semelhante testando a mesma hipótese em uma nova população de indivíduos portadores de doença coronária estável e seguidos prospectivamente no Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

A população selecionada para esta fase do projeto consistiu de 359 pacientes que foram submetidos a procedimento de revascularização coronária percutânea por angioplastia no Serviço de Hemodinâmica do Instituto do Coração no período de Outubro de 1998 a Dezembro de 2005. Pacientes foram selecionados antes do procedimento e eram critérios de inclusão o diagnóstico de doença arterial coronária obstrutiva estável com indicação de revascularização coronária percutânea. Eram critérios de exclusão: presença de síndrome coronária aguda há menos de 6 meses e história prévia de valvopatia.

À inclusão, pacientes responderam a questionário clínico envolvendo questões referentes a história médica prévia, antecedentes familiares de DAC, sedentarismo, tabagismo, hipertensão, obesidade, dislipidemia, diabetes e uso atual de medicações. Durante a entrevista, medidas antropométricas foram realizadas (peso e altura). Uma amostra de sangue foi obtida durante realização do cateterismo para a realização de medidas

bioquímicas e extração de DNA genômico. Todos os pacientes leram e assinaram termo de consentimento esclarecido previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Os pacientes selecionados para este estudo foram seguidos prospectivamente através de consultas médicas periódicas no ambulatório do Serviço de Hemodinâmica e/ou contato telefônico regular.

Para a presente análise optou-se por utilizar a mortalidade como desfecho principal uma vez que a identificação de IAM incidente poderia no caso deste protocolo estar sujeita a viés de identificação.

3.2. Objetivo 2

3.2.1. Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação e estrutura haplotípica do locus do gene da p22phox (CYBA)

Para obtenção dos parâmetros acima citados foram utilizadas informações genóticas derivadas do Projeto HapMap (www.hapmap.org). A informação genotípica utilizada na determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação do *locus* do gene CYBA foi obtida do HapMap Data release #20/phase II, janeiro 2006, NCBI B35 assembly, dbSNP b125. Informações sobre a fase haplotípica do *locus* do gene CYBA foi obtida do HapMap Data release #19/phase II, Oct05, do NCBI B34 assembly, dbSNP b124. Foram utilizadas informações de todas as 4 populações estudadas no

projeto HapMap (Yorubas de Ibadan , Nigéria, Japoneses de Tóquio, Japão, Chineses Han de Pequim, China e residentes de Utah de ascendência do Norte e Oeste Europeu). Para a determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação as informações de indivíduos japoneses e chineses foram agrupadas (uma vez que o padrão de Desequilíbrio de Ligação para estes dois grupos era muito semelhante no *locus* estudado). Tanto as regiões de desequilíbrio de ligação, quanto os haplótipos foram definidos tomando-se como ponto central a região genômica do polimorfismo C242T (utilizamos 50kbp de cada lado genômico do *locus* polimórfico). Utilizou-se o programa Hapviewer, versão 3.32 para a determinação gráfica da estrutura de Desequilíbrio de Ligação local.

Para a determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação em indivíduos da população brasileira, ensaios de genotipagem foram desenvolvidos para mais 6 marcadores localizados nos genes da p22phox, IL17C, MVD e NHN1. Os marcadores selecionados foram: rs2291160, rs2254073, rs11076688, rs7195830, rs8854 e rs4782395. A metodologia utilizada para a realização das genotipagens foi a mesma descrita em 3.1.11. Na tabela a seguir apresentamos primers e endonucleases de restrição utilizados em cada um dos ensaios de genotipagem desenvolvidos.

Tabela 1 . Ensaios de genotipagem desenvolvidos para determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação

Marcador	Primers	Endonuclease de restrição
rs2291160	5' GGAGGTCACCCCTTCCAC 3' 5' TGCTGGAGCTCTTGGACTG 3'	<i>Sml</i> I
rs2254073	5' CACGAGAGGCCCTCATCTAC 3' 5' GTGGCCACGCCCACTTGACAGGTGAGAACG 3'	<i>Hae</i> III
rs11076688	5' ACAGGGTAGGGCCAGAGACT 3' 5' CAGCACCAGCAGGCTCTGGAGCAGCCGCTC 3'	<i>Dde</i> I
rs7195830	5' CAGAGGCTCACGCGCTCCCGGCTTCGCTGA 3' 5' AGATCGGAGGCACCATCA 3'	<i>Dde</i> I
rs8854	5' GTGGCCTCGCCGGAGCTAGGGAGCGGATCT 3' 5' CTTAGGGCAGCTGAAGCACT 3'	<i>Mae</i> I
rs4782395	5' AGGCAGGAGAATTGCTTGAA 3' 5' AGCCAGAAAGGCTATCCTCCTCTACTGA 3'	<i>Dde</i> I

3.2.2. População proveniente do estudo MONICA-Vitória

A população de Vitória/ES – Brasil é uma população urbana proveniente do projeto WHO-MONICA (World Health Organization–Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) este estudo iniciou-se em 1980, estendendo-se durante 10 anos, resultado de um estudo multicêntrico (32 centros) realizado em 21 países no mundo com o objetivo de monitorar e relatar os fatores de riscos associados a doenças cardiovasculares. Em Vitória, adotou-se um método de estudo sem a monitoração dos indivíduos durante o estudo (*cross sectional*) com um número amostral de 2044 participantes entre 25 a 64 anos de idade, que

estão localizados no centro urbano de Vitória/ES. A participação destes indivíduos foi voluntária, após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, inclusive para a coleta de material genético (Pereira, Mota et al. 2003). Esses participantes foram selecionados de forma randomizada, por domicílio, seguido da escolha pela data de nascimento. Foram realizadas avaliações clínicas, no que diz respeito a pressão sanguínea, obesidade e exames bioquímicos laboratoriais de rotina. Os indivíduos foram classificados de acordo com a característica fenotípica da raça (descendentes africanos, brancos e mulatos) seguindo critérios de classificação racial como: textura do cabelo, cor da pele e aspecto da face (Pereira, Mota et al. 2001).

Através da realização das genotipagens proposta nesta amostra, objetivou-se identificar possíveis associações entre os genótipos definidos e a presença de fatores de risco cardiovascular: hipertensão, diabetes, obesidade e dislipidemia.

3.2.3. População utilizada para verificar associações com o grau de acometimento aterosclerótico coronário

A amostra desta população foi selecionada entre os pacientes submetidos a avaliação cineangiocoronariográfica com propósito diagnóstico de DAC no serviço de hemodinâmica do Instituto do Coração (InCor), estudados através da técnica descrita em 1959 por Sones (Sones 1962). Os critérios de inclusão foram: pacientes com insuficiência coronária

demonstrada por provas não invasivas prévias e/ou clínica sugestiva de angina estável ou instável assintomático nas últimas 48 horas. Os critérios de exclusão foram: pacientes submetidos a cateterismo para avaliação de procedimentos invasivos prévios (angioplastia, *stent*, cirurgia), paciente com infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca classe funcional III-IV, disfunção hepática, disfunção tireóidea ou adrenal, hipercolesterolemia familiar, pacientes com transplante cardíaco ou renal, pacientes em tratamento com antivirais, e pacientes com doenças inflamatórias crônicas tais como artrite e lúpus.

Antes do cateterismo os pacientes foram submetidos a questionário de perguntas referentes a história médica pessoal, antecedentes familiares de DAC, sedentarismo, fumo, hipertensão, obesidade, dislipidemia e tratamento atual e presença de condições comórbidas relevantes (insuficiência renal crônica, valvulopatias, hipotireoidismo). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento antes da realização do estudo hemodinâmico.

Durante a entrevista foram coletadas medidas antropométricas (peso e altura) e a amostra de sangue foi obtida durante estudo hemodinâmico.

Como objetivo de identificar os resultados quanto ao grau de lesões, utilizou-se uma classificação de 6 graus descrita abaixo:

- 1 - Cateterismo com coronárias normais ou sem lesões.
- 2 - Irregularidades parietais difusas.
- 3 - Lesões não obstrutivas; menores de 50%.

- 4 - Lesões obstrutivas; entre 50 e 70%.
- 5 - Lesões obstrutivas; entre 70 e 90%.
- 6 - Lesões obstrutivas entre 90 e 100%.

Vinte segmentos coronários foram examinados para criação do escore. Vasos epicárdicos ou ramos principais foram divididos em três segmentos (proximal, medial e distal) exceto ramos secundários da coronária direita que foram divididos somente em porção proximal e distal. Ainda, um escore adicional foi criado para estimar a extensão e severidade da doença. Para determinação do escore de extensão analisou-se em cada segmento a presença de obstrução vascular acima de 50% do lúmen. Utilizando-se este escore foi definido o número total de regiões acometidas.

O processo de seleção ocorreu durante o período de abril de 2000 a abril de 2004. Durante este período foram incluídos neste protocolo 871 pacientes que preenchem os critérios de inclusão acima citados (Lanz, Pereira et al. 2005).

3.2.4. Ensaios de quantificação de expressão gênica em veias safenas humanas

3.2.4.1. Obtenção e cultura das veias safenas humanas

Veias safenas humanas foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio no Instituto do Coração, HC-

FMUSP. Durante o procedimento cirúrgico, foram retirados segmentos da veia não utilizada. Os segmentos venosos foram então cultivados no sistema de cultura *ex vivo*, conforme padronizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração, HC-FMUSP. Este sistema permite o controle da pressão e do fluxo de maneira independente e com isto possibilita mimetizar as condições venosas e arteriais (Figura 1). A veia safena humana foi cultivada por 24 horas em regime venoso (fluxo: 5 mL/min). Este procedimento específico dentro da tese apresentada foi aprovado pela Comissão de Ética do HC-FMUSP (SDC – 1834/01/22, CAPPesq – 299/01).

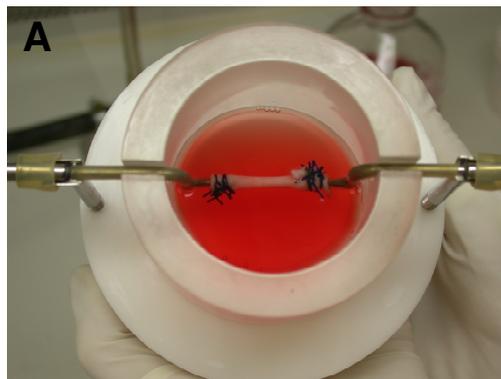
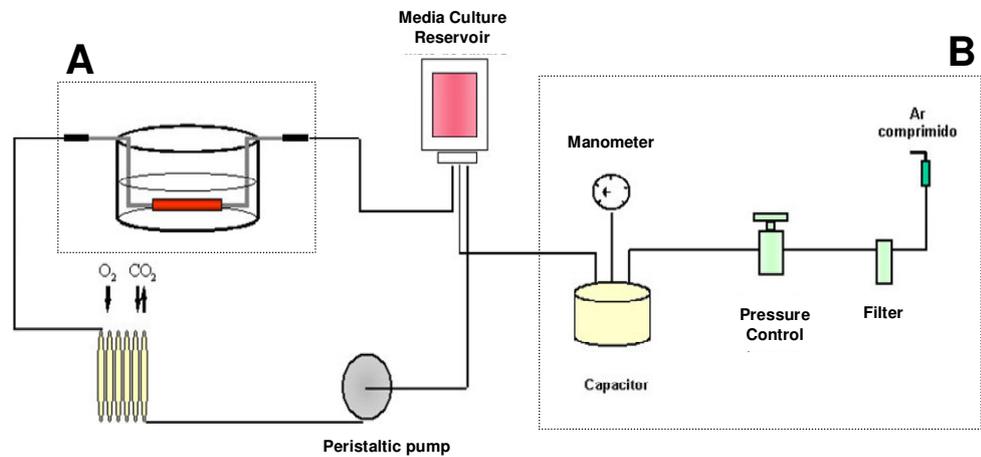


Figura 1. Representação do sistema *ex vivo* de cultura de vaso. A veia safena é colocada na cuba de cultivo (A) e um sistema de bomba peristáltica ajustável faz com que o meio de cultura circule no sistema em velocidade

controlada. Em (B) está representado o sistema de ajuste de pressão que possibilita o controle de fluxo e pressão de maneira independente.

3.2.4.2. Extração de RNA

Após 24 horas em cultura sob regime venoso procedemos à extração de RNA das veias estudadas. Para isolar o RNA total de veias safenas, as amostras foram homogeneizadas em Trizol® Reagent. A partir desta etapa, segue-se o protocolo de extração de RNA, conforme instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com 10 U de deoxiribonuclease (RNase)-free por 1 hora a 37°C. Após o tratamento, foi realizada uma extração com igual volume de mistura contendo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, seguida por precipitação com 0,2 M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração das amostras de RNA total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm. A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 45 minutos. O Trizol® Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotilcianato corresponde a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987; Chomczynski and Sacchi 2006).

3.2.4.3. Reação de Transcriptase Reversa (RT)

Para a síntese do cDNA foram utilizados 5 µg de RNA total, extraído de amostras de veias safenas utilizadas nos ensaios. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65°C por 5 minutos, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, 3U de RNAsin e 2,5U de transcriptase reversa (AMV-RT). Após incubação por 1 hora a 37°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo para denaturação de híbridos RNA-cDNA formados e inativação da enzima utilizada na reação. Em alguns tubos, a transcriptase reversa não foi adicionada, a fim de se controlar a contaminação ou amplificação de DNA genômico. O cDNA obtido foi estocado a -20°C até que seja realizada a reação de PCR.

3.2.4.4. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo-real

O cDNA, obtido na etapa anterior, foi utilizado como molde nas reações de PCR. Para estes experimentos, foram sintetizados primers específicos para os genes da p22phox, IL6, IL8, IL1B, IL1R, IL1RA, TNF-alfa, BMP-2 e CSF3, CXCL3 E CXCL10 (Tabela). Para evitar a amplificação inespecífica, os primers sintetizados são posicionados em diferentes exons.

Desta forma, é possível distinguir, por tamanho, os produtos de PCR derivados da amplificação do cDNA dos derivados da contaminação de DNA genômico.

Tabela 2. Primers utilizados nos ensaios de quantificação da expressão gênica através da técnica de PCR em tempo-real

Gene		
IL1b	F	5' TCT GTA CCT GTC CTG CGT GTT G 3'
	R	5' TTC TTT GGG TAA TTT TTG GGA TCT 3'
CXCL10	F	5' GTC CAC GTG TTG AGA TCA TTG C 3'
	R	5' TCT TGA TGG CCT TCG ATT CTG 3'
IL-8	F	5' AGC TGG CCG TGG CTC TCT 3'
	R	5' TTA GCA CTC CTT GGC AAA ACT G 3'
BMP2	F	5' GCC AGC CGA GCC AAC AC 3'
	R	5' GGT TGT TTT CCC ACT CGT TTC T 3'
IL1-Ra	F	5' GAC CTT CTA TCT GAG GAA CAA CCA A 3'
	R	5' CAT GAG GCT CAA TGG GTA CCA 3'
IL-6	F	5' TGG CAG AAA ACA ACC TGA ACC T 3'
	R	5' GGC AAG TCT CCT CAT TGA ATC C 3'
CXCL-3	F	5' CAT CCC CCA TGG TTC AGA AA 3'
	R	5' AAG TGT CAA TGA TAC GCT GAT AAG CT 3'
CSF3	F	5' CTG GAC GTC GCC GAC TTT 3'
	R	5' CCA TTC CCA GTT CTT CCA TCT G 3'
28S	F	5' TCA TCA GAC CCC AGA AAA GG 3'
	R	5' GAT TCG GCA GGT GAG TTG TT 3'
TNF-A	F	5' AGG CGG TGC TTG TTC CTC A 3'
	R	5' GTT CGA GAA GAT GAT CTG ACT GCC
IL1R1	F	5' ACT CAA CTG GCC GGT GAC A 3'
	R	5' ACT CAA CTG GCC GGT GAC A 3'

Após a reação de PCR, 10 µL de cada amostra, correspondente às amostras de veias safenas estudadas, foram submetidas a eletroforese em

gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular.

Após a transcrição reversa, 1 μ L do cDNA foi utilizado nas reações de PCR contendo os pares de primers. Para a amplificação, foram utilizados 25 pmoles do primer, 1,25 mM de dNTP, 50mM de KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris-Cl (pH 9,0), 0.1% de Triton X-100 e 2,5 U de Taq DNA Polimerase, em um volume total de 50 μ L de reação. Para a amplificação do 28S (normalizador adotado) foram utilizadas as mesmas condições experimentais descritas anteriormente, a exceção dos pares de primers adequados. O programa utilizado consiste na denaturação das fitas de DNA, anelamento dos primers e extensão das cadeias pela DNA polimerase. Todas as etapas de amplificação possuíram duração de 1 minuto, sendo o último ciclo seguido por uma nova extensão a 72°C por 10 minutos.

Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos para cada reação. Nestes tubos, foi adicionada água ao invés de cDNA.

Após a reação de PCR, 10 μ L de cada amostra foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular.

3.2.4.5. Análise da expressão gênica relativa utilizando PCR quantitativo por tempo-real

A transcrição reversa combinada com a reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) é um método sensível para a quantificação da expressão gênica. A tecnologia de PCR em tempo-real foi adaptada para a realização de RT-PCR quantitativo com sensibilidade ainda maior, sendo atualmente o método mais sensível para a quantificação de expressão gênica (Heid, Stevens et al. 1996). Existem basicamente dois métodos diferentes para avaliar-se a expressão gênica através dessa tecnologia: quantificação absoluta e relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias do transcrito de interesse, geralmente através do relacionamento do sinal de PCR a uma curva padrão previamente determinada. A quantificação relativa descreve a mudança na expressão gênica do gene de interesse relativa a um grupo de referência como um grupo controle não tratado ou uma amostra no tempo zero de um experimento de curso temporal (Livak and Schmittgen 2001). Nos experimentos apresentados neste trabalho utilizamos a quantificação da expressão gênica dos genes testados utilizando a técnica de PCR em tempo-real e metodologia analítica de quantificação relativa de expressão gênica.

Nos experimentos de quantificação de expressão gênica realizados neste trabalho utilizamos diversas abordagens para a representação gráfica dos resultados obtidos, assim como para a realização de inferência estatística sobre hipóteses testadas.

Um dos métodos utilizado foi o $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak e Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001). Neste método a normalização com uma referência exógena fornece um método para a correção dos resultados para diferentes quantidades de RNA nas reações. Desta forma utilizamos dados normalizados pelo marcador 28S e a comparação entre as expressões gênicas relativas entre grupo de veias safenas de indivíduos com o genótipo CC e veias safenas de grupo de indivíduos com os genótipos CT ou TT. Este método assume uma eficiência de 100% da reação de PCR e utiliza um único gene de referência para a normalização (no presente trabalho 28S).

Outra alternativa aqui utilizada para analisar os dados obtidos dos experimentos de PCR em tempo-real foi através da utilização da comparação dos valores de ΔCt obtidos de veias safenas de indivíduos com o genótipo CC com os valores obtidos de veias safenas de grupo de indivíduos com os genótipos CT ou TT. As médias dos dois grupos foram comparadas através do teste t de Student como proposto por Yuan JS et al (Yuan, Reed et al. 2006).

Finalmente utilizamos a abordagem proposta por Hellemans J et al., uma modificação do método delta-delta-Ct que utiliza múltiplos genes de referência como normalizadores (aqui utilizamos 28S, GAPDH e Ciclofilina), para uma análise descritiva do aumento relativo de expressão gênica ao compararmos os grupos de vasos de indivíduos com o genótipo CC com os vasos de indivíduos com os genótipos CT e TT (Hellemans, Mortier et al. 2007).

3.3. Objetivo 3

Para o desenvolvimento do objetivo 3 foi utilizado o banco de dados do projeto MASS II já descrito no objetivo 1.

Os modelos de regressão logística descritos nesta etapa do trabalho foram construídos através da utilização do programa de estatística SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os modelos foram derivados através da utilização de variáveis demográficas, clínicas, bioquímicas e genéticas como preditores independentes. Foi utilizada como variável dependente a presença de óbito ou IAM incidente no período de 5 anos de seguimento do estudo MASS II.

Com o objetivo de diminuir a probabilidade de perda de incorporação de variáveis independentes importantes o p valor foi fixado em 0,10 para a entrada de variáveis no modelo. O modelo final foi definido através da utilização de algoritmo step-wise do tipo forward (baseado em verossimilhança) e estimado através do X^2 -Wald e da mudança $-2\log$ da verossimilhança em cada passo. O p valor foi fixado em 0,05 como critério para seleção de variáveis independentes.

Após definição do melhor modelo, estimativas individuais de risco foram algebricamente calculadas para cada participante do estudo.

A representação gráfica da acurácia de cada um dos diferentes modelos propostos foi observada através da construção de curvas ROC e análise descritiva de suas respectivas áreas sob a curva (AUC).

Árvores de classificação foram também utilizadas como técnicas de classificação com o objetivo de discriminar a população estudada em diferentes estratos de risco para a ocorrência do evento (morte + IAM incidente).

O procedimento de construção de árvores de classificação gera um modelo de classificação semelhante a uma árvore através da classificação de casos em grupos (ou valores preditos) de uma variável dependente. Este tipo de procedimento pode ser utilizado como uma forma eficiente de estratificação (através da classificação de indivíduos em alto- médio e baixo-risco, por exemplo) ou de predição (através da criação de regras que podem então ser utilizadas na predição de ocorrência de eventos).

As árvores de classificação foram geradas com a utilização do programa estatístico SPSS 13.0. O método de crescimento utilizado foi o método de CHAID (Chi-squared Automatic Interaction Detection). Neste algoritmo, em cada passo o procedimento escolhe qual a variável independente que tem maior interação com a variável dependente. Categorias para cada variável independente são mescladas se estas não são significativamente associadas à variável dependente.

4 . Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Objetivo 1

Investigar a associação entre o polimorfismo C242T no gene codificador da subunidade p22phox da NADPH oxidase humana e eventos cardiovasculares em pacientes portadores de doença arterial coronária multiarterial após 5 anos de seguimento.

4.1.1. Características clínicas de entrada de acordo com o genótipo C242T do gene p22phox

Como estratégia analítica inicial optou-se por estudar descritivamente a distribuição de variáveis clínicas e demográficas dos pacientes estudados no

momento de entrada no estudo MASS II. O genótipo C242T do gene codificador da p22phox foi realizado em 558 pacientes.

As frequências genóticas encontradas foram de 44,4% para o genótipo CC, 40,9% para o genótipo CT e 14,7% para o genótipo TT. Tal frequência de distribuição genotípica encontra-se de acordo com a predita pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Devido ao pequeno número relativo de indivíduos portadores do genótipo TT, optamos por agrupá-los com os indivíduos portadores do genótipo CT, permitindo uma comparação entre indivíduos portadores do alelo T contra os não-portadores. Na tabela a seguir encontra-se a distribuição de fatores de risco cardiovascular no momento de início de seguimento de acordo com a presença ou não do alelo T.

Tabela 3. Características clínicas e demográficas de acordo com a presença ou não do alelo T

	CC	CT + TT	p valor
Número	248	310	
Idade, anos	59.7 (9.0)	59.6 (9.3)	0.89
Sexo masculino, %	64.1	71.6	0.07
Tabagismo atual, %	32.7	33.2	0.93
Hipertensão, %	56.9	60.3	0.44
Glicemia, mg/dL	129.1 (57.8)	128.1 (56.3)	0.84
Colesterol total, mg/dL	222.5 (46.5)	223.1 (49.3)	0.88
LDL colesterol, mg/dL	146.7 (41.6)	147.3 (45.4)	0.88
HDL colesterol, mg/dL	36.7 (9.1)	37.9 (11.5)	0.19
Triglicérides, mg/dL	191.9 (117.6)	192.4 (114.6)	0.96
Tratamento inicial			
Médico, %	28.2	36.1	
ATC, %	36.3	31.3	0.13
RM, %	35.5	32.6	
Tempo médio de seguimento, meses	56.5 (12.5)	54.3 (14.4)	0.06

Esta análise revelou não haver nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição dos fatores de risco estudados e a presença do alelo 242T. O tempo médio de seguimento também não foi diferente entre os grupos estudados.

4.1.2. Desfechos cardiovasculares e o genótipo C242T do gene p22phox

Uma vez não identificada qualquer diferença importante na distribuição do perfil de risco dos grupos estudados no momento de início do estudo,

realizamos a análise univariada dos desfechos cardiovasculares após 5 anos de acordo com os grupos genotípicos definidos pelo polimorfismo C242T da gene p22phox:

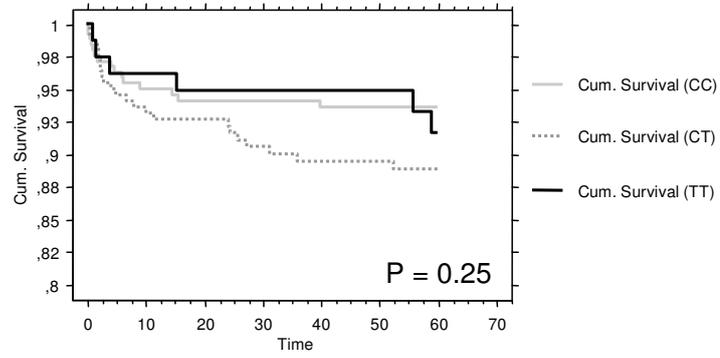
Tabela 4. Incidência de desfechos cardiovasculares após 5 anos de seguimento de acordo com genótipo C242T

Desfecho	CC	CT	TT	P valor
Infarto do Miocárdio	6,1 (15)	10,1 (23)	7,3 (6)	0,26
Acidente Vascular Cerebral	3,6 (9)	4,8 (11)	2,4 (2)	0,59
Necessidade de nova revascularização	17,0 (42)	17,5 (40)	15,9 (13)	0,94
Óbito	9,3 (23)	18,9 (43)	14,6 (12)	0,01

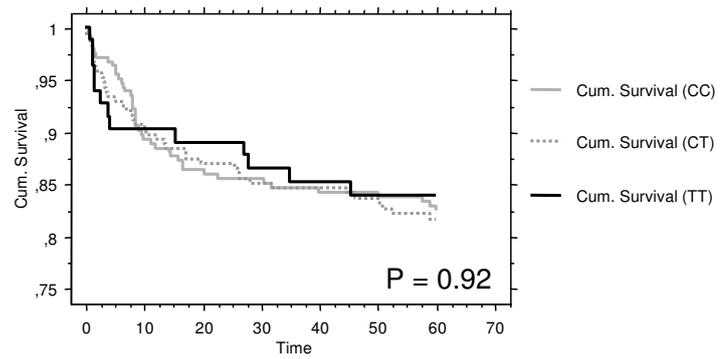
A análise univariada (sem levar em conta o tempo de seguimento ou ajustes por covariáveis) mostrou uma diferença estatisticamente significativa em relação à mortalidade geral associada à presença do alelo 242T do polimorfismo estudado. A seguir, passamos a explorar a possibilidade de que diferenças no tempo médio de seguimento pudessem interferir nas variáveis em questão. Para tal, construímos curvas de Kaplan-Meier comparando os desfechos cardiovasculares principais de acordo com o grupo genotípico. A comparação entre as curvas foi realizada através do teste de log-rank.

A figura a seguir mostra as incidências de infarto do miocárdio, necessidade de nova revascularização e óbito de acordo com os genótipos estudados. Não calculamos as curvas para acidente vascular cerebral em virtude do pequeno número de eventos.

A.



B.



C.

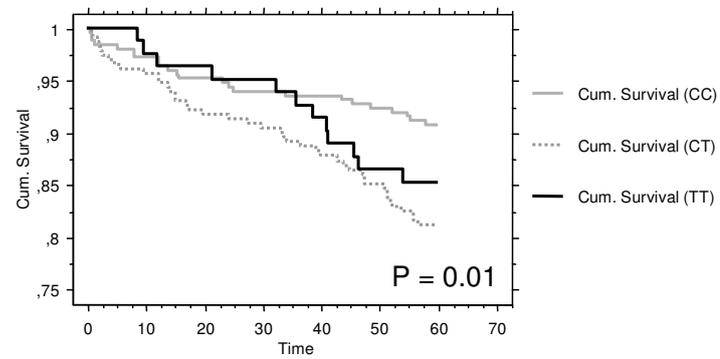


Figura 2: Incidência de eventos cardiovasculares de acordo com genótipo C242T do gene p22phox. A. Infarto agudo do miocárdio; B. Novo procedimento de revascularização; C. Óbito.

Interessante notar que para o desfecho mortalidade um aumento significativo na incidência de óbito foi verificado em indivíduos portadores do alelo 242T do gene da p22phox. Após a construção de um desfecho combinado para óbito e infarto do miocárdio incidente, verificamos o seguinte resultado:

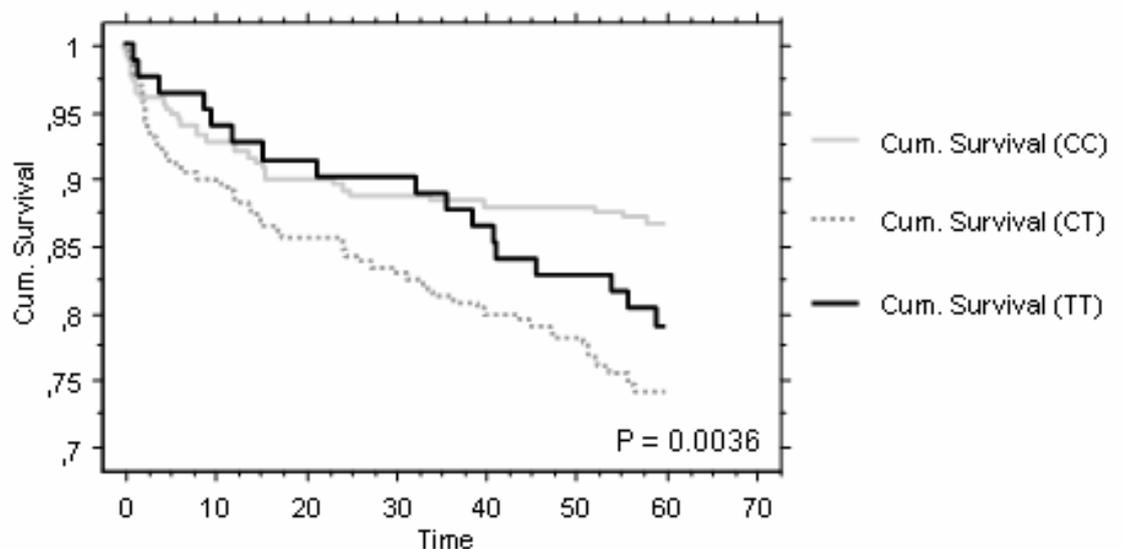


Figura 3: Incidência de mortalidade geral e/ou infarto agudo do miocárdio em relação ao genótipo C242T do gene da p22phox.

