

**LETÍCIA DE ARAUJO FUNARI FERRI**

**Polimorfismos no gene paraoxonase 1 como  
preditores de eventos cardiovasculares em  
pacientes com doença coronária estável**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Neuza Helena Moreira Lopes

**SÃO PAULO  
2009**

Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano, porque o humano é imperfeito.

*Fernando Pessoa*

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Samuel** e **Regina**, fonte de amor e perseverança, meu espelho de humanidade, honestidade, responsabilidade e caráter. Sempre me apoiaram nos momentos e decisões mais difíceis.

Ao meu irmão **Henrique** e à minha cunhada **Mirella**, que por tantas vezes me ajudaram em etapas importantes de minha vida e sempre torceram por mim.

Ao meu marido **Maurício** que está ao meu lado de forma incondicional. Seu amor constante, paciência e incentivo são fundamentais em minha vida.

À minha filha **Valentina “Gostosinha”** que apesar de pequenina, tem participado ativamente de todas as etapas da minha vida. Sua alegria nas coisas simples recolocou tudo no seu devido lugar.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À grande amiga e orientadora ***Dra. Neuza Helena Moreira Lopes***, pelas oportunidades que sempre me ofereceu, pela confiança depositada, pelos ensinamentos científicos recebidos e divididos nesta jornada, e principalmente pelo privilégio do convívio que tanto me mostrou o exemplo de um grande orientador.

Ao ***Prof. Dr. Whady Hueb*** pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho.

Ao ***Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg***, seu espírito científico incansável guiou meu desenvolvimento.

Ao ***Dr. Alexandre Pereira***, pela amizade, carinho e apoio desde o começo. Sua paciência e dedicação foram imprescindíveis para a minha compreensão do tema e conclusão desta tese.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Lerário**, que sempre me acolheu demonstrando respeito e amizade.

Ao **Dr. Roberto Betti**, grande amigo e companheiro desde minha chegada a São Paulo.

Ao **Dr. Sandro Rizoli**, pela amizade, por compartilhar seus conhecimentos e me direcionar neste aprendizado, sempre com solicitude, desprendimento e elegância.

À **Neuza Gomes Rangel**, pelo apoio constante nestes momentos tão singulares em minha vida.

Ao **Prof. Roberto Barbosa Bazotte**, meu primeiro e dedicado orientador, seus ensinamentos foram imprescindíveis.

À **Myrthes E. Takiuti**, pelo carinho, amizade, atenção.

À **Laura Caringe**, pela sua amizade, e alegria constante em todos os momentos.

À **Eliana O. Lima**, pela atenção e profissionalismo demonstrados durante a execução desta tese, reafirmando sua competência e sensibilidade.

À **Priscyla B.M. Girardi**, sempre amiga e disposta a ajudar. Chegamos juntas à São Paulo e desde então já dividimos importantes momentos de nossas vidas.

À **Teryo Nakano**, pela amizade discreta, mas sempre presente.

À **Marcela F. Silva, Célia Regina e Elizabete Forte**, que sempre foram grande torcedoras em importantes momentos de minha vida.

À **Julia Fukushima**, por sua atenção e amizade criada durante a execução deste trabalho.

À **Isabel Cristina Lameirinhas, Maria de Lourdes Junqueira e Silvana Campos Sales** e, amigas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular pela ajuda incansável, motivadora e indispensável para a elaboração deste trabalho.

À **Neusa Dini, Eva e Juliana** que sempre foram amigas prontas para ajudar e grandes torcedoras do meu sucesso.

À **Maria Helena Vargas** grande amiga e profissional, cuja ajuda foi essencial na execução desta tese.

Ao Prof. Dr. **José Eduardo Krieger** que disponibilizou prontamente toda a estrutura do laboratório para a execução deste trabalho.

A todos os meus **Amigos** que deram seu apoio neste momento tão singular em minha vida.

À toda minha **Família** que sempre me apoiou que sempre foi grande incentivadora da minha carreira.

Aos **Pacientes**, que em seus momentos de dor e sofrimento confiam sua vida aos profissionais da saúde, sendo o grande motivo da realização desse trabalho.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro do projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença Arterial Coronária: Panorama Atual e Fatores de Risco .....	2
1.2 Fatores de Risco para a DAC.....	4
1.3 Estratificação do Risco Associado a Eventos Cardiovasculares em Doença Coronária Estável.....	5
1.4 Estudos Clínicos em Doença Arterial Coronária Crônica .....	7
1.5 A Importância de Fatores de Risco Genético no Processo de Aterogênese .....	8
1.6 Dislipidemia e Polimorfismo .....	10
1.7 HDL-c e Paraoxonase .....	11
1.7.1 Paraoxonase .....	12
1.8 Variantes genéticas da Paraoxonase 1 e DAC .....	14
1.9 Relevância do Estudo.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Primário .....	20
2.2 Objetivos Secundários.....	20
3 MÉTODOS .....	22
3.1 Estudo MASS II .....	23
3.1.1 Seleção de pacientes .....	24
3.1.2 Critérios de inclusão.....	25
3.1.3 Critérios de exclusão.....	25
3.1.4 Definição de critérios e procedimentos de investigação .....	26
3.2 Intervenção Terapêutica.....	29
3.2.1 Terapêutica clínica .....	29
3.2.2 Revascularização miocárdica percutânea.....	30
3.2.3 Revascularização cirúrgica do miocárdio .....	31
3.3 Definição de Variáveis para o Banco de Dados .....	31
3.4 MASS II Genético .....	33
3.4.1 Preparação da amostra para análise dos polimorfismos .....	33
3.4.2 Seleção dos SNPs .....	34
3.4.3 Polimorfismos da PON1: frequência no International HapMap Project .....	35
3.4.4 Genotipagens.....	36
3.4.5 Extração e processamento do DNA .....	37
3.4.6 Digestão com enzimas de restrição .....	37
3.5 Análise Estatística .....	38