Claramente ao estudarmos a incidência deste desfecho combinado (óbito + infarto do miocárdio incidente) acrescentamos acurácia ao modelo inicial, conseguindo agora separar os pacientes em duas populações de risco de eventos incidentes distintos: aqueles indivíduos portadores do alelo 242T e os indivíduos não portadores do alelo 242T (genótipo CC). Vale notar que neste caso em particular, a associação dos eventos IAM incidente e óbito geral (126 eventos, sendo 45 IAM incidentes e 81 óbitos) torna-se interessante uma vez que a maioria dos pacientes com IAM incidente nesta população não faleceu durante o período de 5 anos (entre os 45 indivíduos que apresentaram infarto incidente, 14 vieram a falecer durante o período de seguimento, 31%).

Na figura a seguir, agrupamos os indivíduos com os genótipos CT e TT a fim de melhor ilustrar este modelo.

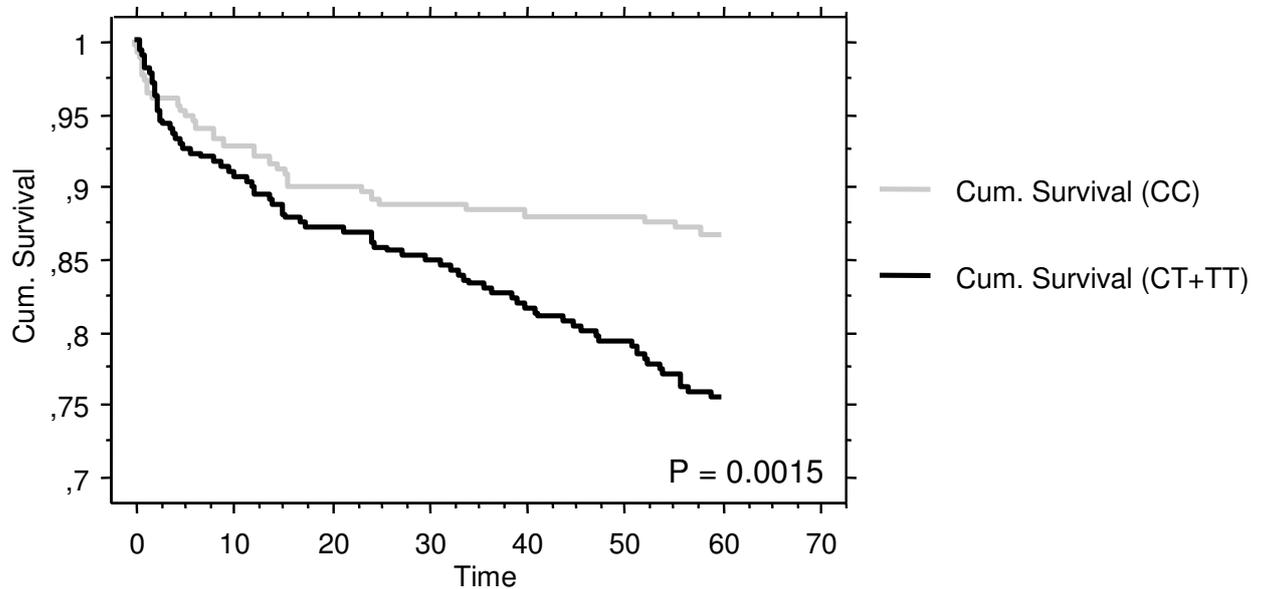


Figura 4: Incidência de mortalidade geral e/ou infarto agudo do miocárdio incidente em relação ao genótipo C242T do gene da p22phox (separado em dois grupos genotípicos).

A análise de regressão não-ajustada para outros fatores de risco mostra um risco 1.9 vezes maior de óbito ou IAM (desfecho combinado) para os indivíduos portadores do alelo 242T em relação aos indivíduos não-portadores deste alelo após 5 anos (IC 95% 1.27 – 2.89).

A seguir, procuramos realizar a análise multivariada, explorando o efeito do polimorfismo C242T e dos outros fatores de risco para os

desfechos estudados. Esta etapa é importante não apenas por proporcionar informação sobre a independência ou não do marcador genético, mas também por permitir contextualizar o efeito do polimorfismo frente a outros fatores de risco cardiovascular utilizados na prática clínica.

Optamos por trabalhar com o *odds ratio* (razão de chances) como medida de associação básica. A inferência das razões de chance para cada variável no modelo foi realizada através de modelo de riscos proporcionais de Cox, que tem como vantagem, assim como as análises apresentadas através das curvas de Kaplan-Meier, levar em consideração diferentes tempos de seguimento ou tempo até o desfecho em questão.

A seguir, apresentamos tabela contendo as medidas de associação e os valores dos testes de hipótese para um modelo “forçado” contendo todas as variáveis preditoras estudadas. Utilizamos a partir deste momento o desfecho combinado de óbito + IAM incidente e uma divisão binária dos grupos genotípicos (indivíduos portadores ou não do alelo 242T do gene da p22phox).

Tabela 5. Modelo de riscos proporcionais de Cox para desfecho combinado (óbito + IAM)

	OR	IC 95%		p valor
Polimorfismo C242T p22phox	1.89	1.22	2.94	0.0047
Idade, anos	1.04	1.02	1.07	0.0012
Tratamento recebido	0.78	0.48	1.27	0.58
IAM prévio	2.29	1.51	3.46	<0.0001
Hipertensão	1.61	1.03	2.52	0.369
Triglicérides	1.01	1.00	1.01	0.0282
LDL-Colesterol	1.01	0.99	1.01	0.3253
HDL-Colesterol	1.01	0.98	1.03	0.7270
Carga aterosclerótica	0.82	0.53	1.25	0.3496
IMC	0.98	0.93	1.04	0.5454
Sexo	0.84	0.53	1.35	0.4777
Diabetes	1.45	0.96	2.18	0.08
Tabagismo	1.48	0.96	2.28	0.07

IMC - índice de massa corpórea

Carga aterosclerótica foi definida através do número de vasos acometidos

Esta análise revela que o genótipo C242T do gene da p22phox persiste significativamente associado a uma chance maior do desfecho combinado, mesmo após ajuste para outras variáveis. Outro dado interessante proveniente desta análise é a não observação de alteração significativa da medida de associação utilizada em relação à encontrada na análise univariada. Isto sugere a ausência de interação importante entre o

mecanismo de ação do polimorfismo estudado com os outros fatores de risco ajustados no modelo.

4.1.3. Estudo de confirmação da associação encontrada em população independente

É muito comum na literatura de estudos de associação genéticos de um determinado marcador a ocorrência de resultados discordantes em relação às associações inicialmente descritas. Múltiplas são as razões para tal fato: o pequeno poder estatístico dos trabalhos, as diferenças nas populações estudadas, a estrutura populacional no *locus* estudado, as diferentes formas de determinação do desfecho em estudo, ou mesmo o erro tipo I, ou seja, a ocorrência de um resultado falso-positivo decorrente da realização de múltiplos testes em diferentes polimorfismos.

Assim, com o objetivo de confirmar nosso achado inicial, realizamos um estudo semelhante testando a mesma hipótese em uma nova população de indivíduos portadores de doença arterial coronária estável, em seguimento clínico no Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

4.1.4. Dados descritivos da amostra utilizada em estudo confirmatório

A amostra utilizada no estudo confirmatório foi composta de 339 indivíduos atendidos no Serviço de Hemodinâmica do Instituto do Coração –

HC-FMUSP. Os indivíduos pertencentes a esta amostra eram indivíduos portadores de doença coronária estável que foram submetidos a procedimento de angioplastia coronária para tratamento de insuficiência coronária. O momento da angioplastia foi considerado o início do seguimento do estudo. A tabela a seguir traz os dados descritivos da população em questão no momento de inclusão do estudo:

Tabela 6. Características Clínicas e demográficas da população estudada na fase confirmatória:

Número de indivíduos	339
Sexo masculino, %	64,3
Idade, anos	60,1 (10,4)
Raça, %	
Branca	67,6
Parda	27,7
Negra	2,7
Oriental	2,1
Diabetes, %	32,6
Hipertensão, %	73,5
Dislipidemia, %	65,5
Tabagismo atual, %	14,3
Antecedente Familiar de DAC precoce, %	18,3
IAM prévio, %	35,7
Insuficiência Cardíaca Congestiva, %	16,4
Número de vasos acometidos, %	
1	66,4
2	28
3	5,7

Apesar de ser semelhante à população do estudo MASS II utilizada na primeira fase do estudo, a população deste segundo estudo apresenta algumas características que diferenciam essa amostra confirmatória. Dentre estas, destaca-se a presença de 16% de indivíduos com história de

insuficiência cardíaca congestiva (característica ausente na população do MASS II, uma vez que tratava-se de critério de exclusão do estudo); a presença de um número grande de indivíduos com lesão coronária obstrutiva uniarterial (critério de exclusão do estudo MASS II), e a presença de algumas informações adicionais não coletadas no estudo MASS II como a presença de história familiar de doença coronária precoce.

A distribuição das freqüências genóticas para a população desta amostra foi a seguinte: 45,2% de indivíduos com o genótipo CC, 44,9% de indivíduos com genótipo CT e 9,9% de indivíduos com o genótipo TT. Essa distribuição não se mostrou significativamente diferente da encontrada no estudo MASS II e anteriormente descrita.

Apresentamos abaixo a tabela contendo a distribuição dos principais fatores de risco cardiovascular no momento da inclusão no estudo de acordo com os genótipos do polimorfismo C242T do gene p22phox.

Tabela 7. Características Clínicas e demográficas da população estudada na fase confirmatória de acordo com genótipo:

	CC	CT	TT	p valor
Sexo masculino, %	60,00	65,80	75,80	0,20
Idade, anos	61,39 (10,5)	58,78 (10,0)	60,34 (11,03)	0,09
Raça, %				
Branca	65,30	69,80	66,70	0,59
Parda	29,30	26,20	30,30	
Negra	2,00	3,40	3,00	
Oriental	3,30	0,70	0,00	
Diabetes, %	28,00	37,40	33,30	0,22
Hipertensão, %	74,00	73,50	72,70	0,99
Dislipidemia, %	62,90	74,80	71,90	0,09
Tabagismo atual, %	8,30	18,60	25,00	0,01
Antecedente Familiar de DAC precoce, %	18,20	19,30	15,60	0,89
IAM prévio, %	34,80	33,10	51,50	0,13
Insuficiência Cardíaca Congestiva, %	17,90	12,30	28,10	0,07
Número de vasos acometidos, %				
1	62,80	70,90	66,70	0,48
2	29,10	24,30	33,30	
3	8,10	4,80	0,00	

É interessante notar uma tendência a uma frequência maior de indivíduos com IAM prévio ou insuficiência cardíaca no grupo de indivíduos portadores do genótipo TT. No entanto, devemos ressaltar que o desenho do estudo de confirmação não preenche os critérios para um estudo de

prevalência, e inferências derivadas dos dados encontrados nesta fase são apenas especulativas.

4.1.5. Desfechos cardiovasculares e o genótipo C242T do gene p22phox: Resultados em amostra de confirmação

Uma vez não identificada qualquer diferença importante na distribuição do perfil de risco dos grupos estudados no momento de início do estudo, a análise univariada dos desfechos cardiovasculares principais do estudo foi conduzida. Como o protocolo de seguimento da coorte de confirmação não seguiu critérios estritos e homogêneos (uma vez que os pacientes não estavam incluídos em um protocolo de seguimento e sim eram mantidos em seu seguimento rotineiro na Instituição), o único desfecho cardiovascular que consideramos não-sujeito a viés de identificação foi o de mortalidade. Esta informação foi obtida de maneira fidedigna para 100% dos 339 indivíduos participantes desta amostra e, por conseguinte, é o desfecho cardiovascular escolhido para esta etapa do estudo.

O tempo médio de seguimento dos pacientes nesta fase do estudo foi de 1000 dias (desvio padrão de 431 dias). Durante este tempo de seguimento foram verificados apenas 13 óbitos, o que reflete a presença de uma população menos grave do que a estudada na primeira fase do estudo.

Não obstante o pequeno número de óbitos incidentes neste grupo estudado, 10 foram verificados no grupo de indivíduos portadores do alelo 242T e apenas 3 em indivíduos não portadores do alelo 242C. Desta

maneira, a presença do alelo 242T nesta população de indivíduos submetidos à angioplastia coronária para o tratamento de doença arterial coronária estável esteve associada a um risco 2,63 vezes maior de mortalidade ($p = 0,02$, IC 95% 1,17 – 5,93).

A seguir, passamos a explorar a possibilidade de que diferenças no tempo médio de seguimento possam interferir nas inferências encontradas. Para tal construímos curvas de Kaplan-Meier comparando os desfechos cardiovasculares principais de acordo com o grupo genotípico. A comparação entre as curvas foi realizada através do teste de log-rank. Neste cenário o papel do polimorfismo C242T na estratificação do risco de óbito fica ainda mais claro.

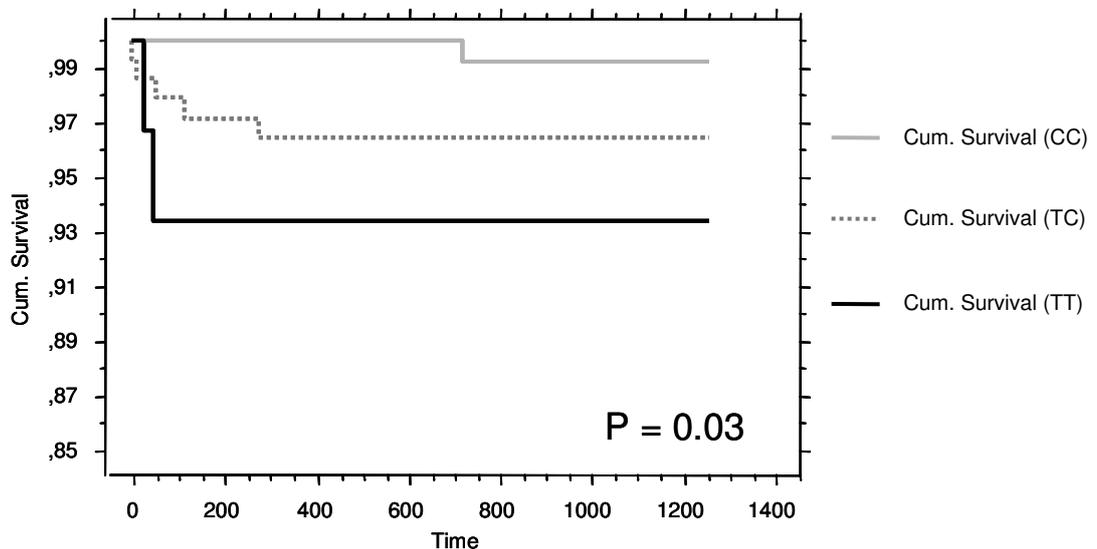


Figura 5: Curvas de Kaplan-Meier para mortalidade de acordo com genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox. Tempo expresso em dias de

seguimento após angioplastia coronária. P valor refere-se a teste de log-rank para tendência linear de efeito.

Em conclusão, após o término dos experimentos propostos para responder ao objetivo 1 formulado concluímos que a presença do alelo 242T do gene da p22pphox em indivíduos brasileiros portadores de doença arterial coronária estável está associada a um maior risco de óbito quando comparada à ausência deste alelo.

Consideramos que os resultados até aqui obtidos dão suporte à busca do objetivo 2.

4.2. Objetivo 2

Investigar o potencial mecanismo molecular de ação do polimorfismo estudado na modulação do risco cardiovascular em humanos.

4.2.1. Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação e Estrutura haplotípica do *locus* do gene da p22phox (CYBA)

Como estratégia analítica inicial desta etapa, consideramos de fundamental importância um estudo descritivo detalhado da estrutura haplotípica do *locus* do gene da p22phox (CYBA) na população em questão. A importância deste mapeamento descritivo é identificar diferenças nos padrões de desequilíbrio de ligação na região do polimorfismo C242T. Estas diferenças precisam ser detectadas uma vez que podem enviesar os resultados obtidos até o momento (por exemplo, por diferenças na estratificação étnica). Outro ganho potencial consiste em conhecer o bloco de desequilíbrio de ligação no qual se encontra o polimorfismo C242T, contendo também outros marcadores que possam ser responsáveis diretos pela associação descrita no objetivo 1.

Para este fim, utilizamos dados tornados públicos pelo projeto internacional Hapmap que, através de um mapeamento genotípico detalhado do genoma de 4 populações humanas, caracterizou a estrutura de desequilíbrio de ligação nestes grupos. Nosso objetivo foi obter os dados descritivos da estrutura realizada pelo Hapmap nos 4 grupos populacionais

estudados: caucasianos de origem européia, negros de origem africana, chineses e japoneses.

4.2.2. Localização e estrutura genômica do gene da p22phox

O gene da p22phox localiza-se no braço longo do cromossomo 16 (16q24) humano. Sua seqüência genômica estende-se por 7,76 Kbp entre os nucleotídeos 87Mbp e 88Mbp. O gene é composto por 6 exons que codificam uma proteína de 195 aminoácidos. São atualmente descritos na base de dados de polimorfismos humanos dbSNP 61 polimorfismos diferentes de base única (SNPs) na região genômica do gene. Dos 61 polimorfismos já catalogados neste gene, 11 foram estudados no projeto Hapmap, entre os quais o SNP rs4673, também denominado polimorfismo C242T.

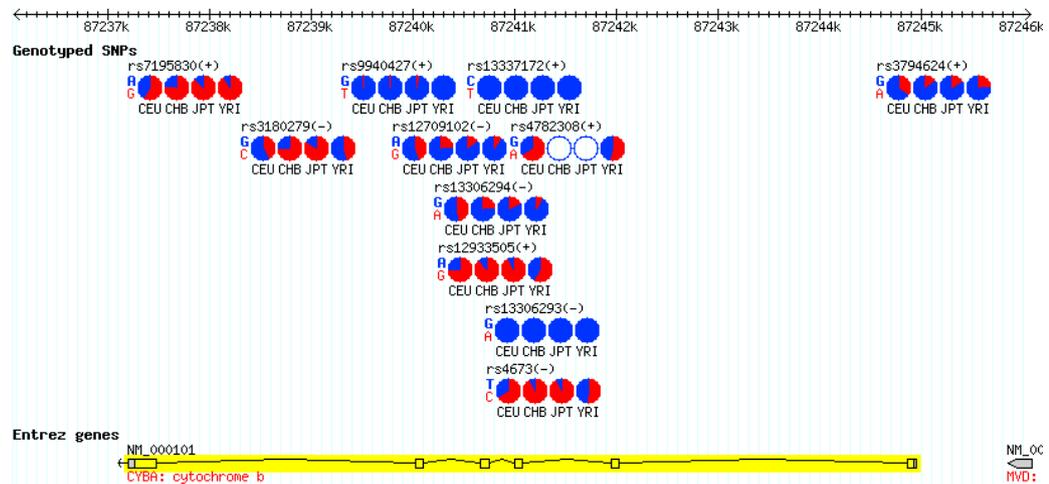


Figura 6. Estrutura genômica do gene CYBA (p22phox) e SNPs genotipados pelo projeto Hapmap para o lócus em questão. Gráficos de pizza mostram a frequência alélica relativa para cada população estudada. CEU: caucasianos de origem européia, CHB: chineses, JPT: japoneses, YRI: africanos provenientes da Nigéria.

Ampliando a região genômica estudada pode-se obter uma visão dos genes contíguos ao gene da p22phox. Na Figura 6 estão representados os genes existentes a 80Kbp de cada lado do gene da p22phox. Claramente, observa-se uma proximidade grande entre os genes codificadores para IL17c, p22phox e MVD (difosfomevalonato decarboxilase). Não distantes, situam-se ainda os genes NHN1, uma proteína nuclear conservada NHN1, e o SNAI3, *snail homolog 3*. O estudo das diferentes estruturas de

desequilíbrio de ligação nesta região genômica foi realizado a partir da região representada pela Figura 6, que corresponde ao intervalo genômico do cromossomo 16 dos nucleotídeos 87160553 a 87321602.

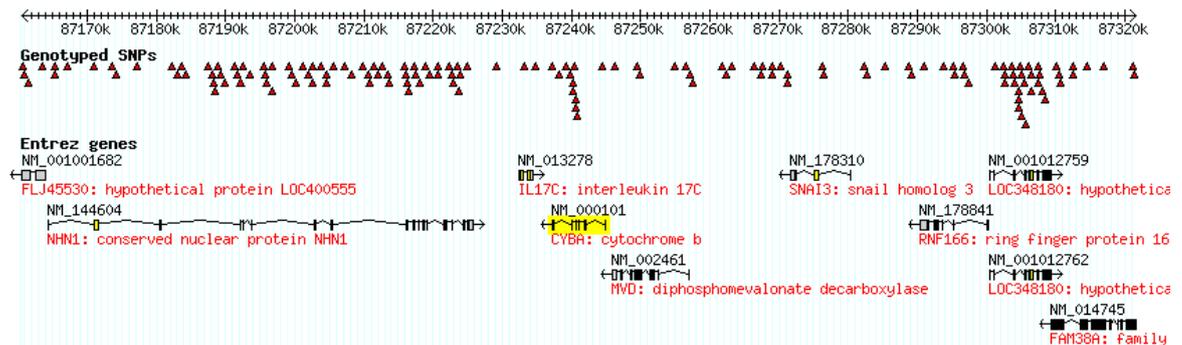


Figura 7. Representação da disposição gênica existente no cromossomo 16 flanqueando o gene CYBA (p22phox), em amarelo. Intervalo representado: nucleotídeos 87160553 a 87321602.

4.2.3. Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação na região genômica selecionada

Após a identificação dos genes candidatos potencialmente associados diretamente ao efeito observado para o polimorfismo C242T na população estudada, a determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação nesta mesma região foi avaliada através da obtenção dos dados genotípicos do projeto Hapmap (para os marcadores genotipados nesta região e construção dos mapas de desequilíbrio de ligação).

Na população CEU, indivíduos caucasianos com ascendência europeia, foram genotipados 148 diferentes SNPs na região estudada. A

Figura a seguir mostra a estrutura de desequilíbrio de ligação da região estudada.

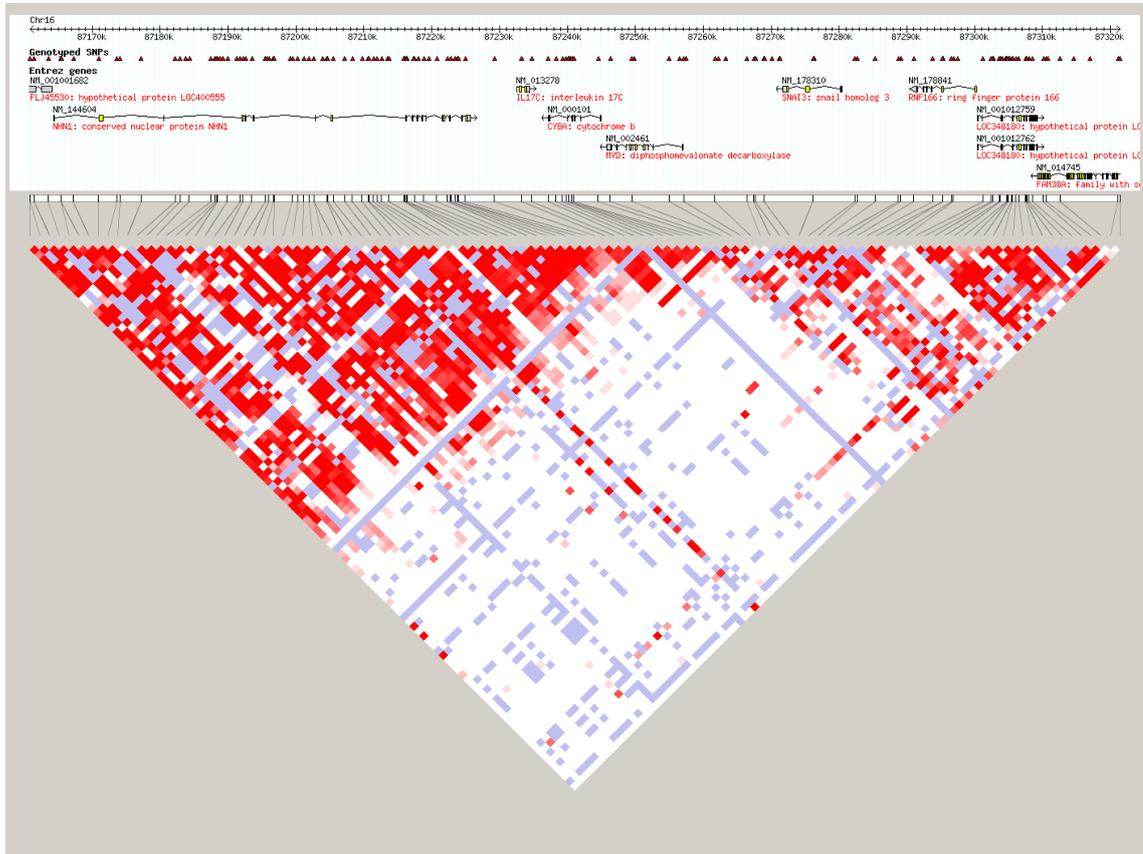


Figura 8. Estrutura de desequilíbrio de ligação em região genômica contendo o gene da p22phox. Dados extraídos a partir da população CEU.

Claramente, um grande bloco de recombinação liga os genes MVD, p22phox, IL17c e NNN1 nesta população. Não parece haver dependência de marcadores no gene da p22phox com SNAI3 nesta população.

No entanto, uma visão centrada no SNP rs4673, o polimorfismo C242T, mostra a ausência de relação de grande dependência (correlação) entre este marcador e marcadores tanto à montante (Figura 9), quanto à

jusante de sua localização genômica (Figura 10), à exceção de marcadores localizados no gene IL17c (Figura 9) ou MVD (Figura 10).

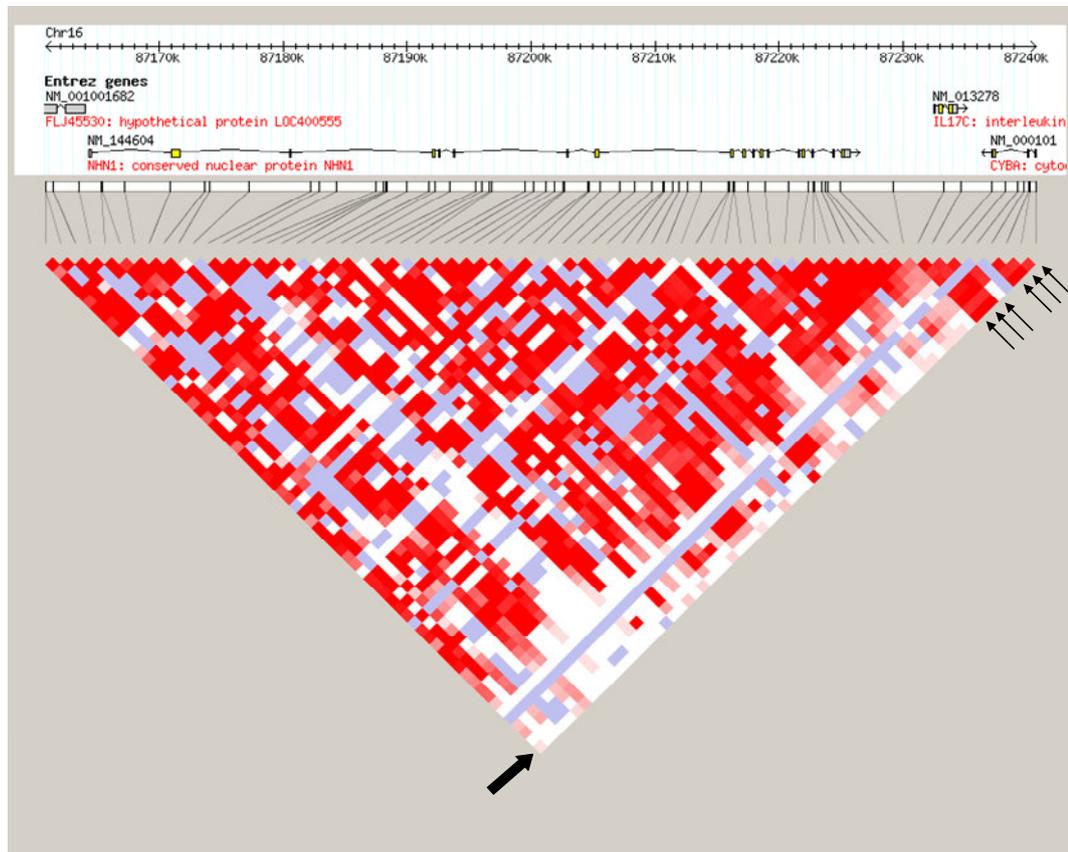


Figura 9. Estrutura de desequilíbrio de ligação da região 3' do marcador rs4673 obtida a partir de dados provenientes da população CEU. Seta larga indica linha com o grau de correlação dois-a-dois do marcador rs4673 e outros marcadores testados nesta região. Setas finas mostram que marcadores do gene da p22phox e da IL17c são os únicos a apresentaram forte correlação com o polimorfismo C242T nesta população.