4	RESULTADOS .....	41
4.1	Análise da População do MASS II Genético no Tempo Basal .....	42
4.2	Polimorfismos da PON1 no MASS II Genético .....	44
4.3	Características dos Pacientes em Relação às Variantes Genéticas e Uso de Drogas .....	45
4.4	Características Lipídicas Laboratoriais dos Pacientes em Relação às Variantes Genéticas no Tempo Basal .....	46
4.5	Comportamento do Colesterol Total no Período do Estudo (cinco anos) em Relação às Variantes Genéticas .....	48
4.6	Avaliação dos Níveis de Lipídeos no Decorrer de Cinco Anos por Análise Genotípica de Dominância .....	48
4.7	Avaliação dos Níveis de Colesterol total, HDL-c, LDL-c e Triglicérides por Alelos de Dominância nos Pacientes Sem Uso de Estatina no Tempo Basal .....	50
4.8	Eventos nos Pacientes do Projeto MASS II Genético .....	50
4.9	Sobrevida Livre de Morte e Eventos.....	52
4.10	Polimorfismos PON1 e Eventos Clínicos.....	53
4.10.1	R192Q.....	54
4.10.2	R160G.....	56
4.10.3	Leu55Met.....	59
4.10.4	Promoter_161 .....	61
4.10.5	rs3917464 .....	63
4.11	Análise de Eventos Combinados por Alelos de Dominância .....	64
4.11.1	Frequência Polimorfismos no MASS II Genético e determinação dos alelos de risco.....	66
4.11.2	Análise combinada de polimorfismos para eventos .....	67
4.12	Análise Multivariada .....	70
4.12.1	Análise univariada no grupo médico .....	73
4.12.2	Análise multivariada no grupo médico do MASS II Genético .....	75
4.12.2.1	Regressão logística para IAM: MASS II Genético clínico .....	76
4.12.2.2	Regressão logística para óbito: MASS II Genético clínico .....	77
4.12.2.3	Regressão logística para eventos combinados: MASS II Genético clínico .....	78
4.13	Distribuição das variantes genéticas no gene PON1.....	79
5	DISCUSSÃO.....	86
5.1	Considerações Gerais.....	87
5.2	Características Basais dos Pacientes do Estudo MASS II em Relação aos Polimorfismos .....	89
5.3	Polimorfismos e Níveis Séricos de Lipídeos.....	90
5.4	Características Basais dos Pacientes do Estudo MASS II e Desfechos Clínicos.....	92
5.5	Polimorfismos e Desfechos Cardiovasculares .....	93
5.5.1	Eventos combinados.....	93
5.5.2	Acidente vascular encefálico.....	94
5.5.3	Nova intervenção .....	94
5.5.4	Óbito .....	95
5.6	Fenótipos e Genótipos e Eventos.....	96
5.7	Análise combinada de polimorfismos: R192Q e Leu55Met.....	97

5.8 Grupo MASSII Genético Médico.....	98
5.9 Limitações do Estudo .....	100
5.10 Considerações Finais .....	101
6 CONCLUSÕES.....	102
7 ANEXOS.....	104
8 REFERÊNCIAS .....	133

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	- "Expert Committee of American Diabetes Association"
AVE	- Acidente vascular encefálico
ATC	- Angioplastia
CARE	- "Cholesterol and Recurrent Events"
CCS	- Canadian Cardiovascular Society
CPK	- Creatinofosfatoquinase
CID-10	- Código Internacional de Doenças
DAC	- Doença arterial coronária
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HDL-c	- Lipoproteína de alta densidade-colesterol
InCor	- Instituto do Coração
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	- Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
MASS II	- "The Medicine, Angioplasty or Surgery Study II"
IAM	- Infarto agudo do miocárdio
NCEP	- "National Cholesterol Education Program"
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PON	- Paraoxonase
IMC	- Índice de massa corpórea
PON1	- Paraoxonase 1
REGRESS	- REgression GRowth Evaluation Statin Study
RM	- Revascularização do miocárdio
SNP	- Polimorfismo
WISE	- "Women's Ischemia Syndrome Evaluation"

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráfico das projeções globais de morte, 2004-2030.....	3
Figura 2 -	Família gene PON no cromossomo 7. Apenas alguns polimorfismos estão representados.....	13
Figura 3 -	Seqüência dos cinco polimorfismos do gene PON1 estudados.....	34
Figura 4 -	Gene PON1 com os dois blocos de haplótipos formados pelos cinco polimorfismos. Os polimorfismos rs662 e rs13306698 formam um haplótipo (bloco 1) e os polimorfismos rs705381 e rs3917464 formam um outro haplótipo (bloco 2).....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismos estudados no MASS II genético: substituição de nucleotídeos e relação destes com a proteína .....	35
Tabela 2 - Polimorfismos estudados: contexto genômico e referência no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) - Frequência na população caucasiana no banco de dados HapMap: Cromossomo 7 gene PON1 .....	36
Tabela 3 - Características dos 518 Pacientes do Projeto MASS II Genético nos Respective Grupos de Tratamento.....	43
Tabela 4 - Concentração de lipídeos no tempo basal em relação ao polimorfismo rs705381PON (Promoter_161) .....	47
Tabela 5 - Ocorrência de eventos no estudo MASS II genético nos três grupos de tratamento: médico, angioplastia e cirurgia .....	51
Tabela 6 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo R192Q.....	54
Tabela 7 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo R160G.....	57
Tabela 8- Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo Leu55Met .....	59
Tabela 9 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo PON1: Promoter_161.....	61
Tabela 10 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo Promoter_161 com combinação de Genótipos .....	62
Tabela 11 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo PON1 (rs3917464) .....	63
Tabela 12 - Número absoluto e percentual de pacientes nos genótipos dos polimorfismos da PON1 no estudo MASS II Genético.....	66
Tabela 13 - Polimorfismos da PON1: alelos de risco na literatura e no estudo MASS II .....	67

Tabela 14	Presença do alelo de Risco (A) na posição R192Q ou Leu55Met e eventos cardiovasculares .....	68
Tabela 15	- Eventos cardiovasculares e combinação aditiva da presença de pelo menos 1 alelo de risco na posição R192Q e Leu55Met.....	69
Tabela 16	- Regressão Logística para óbito: análise alélica aditiva para o alelo A (risco para óbito) nos códons 55 e 192 .....	70
Tabela 17	- Análise univariada para óbito nos pacientes MASS II genético.....	71
Tabela 18	- Regressão Logística para óbito no MASS II Genético .....	72
Tabela 19	- Valor de p na análise univariada de variáveis clínicas e eventos no grupo de tratamento médico do estudo MASS II genético.....	74
Tabela 20	- Regressão logística para IAM no MASS II Genético clínico.....	76
Tabela 21	- Regressão logística para óbito no Grupo MASS II genético clínico.....	77
Tabela 22	- Regressão logística para eventos combinados no grupo MASS II Genético clínico.....	78
Tabela 23	- Associação dos haplótipos (blocos 1 e 2): eventos combinados .....	81
Tabela 24	- Associação dos haplótipos (blocos 1 e 2): óbito .....	82
Tabela 25	- Associação de eventos combinados com os alelos do polimorfismo do gene da PON1 .....	83
Tabela 26	- Associação de óbito com os alelos do polimorfismo do gene da PON1 .....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Eventos em cinco anos: MASS II Genético .....	52
Gráfico 2 - Curva de kaplan-meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo PON1: R192Q .....	55
Gráfico 3 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo PON1: R160G .....	58
Gráfico 4 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e Sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo Leu55Met .....	60
Gráfico 5 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo Promoter_161 .....	62
Gráfico 6 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo PON1: rs391764 .....	64
Gráfico 7- Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados na análise por dominância alelo polimórfico G e alelo A: R192Q .....	65