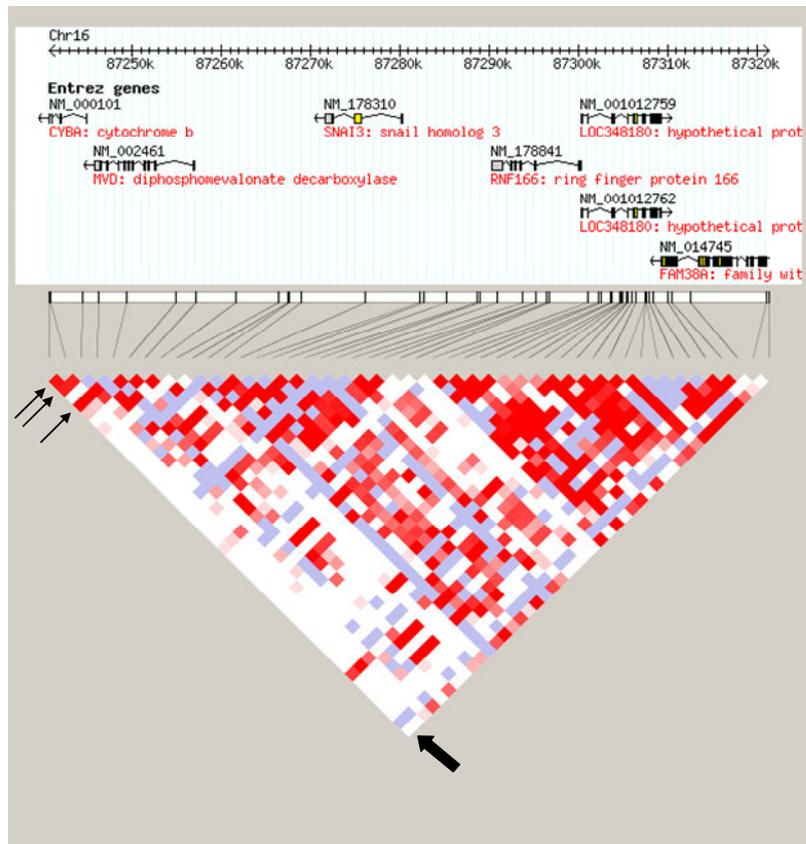


Figura 10. Estrutura de desequilíbrio de ligação da região 5' do marcador rs4673 obtida a partir de dados provenientes da população CEU. Seta larga indica linha com o grau de correlação dois-a-dois do marcador rs4673 e outros marcadores testados nesta região. Setas finas mostram que marcadores do gene da p22phox e do gene MVD são os únicos a apresentaram forte correlação com o polimorfismo C242T nesta população.

Na população YRI, de indivíduos africanos provenientes da Nigéria foram estudados 143 diferentes SNPs. A figura a seguir mostra a estrutura de desequilíbrio de ligação na região estudada.

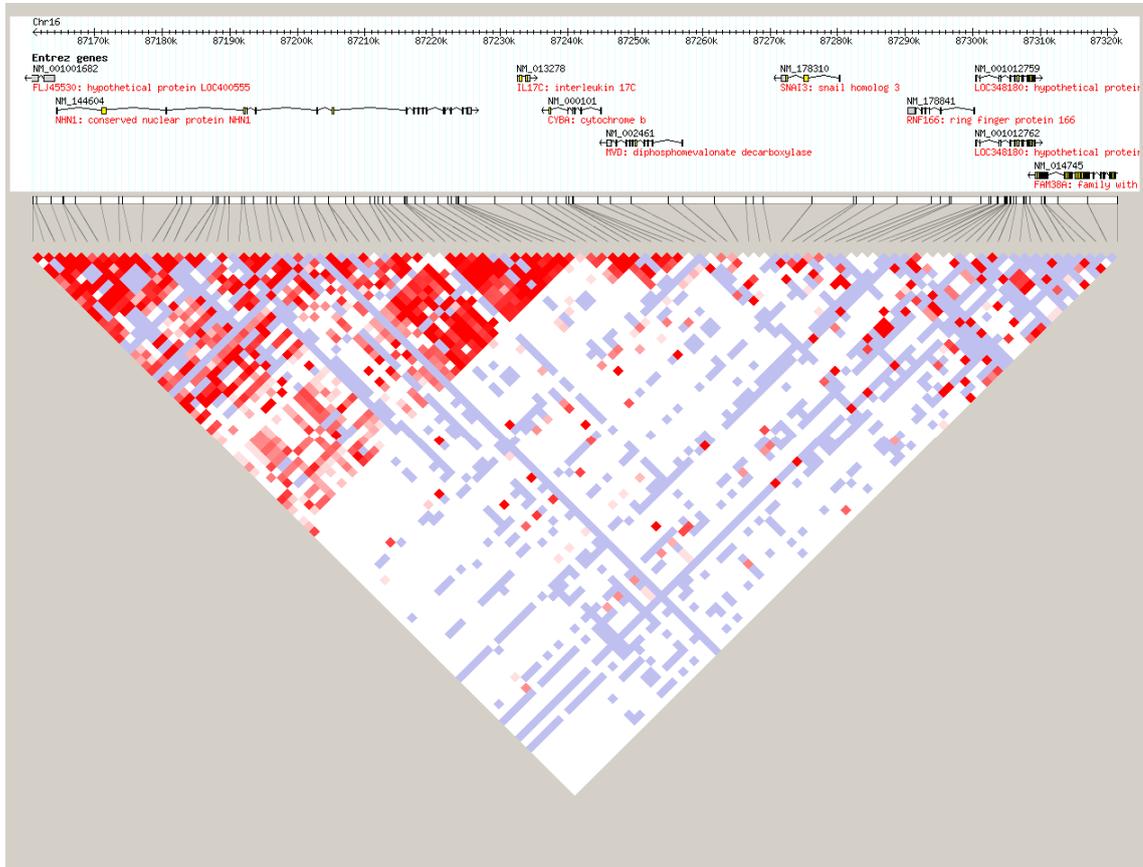


Figura 11. Estrutura de desequilíbrio de ligação em região genômica contendo o gene da p22phox. Dados extraídos a partir da população YRI.

Aparentemente, apesar de uma estrutura de desequilíbrio de ligação um pouco menos compacta, o mesmo grande bloco que une os genes MVD, p22phox, IL17c e NHN1 também parece estar presente nesta população. Aqui, já não existe qualquer correlação entre marcadores no gene da p22phox e marcadores situados 5' desta região genômica.

Da mesma maneira como realizado para a população CEU, a análise mais cuidadosa das relações de correlação entre o marcador rs4673 e

outros marcadores na região mostra a estrutura representada nas figuras 12 e 13.

De particular interesse é o fato de que uma análise detalhada da região genômica a 3' de rs4673 mostra que o bloco de desequilíbrio de ligação na população africana já é de menor tamanho e engloba apenas o gene *NHN1*. De fato, os genes *IL17c* e da *p22phox* situam-se em outro bloco de desequilíbrio de ligação e no caso particular do marcador rs4673 somente existe correlação importante com outros marcadores do próprio gene codificante da *p22phox* (Figura 12).

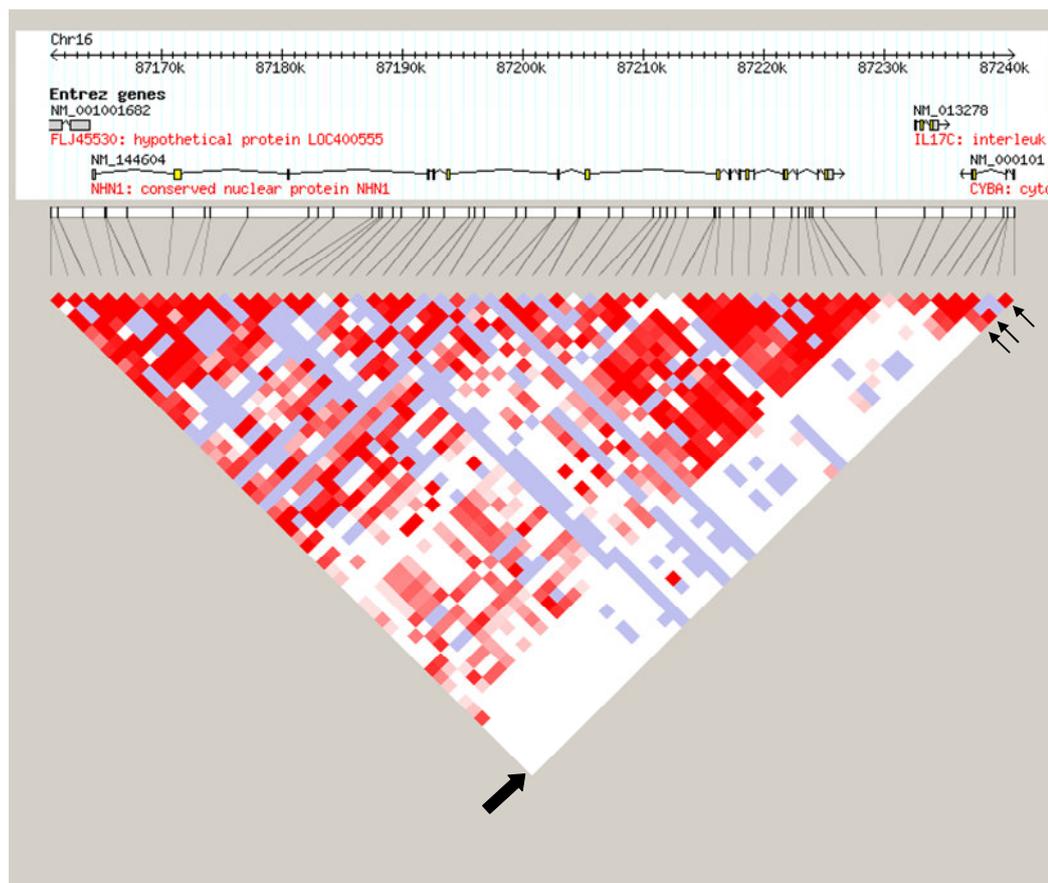


Figura 12. Estrutura de desequilíbrio de ligação da região 3' do marcador rs4673 obtida a partir de dados provenientes da população YRI. Seta larga indica linha com o grau de correlação dois-a-dois do marcador rs4673 e outros marcadores testados nesta região. Setas finas mostram que marcadores do gene da p22phox são os únicos a apresentar forte correlação com o polimorfismo C242T nesta população.

Assim como o observado na região genômica a 3' de rs4673, a análise da região a 5' desse marcador na população YRI também restringe a região em desequilíbrio de ligação com este marcador (portanto, potencialmente envolvida na modulação do risco observada no objetivo 1). Nesta região, apenas os marcadores do próprio gene p22phox apresentam estrutura de desequilíbrio importante com o marcador rs4673 (Figura 13).

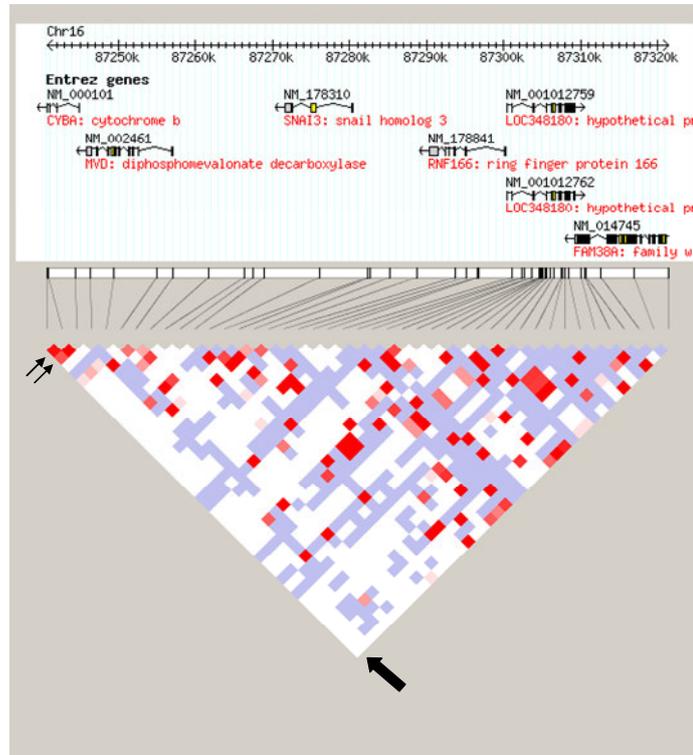


Figura 13. Estrutura de desequilíbrio de ligação da região 5' do marcador rs4673 obtida a partir de dados provenientes da população YRI. Seta larga indica linha com o grau de correlação dois-a-dois do marcador rs4673 e outros marcadores testados nesta região. Setas finas mostram que marcadores do gene da p22phox são os únicos a apresentar forte correlação com o polimorfismo C242T nesta população.

Para a análise das populações orientais optamos por agrupar os dados provenientes das genotipagens de indivíduos japoneses com as genotipagens provenientes de indivíduos chineses. A figura a seguir mostra

a estrutura de desequilíbrio de ligação da região estudada nas populações orientais.

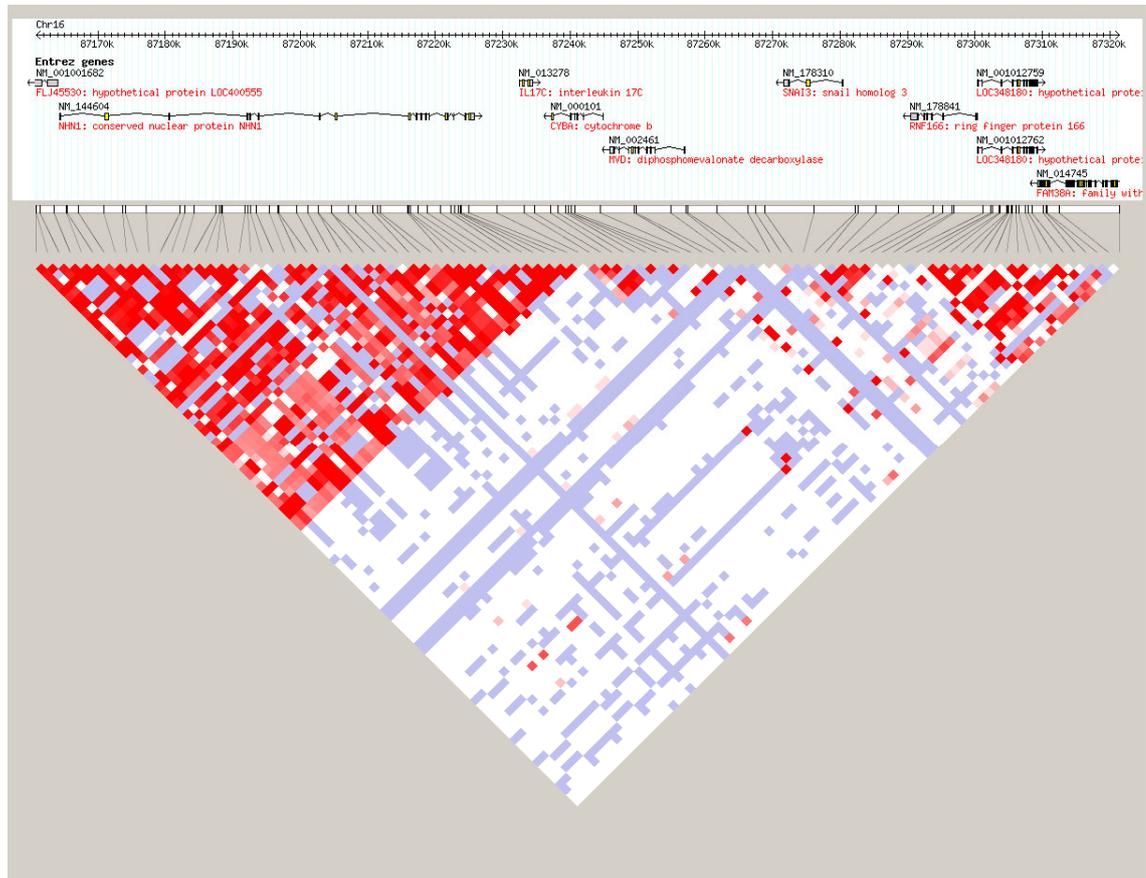


Figura 14. Estrutura de desequilíbrio de ligação em região genômica contendo o gene da p22phox. Dados extraídos a partir da população japonesa (JPN) e chinesa (CHN).

Ao contrário do observado na população caucasiana, na população de indivíduos orientais, o grande bloco de desequilíbrio de ligação do gene NHI1 não contém os genes IL17c, p22phox e MVD, que aparentemente encontram-se também pouco correlacionados entre si. Da mesma maneira

como realizado para as populações CEU e YRI, a análise mais cuidadosa das relações de correlação entre o marcador rs4673 e outros marcadores na região mostra a seguinte estrutura representada nas figuras 15 e 16.

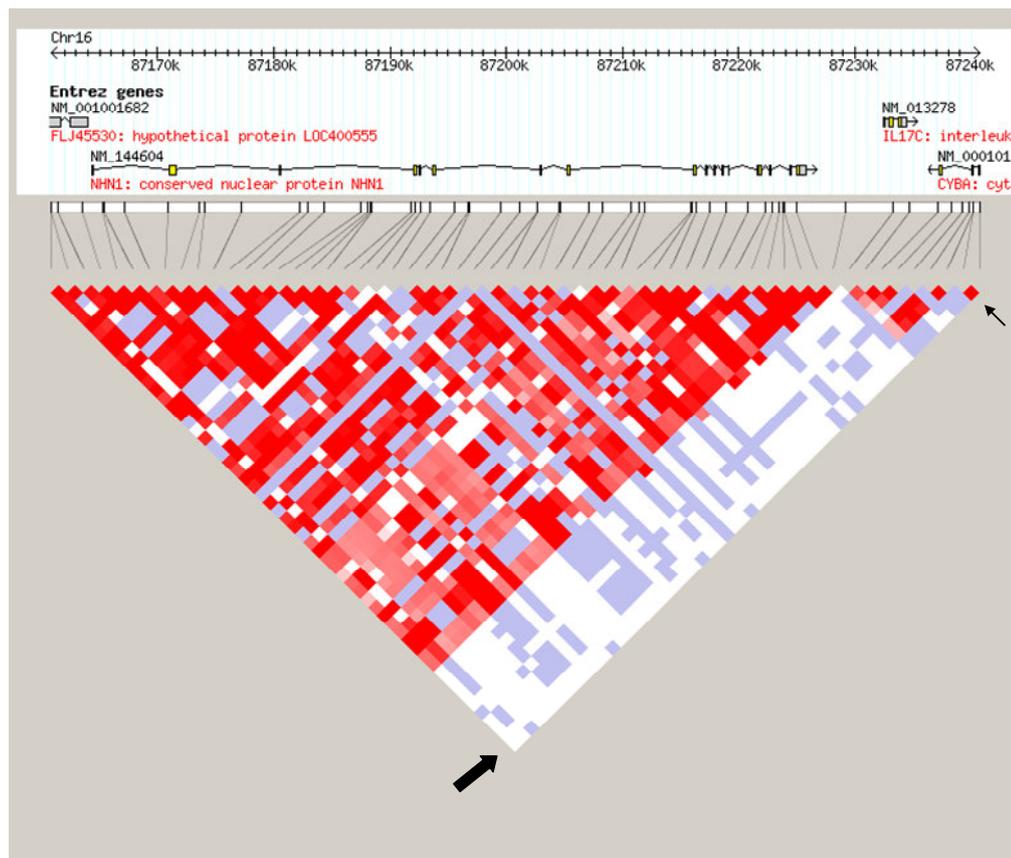


Figura 15. Estrutura de desequilíbrio de ligação da região 3' do marcador rs4673 obtida a partir de dados provenientes da população JPN+CHN. Seta larga indica linha com o grau de correlação dois-a-dois do marcador rs4673 e outros marcadores testados nesta região. Setas finas mostram que marcadores do gene da p22phox são os únicos a apresentar forte correlação com o polimorfismo C242T nesta população.

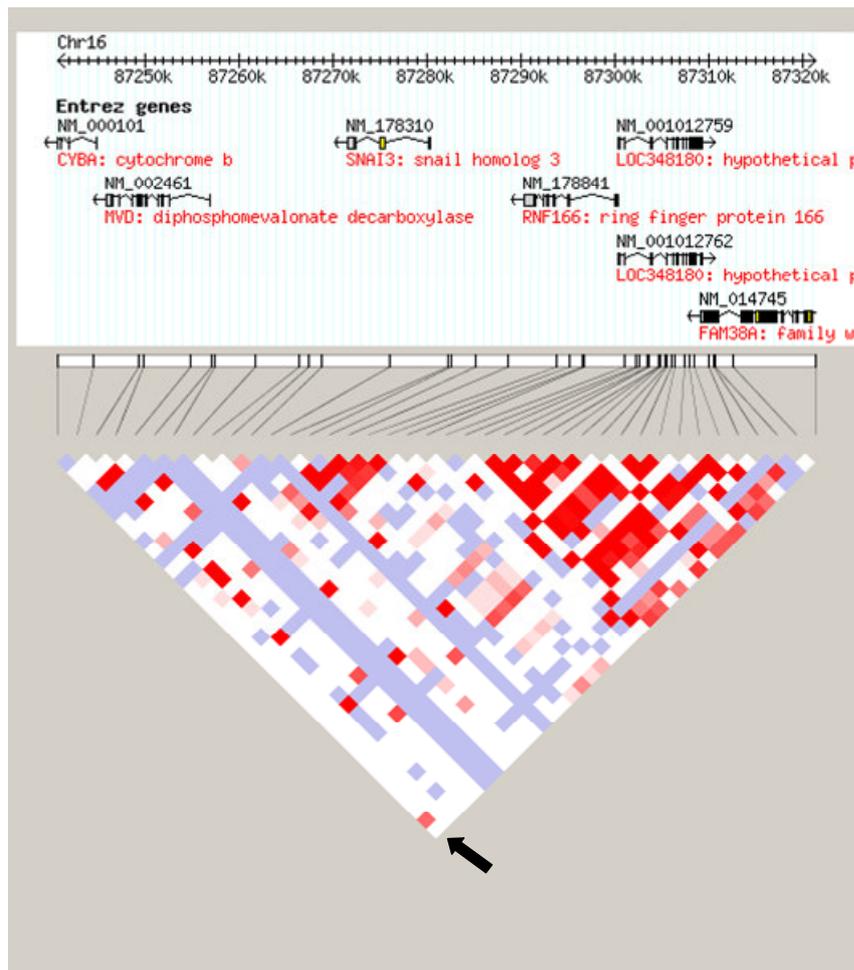


Figura 16. Estrutura de desequilíbrio de ligação da região 5' do marcador rs4673 obtida a partir de dados provenientes da população JPN+CHN. Seta larga indica linha com o grau de correlação dois-a-dois do marcador rs4673 e outros marcadores testados nesta região.

À semelhança do verificado na população africana, apenas marcadores dentro do próprio gene codificador da p22phox encontram-se significativamente correlacionados com o marcador rs4673 na amostra de indivíduos de etnia oriental.

Ao final desta análise descritiva, reúnem-se elementos para apontar o marcador rs4673, polimorfismo C242T do gene da p22phox, como um marcador molecular com uma pequena estrutura de correlação com outros marcadores contíguos. Desta forma, o resultado obtido no objetivo 1 parece estar pouco sujeito aos vieses de associação por um marcador em outro gene que não o da p22phox. Em particular, apenas marcadores nos genes IL17c e MVD, poderiam justificar o resultado de associação positivo encontrado com o polimorfismo C242T do gene p22phox, mas tal hipótese é pouco provável. Assim, as alterações moleculares na própria proteína p22phox são as principais candidatas a explicar o mecanismo molecular da associação descrita no objetivo 1.

4.2.4. Determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação na região genômica do gene da p22phox na população brasileira:

Com base nos resultados obtidos até o presente momento, optamos por determinar a estrutura de desequilíbrio de ligação na região genômica do gene da p22phox, incluindo a região genômica dos genes imediatamente contíguos ao gene da p22phox, uma vez que marcadores nestes genes encontram-se em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo C242T nas populações estudadas pelo projeto Hapmap.

Com este objetivo, ensaios de genotipagem foram desenvolvidos para mais 6 marcadores localizados nos genes da p22phox, IL17C, MVD e NHN1. Os marcadores selecionados foram: rs2291160, rs2254073, rs11076688,

rs7195830, rs8854 e rs4782395. A distribuição destes marcadores de acordo com a localização genômica ao longo do cromossomo 16 humano pode ser apreciada na figura a seguir.

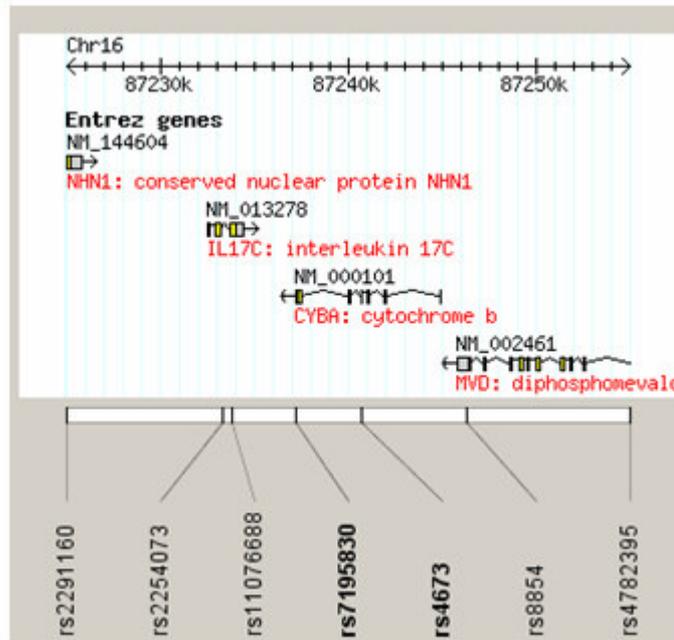


Figura 17. Distribuição genômica dos marcadores selecionados para a determinação da estrutura de desequilíbrio de ligação do gene p22phox na população brasileira.

Através da utilização do programa Haploviewer e do algoritmo de determinação de blocos de desequilíbrio de ligação proposto por Gabriel *et al.*, obtivemos a seguinte estrutura de ligação utilizando os indivíduos participantes do estudo MASS II.

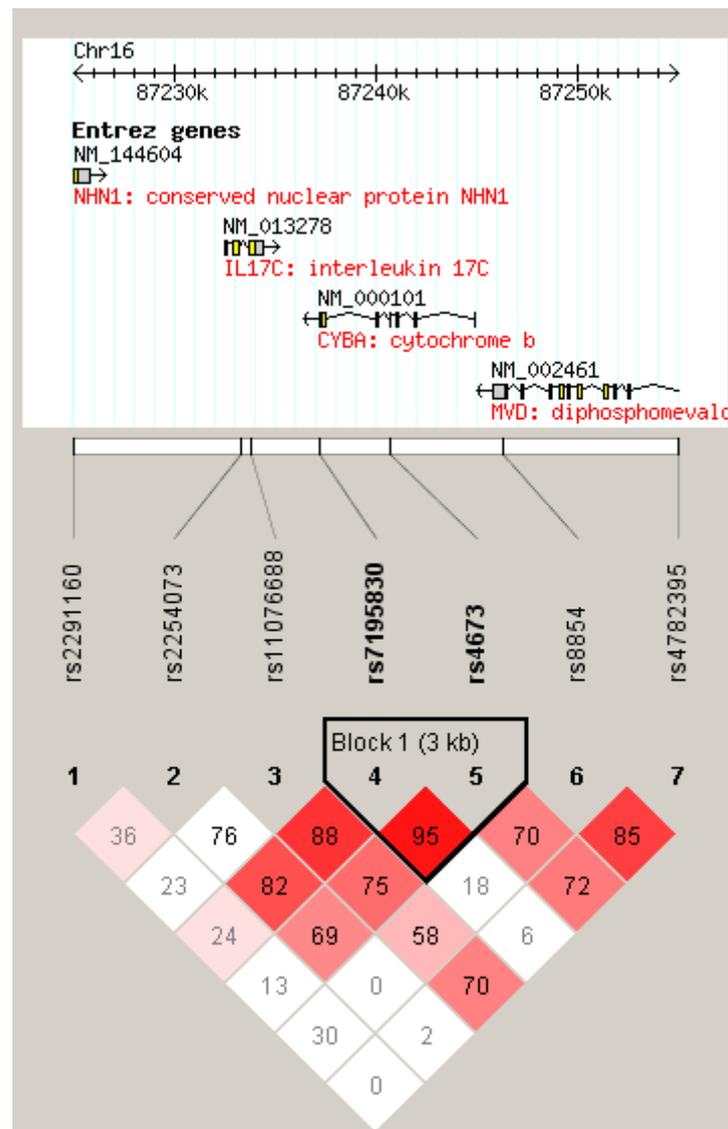


Figura 18. Estrutura de Desequilíbrio de Ligação do gene da p22phox na população brasileira. Bloco 1 de desequilíbrio de ligação definido por algoritmo proposto por Gabriel *et al.*

Como esperado após a análise utilizando dados do projeto Hapmap, o marcador rs4673, polimorfismo C242T, apresenta apenas desequilíbrio de ligação significativo com marcadores dentro do próprio gene da p22phox, em nosso painel apenas com o marcador rs7195830. Outros marcadores

situados nos genes da IL17C, MVD ou NHN1 não apresentam correlação significativa com o marcador rs4673, sendo improvável que tais marcadores expliquem a associação descrita no objetivo 1 entre rs4673 e eventos cardiovasculares nas populações estudadas.

4.2.5. Medidas de associação entre marcadores estudados e eventos cardiovasculares na população MASS II

Uma outra forma de avaliar tanto a confiabilidade da associação descrita para o marcador rs4673 como a provável ligação direta entre variabilidade genética em p22phox e a modulação do risco cardiovascular nas populações estudadas consiste em buscar a mesma associação previamente descrita para rs4673 com outros marcadores na mesma região genômica, porém situados em outros genes.

A tabela a seguir trás o p valor assim como o valor da estatística Qui-quadrado observada nos testes de associação entre os diversos marcadores estudados nesta região genômica e fenótipo combinado de óbito ou infarto agudo do miocárdio após 5 anos de seguimento da população do estudo MASS II.

Tabela 8. Associação entre marcadores polimórficos testados na região genômica de p22phox e óbito+IAM

	Marcador	Alelo associado	Razão Caso/Controle	Chi-quadrado	p valor
1	rs2291160	G	0.649, 0.593	2.103	0.147
2	rs2254073	C	0.783, 0.765	0.258	0.6114
3	rs11076688	T	0.099, 0.091	0.119	0.7298
4	rs7195830	G	0.715, 0.653	2.584	0.108
5	rs4673	T	0.434, 0.342	5.809	0.0159
6	rs8854	A	0.093, 0.090	0.02	0.8878
7	rs4782395	T	0.619, 0.578	0.992	0.3192

De modo interessante, apenas o marcador rs4673 encontra-se significativamente associado ao fenótipo combinado. Ainda, o marcador rs71955830, que também está localizado no gene da p22phox e apresenta um valor de desequilíbrio de ligação de 95 com rs4673, não mostra associação significativa com o fenótipo estudado. Finalmente, utilizando-se os dois marcadores pertencentes ao único bloco de desequilíbrio de ligação observado na região testada (rs71955830 e rs4673), não houve acréscimo significativo na associação encontrada (valor de Qui-quadrado de 4,76 e p valor de 0,03 para análise haplotípica), o que sugere que toda a associação observada advém fundamentalmente da informação fornecida pelo marcador rs4673.

Em conclusão, os dados descritos até o presente momento sugerem fortemente que o resultado de associação descrito no objetivo 1 deve-se fundamentalmente à variabilidade genética existente no gene da p22phox (uma vez que não observamos em nossa população desequilíbrio de ligação significativo entre rs4673 e marcadores localizados nos genes contíguos a p22phox). Ainda, sugerem que a associação descrita pode ser causada diretamente por modificação molecular induzida pelo polimorfismo C242T e não explicada por outra alteração genética em desequilíbrio de ligação com a mesma.

4.2.6. Definindo hipóteses para explicar mecanismo molecular da associação encontrada

Após a definição do marcador rs4673 como o principal candidato a explicar diretamente a associação encontrada, o mecanismo molecular de ação desta associação poderia expressar-se em diversos níveis dentro da arquitetura fenotípica da doença coronária estável.

A natureza complexa do fenótipo estudado é evidente, e a relação entre o marcador genético em questão e a maior incidência de eventos cardiovasculares poderia resultar de vários fenótipos intermediários. Destes, os principais candidatos seriam:

- Alterações protéicas codificadas pelo polimorfismo C242T poderiam expressar-se fenotipicamente através da modulação de um dos fatores de risco cardiovascular clássicos e assim modular a incidência de eventos cardiovasculares em uma população de pacientes com doença arterial coronária multiarterial;
- Alterações protéicas codificadas pelo polimorfismo C242T poderiam expressar-se fenotipicamente através da modulação da carga aterosclerótica, o que poderia refletir-se em uma maior incidência de eventos cardiovasculares em uma população de pacientes com doença arterial coronária multiarterial;

- Alterações protéicas codificadas pelo polimorfismo C242T poderiam não modular nem fatores de risco cardiovasculares clássicos, nem a chance de determinado indivíduo apresentar uma maior carga aterosclerótica, mas sim modular diretamente a estabilidade de placas ateroscleróticas, modulando, assim, a incidência de eventos cardiovasculares em uma população de pacientes com doença arterial coronária multiarterial.

A seguir testaremos as hipóteses formuladas em cada um dos cenários sugeridos.

4.2.7. Teste de hipótese

Alterações protéicas codificadas pelo polimorfismo C242T poderiam expressar-se fenotipicamente através da modulação de um dos fatores clássicos de risco cardiovascular e assim modular a incidência de eventos cardiovasculares numa população de pacientes com doença arterial coronária multiarterial.

A hipótese enunciada pressupõe uma associação entre o polimorfismo C242T do gene da p22phox com fatores de risco cardiovasculares, o que influenciaria o risco de óbito e IAM incidente na população estudada. Dessa maneira, o alelo 242T estaria associado a níveis pressóricos maiores, ou a uma maior prevalência de diabetes, ou a níveis mais elevados de colesterol, o que aumentaria por conseguinte a chance de óbito ou IAM.

Para testarmos a hipótese apresentada, estudamos a distribuição do polimorfismo C242T em 1575 indivíduos selecionados aleatoriamente de uma população urbana brasileira. Os indivíduos aqui descritos foram selecionados de modo a formarem uma amostra representativa da população geral da cidade de Vitória/ES.

Na tabela a seguir apresentamos a distribuição de variáveis demográficas e de risco cardiovascular para a amostra selecionada. Note-se que os dados apresentados exemplificam a distribuição destas variáveis na população urbana brasileira.

Tabela 9. Características demográficas da população urbana da cidade de Vitória

Idade, anos	44,78	10,86
Sexo masculino, %	45,5	
Classe Socioeconômica, %		
A	10,3	
B	27,5	
C	31	
D+E	31,2	
Etnia, %		
Branco	35,3	
Mulato	51,2	
Negro	7,9	
Outros	5,6	
Tabagismo, %	22,1	
Pressão Arterial Sistólica	127,94	21,87
Pressão Arterial Diastólica	84,21	14,02
Colesterol Total, mg/dL	214,4	47,79
Triglicérides, mg/dL	137,6	127,9
HDL-Colesterol, mg/dL	45,36	12,35
LDL-Colesterol, mg/dL	142,22	39,58
VLDL-Colesterol, mg/dL	25,6	20,14
Glicose sérica, mg/dL	104,99	32
Creatinina, mg/dL	0,97	0,2
Ácido úrico, mg/dL	4,8	1,51
Leucócitos	6588	2643
IMC	26,29	4,88
Clearance de creatinina	89,47	25,52

Foi possível obter o genótipo do polimorfismo C242T nos 1575 indivíduos estudados neste estudo transversal. As freqüências genotípicas observadas foram, respectivamente: 43,0% para o genótipo CC, 11,0% para o genótipo TT e 46,0% para o genótipo CT. Tal freqüência de distribuição genotípica encontra-se de acordo com a predita pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Devido ao pequeno número relativo de indivíduos portadores do genótipo TT, optamos por agrupá-los com os indivíduos portadores do genótipo CT (de forma que uma comparação entre indivíduos portadores ou não do alelo T pudesse ser conduzida).

A seguir, apresentamos a distribuição de variáveis demográficas e fatores de risco cardiovascular de acordo com o genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox nesta mesma população.

Conforme demonstrado na Tabela, a presença de determinado genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox não parece associar-se a nenhum dos fatores de risco cardiovascular maiores na população brasileira. Assim, a hipótese de que a associação entre o polimorfismo C242T e a incidência de eventos cardiovasculares pudesse ser explicada por uma modulação de fatores clássicos de risco cardiovascular não encontra evidência empírica na população brasileira estudada.

Tabela 10. Características demográficas da população urbana da cidade de Vitória

	CC	CT + TT	p valor
Idade, anos	44,91 (10,82)	44,69 (10,90)	0,69
Sexo masculino, %	40,72	59,28	0,06
Classe Socioeconômica, %			
A	11,54	9,36	
B	25,74	28,73	0,46
C	30,77	31,29	
D+E	31,95	30,62	
Etnia, %			
Branco	37,05	33,97	
Mulato	51,51	51,13	0,19
Negro	6,33	8,91	
Outros	5,12	5,98	
Tabagismo, %	23,08	21,4	0,43
Pressão Arterial Sistólica	127,79 (20,56)	128,08 (22,82)	0,8
Pressão Arterial Diastólica	84,00 (13,78)	84,37 (14,18)	0,61
Colesterol Total, mg/dL	214,29 (50,34)	214,51 (45,84)	0,93
Triglicérides, mg/dL	142,73 (158,17)	133,80 (99,25)	0,17
HDL-Colesterol, mg/dL	44,98 (12,50)	45,65 (12,25)	0,3
LDL-Colesterol, mg/dL	141,83 (40,80)	142,52 (38,70)	0,74
VLDL-Colesterol, mg/dL	26,16 (24,95)	25,19 (15,60)	0,86
Glicose sérica, mg/dL	103,40 (29,13)	106,19 (34,00)	0,09
Creatinina, mg/dL	0,97 (0,20)	0,97 (0,20)	0,75
Ácido úrico, mg/dL	4,78 (1,47)	4,81 (1,51)	0,7
Leucócitos	6672 (3405)	6523 (1876)	0,27
IMC	26,28 (4,96)	26,29 (4,81)	0,96
Clearance de creatinina	90,09 (25,79)	88,99 (25,27)	0,4

4.2.8. Teste de hipótese:

Alterações protéicas codificadas pelo polimorfismo C242T poderiam expressar-se fenotipicamente através da modulação da carga aterosclerótica, o que poderia refletir-se em uma maior incidência de eventos cardiovasculares em uma população de pacientes com doença arterial coronária multiarterial.

Dados iniciais das análises apresentadas para o objetivo I do presente estudo sugerem que não existe relação entre o desenvolvimento aterosclerótico e o polimorfismo C242T estudado. No entanto, cabe ressaltar que a população do estudo MASS II caracteriza-se por ser uma população com pequena variabilidade inter-individual com relação à carga aterosclerótica dos indivíduos estudados. Todos os indivíduos estudados eram indivíduos bi- ou tri-arteriais, não representando assim o espectro de variabilidade populacional do processo aterogênico.

No sentido de melhor explorar a hipótese de uma possível associação entre o polimorfismo C242T e uma maior ou menor suscetibilidade individual ou desenvolvimento de lesões coronárias ateroscleróticas optamos por estudar uma nova população, composta por indivíduos submetidos a exame de angiografia coronária frente a suspeita clínica de insuficiência coronária.

Nesta nova amostra de indivíduos analisamos 871 indivíduos submetidos pela primeira vez a exame de cineangiocoronariografia (com a indicação clínica de investigar possível doença arterial coronária obstrutiva).

O gráfico a seguir mostra a distribuição relativa do número de artérias epicárdicas principais com obstrução significativa (maior do que 50%).

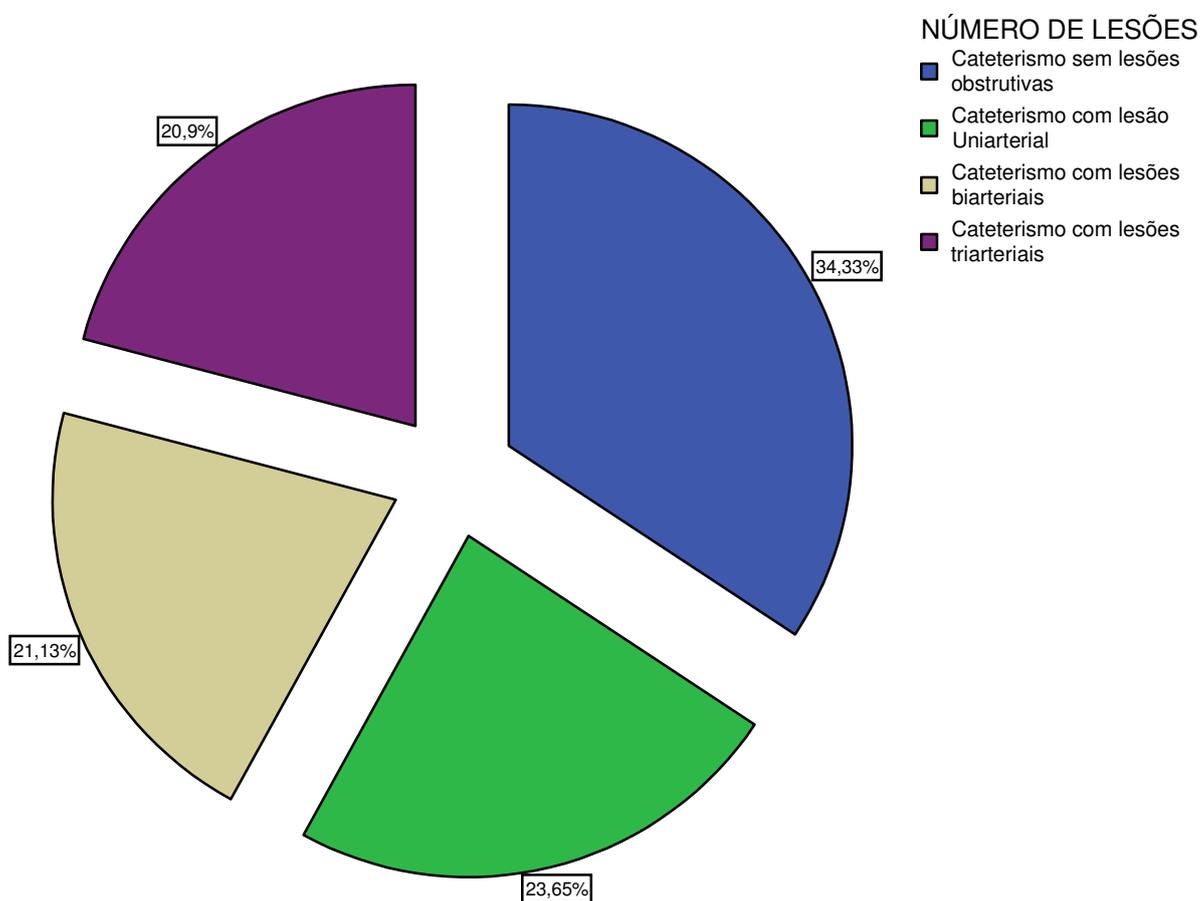


Figura 19. Distribuição relativa do número de artérias epicárdicas com obstrução luminal maior que 50%.

Conforme esperado, num número expressivo dos exames não foi observada qualquer lesão coronária obstrutiva significativa (34,3%). Considerando a distribuição do número total de lesões epicárdicas em todos

os segmentos estudados (terços proximais, médios e distais), observamos a seguinte distribuição na população estudada:

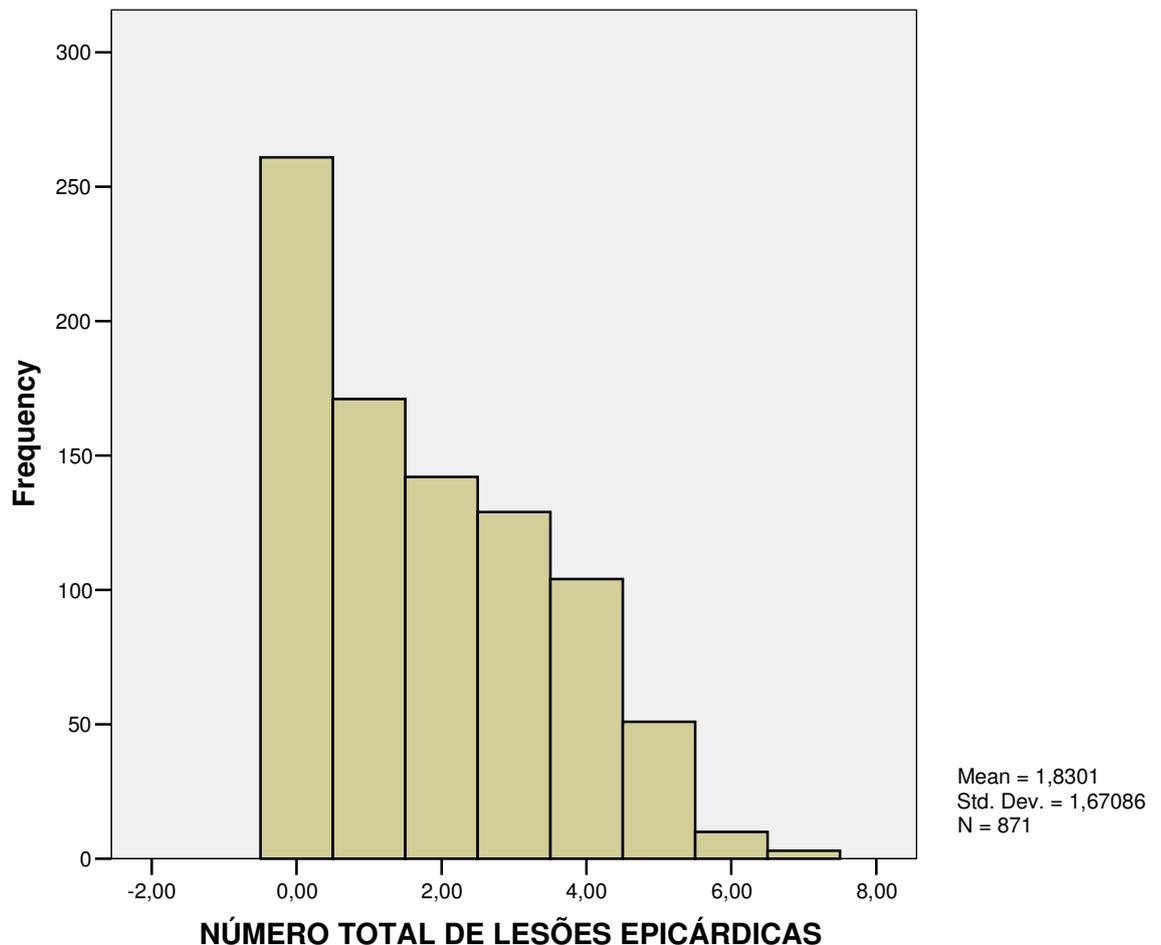


Figura 20. Distribuição do número total de lesões epicárdicas em todos os segmentos estudados

Claramente não se observa distribuição normal no número total de lesões epicárdicas nos indivíduos estudados. Desta maneira, optamos por separar nossa amostra com relação aos tercís da variável número total de lesões epicárdicas, de forma a comparar o primeiro (indivíduos com menor

número total de lesões epicárdicas) com o terceiro tercil (indivíduos com o maior número total de lesões epicárdicas). Na tabela a seguir apresentamos as características clínicas e demográficas da amostra estudada com relação ao tercil do número total de lesões epicárdicas. Destaca-se que o primeiro tercil inclui apenas indivíduos sem lesões epicárdicas com obstrução luminal maior que 50% e que o terceiro tercil inclui indivíduos com lesões coronárias obstrutivas em pelo menos 3 artérias epicárdicas (o segundo tercil inclui indivíduos com 1 ou 2 lesões coronárias obstrutivas).

Tabela 11. Características clínicas e demográficas de acordo com o número total de lesões (tercil)

	Primeiro Tercil	Segundo Tercil	Terceiro Tercil	p Valor
Idade	56,65 (10,30)	59,70 (9,99)	61,18 (10,54)	0,24
Sexo Masculino, %	34,1	55,6	63,6	< 0,001
Tabagismo atual, %	14,9	22,4	21,2	0,001
HAS, %	70,9	70,9	75,1	0,43
DM tipo 2, %	24,5	34,2	43,4	< 0,001
IMC	29,15 (5,88)	27,30 (4,75)	27,40 (4,32)	0,07
Colesterol Total, mg/dL	222,08 (45,86)	230,79 (55,48)	233,00 (45,19)	0,73
Triglicérides, mg/dL	174,76 (158,64)	175,87 (118,31)	193,94 (146,80)	0,28
LDL-colesterol, mg/dL	139,49 (39,93)	145,40 (46,20)	148,83 (37,03)	0,54
HDL-colesterol, mg/dL	46,71 (12,78)	45,18 (12,07)	42,18 (11,18)	0,51
História Familiar de IAM	38,7	39,3	36,7	0,79

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica, DM tipo 2 - Diabetes Mellitus tipo 2, IMC - Índice de Massa Corpórea
 Variáveis categóricas comparadas através do teste do Chi-quadrado
 Variáveis contínuas comparadas através de ANOVA

A seguir, apresentamos a distribuição genotípica do polimorfismo C242T do gene da p22phox de acordo com os tercís do número total de obstruções coronárias significativas.

Tabela 12. Frequências Genotípicas do polimorfismo C242T do gene da p22phox de acordo com o tercil do número total de lesões epicárdicas observadas ao exame cineangiográfico

Genótipo	Primeiro Tercil	Segundo Tercil	Terceiro Tercil
CC	41,1	44,8	42,1
CT	46,1	44,2	45,5
TT	12,8	11,0.	12,3

A comparação entre as frequências genotípicas nos três grupos de distribuição de lesões ateroscleróticas coronárias não mostrou haver diferença significativa entre os grupos ($p = 0,90$).

Uma outra maneira de analisar o potencial efeito de um marcador genético na modulação de um fenótipo complexo é o de estudar potenciais efeitos de interação deste marcador com outros fatores importantes para a definição do fenótipo estudado. Exploramos esta possibilidade através da avaliação do poder preditivo dos diversos fatores associados à carga aterosclerótica na população estudada, levando-se em consideração grupos genotípicos específicos do polimorfismo C242T.

Na tabela a seguir, apresentamos as estimativas de associação entre diversos fatores de risco cardiovasculares e a chance de encontrar-se no tercil mais elevado da distribuição do número de artérias epicárdicas acometidas ao exame de cineangiocoronariografia.

Tabela 13. Grau de associação entre fatores de risco cardiovascular e número de artérias epicárdicas acometidas por grupo genotípico

	OR (95% IC)	OR (95% IC)
	CC	CT + TT
HAS	1,08 (0,61 - 1,92)	1,27 (0,77 - 2,10)
Hipertrigliceridemia	1,13 (0,62 - 2,06)	1,65 (1,0 - 2,74)
Obesidade	0,36 (0,20 - 0,65)	0,51 (0,31 - 0,84)
Hiperglicemia	1,69 (0,95 - 3,01)	2,55 (1,56 - 4,16)
HDL Baixo	1,10 (0,55 - 2,61)	1,77 (0,90 - 3,47)

HAS - hipertensão arterial sistêmica

Hipertrigliceridemia definida como triglicérides > 150 mg/dL

Obesidade definida como IMC > 30

Hiperglicemia definida como glicemia de jejum acima de 110 mg/dL

HDL baixo definido como HDL < 40 em homens e HDL < 50 em mulheres

OR calculados como razão de chance do primeiro tercil versus último tercil da distribuição do número de artérias epicárdicas acometidas.

Nesta tabela observamos um maior impacto dos diversos fatores listados no risco de uma maior carga aterosclerótica no grupo de indivíduos com genótipo CT + TT em relação aos indivíduos com genótipo CC. Este dado sugere haver interação entre a capacidade aterogênica de diversos fatores de risco cardiovascular e o genótipo C242T do gene da p22phox.

Uma outra maneira de quantificar este efeito de interação é o de estudar o número médio de vasos epicárdicos acometidos (com lesão obstrutiva maior do que 50%) em relação ao número de fatores de risco cardiovasculares nos dois grupos genotípicos.

Na figura a seguir essa relação é representada. Enquanto no grupo de indivíduos portadores do genótipo CT ou TT uma relação linear entre o número de fatores de risco e o grau de aterosclerose apresentada ao exame parece claro e mostra tendência linear, o mesmo não é observado no grupo de indivíduos com o genótipo CC.

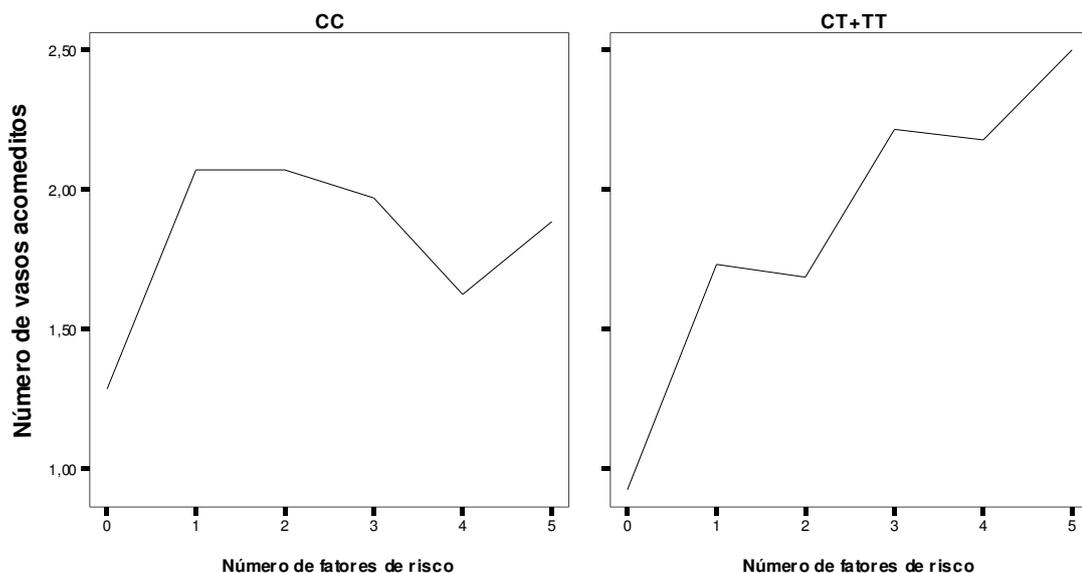


Figura 21. Relação entre número de fatores de risco cardiovascular e número médio de artérias epicárdicas acometidas de acordo com grupo genotípico.

De fato, um teste estatístico para o termo de interação “número de fatores de risco * genótipo C242T” é estatisticamente significativo ($p=0,038$) e apenas o grupo de indivíduos pertencentes ao grupo genotípico CT+TT apresenta uma tendência linear significativa ($p=0,0004$ para o grupo CT + TT e $p=0,95$ para o grupo CC).

Desta maneira, apesar de não observarmos associação direta entre o genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox e a carga aterosclerótica, os dados apresentados sugerem que existe interação entre o polimorfismo C242T e fatores de risco cardiovascular aterogênicos na modulação da carga aterosclerótica em indivíduos com suspeita clínica de insuficiência coronária.

4.2.9. Teste de hipótese

Alterações protéicas codificadas pelo polimorfismo C242T poderiam não modular nem fatores de risco cardiovasculares clássicos, nem a chance de determinado indivíduo apresentar uma maior carga aterosclerótica, mas sim modular diretamente a estabilidade de placas ateroscleróticas, modulando, assim, a incidência de eventos cardiovasculares em uma população de pacientes com doença arterial coronária multiarterial.

4.2.9.1 Existe associação entre o polimorfismo C242T e a expressão do gene CYBA (p22phox) em veias safenas humanas?

Inicialmente nossa abordagem foi a de investigar a possível existência de relação entre o genótipo do polimorfismo C242T e a expressão tecidual vascular do próprio gene da p22phox. Para este experimento desenvolvemos ensaio específico para a quantificação da expressão do gene em amostras de veias safenas mantidas em cultura *ex vivo* por 24 horas após retirada durante procedimento de revascularização cirúrgica do miocárdio.

Foram realizadas dosagens em amostras de 28 pacientes (14 com o genótipo CC e 14 com o genótipo CT ou TT). Não identificamos qualquer tendência à expressão diferencial do gene da p22phox com relação aos genótipos estudados (Figura).

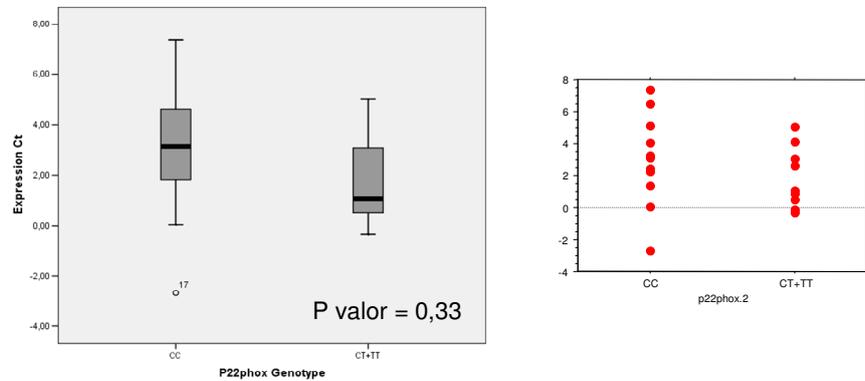


Figura 22. Comparação entre valores de Δ Ct (normalizados com 28S) para o gene CYBA (p22phox) de acordo com genótipos do polimorfismo C242T.

4.2.9.2. O polimorfismo C242T pode modular o padrão de expressão gênica em tecido vascular humano para genes associados à resposta inflamatória?

Uma vez não se verificando qualquer relação entre o genótipo do polimorfismo C242T e a expressão gênica vascular do gene CYBA, passamos a explorar a hipótese de que a alteração protéica codificada pelo polimorfismo C242T possa levar a uma proteína p22phox diferenciada que poderia modular o padrão de expressão gênica em tecido vascular de respostas associadas ao papel da NADPH oxidase.

Dessa forma, desenvolvemos ensaios específicos para 10 diferentes genes associados à respostas inflamatórias e exploramos a possibilidade de que a expressão destes genes possa estar associada aos genótipos do polimorfismo C242T.

Este segundo experimento foi conduzido de maneira independente ao primeiro experimento em 15 novas amostras de veias safenas humanas retiradas sob o mesmo protocolo anteriormente descrito.