## RESUMO

Ferri LAF. *Polimorfismos no gene paraoxonase 1 como preditores de eventos cardiovasculares em pacientes com doença coronária estável* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Os polimorfismos do gene da paraoxonase 1 (PON1) estão relacionados ao metabolismo lipídico conferindo efeito marginal e modesto nas concentrações séricas das lipoproteínas e sobre o risco de desenvolvimento de doença arterial coronária (DAC). O objetivo primário deste estudo é avaliar se há associação entre os polimorfismos da PON1: R192Q- rs662, R160G: rs13306698, Leu55Met: rs854560, Promoter\_161: rs705381 e rs3917464 e eventos cardiovasculares em 5 anos numa sub-população com DAC estável do estudo MASS II (Medical, Angioplasty or Surgery Study II). Como objetivos secundários, investigamos a influência destes polimorfismos nas concentrações lipídicas iniciais e após 5 anos de acompanhamento, e também a sua relação com os desfechos cardiovasculares combinados no grupo randomizado para tratamento clínico exclusivo. Foram randomizados 611 pacientes para o MASS II. A população alvo deste estudo foi constituída por 518 pacientes que tiveram material genético coletado (MASS II Genético). Os polimorfismos avaliados, apesar de estarem associados ao metabolismo do HDL-c, apresentaram baixa associação com os níveis lipídicos e com o seu comportamento ao longo de 5 anos. Houve diferença nas concentrações médias de HDL-c entre os genótipos do Promoter\_161, o alelo T associado a concentrações mais baixas de HDL-c ( $p=0,0369$ ). Análise univariada mostrou que houve associação entre o raro alelo G do polimorfismo R160G (5 pacientes) e aumento da mortalidade, porém quando incluído no modelo ajustado por regressão logística multivariada não se mostrou preditor independente de óbito nesta população. Na análise do grupo randomizado para o tratamento médico, o polimorfismo R192Q está associado de forma independente ao novo infarto agudo do miocárdio, óbito, e eventos combinados. Genótipo GG aumentou o risco de óbito em 7,69 vezes (IC: 1.65- 35.76) e de IAM em 6,58 vezes (IC: 1.39- 30.46) quando comparado ao genótipo AA. Alelo A estava independentemente associado a ocorrência de eventos cardiovasculares combinados com um OR de 3,03 (IC: 1.29- 7.07). Em conclusão, o nosso estudo mostrou associação do alelo G na posição R160G com risco aumentado de óbito em pacientes com DAC estável. Em pacientes mantidos no tratamento clínico a posição R192Q está associada ao maior risco de óbito, IAM e eventos cardiovasculares combinados.

Descritores: Polimorfismo genético. Marcadores genéticos. Doenças cardiovasculares. Lipídeos. Doenças das coronárias. Prognóstico.

## SUMMARY

Ferri LAF. *Paraoxonase1 gene polymorphisms as predictors of cardiovascular events in stable coronary artery disease* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms have a known relation with lipid metabolism, conferring a marginal and modest effect on serum lipoprotein concentrations and also on development of coronary artery disease (CAD). The primary objective of this study is to investigate the association between PON1 polymorphisms: R192Q- rs662, R160G: rs13306698, Leu55Met: rs854560, Promoter\_161: rs705381, and rs3917464 and 5-year follow-up cardiovascular events in a subpopulation with stable CAD from MASS II (Medical, Angioplasty or Surgery Study II). Secondary objectives will be to evaluate the influence of these polymorphisms on baseline and 5-year follow-up lipid concentrations and also its association with combined cardiovascular events in the MASS II group randomized for medical treatment. MASS II had 611 patients randomized. Target population comprises 518 patients who had genetic material sampled. Even though the polymorphisms were linked to HDL-c metabolism, there was a low association with lipid levels and changes over the 5-year follow-up. HDL-c mean concentrations were different in the Promoter\_161 genotypes, T-allele was associated with lower levels ( $p=0.0369$ ). Univariate analysis showed association between the rare G-allele of polymorphism R160G (5 patients) and increased mortality, but when adjusted in the multivariate logistic regression model this variable was not independent predictor of mortality in this population. In the medical treatment group, r192Q is associated with new myocardium infarction (MI), combined events and death. When compared to AA genotype, GG genotype increased the risk of death by 7.69 (CI: 1.65- 35.76) and of MI by 6.58 (CI: 1.39- 30.46). A-allele is independently associated with combined cardiovascular events with a OR of 3.03 (CI: 1.29- 7.07). In conclusion, this study showed association between G-allele on R160G position with increased mortality in patients with stable CAD. R192Q polymorphism is associated with higher risk of death, MI and combined cardiovascular events in patients treated medically.

Descriptors: Genetic polymorphism. Genetic markers. Cardiovascular disease. Lipids. Coronary disease. Prognosis

# **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Doença Arterial Coronária: Panorama Atual e Fatores de Risco**

A doença arterial coronária (DAC) é uma doença complexa com predisposição genética clara e participação importante de fatores ambientais relacionados à aterosclerose (Wang, 2005).

O relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) “The Global Burden of Disease” ordenou as principais causas de morte em todas as idades. A DAC foi considerada a causa mais freqüente de morte; correspondendo a 12,2% do total de mortes (7,2 milhões). A segunda causa de morte foi o acidente vascular encefálico (AVE) (9,7% - 5,7 milhões). Este posicionamento de primeiro e segundo lugar é intercambiável dependendo do índice de desenvolvimento do país. A DAC ocupa a primeira posição nos países desenvolvidos e o segundo lugar nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. As implicações econômicas mundiais da DAC são catastróficas. As previsões indicam que a DAC ocupará o segundo lugar em 2030, perdendo apenas para o câncer (WHO, 2008) (Figura 1).

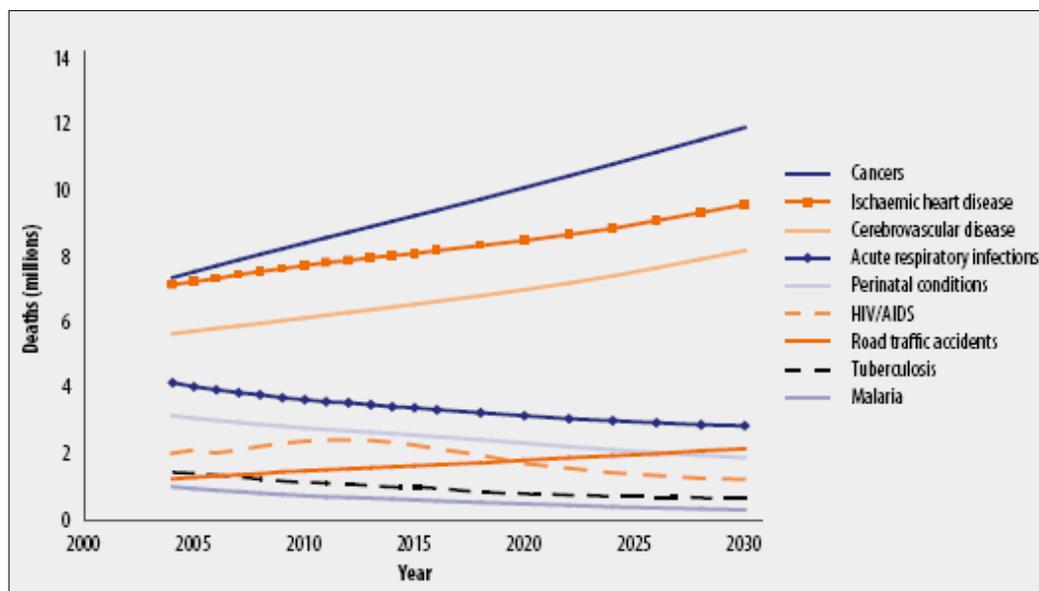


Figura 1 - Gráfico das projeções globais de morte, 2004-2030 [Fonte: WHO, 2008]

Apesar do grande número de mortes, o número de pacientes acometidos por DAC crônica cresce progressivamente em todo o mundo, em razão de maior sobrevivência após o tratamento dos quadros isquêmicos agudos, ao maior número de diagnósticos realizados, bem como em razão da grande prevalência de fatores de risco associada à mudança no estilo de vida (Wilson *et al.* 1998; Unal *et al.*, 2004).

Visto o impacto econômico da DAC na sociedade e suas projeções de crescimento, é imprescindível que os fatores genéticos e ambientais sejam estudados, com o intuito de estabelecer o peso de cada um destes componentes no desenvolvimento e na evolução da DAC; para que as ações de prevenção possam ser efetivas.

## 1.2 Fatores de Risco para a DAC

Os fatores de risco clássicos para a DAC são: dislipidemia, hipertensão, tabagismo, obesidade, diabetes, sedentarismo e história familiar precoce para DAC (Unal *et al.*, 2004; Lloyd-Jones *et al.*, 2004a; Smith *et al.*, 2006). O impacto destes fatores de risco para o desenvolvimento da DAC e seus eventos adversos foi estimado entre 55% a 75% (Beaglehole e Magnus, 2002). Este percentual sem a identificação dos fatores determinantes da doença, permite inserir a DAC em um modelo de doença multifatorial (Naghavi *et al.*, 2003a e 2003b).

Além dos fatores dos fatores de risco clássicos supracitados, recentemente os fatores genéticos tem sido mais estudados e cogitados como fator de risco para DAC. Entretanto, poucos marcadores genéticos são atualmente conhecidos (Beaglehole e Magnus, 2002; Lloyd-Jones *et al.*, 2004b; Ganesh e Nabel, 2005; Morgan *et al.*, 2007). Conseqüentemente, diversas iniciativas em todo o mundo têm objetivado identificar os determinantes genéticos da doença, visando a elucidação de aspectos desconhecidos da aterogênese, novas formas de estratificação de risco, prevenção e tratamento (Naghavi *et al.*, 2003a e 2003b; Ganesh *et al.*, 2004; Ridker *et al.*, 2007).

### **1.3 Estratificação do Risco Associado a Eventos Cardiovasculares em Doença Coronária Estável**

A DAC crônica geralmente tem uma evolução favorável, com uma taxa anual de mortalidade que varia em torno de 1% a 3 %, dependendo das características clínicas do paciente. Dentre os fatores prognósticos da DAC crônica, destacam-se parâmetros clínicos, eletrocardiográficos, angiográficos, demográficos e a função do ventrículo esquerdo (Gibbons, 2008).

O prognóstico da doença coronária crônica é imprevisível, visto que pacientes com perfil clínico parecido, ou seja, portadores dos mesmos fatores de risco clássicos podem ter evoluções diferentes. Portanto, é primordial o conhecimento de marcadores de risco discriminatórios, para agir de forma efetiva e individualizada na prevenção e no tratamento da DAC estabelecida.

Neste contexto inserem-se os marcadores de risco genéticos. Não só para a determinação individual do prognóstico da DAC, mas também na modulação dos fatores de risco clássicos (dislipidemia, diabetes e hipertensão arterial) na ocorrência de eventos cardiovasculares nesta população. Apenas recentemente, evidências têm demonstrado que estes fatores de risco clássicos apresentam forte relação com os marcadores genéticos. Portanto, os fatores de risco genéticos poderiam definir o risco de DAC, aumentando o desenvolvimento de condições clínicas associadas à ela, como diabetes e dislipidemia, por exemplo.

Estudos demonstraram e quantificaram o papel de marcadores genéticos na variabilidade individual dos diversos fatores de risco clássicos associados à DAC. O “Northern Manhattan Family Study” avaliou 803 pacientes de 89 famílias hispânico-caribenhas e determinou a herdabilidade

de vários fatores de risco cardiovascular: circunferência abdominal (46%), glicemia de jejum (24%), triglicérides (47%), lipoproteína de alta densidade colesterol (HDL-c) (60%), pressão arterial sistólica (16%), pressão arterial diastólica (21%) e hipertensão arterial (30%) (Lin *et al.*, 2005). No “San Antonio Family Heart Study”, foram estudados 1.250 indivíduos de 40 famílias mexicanas residentes no Texas. Para a maioria dos fenótipos relacionados aos lipídeos 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 ambientais, analisados conjuntamente, foram responsáveis por 50 a 60% do total da variabilidade fenotípica para lipídeos/lipoproteínas, pressão arterial, e medidas antropométricas; e 30 a 50% das mensurações relacionadas à glicemia. Os valores de herdabilidade obtidos foram todos significativos: colesterol total (39,2%), lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-c) (45,5%), lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL-c) (40,1%), triglicérides (39,6%), apoA1 (43,1%), apoA2 (34,1%), apoB (30,8%), apoE (33,3%), LpA1 (36,0%), Lp[a] (39,0%), atividade de LCAT (20,6%), glicemia de jejum e 2h após sobrecarga de glicose (18,3% e 15,9%, respectivamente), insulina de jejum e duas horas após sobrecarga (34,8% e 12,9%, respectivamente), pressão arterial sistólica e diastólica (14,8% e 28,3%, respectivamente) e índice de massa corpórea (42,4%) (Mitchell *et al.*, 1996).

Estes dados indicam a urgência de que os estudos de identificação de fatores de risco para a DAC; incorporem os fatores genéticos ao seu desenho e forma de análise. É imprescindível que além das diversas inter-

relações e modulações entre os determinantes genéticos de fatores de risco clássicos, as outras variáveis de risco genético que atuem de maneira outra, que não via fatores de risco clássicos, sejam acrescentadas aos estudos (Wallace, 2006; Kraft *et al.*, 2007).

Portanto, a ocorrência da DAC é resultado da confluência de fatores genéticos e ambientais (Voetsch e Loscalzo, 2004). É imprescindível que estes fatores sejam estudados, para que fique bem estabelecido o peso de cada fator no desenvolvimento da DAC, para que no futuro a medicina possa agir de forma efetiva na prevenção e tratamento da DAC (Clayton e McKeigue, 2001; Merikangas *et al.*, 2006).