Na tabela a seguir apresentamos os dados de expressão relativa dos genes testados em dois grupos definidos pela presença ou não do alelo 242T.

Tabela 14. Expressão relativa de genes inflamatórios de acordo com genótipo do polimorfismo C242T em veias safenas humanas

	28S		DCt		DDCt		Aumento					p-Value
BMP2												
CC	26,56	1,68	24,82	1,05	1,74	1,98	0,00	1,98	1,00	0,25	3,95	0,04
CT+TT	26,12	1,97	25,46	1,71	0,66	2,61	-1,08	2,61	2,11	0,35	12,88	
CSF3												
CC	25,65	2,60	24,82	1,05	0,83	2,81	0,00	2,81	1,00	0,14	7,00	0,08
CT+TT	24,33	2,47	25,46	1,71	-1,13	3,00	-1,96	3,00	3,89	0,49	31,21	
CXCL3												
CC	31,82	5,40	24,82	1,05	7,01	5,50	0,00	5,50	1,00	0,02	45,32	0,19
CT+TT	28,98	4,73	25,46	1,71	3,52	5,03	-3,49	5,03	11,26	0,35	367,04	
CXCL10												
CC	28,29	3,21	24,82	1,05	3,48	3,38	0,00	3,38	1,00	0,10	10,39	0,41
CT+TT	27,89	2,15	25,46	1,71	2,44	2,74	-1,04	2,74	2,06	0,31	13,79	
IL1b												
CC	20,05	2,38	24,82	1,05	-4,76	2,61	0,00	2,61	1,00	0,16	6,09	0,05
CT+TT	18,57	2,26	25,46	1,71	-6,89	2,83	-2,13	2,83	4,37	0,61	31,03	
IL1R1												
CC	22,72	1,54	24,82	1,05	-2,10	1,86	0,00	1,86	1,00	0,27	3,64	0,38
CT+TT	22,77	0,74	25,46	1,71	-2,69	1,86	-0,59	1,86	1,51	0,41	5,48	
IL6												
CC	18,63	2,25	24,82	1,05	-6,19	2,48	0,00	2,48	1,00	0,18	5,59	0,29
CT+TT	18,09	2,97	25,46	1,71	-7,37	3,43	-1,18	3,43	2,27	0,21	24,41	
IL8												
CC	19,71	2,55	24,82	1,05	-5,11	2,76	0,00	2,76	1,00	0,15	6,76	0,18
CT+TT	18,58	2,94	25,46	1,71	-6,88	3,40	-1,78	3,40	3,43	0,32	36,24	
TNF-ALFA												
CC	22,90	1,89	24,82	1,05	-1,91	2,16	0,00	2,16	1,00	0,22	4,47	0,11
CT+TT	22,41	2,15	25,46	1,71	-3,05	2,75	-1,14	2,75	2,21	0,33	14,81	
IL1RA												
CC	27,96	3,77	24,82	1,05	3,14	3,92	0,00	3,92	1,00	0,07	15,09	0,02
CT+TT	24,80	2,57	25,46	1,71	-0,66	3,09	-3,80	3,09	13,89	1,63	118,14	

Dos 10 genes inflamatórios testados, 3 apresentaram expressão relativa significativamente maior nos indivíduos portadores do alelo 242T (BMP2, IL1b e IL1Ra). Ainda, uma tendência a expressão aumentada em indivíduos portadores do alelo 242T foi também observada em outros 2 genes (CSF3 e TNF-alfa).

Desta maneira, os resultados apresentados sugerem que o polimorfismo C242T não tem importante papel na modulação vascular da expressão gênica basal do gene CYBA (p22phox). No entanto, a presença do alelo 242T parece estar associada a aumento significativo na expressão vascular basal de diversos genes com papel na modulação da resposta inflamatória vascular. Tal fato pode explicar os resultados observados até o presente momento, justificando assim, um papel na modulação do impacto de fatores de risco cardiovasculares na carga aterosclerótica e uma maior incidência de eventos cardiovasculares em pacientes com doença arterial coronária.

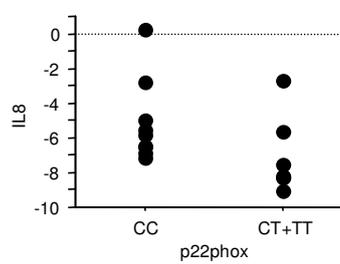
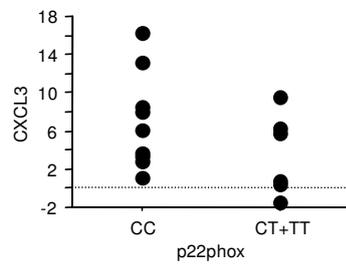
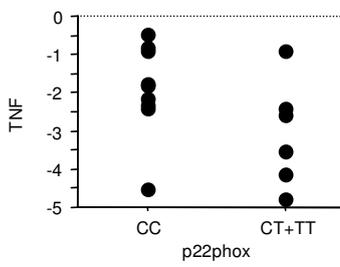
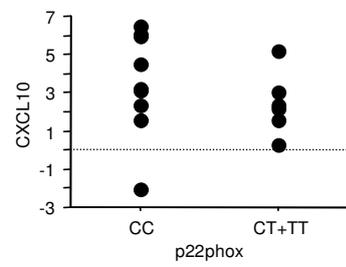
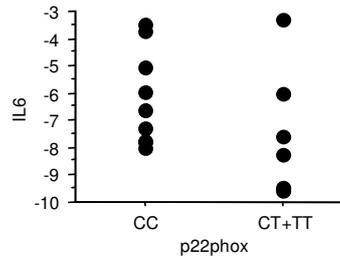
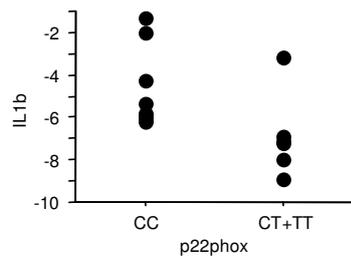
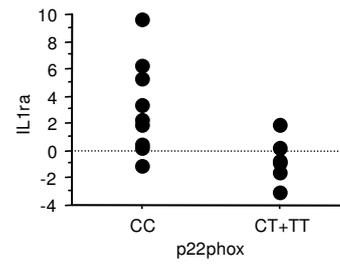
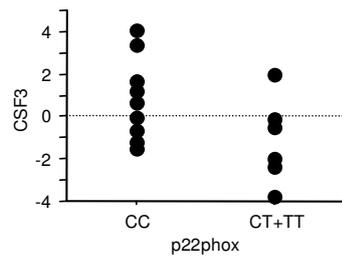
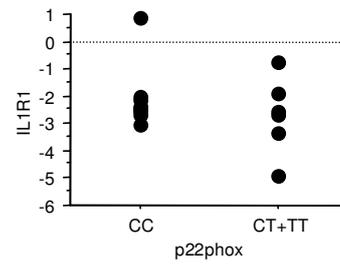
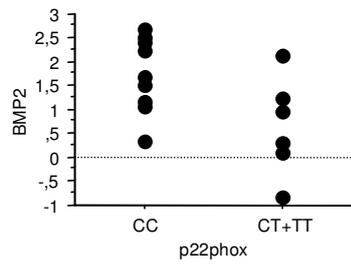


Figura 23: Pontos médios de 3 replicatas para valores deltaCt normalizados por 28S para cada vaso estudado de acordo com grupo genotípico do polimorfismo C242T para 10 genes inflamatórios. Note que valores menores de deltaCt representam expressão maior do gene estudado.

4.3. Objetivo 3

Avaliar se a informação clínica advinda do marcador molecular estudado pode ser associada a algoritmos clínicos de predição do risco cardiovascular.

4.3.1. Variáveis clínicas e demográficas preditoras do evento combinado morte + IAM incidente na população de indivíduos participantes do estudo MASS II

Ao abordar o objetivo 3 devemos inicialmente considerar quais são as variáveis demográficas, clínicas ou bioquímicas com poder preditivo sobre o desfecho combinado de morte + IAM incidente na população do estudo MASS II. Esta análise preliminar se faz de fundamental importância uma vez que eventualmente apenas a utilização de variáveis facilmente disponíveis e já comumente utilizadas pode gerar algoritmo com capacidade preditora eficiente e com elevada acurácia na predição de quais indivíduos terão morrido ou sofrido um IAM nos 5 anos seguintes à obtenção das informações de entrada sem que haja necessidade de associar informação advinda de um novo teste de estratificação (em nosso caso um teste genético de determinação do genótipo do polimorfismo p22phox C242T).

Com esse objetivo construímos modelo de regressão logística avaliando como variável dependente a ocorrência ou não de morte ou IAM incidente no período de 5 anos de seguimento e, como variáveis

independentes, variáveis demográficas, clínicas e bioquímicas utilizadas comumente em modelos de predição de eventos cardiovasculares em diversos cenários (prevenção primária, secundária e terciária).

Desta maneira, ao final de 5 anos de seguimento, 21% dos indivíduos participantes do estudo haviam apresentado o evento combinado estudado. Na tabela a seguir são apresentadas as variáveis consideradas no modelo de regressão logística como candidatas a predizer a ocorrência deste desfecho.

Tabela 15. Variáveis consideradas na criação de modelo de regressão logística para morte + IAM

IAM prévio
IMC
HAS
Sexo
DM tipo 2
Tabagismo
Idade
Colesterol total
Triglicérides
Tratamento recebido
Número de artérias epicárdicas acometidas

É interessante notar que, considerando-se as variáveis previamente listadas somente idade, presença de HAS e história prévia de IAM foram

incluídas no modelo final de predição. Na tabela a seguir descrevem-se as características finais do modelo.

Tabela 16. Variáveis no modelo logístico final

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Passo 1(a)	Idade (anos)	0,042808	0,011779	13,20821	1	0,000279	1,04
	Constant	-3,985152	0,735614	29,34874	1	6,05E-08	0,01
Passo 2(b)	Idade (anos)	0,048957	0,012139	16,26642	1	5,5E-05	1,05
	IAM	0,83818	0,21301	15,48375	1	8,32E-05	2,31
	Constant	-4,773049	0,783695	37,09345	1	1,13E-09	0
Passo 3(c)	Idade (anos)	0,048055	0,012193	15,53234	1	8,11E-05	1,05
	IAM	0,835177	0,213761	15,26506	1	9,34E-05	2,31
	HAS	-0,500064	0,223218	5,018693	1	0,025075	1,65
	Constant	-4,532045	0,790546	32,86506	1	9,88E-09	0,01

Com relação a estimativas da medida de força de associação no modelo final, os valores do R^2 de Cox & Snell e Nagelkerke foram respectivamente 0,057 e 0,090.

Ressalta-se que a despeito de obtermos um modelo com variáveis independentes e preditoras do evento estudado, a capacidade de discriminação destas variáveis não permite a construção de um algoritmo preditivo com acurácia adequada para seu uso clínico. A representação gráfica da capacidade de acurácia de cada uma das variáveis estudadas pode ser observada através das seguintes curvas ROC e suas respectivas áreas sob a curva (AUC).

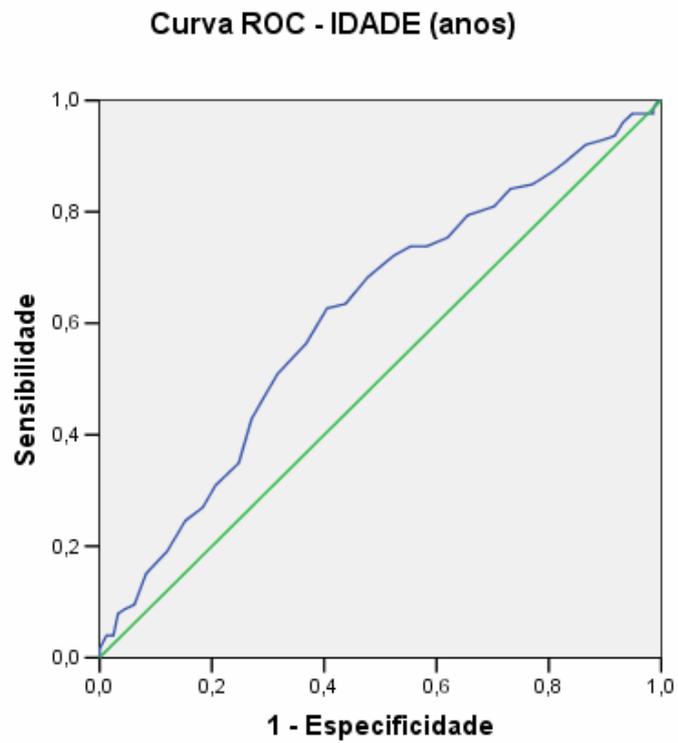


Figura 24. Curva ROC considerando a idade em anos como variável contínua e sua respectiva AUC para a predição de morte + IAM incidente. Área sob a curva = 0,613.

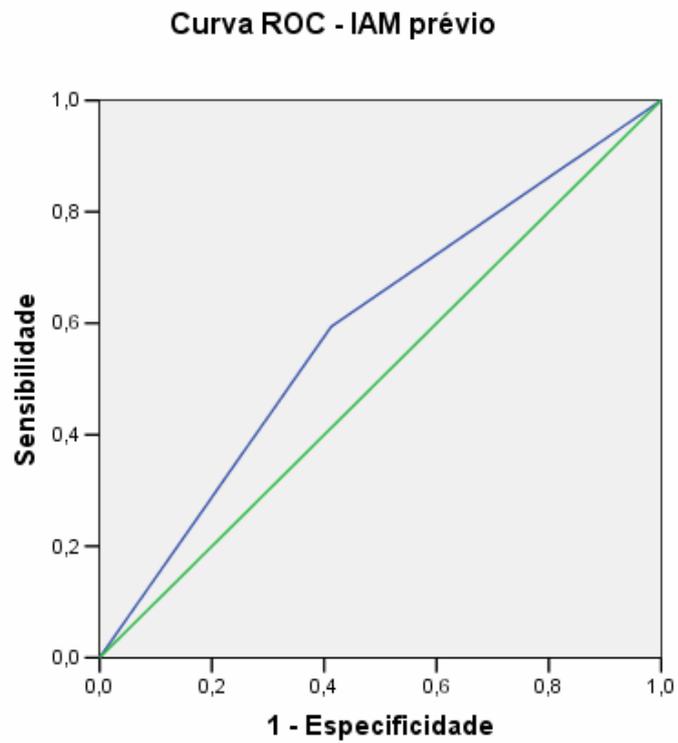


Figura 25. Curva ROC considerando IAM prévio e sua respectiva AUC para a predição de morte + IAM incidente. Área sob a curva = 0,591.

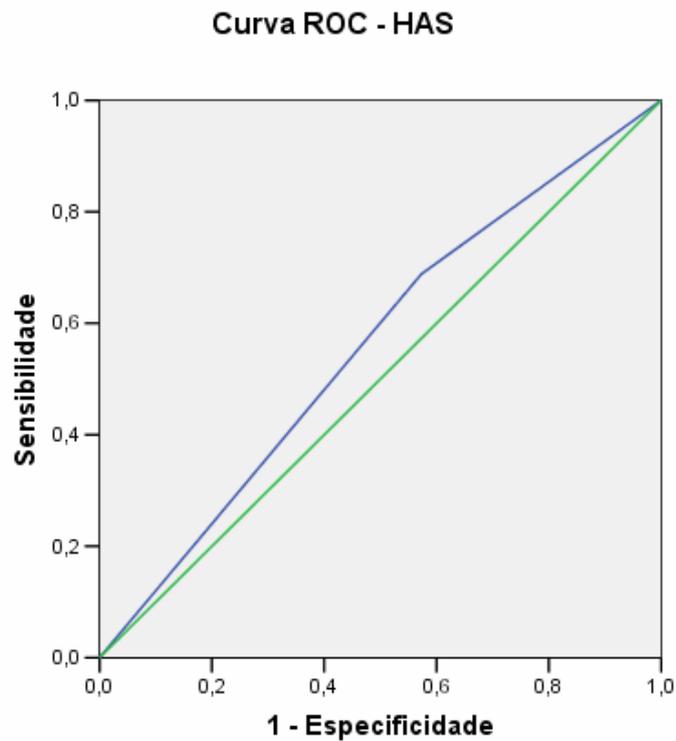


Figura 26. Curva ROC considerando HAS e sua respectiva AUC para a predição de morte + IAM incidente. Área sob a curva = 0,558.

Claramente, muito embora estas variáveis estejam associadas ao desfecho estudado, seu uso individual como preditoras do evento não parece ter grande aplicabilidade em virtude da baixa acurácia diagnóstica de cada variável individualmente. Na tabela a seguir apresentamos as sensibilidades, especificidades e acurácia das três variáveis selecionadas pelo modelo quando utilizadas individualmente.

Tabela 17. Sensibilidade, especificidade e acurácia das variáveis selecionadas na predição do desfecho óbito + IAM incidente em 5 anos de seguimento.

	Sensibilidade	Especificidade	Área sob a curva
Idade (anos)	0,63	0,60.	0,61
IAM prévio	0,59	0,59	0,59
HAS	0,69	0,43	0,56

A pequena contribuição relativa de cada uma das variáveis selecionadas no modelo apresentado pode também ser contemplada através da utilização de árvores de classificação, onde a diferença na incidência de eventos em cada subgrupo pode ser observada.

Nas figuras a seguir apresentam-se a capacidade de classificação de cada uma das variáveis selecionadas com relação à diferença na incidência de eventos em cada grupo definido.

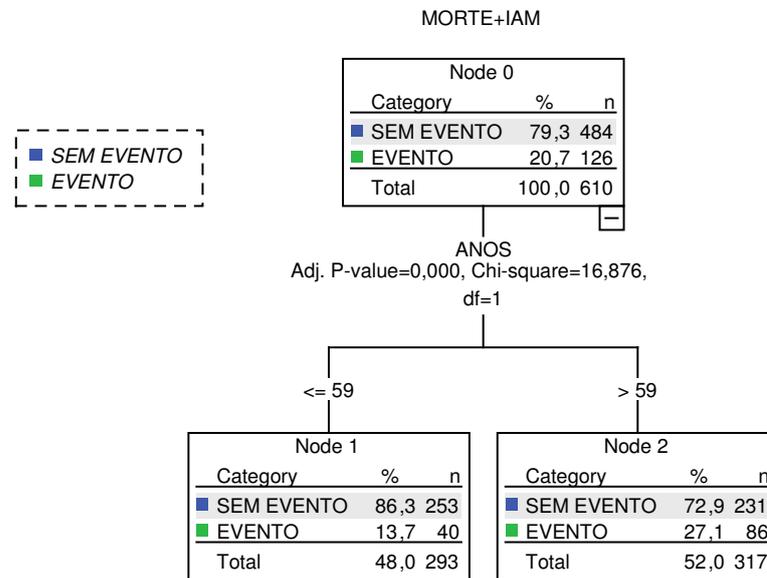


Figura 27. Árvore de classificação utilizando como variável dependente a ocorrência ou não de evento morte ou IAM incidente e variável independente idade em anos.

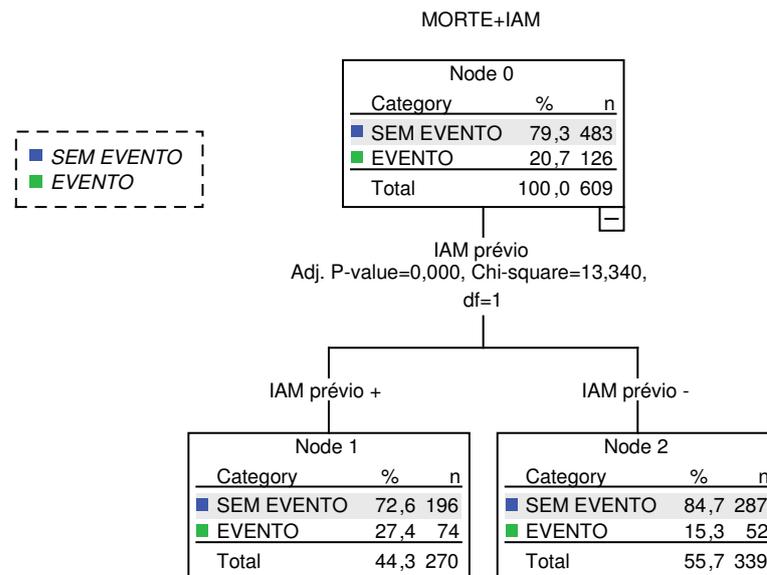


Figura 28. Árvore de classificação utilizando como variável dependente a ocorrência ou não de evento morte ou IAM incidente e variável independente história de IAM prévio.

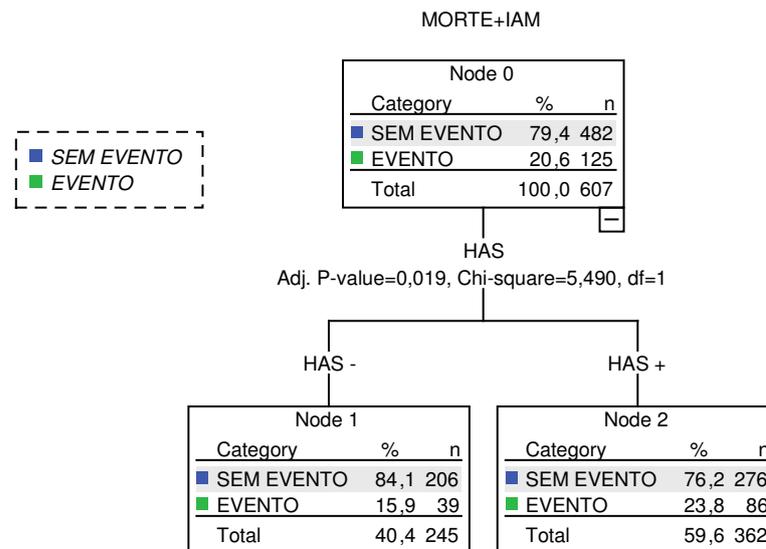


Figura 29. Árvore de classificação utilizando como variável dependente a ocorrência ou não de evento morte ou IAM incidente e variável independente história de HAS.

Note-se que a capacidade de estratificação das variáveis selecionadas é baixa. Mesmo a melhor variável selecionada (idade em anos) apresenta uma discreta capacidade, conseguindo estratificar dois grupos: um com baixo risco (incidência de evento de 13,7%) e outro com alto risco (incidência de evento de 27,1%).

Mesmo a utilização conjunta das três variáveis na delimitação do risco de apresentar o evento estudado não se constitui em ferramenta com alta acurácia.

A construção do modelo de regressão logística com dados prospectivamente adquiridos permite que se possa utilizar o modelo ajustado para a obtenção do risco predito para cada indivíduo da amostra. No caso do modelo gerado para a predição do evento morte + IAM incidente, esse risco é dado pela seguinte fórmula:

$$1/1+\text{EXP}(-(-5.027+(0.048*\text{IDADE EM ANOS})+(0.834*\text{IAM PRÉVIO})+(0.502*\text{HAS})))$$

Através da aplicação da fórmula acima aos dados empiricamente observados, obtém-se o seguinte histograma de distribuição de risco na população estudada.

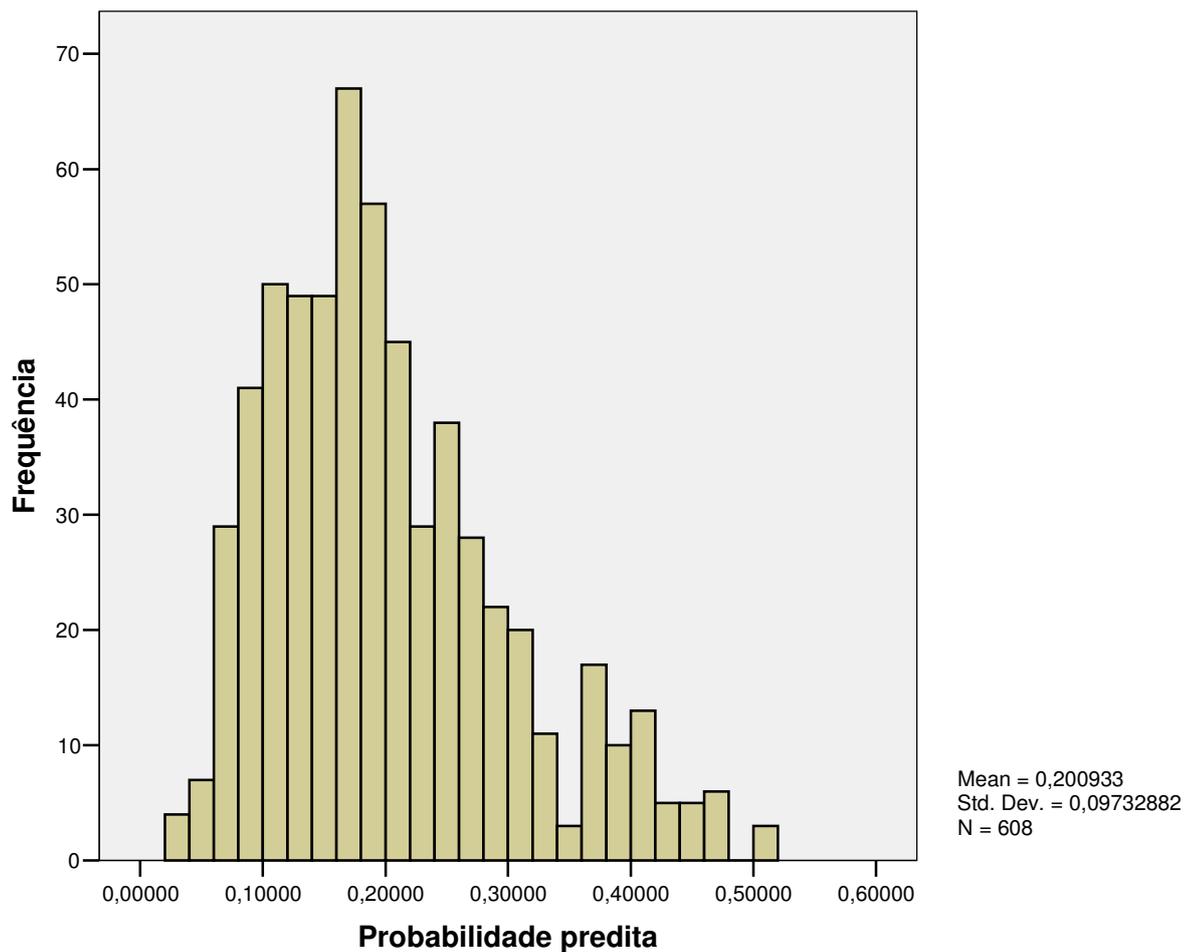


Figura 30. Histograma de distribuição da probabilidade predita de evento de acordo com modelo logístico empiricamente observado.

A utilização das probabilidades preditas utilizando um modelo contendo idade em anos, história de IAM prévio e HAS melhora a acurácia preditora da ferramenta diagnóstica proposta. Tal fato pode ser observado na curva ROC apresentada a seguir.

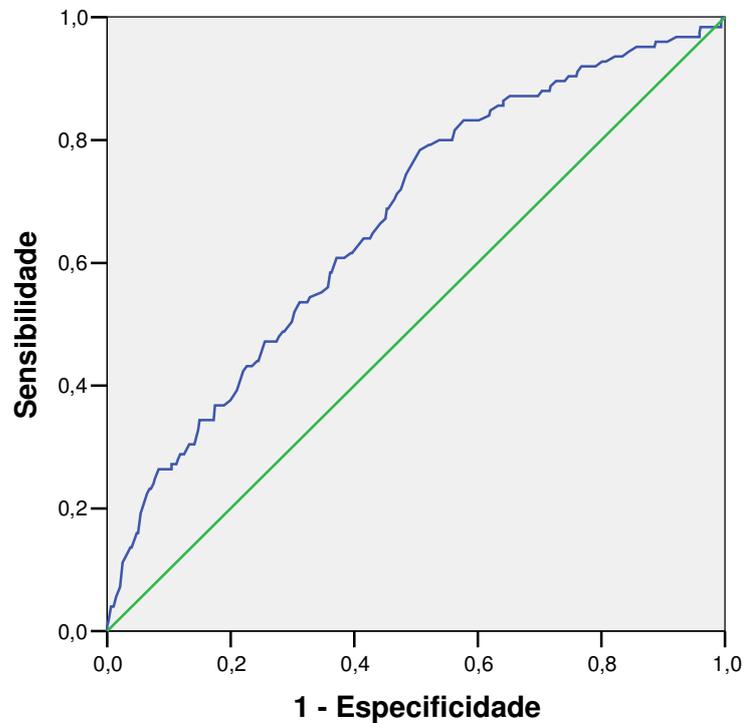
Curva ROC - Idade, IAM prévio, HAS

Figura 31. Curva ROC considerando Idade, IAM prévio e HAS e sua respectiva AUC para a predição de morte + IAM incidente. Área sob a curva = 0,669.

Como esperado o uso de informação advinda das 3 variáveis selecionadas como preditoras independentes de morte + IAM incidente adiciona capacidade de estratificação ao modelo. Nesta situação, o ponto de corte com melhor poder discriminativo (probabilidade maior ou menor que 16,5%) tem sensibilidade de 83,2%, especificidade de 42,3% e área sob a curva de 0,67.

A vantagem na utilização conjunta das 3 variáveis predictoras também pode ser observada através da construção de árvores de classificação.

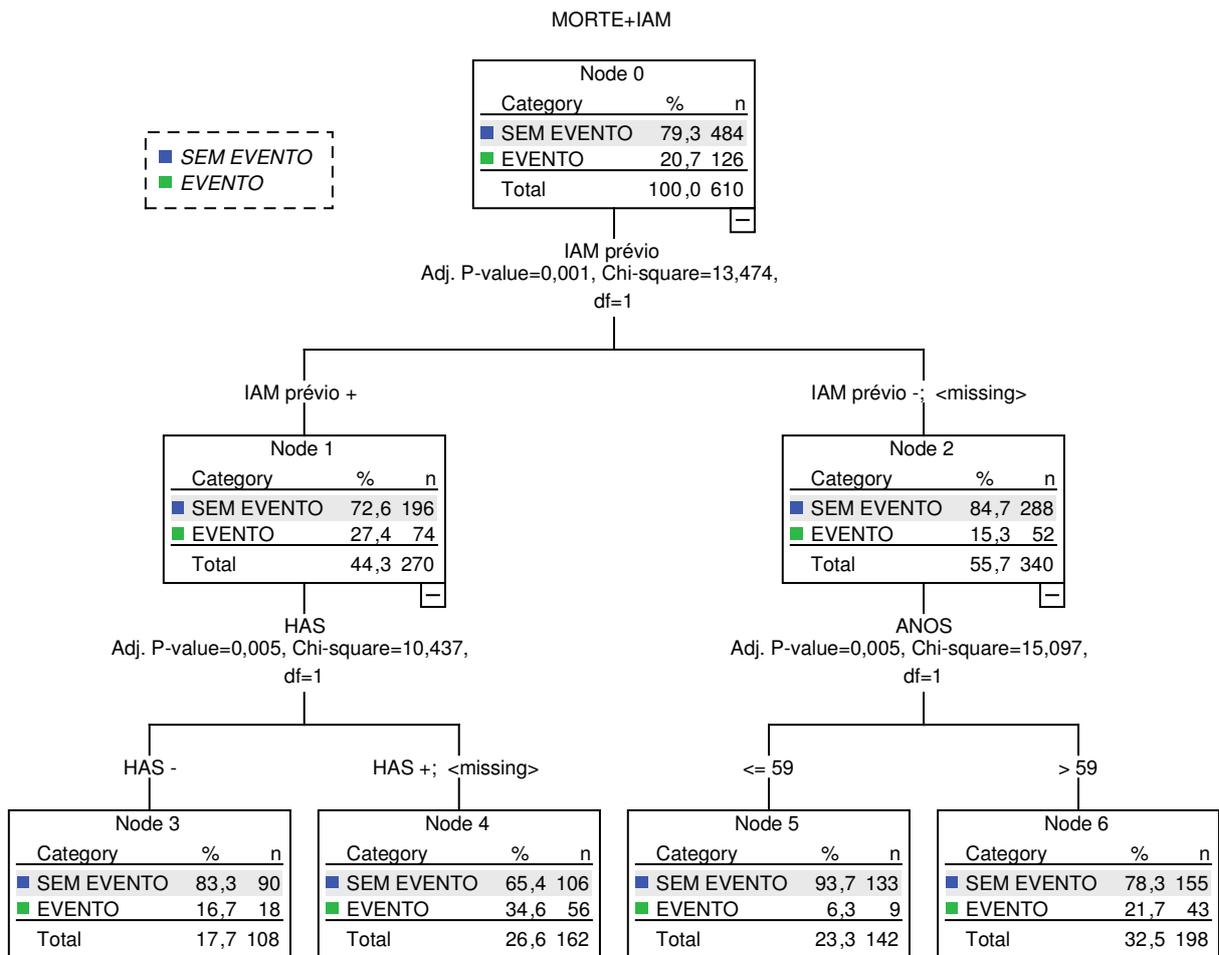


Figura 32. Árvore de classificação utilizando como variável dependente a ocorrência ou não de evento morte ou IAM incidente e variáveis independentes idade em anos, história de IAM prévio e história de HAS.

Como esperado, a utilização de informação advinda de 3 variáveis consegue estratificar a população de indivíduos estudados em 4 diferentes grupos, um com baixo risco de evento (incidência predita em 6,3%), um com alto risco de evento (incidência predita em 34,6%) e dois com risco intermediário de evento (incidências previstas em 17,7% e 26,6%).

A despeito da melhor acurácia alcançada na discriminação do risco de eventos utilizando-se o modelo construído através de informações de variáveis demográficas, clínicas e bioquímicas, fica clara a necessidade de melhorar a capacidade preditora de tal modelo caso sua utilização como ferramenta clínica seja vislumbrada.

4.3.2. Adicionando informação genética ao modelo preditivo: existe ganho de acurácia?

Após definir a necessidade de um melhor modelo preditivo do desfecho estudado (morte + IAM incidente), a consideração sobre o acréscimo de informação advinda com a utilização de variável genética passa a ser relevante.

Neste cenário, um novo modelo logístico deve preferivelmente contemplar a presença da variável genética a ser acrescentada como preditora independente do desfecho de interesse.

A introdução do genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox como variável independente no modelo de regressão logística proposto pode

ser avaliada quanto às alterações das estimativas relativas de risco na tabela abaixo.

Tabela 18. Variáveis na Equação

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Passo 1(a)	P22phox C242T	0,85	0,24	13,07	1	0,00	2,35
	Constant	-1,96	0,20	100,49	1	0,00	0,14
Passo 2(b)	IAM prévio	0,78	0,22	12,28	1	0,00	2,19
	P22phox C242T	0,89	0,24	13,90	1	0,00	2,43
	Constant	-2,37	0,24	98,79	1	0,00	0,09
Passo 3(c)	Idade (anos)	0,04	0,01	11,67	1	0,00	1,04
	IAM prévio	0,88	0,23	14,81	1	0,00	2,41
	P22phox C242T	0,90	0,24	13,81	1	0,00	2,45
	Constant	-5,07	0,84	36,14	1	0,00	0,01
Passo 4(d)	Idade (anos)	0,04	0,01	10,73	1	0,00	1,04
	HAS	0,52	0,24	4,73	1	0,03	1,69
	IAM prévio	0,87	0,23	14,33	1	0,00	2,39
	P22phox C242T	0,89	0,24	13,37	1	0,00	2,42
	Constant	-5,30	0,86	38,10	1	0,00	0,00

Chama atenção que não apenas informação genotípica do polimorfismo C242T é independentemente associada ao desfecho estudado (informação já explorada no objetivo 1 através de modelo de riscos proporcionais de Cox), mas também que a contribuição relativa do polimorfismo C242T é a primeira variável a entrar no modelo, denotando seu importante peso na estimativa final da acurácia do mesmo.

Ao compararmos as estimativas da medida de força de associação no modelo final, os valores do R^2 de Cox & Snell e Nagelkerke foram respectivamente 0,077 e 0,123, ambos maiores do que os observados no modelo prévio, que não levava em consideração informações advindas do conhecimento de teste genético (0,057 e 0,090, respectivamente).

Interessantemente, o novo modelo, que leva em consideração informações genéticas, parece também desempenhar melhor sua função preditora de eventos. A comparação das curvas ROC mostra um ganho de acurácia representado pela maior área sob a curva para o modelo envolvendo informações clínicas e genéticas quando comparado ao modelo envolvendo apenas informações clínicas (0,69 versus 0,66, respectivamente).

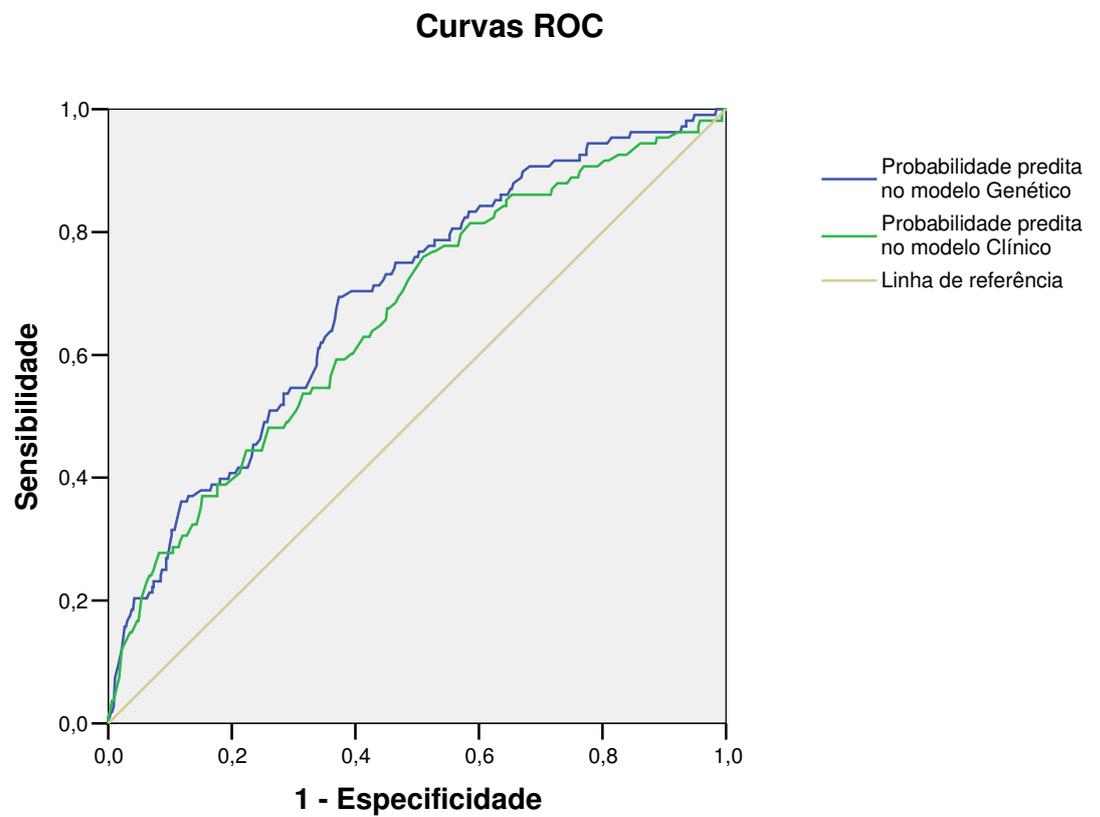


Figura 33. Curvas ROC para o modelo utilizando apenas variáveis clínicas (curva verde) e modelo utilizando variáveis clínicas e genéticas (curva azul).

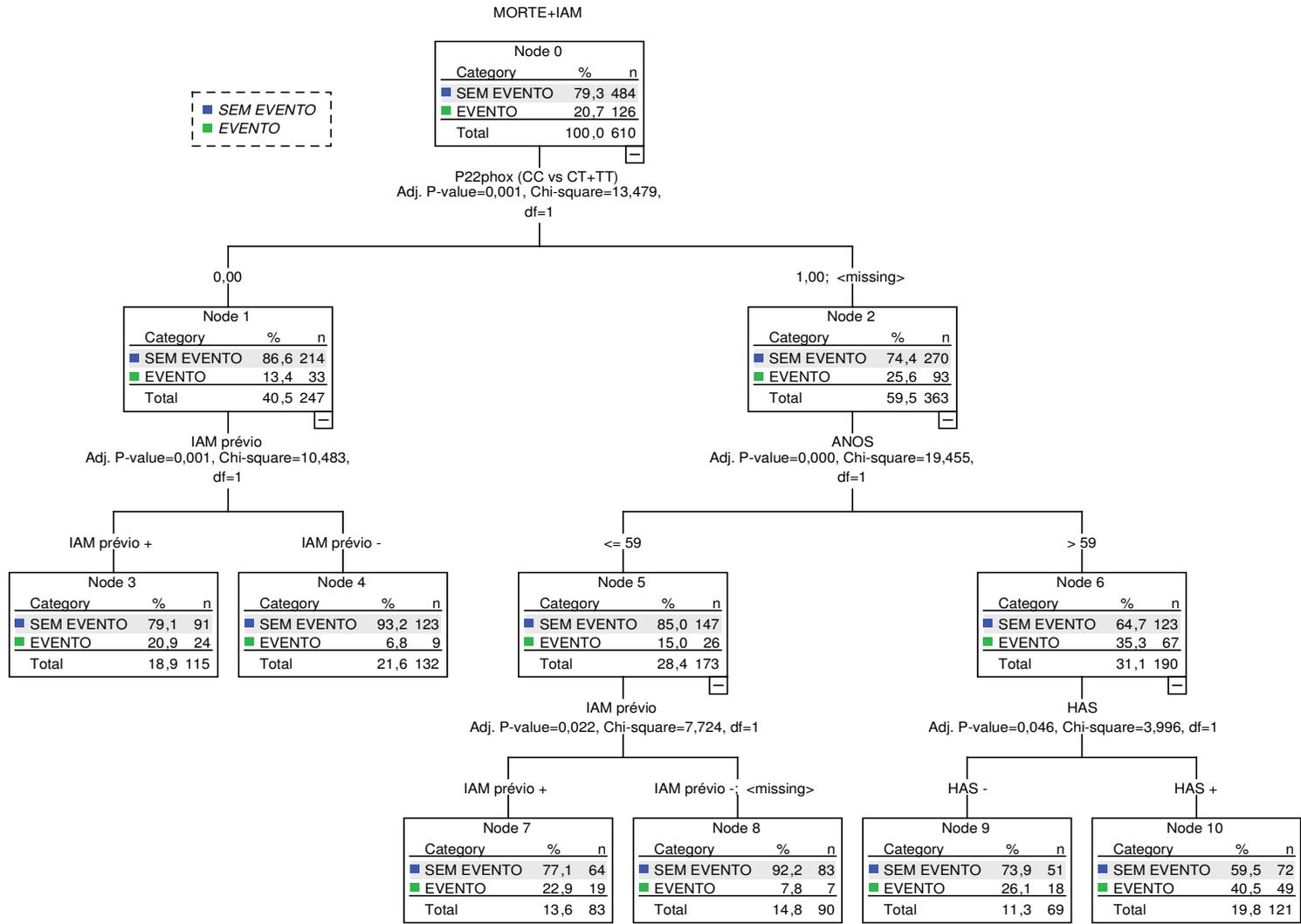
Comparando-se as sensibilidades, especificidades e áreas sob a curva dos dois diferentes modelos obtemos:

Também através de árvores de classificação obtemos um cenário com maior poder de discriminação ao utilizarmos o modelo contendo informações clínicas e genéticas.

Tabela 19. Sensibilidade, especificidade e acurácia das variáveis selecionadas na predição do desfecho óbito + IAM incidente em 5 anos de seguimento.

	Sensibilidade	Especificidade	Área sob a curva
Modelo Clínico	0,76	0,49	0,66
Modelo Genético	0,69	0,63	0,69

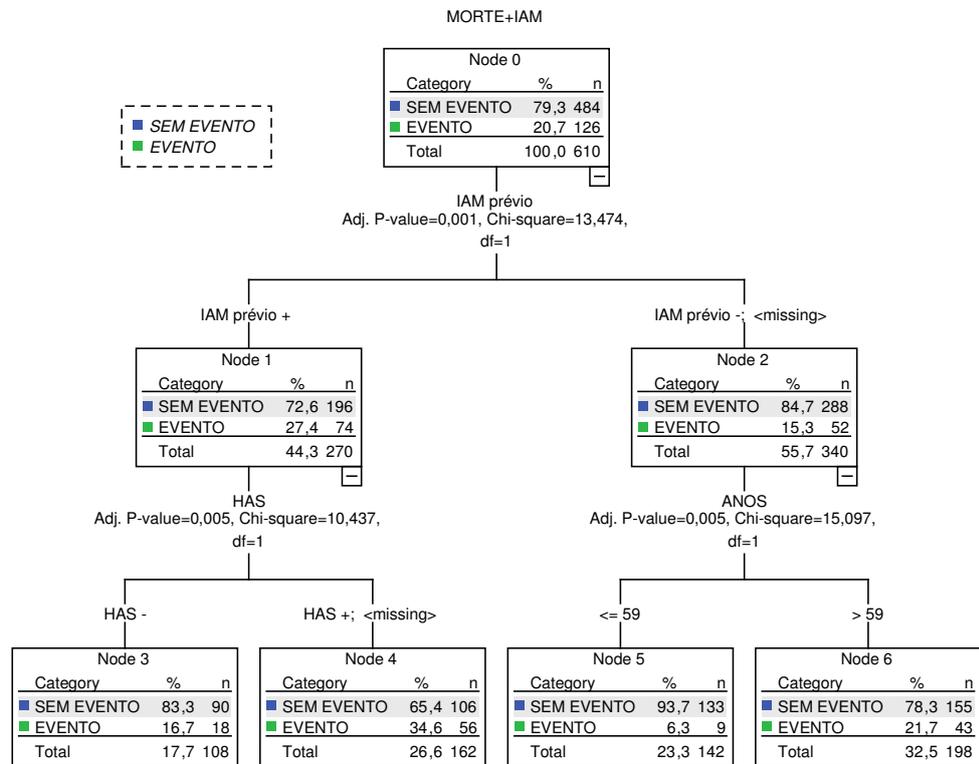
Figura 34. Árvore de classificação utilizando variáveis clínicas e genética



Através da utilização da metodologia apresentada, o modelo contendo informações genéticas é capaz de estratificar indivíduos em 6 diferentes grupos, 2 de baixo risco (6,8% e 7,8%), um de alto risco (40,5%) e três com taxas de incidência de eventos intermediária.

A melhor capacidade discriminatória resultante do modelo envolvendo a inclusão de informações de variável genética pode ser observada através da construção de curvas de incidência de eventos estratificadas para os diferentes nós obtidos nas árvores de classificação.

A.



B.

Incidência de Mortalidade - Modelo Clínico

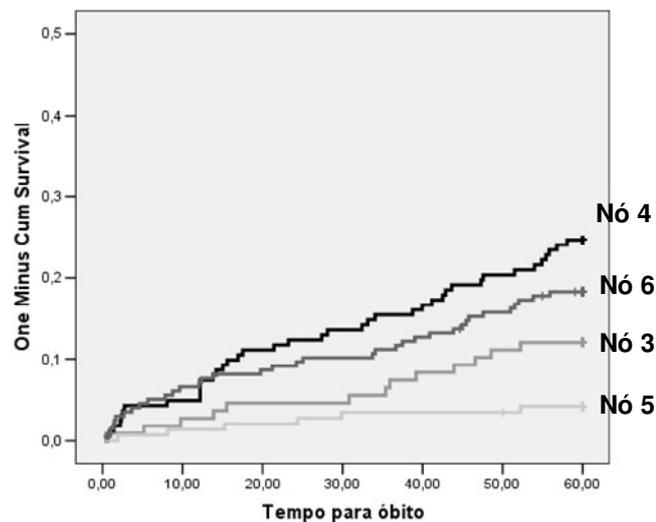
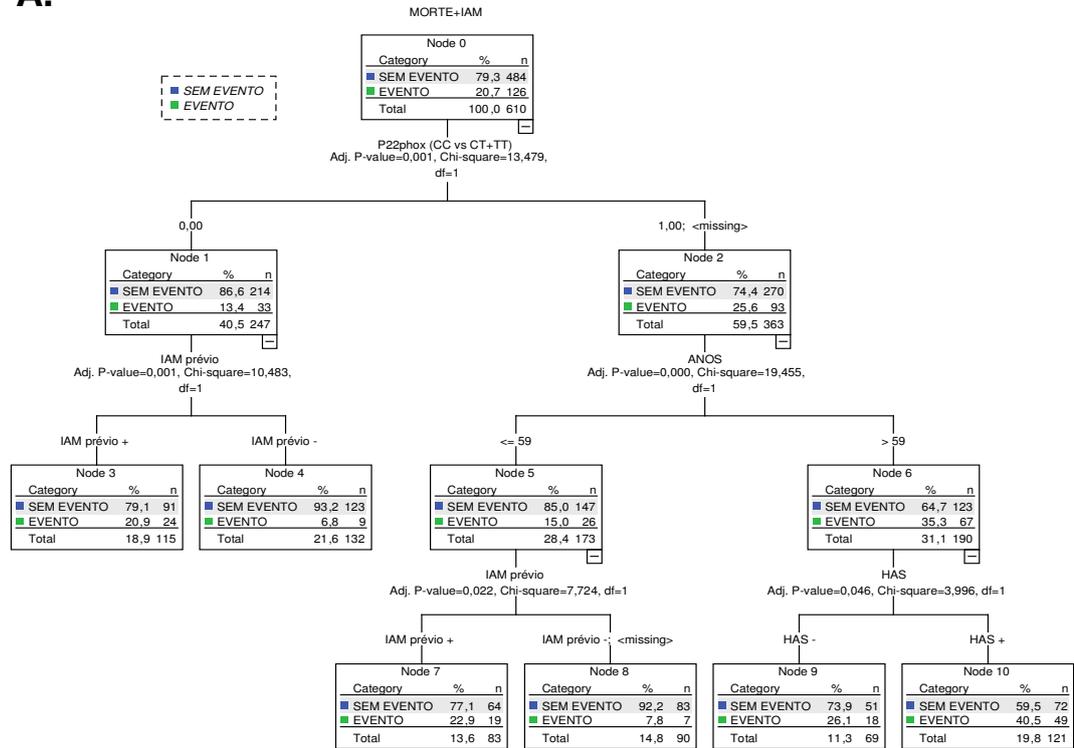


Figura 35: Árvore de classificação do modelo clínico definindo 4 diferentes nós e curva de mortalidade representando tempo para óbito nos 4 nós previamente definidos.

A.



B.

Incidencia de Mortalidade - Modelo Genético

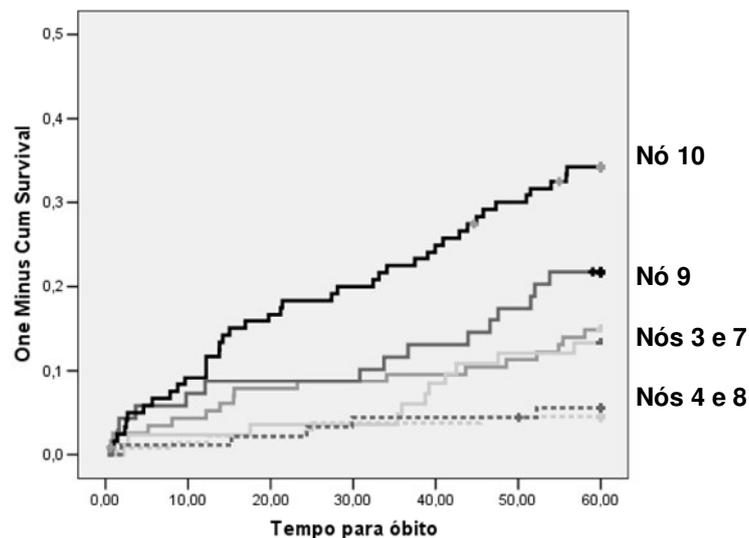


Figura 36. Árvore de classificação do modelo genético definindo 6 diferentes nós e curva de mortalidade representando tempo para óbito nos 6 nós previamente definidos.

As diferentes curvas obtidas nos modelos acima descritos podem ser comparadas 2x2 através do teste de log-rank. As tabelas a seguir trazem os resultados destas comparações.

Tabela 20. Diferenças entre curvas de Kaplan-Meier para nós definidos no modelo clínico

	# Nó	3	4	5	6
		Chi-Square Sig.	Chi-Square Sig.	Chi-Square Sig.	Chi-Square Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3		6,49 0,01	5,24 0,02	2,08 0,15
	4	6,49 0,01		24,22 0,00	2,02 0,16
	5	5,24 0,02	24,22 0,00		14,78 0,00
	6	2,08 0,15	2,02 0,16	14,78 0,00	

Tabela 21. Diferenças entre curvas de Kaplan-Meier para nós definidos no modelo genético

	# Nó	3	4	7	8	9	10
		Chi-Square Sig.					
Log Rank (Mantel-Cox)	3		7,57 0,01	0,11 0,74	4,42 0,04	1,45 0,23	11,95 0,00
	4	7,57 0,01		5,16 0,02	0,11 0,74	14,37 0,00	36,48 0,00
	7	0,11 0,74	5,16 0,02		2,92 0,09	1,96 0,16	11,52 0,00
	8	4,42 0,04	0,11 0,74	2,92 0,09		9,26 0,00	24,08 0,00
	9	1,45 0,23	14,37 0,00	1,96 0,16	9,26 0,00		3,32 0,07
	10	11,95 0,00	36,48 0,00	11,52 0,00	24,08 0,00	3,32 0,07	

Após o exposto, pode-se concluir que o polimorfismo C242T do gene da p22phox não apenas encontra-se associado de maneira independente a uma maior incidência de eventos cardiovasculares na população estudada, como também sua utilização em algoritmo clínico de predição de eventos em uma população de pacientes portadores de doença arterial coronária multiarterial com função ventricular preservada adiciona informação ao modelo utilizando apenas informações clínicas, demográficas e bioquímicas e contribui para uma melhor estratificação de risco em indivíduos da população estudada.

5 . Discussão

5. DISCUSSÃO

“...why should the offspring at one time bear a stronger resemblance to the father, at another to the mother, and, at a third, to progenitors both maternal and paternal, farther removed?”

William Harvey, *De Generatione Animalium*, 1651

“Long life, is like some Diseases, a Thing Hereditarie, within certaine Bounds.”

Francis Bacon, *Historie Naturall and Experimentall of Life and Death*, 1638

Foi necessário muito tempo para que a humanidade descobrisse a existência de relações biológicas consistentes entre pais e filhos.

Até há aproximadamente 2 séculos a palavra “hereditário” não tinha qualquer significado biológico. Não existiam estudos sobre hereditariedade pelo simples fato de que até aquele momento na história da humanidade este fenômeno ainda não havia sido “descoberto”, conceituado.

Interessante notar que as ferramentas necessárias para que as bases desse fenômeno pudessem começar a ser entendidas não foram novos aparatos tecnológicos, mas sim bancos de dados que pudessem ser analisados estatisticamente (Cobb 2006).

5.1. Superóxido e doença vascular

As primeiras alterações descritas da doença vascular são anormalidades no endotélio, resultando na perda das funções de homeostase características do órgão e que inibem processos relacionados a patologias como inflamação e trombose. Em particular, o óxido nítrico (NO) produzido pela NO-sintase no endotélio vascular (eNOS) tem a capacidade de modular pressão e fluxo e importantes efeitos anti-aterogênicos em plaquetas, células musculares lisas e células endoteliais (Fortuno, Jose et al. 2005).

Em humanos a função endotelial dependente de NO se encontra deficiente em estados pré-ateroscleróticos como na hipercolesterolemia, no diabetes mellitus, na hipertensão e no tabagismo. Ainda mais interessante, estudos prospectivos foram capazes de identificar a disfunção endotelial

como uma variável independente, preditora de eventos cardiovasculares (Schachinger, Britten et al. 2000; Heitzer, Schlinzig et al. 2001).

Os mecanismos que resultam na perda da bioatividade de NO na doença vascular, a despeito de muito estudados, permanecem pouco conhecidos. Um aumento na produção local ou sistêmica de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o anion superóxido parece contribuir para este déficit. De fato, a contribuição de radicais livres na disfunção endotelial mediada por NO também é uma variável preditora de uma maior incidência de eventos cardiovasculares (Heitzer, Schlinzig et al. 2001).

As diferentes fontes de superóxido no tecido vascular variam em diferentes tipos de vasos e em diferentes espécies. Em humanos, a produção de superóxido é observada em células da camada média e adventícia vascular e, em menor quantidade, em células endoteliais. Em alguns estados patológicos, como no diabetes, por exemplo, a contribuição de células endoteliais para a produção de superóxido parece ser mais proeminente (Channon and Guzik 2002).

Nas diferentes células que formam a parede vascular o superóxido pode ser produzido por diferentes oxidases. Fontes potenciais de produção vascular de superóxido incluem NADPH oxidases, xantino oxidases, lipoxigenase, oxidases mitocondriais e NO sintases. Uma série de estudos demonstrou a grande importância relativa de NADPH oxidases na produção de superóxido em tecido vascular humano (Guzik, West et al. 2000).

NADPH oxidases são proteínas formadas por várias subunidades protéicas presentes em vasos humanos, o que inclui artérias coronárias

normais e doentes, veias safenas, artérias mamárias e células musculares lisas e endoteliais em sistemas de cultura *ex vivo*. O sistema da NADPH oxidase, mais conhecido por seu papel no processo de oxidação respiratória neutrofílico é formado por múltiplas subunidades protéicas que incluem p47phox, p67phox, p22phox, Rac e gp91phox ou outra proteína da família Nox. A subunidade p22phox é necessária para a atividade enzimática em todas as NADPH oxidases e se liga à subunidade Nox formando o citocromo b558. Níveis aumentados de p22phox, p47phox, p67phox e Nox estão presentes em artérias coronárias humanas com aterosclerose e em vasos de indivíduos com diabetes e associam-se a uma produção aumentada de superóxido. Tal fato sugere que o aumento de expressão gênica e/ou aumento dos níveis protéicos mediado por alterações pós-transcricionais são importantes na regulação de um aumento de atividade de NADPH oxidase na doença vascular. Ainda, a ativação aguda de subunidades do complexo da NADPH oxidase (via fosforilação protéica, por exemplo) parece também ter relevância na modulação da função enzimática do complexo.

A associação entre o processo de neutralização do NO proporcionado pelo superóxido sugere que a produção de superóxido pode, em parte, modular a disfunção endotelial na aterosclerose humana. No entanto, o número de estudos *in vivo* disponíveis ainda é pequeno. Huraux e colaboradores encontraram grande variabilidade tanto na vasodilatação mediada por NO quanto na produção basal de superóxido em artérias mamárias (Huraux, Makita et al. 1999). Guzik e colaboradores observaram uma relação inversa entre o perfil de risco cardiovascular e vasodilatação

mediada por NO em estudos de tensão isométrica e uma relação direta entre o perfil de risco cardiovascular e a produção de superóxido pela NADPH oxidase (Guzik, West et al. 2000).

5.2. Fatores genéticos modulando a produção vascular de superóxido

A identificação das NADPH oxidases como a principal fonte de produção vascular de superóxido na aterosclerose levou a um grande interesse na identificação de variantes genéticas nos genes codificantes para as diferentes subunidades da NADPH oxidase que pudessem modular a produção vascular de superóxido.