#### **1.4 Estudos Clínicos em Doença Arterial Coronária Crônica**

Diversos ensaios clínicos foram realizados comparando os tratamentos de revascularização cirúrgica do miocárdio, angioplastia percutânea coronária e o tratamento clínico medicamentoso com o intuito de avaliar qual a melhor opção terapêutica para pacientes com DAC estável, (Srinivas *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2006; King, 2007, Hueb *et al.*, 2007). Apesar das particularidades inerentes a cada um destes ensaios clínicos, um resultado comum a todos é a ausência de diferença entre a opção do tratamento e a mortalidade nos pacientes portadores de DAC estável em cinco anos de evolução.

O estudo MASS II (“Medical, Angioplasty or Surgery Study II”) comparou as três opções terapêuticas disponíveis: angioplastia, revascularização do miocárdio e tratamento clínico; em pacientes com

coronária multiarterial estável e função ventricular preservada. Assim como os outros estudos clínicos, ao final de cinco anos, não houve diferença na mortalidade entre os três grupos de tratamento (Hueb *et al.*, 2007).

Recentemente, discute-se quanto ao estudo de variantes gênicas para DAC, vem sendo considerada em subgrupos de pacientes com características específicas que possibilitem a delimitação de um fenótipo preciso entre as várias apresentações clínicas da DAC (Arnett *et al.*, 2007). Em relação aos pacientes com doença arterial coronária estável, poucos estudos genéticos foram realizados e desta forma ainda não está estabelecida a real participação dos polimorfismos (SNPs) na ocorrência de novos eventos cardiovasculares.

### **1.5 A Importância de Fatores de Risco Genético no Processo de Aterogênese**

Na última década, vários estudos sobre diferentes polimorfismos como fatores de risco para DAC e infarto agudo do miocárdio (IAM) demonstraram resultados inconclusivos (Lane e Grant, 2000; Voetsch e Loscalzo, 2004; Ajjan e Grant, 2006; Watkins e Farrall, 2006). Estes resultados refletem algumas questões importantes: (a), a patogênese da DAC envolve vários mecanismos bioquímicos e fenótipos intermediários (por exemplo, dislipidemia e hipertensão arterial), cada um por sua vez sob o controle de múltiplos genes; e (b) a enorme heterogeneidade das investigações, em termos de estudo, etnia, fenótipos dos pacientes incluídos e desfechos clínicos (Lane e Grant, 2000).

Em se tratando do código genético, com aproximadamente dois milhões de polimorfismos já identificados, a avaliação do efeito isolado de um determinado alelo é um desafio, pois a DAC é muito susceptível a interações gene-gene e gene-ambiente (Watson *et al.*, 1995). A expressão de variações específicas em um sistema biológico complexo é sujeito a modificações de outros genes envolvidos no mesmo processo fisiológico, o que prejudica, por exemplo, a identificação real do papel de um determinado polimorfismo na homeostase do sistema. Em contrapartida, um traço herdado pode ser modificado ou manifestado por influências do meio ambiente quando uma única mutação responde por uma síndrome genética ou diversos polimorfismos, aparentemente de pouca influência em condições basais, gerando um fenótipo alternativo após sofrerem influências ambientais.

Estudos de associação genética de diferentes variantes gênicas das principais vias biológicas envolvidas na patogênese da DAC - metabolismo das lipoproteínas, integridade endotelial, inflamação arterial e trombose - demonstraram aumento de risco em pacientes portadores de DAC (La Du, 1988). A predisposição genética para a DAC provavelmente resulta a partir de efeitos aditivos ou sinérgicos de vários genes com a participação funcional de suas determinadas variantes gênicas (alelo). No entanto, pouca atenção tem sido dedicada a avaliar o efeito combinado de genes específicos relacionados a específicas vias biológicas, e a análise simultânea de múltiplos alelos, para a determinação do risco, que poderiam ser antecipadas, por analogia com o conhecido efeito aditivo de fatores de risco convencionais que significativamente aumentam o risco da susceptibilidade à doença.

## 1.6 Dislipidemia e Polimorfismo

A dislipidemia é um dos principais fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento da aterosclerose sendo que níveis elevados de LDL-c e triglicérides e baixos de HDL-c têm sido associados à mortalidade cardiovascular. Estudos têm demonstrado que, além das alterações quantitativas, diferenças qualitativas entre as lipoproteínas podem ter influência significativa no resultado clínico e têm potencial impacto na mortalidade (Naghavi *et al.*, 2003a ;Beaglehole e Magnus, 2002).

Recentes evidências têm demonstrado que variações genéticas nos genes envolvidos no metabolismo lipídico podem influenciar o risco de doença cardiovascular (Baroni *et al.*, 2003; Regieli *et al.*, 2009), embora vários *single nucleotides polymorphism* (SNPs) em genes relacionados ao metabolismo lipídico só modestamente influenciam os níveis plasmáticos de LDL-c, HDL-c e triglicérides (Mackness *et al.*, 2001). Além disso, foi proposto que a seqüência de variantes do DNA representam um índice de tempo de exposição à níveis de lipoproteínas alterados durante a vida e podem acrescentar informações preditivas superiores a dos valores sanguíneos de lipídios isolados (Ye *et al.*, 2006).

Recentemente foi publicado um escore genótipo, composto por nove SNPs, validado e associado à modulação das concentrações séricas de LDL-c e HDL-c como fator de risco independente para a incidência de doença cardiovascular em uma coorte de caucasianos (Kathiresan *et al.*, 2008).

Essa estratégia de combinações de SNPs, de determinada via biológica, como uma painel de marcador de risco para DAC tornou-se bastante atrativa e esta abordagem foi tomada neste trabalho (Kathiresan *et al.*, 2008).

### **1.7 HDL-c e Paraoxonase**

A dislipidemia é considerada fator de risco para a DAC há algumas décadas, porém na atualidade tem-se dado maior atenção às frações do colesterol. Evidências recentes sugerem que a lipoproteína de alta densidade (HDL) inibe a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, portanto oferece proteção contra o risco de DAC.

Esta propriedade antioxidante do HDL é dada em parte pela paraoxonase 1 (PON1), enzima associada ao HDL, que protege as lipoproteínas contra a peroxidação lipídica. Portanto a PON1 aparentemente tem função primordial na proteção contra DAC (Hassett *et al.*, 1991; Mackness e Durrington, 1995; Pfohl *et al.* 1999; Navab *et al.*, 2000). Esta relação entre paraoxonase1 e DAC foi apenas recentemente bem estabelecida.