De fato, evidências de um importante componente genético na determinação da variabilidade inter-individual de fenótipos intermediários relacionados a processos de homeostase oxidativa estão presentes na literatura (Wang, Rainwater et al. 2001). Wang *et al.* observaram uma herdabilidade de 51% na variabilidade inter-individual da atividade antioxidante total do plasma, uma medida que reflete o balanço entre oxidantes e antioxidantes no sistema, em uma população de indivíduos de origem mexicana nos EUA (Wang, Rainwater et al. 2001). Da mesma maneira, Lacy *et al.* observaram que a herdabilidade dos níveis plasmáticos de peróxido de hidrogênio varia entre 20 e 35% da variância inter-individual observada (Lacy, Kailasam et al. 2000).

Polimorfismos genéticos comuns na região promotora e codificante do gene CYBA (p22phox) podem ter importantes efeitos na expressão gênica,

atividade enzimática ou na geração de superóxido vascular, justificando em parte a grande variabilidade inter-individual nos processos de estresse oxidativo vascular e bioatividade de NO.

O polimorfismo C242T no gene da p22phox leva à substituição de tirosina por histidina na posição 72 da p22phox. Devido à relação de 1:1 entre a p22phox e a gp91phox e devido ao fato da necessária presença da p22phox para a estabilização do ambiente heme nativo do citocromo b558 é possível que o polimorfismo C242T possa regular a estabilidade da ligação entre p22phox e gp91phox e, conseqüentemente, a atividade enzimática de NADPH oxidase.

Inicialmente, Inoue e colaboradores descreveram uma associação entre o genótipo TT do polimorfismo C242T e um risco diminuído de desenvolvimento de DAC em indivíduos japoneses (Inoue, Kawashima et al. 1998). Ainda, Guzik e colaboradores encontraram uma associação entre a presença do alelo T242 e uma expressão basal diminuída do mRNA do gene da p22phox. Ainda, estes autores relataram uma estimulação da produção de superóxido diminuída em vasos de indivíduos portadores do alelo T242 quando comparada a de indivíduos portadores do alelo C242 (Guzik, West et al. 2000).

De maneira contrária, uma série de autores observou uma associação entre a presença do alelo 242T e uma maior chance de DAC (Cahilly, Ballantyne et al. 2000; Nasti, Spallarossa et al. 2006; Niemiec, Zak et al. 2007), e uma maior produção de superóxido (Shimo-Nakanishi, Hasebe et al. 2004) ou oxidação lipídica (Nakano, Matsunaga et al. 2003). Apesar das associações positivas entre a presença do alelo 242T e aterosclerose em alguns estudos,

nenhum estudo até o presente momento havia reportado associação entre este marcador genético e eventos cardiovasculares em humanos.

5.3. Discussão geral dos resultados obtidos

Neste trabalho descreve-se uma associação positiva entre a presença do alelo 242T e uma maior incidência de morte ou IAM incidente em pacientes com DAC multiarterial seguidos prospectivamente por 5 anos. A maior mortalidade associada à presença do alelo 242T se manteve consistentemente presente mesmo após ajuste para fatores de risco cardiovasculares tradicionais em modelo multivariado. Mostra-se, ainda, que a mesma associação foi confirmada em uma segunda amostra de pacientes similares, porém com menor gravidade de doença arterial coronária, o que sugere a consistência da associação descrita para indivíduos da população brasileira.

Estudos anteriores descreveram associações entre o polimorfismo C242T da p22phox e doença cardiovascular com resultados discordantes. Inoue e colaboradores encontraram uma associação entre o genótipo TT e um risco diminuído de desenvolvimento de DAC numa população de indivíduos japoneses (Inoue, Kawashima et al. 1998). Outros estudos, como já descrito, descreveram uma associação no sentido contrário, ou descreveram haver ausência de associação entre este marcador e fenótipos cardiovasculares.

Uma das possibilidades para tantos achados discordantes seria que o polimorfismo C242T é um marcador molecular não diretamente responsável pela alteração funcional causadora do aumento de risco cardiovascular, mas sim em desequilíbrio de ligação com o alelo responsável. Neste cenário, diferentes etnias e, conseqüentemente, diferentes estruturas populacionais para o *locus* do gene da p22phox poderiam explicar grande parte da variabilidade encontrada entre diferentes estudos.

O padrão da estrutura de desequilíbrio de ligação do *locus* estudado foi avaliado em diferentes populações mundiais e, de maneira original, em indivíduos da população brasileira.

A análise do padrão de desequilíbrio de ligação para o *locus* do gene da p22phox em diferentes populações humanas utilizou dados disponibilizados pelo projeto *HapMap* humano e permitiu a observação de que este *locus* é delimitado por um único bloco de desequilíbrio de ligação em todas as populações estudadas. Ainda, nesta mesma análise, reúnem-se elementos para colocar o marcador rs4673, polimorfismo C242T do gene da p22phox, como um marcador molecular com uma pequena estrutura de correlação com outros marcadores contíguos. Desta forma, o resultado de associação obtido parece estar pouco sujeito aos efeitos de confusão de associação por desequilíbrio de ligação (neste caso, por um marcador em outro gene que não o da p22phox). De particular importância, apenas marcadores nos genes IL17c e MVD, poderiam justificar, apesar de com baixa probabilidade, o resultado de associação positivo encontrado para o polimorfismo C242T do gene p22phox. Isto coloca alteração molecular na

própria proteína p22phox como a principal candidata a explicar o mecanismo molecular da associação descrita.

Na tentativa de melhor delimitar outros marcadores nesta mesma região genômica potencialmente associados ao fenótipo cardiovascular descrito, a estrutura de desequilíbrio de ligação do gene da p22phox foi delimitada em indivíduos da população brasileira. Com este objetivo, 6 novos marcadores genéticos foram genotipados na região do gene da p22phox e nos dois genes contíguos, MVD e IL17c. Após essa análise, o marcador rs4673, polimorfismo C242T, apresentou apenas desequilíbrio de ligação significativo com marcadores dentro do próprio gene da p22phox, em nosso painel apenas com o marcador rs71955830. Outros marcadores situados nos genes da IL17c, MVD ou NHN1 não apresentam correlação significativa com o marcador rs4673, o que torna improvável que possam explicar a associação descrita entre rs4673 e eventos cardiovasculares nas populações estudadas.

Interessantemente, apenas o marcador rs4673 mostrou-se significativamente associado ao fenótipo combinado testado (IAM incidente + morte). Ainda, o marcador rs71955830, que também está localizado no gene da p22phox e apresenta um valor de desequilíbrio de ligação de 95 com rs4673, não esteve associado de maneira significativa ao fenótipo estudado. Finalmente, utilizando-se os dois marcadores pertencentes ao único bloco de desequilíbrio de ligação observado na região testada (rs71955830 e rs4673) não houve acréscimo significativo na associação encontrada (valor de chi-quadrado de 4,76 e p valor de 0,03), sugerindo que toda a associação

observada advém fundamentalmente da informação fornecida pelo marcador rs4673.

Neste sentido, os dados descritos sugerem fortemente que o resultado de associação deve-se fundamentalmente à variabilidade genética existente no gene da p22phox (uma vez que não observamos em nossa população desequilíbrio de ligação significativo entre rs4673 e marcadores localizados nos genes contíguos a p22phox). Ainda, sugere-se que a associação descrita pode potencialmente ser causada diretamente por modificação molecular induzida pelo polimorfismo C242T e não explicada por outra alteração genética em desequilíbrio de ligação com a mesma.

A hipótese de que a associação entre o polimorfismo C242T e a incidência de eventos cardiovasculares pudesse ser explicada por uma modulação de fatores de risco cardiovascular maiores não parece encontrar evidência empírica na população brasileira estudada. De fato, não se observou qualquer associação entre o polimorfismo C242T e fatores de risco cardiovascular que pudessem modular a associação descrita com o fenótipo de morte ou IAM incidente.

Ainda, apesar de não observarmos associação direta entre o genótipo do polimorfismo C242T do gene da p22phox e a carga aterosclerótica, os dados apresentados sugerem que existe importante interação entre o polimorfismo C242T e fatores de risco cardiovascular aterogênicos na modulação da carga aterosclerótica em indivíduos com suspeita clínica de insuficiência coronária.

Ao estudarmos o impacto da presença de diversos fatores de risco cardiovascular na intensidade de acometimento por aterosclerose coronária, claramente percebe-se um maior impacto destes fatores de risco no grupo de indivíduos portadores do alelo 242T quando comparado ao impacto dos mesmo fatores em indivíduos portadores do genótipo CC. Este dado sugere haver interação entre a capacidade aterogênica de diversos fatores de risco cardiovascular e o genótipo C242T do gene da p22phox. Tal resultado parece particularmente interessante no sentido em que oferece uma possível justificativa para achados discordantes com relação ao papel do polimorfismo C242T na modulação do risco de doença arterial coronária. No cenário proposto por nossos dados, o marcador C242T só seria capaz de discriminar um risco aumentado de DAC em uma população de alto risco cardiovascular uma vez que interage com fatores de risco clássicos para a modulação desse fenótipo.

Devemos ressaltar que a possibilidade de interação entre fatores de risco cardiovascular e o polimorfismo C242T da p22phox na determinação da carga aterogênica não foi apenas observada em nossos dados. Niemiec *et al.* ao estudarem 341 indivíduos com e sem doença arterial coronária verificaram um importante efeito sinérgico entre a presença do alelo 242T e hipercolesterolemia e tabagismo no risco de desenvolvimento de DAC (Niemiec, Zak et al. 2007). Neste estudo os autores também sugerem a existência de efeitos sinérgicos entre o alelo 242T e a presença de tabagismo e hipercolesterolemia na modulação do risco de DAC. De fato, as estimativas pontuais de risco descritas pelos autores dão suporte a esta

hipótese: um OR de 3.75 para a presença de tabagismo e hipercolesterolemia em indivíduos com o genótipo CC (quando comparados a indivíduos com o genótipo CC e sem estes fatores de risco) e um impressionante aumento do risco de DAC de 17.88 vezes para os indivíduos tabagistas e hipercolesterolemicos portadores do alelo 242T (quando comparados com indivíduos com o alelo 242T e sem estes fatores de risco).

Descrevemos também a associação entre a presença do alelo 242T e uma maior expressão vascular de genes inflamatórios quando comparada à presente em vasos de indivíduos com o genótipo CC. Este resultado pode contribuir para justificar, agora em um cenário molecular, o papel na modulação do impacto de fatores de risco cardiovasculares na carga aterosclerótica e uma maior incidência de eventos cardiovasculares em pacientes com doença arterial coronária observada através do estudo do polimorfismo C242T nas amostras populacionais estudadas. Indivíduos portadores do alelo 242T teriam uma tendência à maior expressão gênica vascular de genes inflamatórios.

Finalmente, os dados aqui descritos permitem concluir que o polimorfismo C242T do gene da p22phox não apenas encontra-se associado de maneira independente a uma maior incidência de eventos cardiovasculares na população estudada, como também sua utilização em algoritmo clínico de predição de eventos em uma população de pacientes portadores de doença arterial coronária multiarterial com função ventricular preservada adiciona informação a modelo utilizando apenas informações

clínicas, demográficas e bioquímicas e contribui para uma melhor estratificação de risco dos indivíduos dessa população.

5.4. Análise crítica sobre a estratégia adotada para abordar o problema proposto no objetivo 1

Indivíduos participantes na primeira fase do estudo foram arrolados em um ensaio clínico randomizado. No entanto, o presente projeto não se utilizou em seu desenho do processo de randomização e sim de sua característica de estudo de seguimento longitudinal (coorte ou estudo de incidência). Nesse sentido, o presente estudo poderia ser caracterizado como um estudo de fatores de risco (genéticos) associados a uma incidência aumentada de eventos cardiovasculares. Como foram comparados indivíduos com a ocorrência de eventos versus indivíduos sem a ocorrência de eventos (não sendo excluído nenhum indivíduo da análise) não se trata de caso-controle alinhado à coorte e sim de estudo de incidência (alternativamente, poderia ser encarado como estudo da capacidade preditora de variável de risco). De fato, a utilização de um desenho caso-controle para esta questão traria importantes vieses de seleção uma vez que somente estariam disponíveis para o estudo indivíduos sobreviventes aos eventos cardiovasculares.

Devido à característica longitudinal do estudo em questão, foi possível a utilização tanto de medidas levando em consideração seguimento, como, por exemplo, o risco relativo, ou medidas de associação decorrentes

diretamente de tabela de contingência (razão de chance). Ainda, a baixa incidência do desfecho principal estudado (IAM + morte), que foi próxima de 20%, não parece conferir grande viés nas estimativas de risco analisadas.

Pretendeu-se, assim, utilizar tanto medidas de associação utilizando como estimativa de risco a razão de chances ou estimativas de risco utilizando a real razão de incidência como o risco relativo.

Talvez a principal limitação desta parte do estudo seja com relação à validade interna e externa de suas inferências. Com relação à validade interna devemos lembrar que indivíduos do estudo MASSII deveriam necessariamente ser candidatos tanto à revascularização cirúrgica, quanto percutânea, quanto serem candidatos a permanecerem em tratamento clínico. Desta maneira, o critério de inclusão do estudo limita a validade interna se considerarmos apenas indivíduos com doença multiarterial e função ventricular esquerda preservada (isto é, a amostra estudada reflete apenas os indivíduos com essa condição clínica e que possam ser tratados de 3 formas indistintamente). Com relação à validade externa, certamente a amostra estudada não é representativa de pacientes com doença coronária multiarterial (uma vez que grande parte dessa população não tem a função ventricular preservada, por exemplo). E certamente não representa a população mais ampla de indivíduos com doença arterial coronária

Isso posto, considera-se que tais aspectos são necessariamente limitações à interpretação dos achados apresentados decorrentes da análise da amostra de indivíduos do estudo MASSII e que a única forma de comprovar a validade e a dimensão das estimativas de risco encontradas

seria através de estudo de validação em diferentes populações de doentes com coronariopatia (uniarterial, com função ventricular diminuída, sem doença coronária estabelecida, por exemplo).

Assim como na epidemiologia clássica, replicação é fundamental no processo decisório sobre uma associação observada (é um resultado falso-positivo?). Em epidemiologia genética o estudo de replicação deve ser conduzido utilizando os mesmo alelos previamente estudados e numa população o mais parecida possível à população original (em termos genéticos e de exposições ambientais) (Bracken 2005).

Tal exercício foi realizado através da análise de 339 indivíduos com diferentes graus de doença coronária e que foram submetidos a procedimento de revascularização percutânea do miocárdio na mesma instituição. Este estudo de replicação, com resultados semelhantes aos encontrados através da análise dos participantes do estudo MASSII, diminuiu consideravelmente a limitação previamente apresentada. No entanto, deve-se ressaltar que a utilização desse marcador molecular como associada a uma maior incidência de eventos cardiovasculares claramente não foi testada em nossa população dentro do amplo espectro de risco cardiovascular apresentado pela doença e deve, necessariamente, ainda ser testada e replicada em outras condições clínicas.

5.5. Variabilidade genética entre populações humanas e a importância do conhecimento da estrutura populacional no locus estudado

Associado ao objetivo de obter uma seqüência fidedigna de todo o genoma humano, o Projeto Genoma Humano também empenhou esforços em identificar seqüências que pudessem variar entre indivíduos. Em média, 2 genomas humanos são mais do que 99.9% idênticos, mas uma diferença entre suas seqüências pode ser identificada a cada 1000 – 1500 nucleotídeos. A grande maioria dessas variações são alterações únicas em um determinado nucleotídeo da seqüência de DNA, como uma deleção, uma inserção, ou a substituição de um nucleotídeo. Esses polimorfismos são chamados “polimorfismos de nucleotídeo único” ou SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*). Tem se estimado que o genoma humano contenha perto de 10 milhões de SNPs “comuns” (com uma freqüência do alelo mais raro superior a 5%). Como cada ser humano carrega duas cópias do genoma humano, mais de 10% da população mundial é portadora do alelo raro de um SNP comum na seqüência de uma de suas duas cópias do genoma. Até hoje, mais de 5 milhões destes SNPs foram identificados no genoma humano e encontram-se disponíveis em banco de dados públicos ou privados.

Devido a essa abundância e densidade, SNPs têm sido propostos como os marcadores polimórficos ideais para a realização de estudos de associação genética e para estudos de mapeamento fino que buscam identificar genes que causem doenças. No entanto, como já discutido, até o momento o uso destes marcadores tem se limitado a análises de pequenas regiões de genes candidatos e poucos são os bancos de dados disponibilizando dados fenotípicos e genéticos em larga escala. Isso se deve

principalmente a duas razões: o custo associado com a genotipagem de um grande número de SNPs em um grande estudo epidemiológico, que ainda é muito elevado; e a utilização de um número menor de SNPs como marcadores indiretos da variabilidade genética de determinada região em uma dada população é dependente do conhecimento da estrutura genética da população em estudo, ou seja, é totalmente dependente da população estudada.

Esse último ponto, pouco discutido em nosso meio, traz conseqüências fundamentais para o entendimento de estudos de associação genética em nossa população. Em primeiro lugar, a utilização de SNPs como marcadores indiretos provavelmente reflete segmentos genômicos diferentes em nossa população quando comparado ao de outras populações onde estudos já tenham sido realizados (o que pode refletir em parte a aparente contradição de resultados de estudos realizados em diferentes populações mundiais). Ainda, como a população brasileira é uma população onde o grau de miscigenação é bastante elevado, diferentes graus de correlação entre marcadores próximos podem estar presentes em diferentes subgrupos de nossa população, tornando o mapeamento de potenciais candidatos ainda mais difícil.

Nos dados obtidos para o *locus* do gene CYBA utilizamos informações de 4 populações de diferentes etnias na tentativa de verificar possíveis diferenças nas estruturas populacionais. Ainda, através da genotipagem de diversos marcadores na região genômica do gene CYBA foi possível obter

também a estrutura populacional da região estudada na população brasileira.

A grande maioria dos SNPs no genoma humano provavelmente foi criada a partir de eventos individuais de mutação em diferentes momentos da história evolutiva de nossa espécie. A partir do momento do evento mutacional, o novo alelo (o novo nucleotídeo mutante) existe em apenas um cromossomo que já tem outros alelos para outros SNPs previamente existentes. Esse arranjo físico de alelos de diferentes SNPs ao longo de um segmento cromossômico é denominado haplótipo. Através de múltiplas gerações sucessivas, eventos de recombinação e novas mutações levam ao rearranjo do haplótipo ancestral ao redor desse novo SNP. Como consequência, o novo alelo permanece na mesma região do haplótipo ancestral apenas com os alelos de outros SNPs que estiverem em um região fisicamente próxima (de maneira que eventos de recombinação não consigam “separar” esses alelos ancestrais). Essa associação não aleatória de alelos adjacentes (em outras palavras, a manutenção de um pequeno segmento do haplótipo ancestral) é denominada “desequilíbrio de ligação”, ou associação alélica. No caso do *locus* estudado na população brasileira a região de desequilíbrio de ligação é pequena e praticamente compreende apenas variações contidas no gene da p22phox.

Um dos conceitos dos estudos de associação genética é de que seria possível identificar o efeito de uma variação genética associada a uma doença através da determinação do segmento de haplótipo ancestral onde esse alelo se originou. Através da utilização de um número suficiente de

SNPs em um estudo genético, qualquer variante comum, mesmo que ela não tenha sido genotipada, deve conter um grau suficiente de desequilíbrio de ligação com um marcador genotipado adjacente ao SNP não genotipado. A consequência direta desse fato seria que os dois marcadores (e o segmento de DNA entre os mesmos) representariam o haplótipo ancestral e que o marcador genotipado deveria estar associado com a doença estudada se o alelo “causador” da doença estiver contido nesse segmento de DNA.

Desta maneira, tem sido proposto que um denso conjunto de marcadores espalhados por todo o genoma poderia permitir que estudos de associação envolvendo de uma só vez todo o genoma possam ser realizados para doenças comuns (Wall and Pritchard 2003; Montpetit, Nelis et al. 2006). No entanto, o grau do desequilíbrio de ligação em uma dada região não é apenas função da distância existente entre SNPs. Na verdade, o tamanho das regiões com desequilíbrio de ligação importante é extremamente variável ao longo do genoma humano o que reflete a história de recombinações e as interações entre recombinação e mutações em diferentes regiões do genoma.

No caso da população brasileira a relação entre diferentes SNPs espalhados pelo genoma não é precisamente conhecida. Ainda, a existência de miscigenação torna a atualização de informações de populações ancestrais apenas parcialmente úteis. Esses fatores devem ser utilizados como pontos de especial atenção na interpretação de resultados de estudos de associação em nossa população. No caso particular do gene da p22phox na população brasileira a utilização de informação haplotípica não aumentou

o poder de detecção de associação quando comparada ao uso de apenas um único marcador, o polimorfismo C242T. Este fato sugere que potencialmente o efeito verificado ao se utilizar o haplótipo no gene da p22phox é causado pelo polimorfismo C242T, em outras palavras, o próprio marcador seria diretamente responsável pela associação clínica, ou molecular, descrita na população brasileira.

Não obstante os dados apresentados sugerirem o papel causal do polimorfismo C242T o número de marcadores genotipados na região próxima ao gene da p22phox pode ainda ser insuficiente para revelar uma associação por desequilíbrio de ligação. Tal fato pode eventualmente confundir uma possível explicação molecular para os dados descritos. No entanto, cabe também ressaltar que, mesmo ocorrendo uma associação por desequilíbrio de ligação ela é, em nossa população, muito provavelmente secundária a um marcador contido na região gênica do gene da p22phox e, por conseguinte, (1.) será capturada pela informação do polimorfismo C242T em nossa população (o que garante seu uso em algoritmos clínicos) e (2.) deve provavelmente se associar a alterações na homeostase protéica do sistema da NADPH oxidase.

5.6. Explicando o mecanismo molecular de associações genéticas: a importância e dificuldade de estudos funcionais

Claramente um dos maiores problemas na condução e interpretação de estudos de associação genética reside no fato da ausência de indícios

sobre a capacidade de marcadores genéticos levarem, de fato, a alterações moleculares consistentes. Tal fato, somado ao enorme número de resultados discordantes para a maioria das associações descritas evidencia parte do problema com o paradigma utilizado para explicar e estudar fenótipos complexos.

Neste sentido, descrevemos em nosso trabalho diferentes abordagens que tiveram o objetivo de dissecar potenciais alterações funcionais geradas por diferentes genótipos no locus do polimorfismo C242T (objetivo 2).

Uma das abordagens escolhidas foi a tentativa de associação do marcador a fenótipos intermediários. De fato, o que se propõem com estes experimentos ainda é uma simples associação, sem a capacidade de progredir sobremaneira em direção do entendimento a respeito da causalidade do fenômeno. No entanto, devemos lembrar que associações com fenótipos não independentes em populações diferentes são indício de consistência e podem contribuir para um melhor delineamento de estratégias a serem utilizadas em experimentos que visem diretamente acessar funcionalidade.

Cabe aqui discutir em maior detalhe o nosso achado que sugere uma provável interação entre o polimorfismo C242T e fatores de risco cardiovascular na modulação do risco de DAC.

Em primeiro lugar, os resultados obtidos não parecem ser acidentais. Guzik *et al.* descreveram o efeito estimulador da hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão e diabetes na produção vascular, via NADPH

oxidase, do anion superóxido, mostrando inclusive que o número de fatores de risco pró-ateroscleróticos está associado ao aumento na produção de superóxido dependente de NADPH (Guzik, West et al. 2000). Por outro lado, a produção de superóxido via NADPH oxidase vascular participa da oxidação de LDL, o que sugere a existência de retro-alimentação positiva entre, por exemplo, hipercolesterolemia, ativação de NADPH oxidase e oxidação de LDL (Aviram 1996; Aviram, Rosenblat et al. 1996). No contexto de nossos resultados, e de outros já descritos, podemos supor que indivíduos portadores do alelo 242T seriam particularmente vulneráveis aos efeitos de outros fatores de risco cardiovascular. A suposta maior produção de superóxido (Shimo-Nakanishi, Hasebe et al. 2004) e LDL oxidada (Nakano, Matsunaga et al. 2003) em portadores do alelo 242T e a concordância sinérgica entre essa maior produção e a que ocorre secundária à presença de fatores de risco cardiovascular poderia intensificar os efeitos associados à presença individual de cada um destes fatores. Tal achado parece ocorrer em outras situações e já foi descrito por nosso grupo com relação a polimorfismo do gene da eNOS e hipercolesterolemia na modulação do risco de hipertensão arterial (Pereira, Sposito et al. 2006). Finalmente, devemos lembrar que a própria produção de p22phox vascular é sujeita a grande variabilidade frente a estímulos ambientais ou à presença de aterosclerose (Azumi, Inoue et al. 1999). Desta maneira, é possível que indivíduos saudáveis, ou que não apresentem fatores associados ao aumento de expressão vascular de p22phox não apresentem qualquer fenótipo.

Não obstante o achado de associação entre um marcador molecular e diferentes fenótipos correlatos em diferentes populações ou fenótipos intermediários numa mesma população possa contribuir para uma melhor delimitação do possível mecanismo molecular de ação da variante estudada, estes ainda e sempre serão dados indiretos de associação. Se por um lado, complementam, refinam ou mesmo formulam hipóteses sobre o potencial mecanismo causal não demonstram causalidade.

O entendimento dos efeitos a jusante de variações genéticas tem atualmente figurado como um dos principais desafios ao entendimento das bases genéticas de fenótipos complexos. Se até há pouco tempo o número de SNPs ou mesmo a capacidade de genotipagem de um grande número de marcadores simultaneamente eram fatores limitantes, atualmente a caracterização funcional de marcadores em que se encontram associações consistentes é ponto central e limitante nesse processo.

No caso particular do presente trabalho tal fato não é exceção. De fato, vários autores já buscaram maior entendimento sobre o mecanismo molecular de ação do polimorfismo C242T. Tais experimentos foram conduzidos utilizando-se células, tecido ou soro de indivíduos em diferentes condições. Os resultados, como já descritos, são controversos.

Testamos inicialmente a hipótese de que a presença do alelo 242T estaria associada a uma maior expressão de p22phox em tecido vascular humano. A seguir utilizamos a mesma abordagem para explorar uma possível associação entre a presença do alelo 242T e a expressão de diversos genes componentes da resposta inflamatória vascular.

Nossos resultados apontam para uma associação entre a presença do alelo 242T e um perfil de expressão gênica vascular mais aterogênico. Cabe, contudo, uma breve discussão sobre as limitações da abordagem escolhida.

Em primeiro lugar utilizamos como modelo vascular de experimentação veias safenas humanas obtidas no momento de procedimento de revascularização cirúrgica. Embora se trate de uma vantagem o estudo do fenômeno de interesse no tecido de interesse (vascular), claramente a utilização de segmentos venosos traz consigo interrogações a respeito da extrapolação dos dados obtidos para o *milieu* arterial. Cabe comentar que outros autores já utilizaram o mesmo sistema como modelo no estudo da produção vascular de superóxido em humanos (Guzik, West et al. 2000).

Outra crítica que deve ser apontada refere-se à escolha dos genes amostrados. Apesar de todos serem importantes personagens da resposta inflamatória vascular o conjunto amostrado claramente é um subconjunto bastante reduzido do universo de genes modulados durante esta resposta. É possível, então, que existam outros genes que não apresentem qualquer associação com o marcador estudado e outros ainda que apresentem padrão de resposta diametralmente oposto ao encontrado para os genes estudados. É reconfortante, no entanto, observar que o padrão de resposta do conjunto de genes amostrados foi homogêneo com relação à associação com o genótipo da p22phox.

Certamente a maior limitação desta abordagem é a grande variabilidade observada nos resultados obtidos em diferentes espécimes vasculares. Mais do que um indicador de grande variabilidade inter-individual (o que seria sobremaneira interessante para nossa abordagem experimental), grande parte da variabilidade observada certamente deveu-se à metodologia experimental adotada (diferentes pacientes em diferentes condições clínicas ao momento da cirurgia, medicação em uso pelos pacientes não padronizada, diferentes idades, diferentes tempos de cirurgia, diferentes condições dos vasos amostrados, etc).

Por fim, cabe ressaltar que abordagens objetivando a caracterização funcional de marcadores moleculares provavelmente também deverão se beneficiar de paradigma semelhante ao utilizado na condução de observações epidemiológicas: a multi-dimensionalidade de observações congruentes. Desta maneira, a caracterização funcional de SNPs deve passar por estudos *in silico* através da utilização de ferramentas de bioinformática que utilizem diversas fontes de informações (filogenia, dados estruturais, dados de seqüência protéica primária, dados de sítios de fatores de transcrição, etc), experimentação *in vitro* em condições basais e de estímulo (provavelmente com a utilização de diversas ferramentas de biologia molecular como medidas de atividade enzimática, medidas de expressão gênica basal, medidas de transativação de outros genes, etc), estudos *ex vivo* em espécimes homogêneos e em amostras com maior heterogeneidade (inclusive com a utilização de diversos tecidos humanos), e

eventualmente até mesmo o estudo de variantes genéticas em modelos animais através da construção de animais geneticamente modificados.

5.7. Sob a criação de modelos de predição de eventos

Parte importante dos dados apresentados reporta a utilização de informações clínicas, bioquímicas, demográficas e genéticas na tentativa de criar modelos de predição de eventos clínicos com a finalidade de aplicação prática. Neste sentido, cabe uma breve discussão sobre a criação de modelos preditores e uma análise crítica sobre a metodologia aqui empregada.