### 1.7.1 Paraoxonase

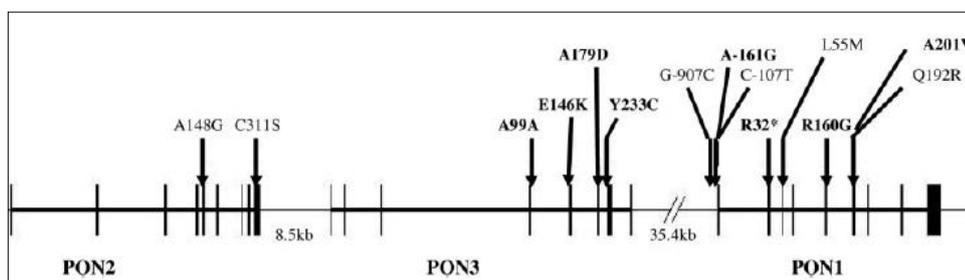
A Paraoxonase (PON) é uma família multigene de enzimas, a qual inclui PON1, PON2 e PON3, localizados adjacientemente no cromossomo 7q21-3 em humanos. A PON foi historicamente e primariamente estudada na toxicologia, por sua propriedade em hidrolizar um grande número de compostos organofosforados, presente em inseticidas, pesticidas e gases que atuam no sistema nervoso central. Desta forma explica-se a origem do nome paraxonase, que advém do pesticida paraoxon (La Du, 1988; Davies *et al.*, 1996).

Nestes primeiros estudos de hidrólise do paraoxon, já foi determinada grande variabilidade de resposta na capacidade de hidrólise do paraoxon entre indivíduos sob influência de dois polimorfismos: PON1 Leu55Met e R192Q (Mackness *et al.*, 1998).

PON1, PON2 e PON3 compartilham similaridade em 60 a 65% dos aminoácidos (Primo-Parmo *et al.*, 1996). PON1 foi a primeira a ser encontrada e a mais estudada. PON2 e PON3 foram apenas recentemente identificadas e ainda apresentam suas funções apenas superficialmente determinadas (Mackness e Mackness, 2004) (Figura 2).

A PON1 é uma proteína constituída por 354 aminoácidos, com peso molecular de 43kDa. (Durrington *et al.*, 2001). O principal local de síntese da PON1 é o fígado, e no sangue encontra-se fortemente e quase exclusivamente associada à HDL-c. Recentemente, foi demonstrado que menos de 5% da paraoxonase sérica estaria ligada à VLDL-c e que uma quantidade ainda menor estaria presente nos quilomícrons (Aviram e Rosenblat, 2008; Fuhrman *et al.*, 2005).

Sabe-se que PON 3 também reside na partícula de HDL (Blatter *et al.*, 1993; Mackness *et al.*, 1993; Watson *et al.* 1995; Reddy *et al.*, 2001), porém *in vivo* a grande responsável pela ação protetora do HDL-c, limitando a oxidação do LDL-c, é a PON1. *In vitro*, as três PON protegem o LDL da oxidação (Beaglehole e Magnus, 2002; Naghavi *et al.*, 2003b; Watkins e Farrall, 2006; Lloyd-Jones *et al.*, 2004b; Voetsch B, Loscalzo, 2004).



**Figura 2 - Família gene PON no cromossomo 7. Apenas alguns polimorfismos estão representados [Fonte: Ranade *et al.*, 2005]**

A atividade enzimática da PON1 já está presente em recém-nascidos, sendo que a partir de um ano de idade atinge concentrações séricas semelhantes ao adulto. Estas concentrações parecem ser constantes por toda a vida, não tendo sido relatadas diferenças entre os sexos (Mackness e Mackness, 2004). Entretanto, já foi relatado que a atividade enzimática da PON1 varia de 10 a 40 vezes entre as populações com diferentes formações étnicas, bem como se apresenta diminuída em pacientes portadores de certas patologias como diabetes, hipercolesterolemia familiar, cirrose hepática, doença renal crônica, entre outras (Mackness *et al.*, 1998; Aynacioglu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003).

A PON1 está diretamente relacionado às propriedades anti-oxidativas e anti-inflamatórias e desta forma tem sido o maior foco das pesquisas que

buscam a correlação da PON com doenças cardiovasculares. Já está bem estabelecido que a atividade sérica da paraoxonase 1 está inversamente correlacionada com DAC, hipercolesterolemia e diabetes (Chen *et al.*, 2003; Hueb *et al.*, 2007).

Desta forma, por apresentar esta atividade antioxidante e a hipótese do LDL oxidado ser um mediador chave da aterosclerose; a paraoxonase 1 tem sido considerada como gene candidato para explicar a susceptibilidade para DAC.

### **1.8 Variantes genéticas da Paraoxonase 1 e DAC**

A atividade da PON1 é claramente influenciada pelos SNPs. Os polimorfismos mais estudados da paraoxonase estão localizados no gene PON1 e são eles: Leu55Met, R192Q.

Ambos têm sido estudados em relação ao risco de DAC, porém os resultados tem sido conflitantes em diferentes populações (Witztum e Steinberg, 1991; Aviram *et al.*, 1998).

O polimorfismo Gln192Arg ou R192Q, resultante da substituição Glutamina por Arginina na posição 192, associou-se com maior presença de extensão da DAC em indivíduos diabéticos (Robertson *et al.*, 2003). Os indivíduos homozigóticos para esta variação apresentaram menor atividade sérica desta enzima e sua relação com o tabagismo conferiu uma importância ainda maior ao polimorfismo (Wang *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2003; Martinelli *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm sugerido que o tabagismo aumenta o risco para DAC, pois reduz a atividade da PON1 e conseqüentemente promove a oxidação lipídica. Desta forma, pacientes com variantes genéticas que causam baixa atividade de PON1 apresentariam maior risco para DAC risco associado ao tabagismo (Robertson *et al.*, 2003).

Também está descrita a correlação entre os polimorfismos da PON e o número de coronárias acometidas em um estudo de 711 pacientes do estudo “Women’s Ischemia Syndrome Evaluation” (WISE). O odds ratio para três artérias foi 2.80 (IC95%: 1,06 - 7,37;  $p = 0,038$ ) para PON1 códon 192 Arg/Arg e 3,68 (IC95%: 1,26 - 10,68;  $p = 0,017$ ) para PON2 códon 311 Cys/Cys (Chen *et al.*, 2003). Este estudo avaliou apenas a associação polimorfismo e extensão da doença, não forneceu dados evolutivos destes pacientes.

Foi feito o estudo de polimorfismos relacionados à PON na população do estudo “Cholesterol and Recurrent Events” (CARE), pacientes com história de infarto agudo do miocárdio e com acompanhamento por cinco anos. Neste estudo o polimorfismo Gln192Arg foi um importante fator de risco para acidente vascular encefálico nesta população de pacientes coronarianos ( $p=0,003$  na análise multivariada incluindo sexo, idade, LDL-c hipertensão, diabetes, tabagismo e tratamento com pravastatina). A chance de apresentar AVE foi 2,28 vezes para os heterozigotos e de 2,47 para os homozigotos (Arg/Arg), quando comparados com os homozigotos (Gln/Gln). (Ranade *et al.*, 2005).

Na população brasileira, um estudo recente demonstrou Leu55Met como marcador genético independente para o primeiro evento de DAC (Jarvik *et al.*, 2000).

Há vários estudos sobre a correlação entre DAC e os polimorfismos da PON (Robertson *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2004), porém além dos resultados serem conflitantes, há poucos estudos que avaliaram a influência do polimorfismo da PON 1 na sobrevida dos pacientes e risco de novos eventos cardiovasculares (Lawlor *et al.*, 2004).

Até o momento foi estudado em diversas populações o efeito destes polimorfismos no risco da doença (primeiro evento e extensão da doença), mas os dados ainda não são conclusivos. Uma meta-análise sobre a associação do polimorfismo R192Q e a DAC concluiu que até o momento da análise não havia evidência robusta para definitivamente associar o polimorfismo R192Q com DAC (Lawlor *et al.*, 2004).

Os dados na literatura são ainda mais escassos sobre o efeito preditor, dos polimorfismos da PON, para novos eventos cardiovasculares em pacientes com DAC estabelecida.

Recentemente, setembro de 2009, foi publicado um estudo onde foi analisado o efeito de dois polimorfismos da PON1: R192Q e Leu55Met nos pacientes pertencente ao REgression GRowth Evaluation Statin Study (REGRESS). Neste estudo foi avaliada a relação destes dois polimorfismos e os eventos cardiovasculares após 10 anos. A glutamina no códon 192 e a metionina no códon 55 foram associadas com maior risco de morte por doença coronária isquêmica, estando o risco por alelo aumentado em 1,71

vezes com a presença da glutamina e em 1,56 pela presença da metionina (Regieli *et al.*, 2009).

Estes resultados enfatizam a nossa hipótese sobre a importância e relevância desta via polimórfica na predição de eventos cardiovasculares em pacientes com doença coronária estabelecida (Regieli *et al.*, 2009).

### **1.9 Relevância do Estudo**

O aspecto relevante deste estudo é que a maioria dos estudos publicados tem relatado a associação dos polimorfismos da PON e o risco de DAC, principalmente o primeiro evento (infarto agudo do miocárdio) ou diagnóstico da lesão coronária.

Faltam estudos com dados evolutivos, referentes à incidência de novos eventos cardiovasculares e mortalidade em uma população com doença coronária estabelecida. Pouco se sabe sobre a influência dos polimorfismos da PON1 no prognóstico em pacientes com DAC após o primeiro evento cardiovascular.

Há poucos estudos na população brasileira sobre a associação de polimorfismos e DAC. Considerando que os polimorfismos são altamente determinados por raças e etnias, é de extrema importância estudos brasileiros que explorem a relação dos polimorfismos da PON1 e DAC.

Este estudo tem como objetivo responder a estas questões que ainda estão em aberto na literatura atual, demonstrando a influência dos polimorfismos da PON1 na evolução de pacientes com doença coronária na população brasileira.

Diante de todos estes fatos expostos, este estudo torna-se único e imprescindível à literatura médica. Neste presente estudo serão analisados cinco polimorfismos do gene da PON1: R192Q, R160G, Leu55Met, Promoter\_161 e rs3917464. Nenhum outro estudo abordou de forma tão abrangente os polimorfismos no gene da PON1.

Este estudo será o primeiro estudo prospectivo, randomizado para grupos de tratamento de doença cardiovascular, com follow-up durante todo o período do estudo, que avaliará o efeito dos polimorfismos da PON1 nos eventos cardiovasculares.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Primário**

Investigar o valor preditivo de cinco polimorfismos (R192Q, R160G, Leu55Met, Promoter\_161 e rs3917464) localizados no gene da PON1, para eventos combinados (infarto agudo miocárdio, mortalidade geral e necessidade de nova intervenção devido à angina refratária) em uma população com doença coronária multiarterial estável e função ventricular normal no período de cinco anos.

## **2.2 Objetivos Secundários**

a) Investigar o valor preditivo de cinco polimorfismos (R192Q, R160G, Leu55Met, Promoter 161 e rs3917464) localizados no gene da PON1 em uma população com doença coronária multiarterial estável e função ventricular normal, no período de cinco anos para:

- mortalidade geral;
- nova intervenção;
- incidência de acidente vascular encefálico;
- incidência de infarto agudo miocárdio.

b) Investigar o valor preditivo dos cinco polimorfismos da PON1 no subgrupo de pacientes randomizados para o grupo clínico do estudo MASS II;

c) Avaliar a influência dos polimorfismos da PON1 no comportamento de Colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides em cinco anos.

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 Estudo MASS II**

“The Medicine, Angioplasty or Surgery Study II” (MASS II) é um estudo randomizado, unicêntrico, prospectivo e multidisciplinar que teve como objetivo comparar os resultados imediatos e tardios dos três tratamentos disponíveis: clínico, revascularização cirúrgica do miocárdio e intervenção percutânea coronária em pacientes portadores de DAC com estenose arterial coronária em múltiplos vasos e função ventricular esquerda preservada (Hueb *et al.*, 2007). Em cada grupo terapêutico, foram analisados os seguintes eventos: necessidade de nova intervenção devido à angina refratária, infarto do miocárdio e morte. A interferência dos fatores de risco tais como: hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo foram também considerados.

O MASS II foi desenvolvido no Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), envolvendo a Unidade Clínica de Coronariopatia Crônica, Serviço de Hemodinâmica, Divisão de Cirurgia Cardíaca, e demais unidades interligadas para exames e procedimentos, com a aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração e da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### 3.1.1 Seleção de pacientes

Durante um período de cinco anos (maio de 1995 a maio de 2000), o estudo MASS II selecionou 611 pacientes, que foram randomizados em três grupos:

- 203 pacientes (33%) para revascularização cirúrgica do miocárdio;
- 205 pacientes (34%) para angioplastia coronária transluminal;
- 203 pacientes (33%) para tratamento clínico medicamentoso.

Os pacientes só foram incluídos e randomizados se, cirurgiões, hemodinamicistas e médicos clínicos concordassem simultaneamente sobre a possibilidade de qualquer uma das opções de tratamento.

A participação dos pacientes foi voluntária após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), inclusive para a coleta de material genético que foi feita no início do estudo. Este estudo foi aprovado na Comissão Científica do Instituto do Coração, sob o nº 2623/05/043 (Anexo B), e da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 416/05 (Anexo C).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os termos da declaração de Helsinque e de boas práticas clínicas.

### 3.1.2 Critérios de inclusão

A população considerada para a inclusão neste estudo foram pacientes com DAC multivascular sintomática, documentada angiograficamente, e isquemia miocárdica, referida através de sintomas ou identificadas por testes ergométricos. A angina de peito foi graduada pela “Canadian Cardiovascular Society” (CCS) (classe II ou III). A obstrução luminal deveria ser maior do que 70%, em pelo menos duas artérias principais, diagnosticadas visualmente pela cinecoronariografia. O paciente foi considerado apto a ser submetido à revascularização do miocárdio (RM) ou angioplastia transluminal coronária (ATC), quando portador de condições clínicas e angiográficas e obedecendo aos critérios previamente estabelecidos em consensos.