Modelos para predição prognóstica de risco têm sido amplamente utilizados em cardiologia não apenas para gerar uma estimativa pontual de risco de eventos futuros, mas também com o intuito de estratificar pacientes em categorias de risco para que medidas de controle e tratamento possam ser mais “individualizadas”. Neste cenário, formas de avaliação dos modelos gerados são de fundamental importância durante todo o processo uma vez que os algoritmos produzidos serão eventualmente incorporados em fluxos clínicos de conduta. De particular interesse para os dados do presente estudo, a avaliação da possibilidade de incorporação de novos fatores de risco (no nosso caso um marcador genético) é de fundamental importância para que investimentos na área possam ser continuamente avaliados e que informações potencialmente úteis não sejam descartadas como de pequena importância.

A acurácia dos modelos gerados pode ser avaliada de diferentes maneiras. Os dois maiores componentes dessa avaliação são a calibração e a discriminação dos modelos (Cook 2007). Calibração é uma medida de quão bem probabilidades preditas concordam com os dados realmente observados. A estatística de Hosmer-Lemeshow, que é uma estatística mais robusta que estatísticas de ajuste mais tradicionais e compara a probabilidade observada com a probabilidade esperada em cada decil de probabilidade, é uma forma bastante popular de avaliar a calibração do modelo. Nos modelos gerados no presente estudo, ambos aparentemente se mostraram bem calibrados, embora o modelo utilizando dados genéticos tenha apresentado um perfil superior de calibração neste quesito.

A discriminação de um modelo é uma medida de quão bom determinado modelo é em separar indivíduos que terão ou não o desfecho de interesse. Se os valores preditos para casos são todos maiores do que os preditos para não-casos diz-se que o modelo tem capacidade de discriminação máxima. A discriminação de um modelo é comumente medida através da área sob a curva (AUC) em uma curva ROC, comumente também denominada estatística *c*.

Diferente do que ocorre com a comparação de modelos diagnósticos, em um cenário de desenvolvimento de modelos prognósticos, o desfecho ainda não ocorreu no momento de aquisição dos dados e ele ainda será determinado por processos determinísticos, mas também estocásticos, de forma que pode apenas ser estimado através de uma probabilidade ou risco.

A curva ROC de um modelo preditor de risco é função da sensibilidade e especificidade de cada medida de risco do modelo. A sensibilidade aqui se refere à probabilidade de ocorrência de evento quando a probabilidade de risco estimada for acima de um valor pré-especificado nos indivíduos que tiveram um evento após o tempo de seguimento estimado no modelo. Da mesma maneira, a especificidade é a probabilidade da não ocorrência de evento quando de um valor abaixo de um ponto pré-especificado naqueles indivíduos que não apresentaram evento após o tempo de seguimento definido. Tanto a sensibilidade, quanto a especificidade, assim como os valores preditivos positivo e negativo, são influenciados por alterações na prevalência da doença (ou evento) na população testada. Desta maneira, a gravidade da doença na população estudada, o tempo de seguimento, os fatores de risco da população estudada podem, e provavelmente irão, mudar características da curva ROC de determinado modelo e, conseqüentemente, a utilização deste modelo nesta nova população terá valores de acurácia, sensibilidade e especificidade diferentes dos obtidos na determinação inicial do modelo. Tal fato deve ser sempre lembrado no cenário do modelo aqui proposto, derivado de pacientes com doença coronária multiarterial e função de ventrículo esquerda preservada.

Um outro ponto que deve ser destacado se refere à estatística c (ou AUC). Esta é uma medida da probabilidade que o risco predito seja maior para um indivíduo que sofreu um evento do que para um indivíduo que não sofreu um evento. Não é, como comumente interpretada, a probabilidade que indivíduos sejam classificados corretamente.

Devido ao fato da AUC ser uma medida construída através de ranks, ela é menos sensível do que medidas baseadas na verossimilhança ou outra medida global de ajuste de modelo. Esta característica a faz uma ferramenta ruim para decidir que variáveis utilizar na construção do modelo. Na construção dos modelos propostos a AUC somente foi utilizada para descrever a discriminação dos modelos. De fato, os modelos foram previamente construídos através de regressão logística e o conseqüente uso de estatísticas de verossimilhança. De qualquer maneira, devido ao pequeno número de indivíduos seguidos prospectivamente (611 pacientes), variáveis potencialmente importantes na predição de risco da população estudada como lípidos ou número de vasos acometidos não foram incorporados ao modelo final. É possível que dentro de uma população maior um modelo com mais variáveis pudesse ser construído e apresentasse, inclusive, maior poder de discriminação. Não obstante esse fato, o modelo que inclui informação genética teve comportamento mais adequado (tanto a calibração, quanto a discriminação) quando comparado ao modelo contendo apenas variáveis clínicas.

Um outro ponto de importante ressalva é que a interpretação dos resultados de um modelo de regressão logística para predizer eventos em casos individuais deve ser realizada com ressalvas. Os modelos de regressão logística não predizem desfechos, mas sim a probabilidade de desfechos. Probabilidades não são observadas ao nível individual. Além disso, um determinado indivíduo pode apresentar um desfecho mesmo tendo uma baixa probabilidade, ou vice-versa. Deve-se lembrar que

probabilidades são predicados de populações de forma que se espera observar que o desfecho estudado é mais freqüente nas populações ou grupos com maiores probabilidades estimadas (fato que ocorre no presente estudo).

Finalmente devemos lembrar que o mais importante dentro do advento de um novo modelo é saber se ele pode estratificar mais indivíduos dentro de categorias extremas de risco (diminuindo, assim, a parcela de indivíduos testados que sejam classificados como risco intermediário). Na figura abaixo se pode claramente observar que a utilização do modelo contendo variáveis genéticas consegue diminuir de maneira importante o número de indivíduos testados classificados como de risco intermediário, aumentando o número de indivíduos classificados como de baixo risco.

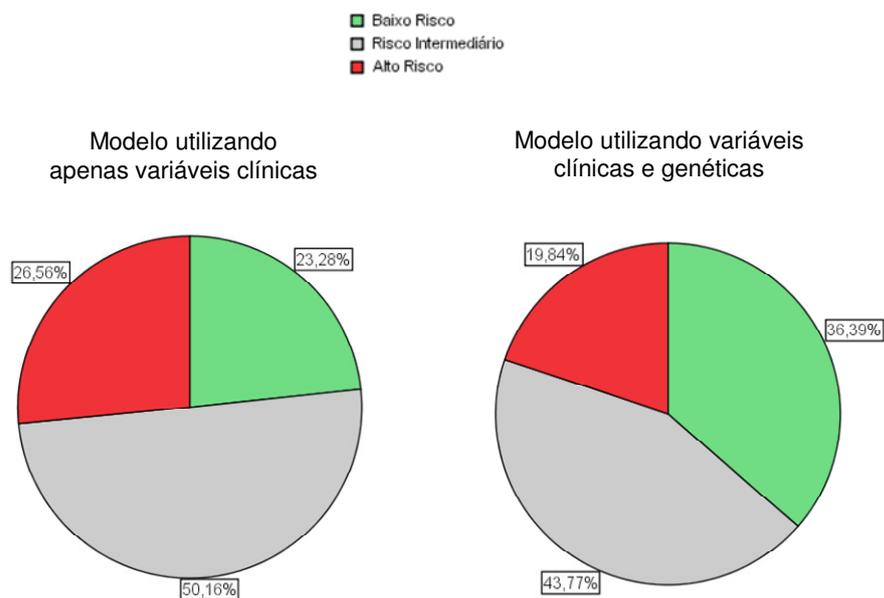


Figura 37. Freqüência de indivíduos classificados como de risco baixo, intermediário ou alto nos dois modelos propostos.

5.8. Análise Integrada: utilizando a complexidade de informações clínicas e genômicas

O desenvolvimento de análises integradas, realizadas através da utilização de várias fontes de dados, é um tema de relevância em medicina. Os benefícios da integração de dados podem ser ilustrados através da consideração do estudo de Framingham, um dos estudos mais importantes relativos ao entendimento longitudinal dos determinantes da doença arterial coronária (Kannel and Dawber 1982). Assim, como resultado da coleta massiva de dados clínicos e laboratoriais em relação à doença coronária e à capacidade de observação longitudinal da incidência de eventos clínicos, foram desenvolvidos os escores preditivos de Framingham, que combinam uma série de variáveis incluindo idade, sexo, tabagismo, diabetes, hipertensão, índice de massa corpórea, frações de colesterol e até mesmo história familiar na predição do risco de desenvolvimento de doença arterial coronária (Wilson, D'Agostino et al. 1998).

No entanto, parece clara a falta de precisão destes modelos, nos quais as estimativas de risco individual são prejudicadas pelo grande desvio padrão da estimativa média, e o fato de que a capacidade de predição poderia ser muito aumentada pela inclusão de dados que demonstrem variações inter-individuais mais sutis e que poderiam ser obtidas, por exemplo, através de análise genética. De fato, a oportunidade de melhor especificidade no processo de decisão clínica proporcionada por tecnologias

genômicas reside na maior capacidade de resolução das mesmas: o potencial de melhor situar um paciente dentro do complexo e multidimensional espectro de risco baseado em uma maior quantidade de informações (genéticas) individuais disponíveis. O escore de risco de Framingham enfatiza o papel do uso de informações clínicas e demográficas disponíveis para a estratificação de risco individual; a utilização de informação genética expande essa mesma visão em direção a uma abordagem que utiliza e se beneficia tanto de dados clínicos e demográficos, quanto genéticos. Algumas abordagens nesse sentido já começam a existir porém de forma ainda preliminar (Morrison, Bare et al. 2007).

Um entendimento mais amplo do potencial clínico de informações genéticas necessita uma mudança de paradigma na forma como obtemos, analisamos e interpretamos dados multi-dimensionais. Por exemplo, a tradição de identificar uma ou um pequeno número de moléculas ou biomarcadores persiste ainda hoje em áreas como câncer e cardiologia (Tzoulaki, Murray et al. 2007). Tipicamente, a utilização de dados clínicos longitudinais e a aplicação de uma abordagem analítica multi-ajustada irá resultar numa estimativa de risco ou um escore de risco que utiliza esses “novos” marcadores na fórmula de predição (Khumri, Idupulapati et al. 2007). No entanto, frequentemente a capacidade preditora dessa variável ou escore está diminuída em situações clínicas discretamente diferentes das presentes quando do experimento que forneceu dados para a criação do escore (Karounos, Chang et al. 2007). Quando discutimos a utilização de dados

genéticos o estudo em uma população etnicamente distinta da utilizada na criação do escore pode justificar um perfil de acurácia totalmente distinto.

Talvez o principal ponto dessa discussão não seja a abordagem analítica ou a tecnologia genômica de obtenção de dados (embora ambas sejam fatores relevantes na discussão), mas sim a forma de buscar a redução de dimensionalidade de informações ou mesmo a interpretação da informação obtida. O papel prognóstico de qualquer marcador (ou marcadores) deve necessariamente ser mais amplamente avaliado em conjunto com uma série de outros fatores, incluindo dados clínicos, sociais, e mesmo outros dados biológicos. A biologia da aterosclerose e o processo patológico do contínuo cardiovascular são incrivelmente complexos e fatores de risco, quer demográficos, genéticos ou bioquímicos representam apenas pequenas peças dentro do quebra-cabeças desses estados patológicos.

Talvez uma abordagem mais integrativa e multidimensional e que leve em consideração todos os tipos de dados e objetive identificar um paciente individual dentro de um espectro complexo de risco definido por múltiplos fatores (levando em consideração pontos multi-dimensionais como interações, complementaridade, redundância e conflitos entre os fatores de risco ao nível do paciente individual) deva ser perseguida. Por exemplo, o melhor modelo clínico preditor de mortalidade na população estudada (doentes multi-arteriais estáveis com função ventricular esquerda preservada) certamente não utiliza todas as variáveis sugeridas no modelo de risco do escore de Framingham (em nosso modelo apenas infarto prévio, idade e hipertensão foram variáveis utilizadas no modelo final). Claramente a

população estudada também não se assemelha à população avaliada na publicação do escore de risco de Framingham, o que dá a idéia de contextualização do uso dessas ferramentas de risco. Da mesma maneira, não necessariamente uma variável genética com capacidade preditora para o risco de hipertensão na população geral tenha a mesma capacidade preditora em indivíduos obesos e não obesos (Danoviz, Pereira et al. 2006), nem tampouco a capacidade preditora de eventos de uma variável potencialmente dependente do tabagismo irá ter qualquer papel em indivíduos que não fumem (Lopes, Pereira et al. 2004).

5.9. Perspectivas em direção a uma abordagem individualizada

Algumas modificações em nossa abordagem parecem ser necessárias para que possamos progredir em direção à real aplicação clínica de marcadores genéticos na avaliação e conduta de pacientes. Em primeiro lugar, análises que desenvolveram algoritmos de estratificação com capacidade de predizer um desfecho clínico, um evento adverso ou uma melhor resposta a determinada terapia deveriam ser incorporadas em desenhos de ensaios clínicos, que poderiam utilizar essa tecnologia para estratificarem pacientes e testar o desempenho destes algoritmos em amostras maiores, mais heterogêneas e com seguimento clínico detalhado. Ao mesmo tempo, nenhum ensaio clínico deveria deixar de incluir em seu desenho de estudo a tentativa de identificação de características subclínicas (genéticas, por exemplo) que tenham a capacidade de prever respostas

medicamentosas diferenciais em pequenos subgrupos de pacientes. Uma série de abordagens nesse sentido já está em andamento (Hernandez-Boussard, Woon et al. 2006), mas nossa capacidade de contextualizar e delimitar dentro do espectro multi-dimensional de risco ainda é muito limitada. Certamente, esse é um ponto fundamental no desenvolvimento e aplicação desse conhecimento (West, Ginsburg et al. 2006).

Neste mesmo sentido, a disponibilidade de várias fontes diferentes de dados genômicos relevantes para a caracterização de dados fenotípicos precisa ser integrada no sentido de desenvolver uma delimitação mais específica do fenótipo clínico e do “setor” multi-dimensional do espectro de risco no qual os dados fenotípicos foram obtidos. A utilização de dados genéticos e de expressão gênica setorial (isto é de vias específicas) ou global (isto é de todo o padrão de expressão gênica celular ou tissular) é uma oportunidade na qual dados de expressão de múltiplas fontes podem certamente colaborar para a melhor caracterização do fenótipo estudado e, por conseguinte, das “coordenadas de localização” no espectro de risco em que se realizam as inferências.

A utilização de outras formas de dados como proteômica, padrões de estrutura de DNA e marcadores epigenéticos também pode contribuir no sentido de integrar informações fenotípicas e genômicas para a melhor definição do fenótipo clínico sob o qual se tenta construir um algoritmo de predição.

Por fim, enquanto certamente existem aplicações para o uso imediato de algoritmos preditores mais eficientes, certamente os dados utilizados para

gerar tais ferramentas também guardam consigo informações que podem dissecar os processos biológicos fundamentais subjacentes aos fenótipos clínicos. Claramente, o melhor entendimento que potencialmente pode ser obtido através da melhor definição do fenótipo clínico, da delimitação da área do espectro de risco com a qual se está trabalhando e da geração de informações com relevância preditora pode também fornecer importantes oportunidades para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, que por sua vez deverão ser utilizadas frente às informações clínicas e genéticas disponíveis (potencialmente serão vantajosas para uma fração dos indivíduos numa dada condição clínica).

Cabe não esquecer que o desenvolvimento dessa nova tecnologia deve necessariamente estar atrelado à verificação de vantagens em termos de eventos de saúde global e indicadores econômicos de melhor eficiência. Sem estes dados dificilmente qualquer nova tecnologia será englobada pelo sistema público ou privado de saúde.

6 . Conclusões

6. CONCLUSÕES

1. A presença do alelo 242T do polimorfismo C242T do gene da p22phox está associada a um risco aumentado de óbito ou IAM em pacientes portadores de doença arterial coronária multiarterial seguidos por 5 anos;
2. Existe interação entre o polimorfismo C242T e fatores de risco cardiovascular aterogênicos na modulação da carga aterosclerótica em indivíduos com suspeita clínica de insuficiência coronária e a presença do alelo 242T está associada a aumento significativo na expressão vascular basal de genes com papel na modulação da resposta inflamatória vascular;

3. A utilização do polimorfismo C242T do gene da p22phox em algoritmo clínico de predição de eventos em uma população de pacientes portadores de doença arterial coronária multiarterial com função ventricular preservada adiciona informação à modelo utilizando apenas informações clínicas, demográficas e bioquímicas e contribui para uma melhor estratificação de risco em indivíduos da população estudada.

7 . Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." *Jama* 285(19): 2486-97.

Aviram, M. (1996). "Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants." *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34(8): 599-608.

Aviram, M., M. Rosenblat, et al. (1996). "Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein." *Metabolism* 45(9): 1069-79.

Azumi, H., N. Inoue, et al. (1999). "Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries." *Circulation* 100(14): 1494-8.

Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-37.

Bourassa, M. G., W. Yeh, et al. (1998). "Long-term outcome of patients with incomplete vs complete revascularization after multivessel PTCA. A report from the NHLBI PTCA Registry." *Eur Heart J* 19(1): 103-11.

Bracken, M. B. (2005). "Genomic epidemiology of complex disease: the need for an electronic evidence-based approach to research synthesis." *Am J Epidemiol* 162(4): 297-301.

Cahilly, C., C. M. Ballantyne, et al. (2000). "A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis." *Circ Res* 86(4): 391-5.

Cai, H. (2005). "NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease." *Circ Res* 96(8): 818-22.

Campeau, L. (1976). "Letter: Grading of angina pectoris." *Circulation* 54(3): 522-3.

Cathcart, M. K. (2004). "Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1): 23-8.

Chaitman, B. R., A. D. Rosen, et al. (1997). "Myocardial infarction and cardiac mortality in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) randomized trial." *Circulation* 96(7): 2162-70.

Channon, K. M. and T. J. Guzik (2002). "Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors." *J Physiol Pharmacol* 53(4 Pt 1): 515-24.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." *Nat Protoc* 1(2): 581-5.

Cobb, M. (2006). "Heredity before genetics: a history." *Nat Rev Genet* 7(12): 953-8.

Cook, N. R. (2007). "Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction." *Circulation* 115(7): 928-35.

Corsetti, J. P., D. Ryan, et al. (2007). "NAD(P)H oxidase polymorphism (C242T) and high HDL cholesterol associate with recurrent coronary events in postinfarction patients." *Atherosclerosis*.

Crouch, M. A. and R. Gramling (2005). "Family history of coronary heart disease: evidence-based applications." *Prim Care* 32(4): 995-1010.

Cutler, J. A., T. J. Thom, et al. (2006). "Leading causes of death in the United States." *Jama* 295(4): 383-4; author reply 384.

Danoviz, M. E., A. C. Pereira, et al. (2006). "Hypertension, obesity and GNB 3 gene variants." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(3): 248-52.

Dinauer, M. C., E. A. Pierce, et al. (1990). "Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease." *J Clin Invest* 86(5): 1729-37.

Dodge, H. T., H. Sandler, et al. (1966). "Usefulness and limitations of radiographic methods for determining left ventricular volume." *Am J Cardiol* 18(1): 10-24.

Evans, A., G. C. Van Baal, et al. (2003). "The genetics of coronary heart disease: the contribution of twin studies." *Twin Res* 6(5): 432-41.

Fortuno, A., G. S. Jose, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." *Exp Physiol* 90(4): 457-62.

Ganesh, S. K. and E. G. Nabel (2005). "Genomics of in-stent restenosis: early insights into a complex disease." *Circulation* 112(16): 2378-9.

Ganesh, S. K., K. A. Skelding, et al. (2004). "Rationale and study design of the CardioGene Study: genomics of in-stent restenosis." *Pharmacogenomics* 5(7): 952-1004.

Giannini, S. D., J. Diament, et al. (1998). "First-degree kinship with young coronary artery disease patients markedly increases lipid-level disorders in asymptomatic hypertensives." *J Cardiovasc Risk* 5(3): 141-5.

Glazier, A. M., J. H. Nadeau, et al. (2002). "Finding genes that underlie complex traits." *Science* 298(5602): 2345-9.

Griendling, K. K. and D. G. Harrison (1999). "Dual role of reactive oxygen species in vascular growth." *Circ Res* 85(6): 562-3.

Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." *Circ Res* 86(5): 494-501.

Guzik, T. J., N. E. West, et al. (2000). "Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis." *Circulation* 102(15): 1744-7.

Guzik, T. J., N. E. West, et al. (2000). "Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors." *Circ Res* 86(9): E85-90.

Haapanen, A., M. Koskenvuo, et al. (1989). "Carotid arteriosclerosis in identical twins discordant for cigarette smoking." *Circulation* 80(1): 10-6.

Hayaishi-Okano, R., Y. Yamasaki, et al. (2003). "Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes." *Diabetes Care* 26(2): 458-63.

He, M. A., L. X. Cheng, et al. (2007). "Associations of polymorphism of P22(phox) C242T, plasma levels of vitamin E, and smoking with coronary heart disease in China." *Am Heart J* 153(4): 640 e1-6.

Heid, C. A., J. Stevens, et al. (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res* 6(10): 986-94.

Heitzer, T., T. Schlinzig, et al. (2001). "Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease." *Circulation* 104(22): 2673-8.

Hellemans, J., G. Mortier, et al. (2007). "qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data." *Genome Biol* 8(2): R19.

Hernandez-Boussard, T., M. Woon, et al. (2006). "Integrating large-scale genotype and phenotype data." *Omics* 10(4): 545-54.

Huraux, C., T. Makita, et al. (1999). "Superoxide production, risk factors, and endothelium-dependent relaxations in human internal mammary arteries." *Circulation* 99(1): 53-9.

Inoue, N., S. Kawashima, et al. (1998). "Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease." *Circulation* 97(2): 135-7.

Irani, K. (2000). "Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." *Circ Res* 87(3): 179-83.

Kannel, W. B. and T. R. Dawber (1982). "Contributors to coronary risk: ten years later." *Heart Lung* 11(1): 60-4.

Karounos, M., A. M. Chang, et al. (2007). "TIMI risk score: does it work equally well in both males and females?" *Emerg Med J* 24(7): 471-4.

Khumri, T. M., M. Idupulapati, et al. (2007). "Clinical and echocardiographic markers of mortality risk in patients with atrial fibrillation." *Am J Cardiol* 99(12): 1733-6.

Kirklin, J. W., R. L. Frye, et al. (1991). "Some comments on the indications for the coronary artery bypass graft operation." *Int J Cardiol* 31(1): 23-30; discussion 31-2.

Kojda, G. and D. Harrison (1999). "Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure." *Cardiovasc Res* 43(3): 562-71.

Kraft, P., Y. C. Yen, et al. (2007). "Exploiting gene-environment interaction to detect genetic associations." *Hum Hered* 63(2): 111-9.

Lacy, F., M. T. Kailasam, et al. (2000). "Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity." *Hypertension* 36(5): 878-84.

Lanz, J. R., A. C. Pereira, et al. (2005). "Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with coronary artery disease severity." *Clin Chim Acta* 362(1-2): 176-81.

Lassegue, B. and R. E. Clempus (2003). "Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(2): R277-97.

Lin, H. F., B. Boden-Albala, et al. (2005). "Heritabilities of the metabolic syndrome and its components in the Northern Manhattan Family Study." *Diabetologia* 48(10): 2006-12.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." *Methods* 25(4): 402-8.

Lopes, N. H., A. C. Pereira, et al. (2004). "Effect of glycoprotein IIIa PIA2 polymorphism on outcome of patients with stable coronary artery disease and effect of smoking." *Am J Cardiol* 93(12): 1469-72.

Marenberg, M. E., N. Risch, et al. (1994). "Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins." *N Engl J Med* 330(15): 1041-6.

Margaglione, M., G. Cappucci, et al. (2000). "C-reactive protein in offspring is associated with the occurrence of myocardial infarction in first-degree relatives." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1): 198-203.

McCarthy, J. J., A. Parker, et al. (2004). "Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes." *J Med Genet* 41(5): 334-41.

Miller, D. T., P. M. Ridker, et al. (2007). "Atherosclerosis: the path from genomics to therapeutics." *J Am Coll Cardiol* 49(15): 1589-99.

Mitchell, B. D., C. M. Kammerer, et al. (1996). "Genetic and environmental contributions to cardiovascular risk factors in Mexican Americans. The San Antonio Family Heart Study." *Circulation* 94(9): 2159-70.

Montpetit, A., M. Nelis, et al. (2006). "An evaluation of the performance of tag SNPs derived from HapMap in a Caucasian population." *PLoS Genet* 2(3): e27.

Morgan, T. M., H. M. Krumholz, et al. (2007). "Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study." *Jama* 297(14): 1551-61.

Morrison, A. C., L. A. Bare, et al. (2007). "Prediction of Coronary Heart Disease Risk using a Genetic Risk Score: The Atherosclerosis Risk in Communities Study." *Am J Epidemiol* 166(1): 28-35.

Mueller, C. F., K. Laude, et al. (2005). "ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2): 274-8.

Myers, R. H., D. K. Kiely, et al. (1990). "Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study." *Am Heart J* 120(4): 963-9.

Nabel, E. G. (2003). "Cardiovascular disease." *N Engl J Med* 349(1): 60-72.

Nakano, T., S. Matsunaga, et al. (2003). "NAD(P)H oxidase p22phox Gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation." *Clin Chim Acta* 335(1-2): 101-7.

Nascetti, S., R. Elosua, et al. (2001). "Variables associated with fibrinogen in a population-based study: interaction between smoking and age on fibrinogen concentration." *Eur J Epidemiol* 17(10): 953-8.

Nasti, S., P. Spallarossa, et al. (2006). "C242T polymorphism in CYBA gene (p22phox) and risk of coronary artery disease in a population of Caucasian Italians." *Dis Markers* 22(3): 167-73.

Niemiec, P., I. Zak, et al. (2007). "The 242T variant of the CYBA gene polymorphism increases the risk of coronary artery disease associated with cigarette smoking and hypercholesterolemia." *Coron Artery Dis* 18(5): 339-46.

Osler, M., C. Holst, et al. (2001). "Influence of genes and family environment on adult smoking behavior assessed in an adoption study." *Genet Epidemiol* 21(3): 193-200.

Pereira, A. C., G. A. Mota, et al. (2001). "Effect of race, genetic population structure, and genetic models in two-locus association studies: clustering of functional renin-angiotensin system gene variants in hypertension association studies." *Braz J Med Biol Res* 34(11): 1421-8.

Pereira, A. C., G. F. Mota, et al. (2003). "Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes." *Hypertension* 41(1): 25-30.

Pereira, A. C., A. C. Sposito, et al. (2006). "Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure." *Atherosclerosis* 184(1): 193-200.

Peyser, P. A. (1997). "Genetic epidemiology of coronary artery disease." *Epidemiol Rev* 19(1): 80-90.

Rosamond, W., K. Flegal, et al. (2007). "Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 115(5): e69-171.

Russell, M. W., D. M. Huse, et al. (1998). "Direct medical costs of coronary artery disease in the United States." *Am J Cardiol* 81(9): 1110-5.

Rutter, M. K., J. B. Meigs, et al. (2005). "Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study." *Diabetes* 54(11): 3252-7.

Ryan, T. J., W. B. Bauman, et al. (1993). "Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American Heart Association/American College of Cardiology Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Committee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty)." *Circulation* 88(6): 2987-3007.

Safian, R. D., T. Feldman, et al. (2001). "Coronary angioplasty and Rotablator atherectomy trial (CARAT): immediate and late results of a prospective multicenter randomized trial." *Catheter Cardiovasc Interv* 53(2): 213-20.

Schachinger, V., M. B. Britten, et al. (2000). "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease." *Circulation* 101(16): 1899-906.

Shimo-Nakanishi, Y., T. Hasebe, et al. (2004). "Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction." *Atherosclerosis* 175(1): 109-15.

Smith, S. C., Jr., J. Allen, et al. (2006). "AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute." *J Am Coll Cardiol* 47(10): 2130-9.

Sones, F. M., Jr. (1962). "Cine-coronary arteriography." *Ohio Med* 58: 1018-9.

Sorensen, T. I., C. Holst, et al. (1998). "Adoption study of environmental modifications of the genetic influences on obesity." *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(1): 73-81.

Sorensen, T. I., G. G. Nielsen, et al. (1988). "Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees." *N Engl J Med* 318(12): 727-32.

Taniyama, Y. and K. K. Griendling (2003). "Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms." *Hypertension* 42(6): 1075-81.

Thom, T., N. Haase, et al. (2006). "Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 113(6): e85-151.

Tzoulaki, I., G. D. Murray, et al. (2007). "Relative value of inflammatory, hemostatic, and rheological factors for incident myocardial infarction and stroke: the Edinburgh Artery Study." *Circulation* 115(16): 2119-27.

Wall, J. D. and J. K. Pritchard (2003). "Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome." *Nat Rev Genet* 4(8): 587-97.

Wallace, H. M. (2006). "A model of gene-gene and gene-environment interactions and its implications for targeting environmental interventions by genotype." *Theor Biol Med Model* 3: 35.

Wang, Q. (2005). "Molecular genetics of coronary artery disease." *Curr Opin Cardiol* 20(3): 182-8.

Wang, X. L., D. L. Rainwater, et al. (2001). "Genetic contributions to plasma total antioxidant activity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(7): 1190-5.

Watkins, H. and M. Farrall (2006). "Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress." *Nat Rev Genet* 7(3): 163-73.

West, M., G. S. Ginsburg, et al. (2006). "Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine." *Genome Res* 16(5): 559-66.

Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, et al. (1998). "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." *Circulation* 97(18): 1837-47.

Wyche, K. E., S. S. Wang, et al. (2004). "C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils." *Hypertension* 43(6): 1246-51.

Yamada, Y., H. Izawa, et al. (2002). "Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes." *N Engl J Med* 347(24): 1916-23.

Yuan, J. S., A. Reed, et al. (2006). "Statistical analysis of real-time PCR data." *BMC Bioinformatics* 7: 85.