### 3.1.3 Critérios de exclusão

Os critérios para a não inclusão foram:

- idade inferior à 35 anos ou superior à 77 anos;
- infarto agudo do miocárdio ou angina instável nas últimas quatro semanas;
- acidente vascular encefálico ou Ataque isquêmico transitório nos últimos seis meses;
- doenças cardíacas associadas (congenitas, valvar, miocardiopatia, não-isquêmica, pericárdica);
- disfunção ventricular com fração de ejeção < 45% (fórmula de Dodge);

- aneurisma de ventrículo esquerdo;
- intervenções percutâneas ou cirúrgias prévias;
- lesão de tronco da artéria coronária esquerda >50%;
- anatomia coronária inacessível para ATC ou RCM (segundo o consenso dos cardiologistas envolvidos);
- gravidez (suspeita, diagnosticada ou planejada);
- outras co-morbidades que contra-indicassem ATC ou RCM;
- expectativa de vida limitada devido doença grave associada (neoplasia, insuficiência renal ou hepática, doenças hematológicas ou discrasias sanguíneas);
- impossibilidade do paciente em colaborar com o protocolo de estudo ou acompanhamento ambulatorial.

#### **3.1.4 Definição de critérios e procedimentos de investigação**

A angina foi considerada de acordo com a classificação funcional da CCS (Campeau, 1976), entendendo-se como refratária quando os pacientes tratados com terapia anti-isquêmica tríplice (beta-bloqueador e/ou bloqueador de canal de cálcio, nitrato e aspirina) não obtiveram sucesso, necessitando de uma intervenção.

O infarto agudo do miocárdio foi assim definido:

a) surgimento de novas ondas Q em pelo menos duas derivações eletrocardiográficas contíguas; ou:

b) sintomas compatíveis com IAM, associados à elevação da fração MB da enzima creatinofosfatoquinase (CPK) maior que três vezes o limite

superior ao normal, não sendo considerado para o grupo ATC quando esta elevação ocorresse dentro de 96 horas após o procedimento (Chaitman *et al.*, 1997) e para o grupo da cirurgia não foi considerado a elevação enzimática até quatro vezes o limite superior dentro das primeiras 48 horas.

O acidente vascular encefálico foi definido através de exames clínicos pelo neurologista e com confirmação de imagem.

O diagnóstico de diabetes foi realizado pelos critérios estabelecidos pelo “Expert Committee of American Diabetes Association (ADA)”, sendo os valores de corte 126 mg/dL ao jejum e 200 mg/dL após o teste de tolerância à glicose (GTT) ou glicemia ao acaso. O diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica foi considerado quando os níveis de pressão sistólica e diastólica foram maiores que 140 e 90 mmHg, respectivamente ou em uso de antihipertensivo, baseado na definição da V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC, 2007). A síndrome metabólica foi definida segundo os critérios do “National Cholesterol Education Program” (NCEP) (Charles *et al.*, 2003).

Em relação ao tabagismo, ex-tabagista foi considerado quando cessou de fumar há mais de um ano e o índice de massa corpórea (IMC) foi calculado conforme a fórmula  $\text{Peso/Altura}^2$ .

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 considerados a partir da data de randomização, seguindo o princípio de “intention to treat”.

O teste de esforço foi considerado ineficaz quando o paciente não conseguiu atingir 5 METs (equivalente metabólico) ou frequência cardíaca máxima < 80%. Exames de rotina incluíram ECG de repouso, ecocardiograma e rotina laboratorial a cada seis meses.

As cinecoronariografias foram realizadas 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 (Sones, 1962) A fração de ejeção foi calculada pela fórmula de proposta por Dodge (Dodge *et al.*, 1966). Dois observadores experientes quantificaram visualmente as obstruções, 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.* (1993). A doença aterosclerótica coronária multiarterial foi considerada quando encontrada estenose de > 70% em mais de uma artéria coronária ou um dos seus ramos, considerando-se apenas vasos com diâmetro luminal superior a 1,5 mm.

Os pacientes do grupo ATC foram submetidos à angiografia coronária, de rotina, no sexto mês pós-procedimento. A realização da cinecoronariografia estava programada para o quinto ano de seguimento.

## **3.2 Intervenção Terapêutica**

### **3.2.1 Terapêutica clínica**

Os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos a um completo regime terapêutico os quais incluíram: nitratos, aspirina, beta-bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da enzima de conversão de angiotensina (ECA), ou uma combinação destes fármacos, a menos que, contra-indicados. Inibidores da Hydroxymethylglutaryl-Coenzima-A redutase também foram prescritos, além da recomendação de uma dieta pobre em gorduras saturadas e carboidratos. Insulina e hipoglicemiantes orais foram prescritos para o controle glicêmico dos pacientes portadores de diabetes.

Todos os medicamentos estavam disponíveis sem ônus para os pacientes no Instituto do Coração, e foram prescritos para os três grupos terapêuticos.

As consultas foram trimestrais no primeiro ano de acompanhamento e, a partir do segundo ano foram semestrais. Durante as consultas, eram feitas avaliações clínicas e laboratoriais com o intuito de atingir todas as metas estabelecidas para o controle dos fatores de risco da DAC, de acordo com as recomendações vigentes.

### 3.2.2 Revascularização miocárdica percutânea

Para os pacientes encaminhados para o tratamento percutâneo, o procedimento estava disponível dentro de três semanas após a randomização. Os recursos utilizados para a terapêutica através de cateter, incluíram: “stents”, LASER, aterectomia direcional e balão, sendo que em 80% pelo menos um “stent” foi utilizado. Os intervencionistas foram estimulados a intervir em todas as artérias que pudessem estar contribuindo para a isquemia miocárdica e/ou demonstrassem obstrução  $\geq 70\%$ , de tal modo que a estratégia foi planejada para permitir a revascularização funcional completa. A ATC foi realizada de acordo com protocolo padronizado, incluindo a administração oral de aspirina ou ticlopidina nas 24 horas precedentes; heparina endovenosa (10000 UI) e nitroglicerina foram infundidas imediatamente antes e durante o procedimento. Glicoproteína IIb/IIIa não foi usada neste grupo de pacientes e, o procedimento percutâneo, seria considerado como sucesso, quando a estenose residual fosse inferior a  $<50\%$  do diâmetro luminal TIMI-3 ou foi reduzida em pelo menos 20% do valor inicial da lesão.

No caso de oclusão aguda do vaso tratado durante a ATC, a cirurgia de revascularização miocárdica de emergência foi uma opção.

### **3.2.3 Revascularização cirúrgica do miocárdio**

Para os pacientes encaminhados para a revascularização cirúrgica do miocárdio, o procedimento estava disponível dentro de quatro semanas, após a randomização. A revascularização completa foi estimulada se tecnicamente factível em todas as artérias abordáveis, incluindo aquelas com estenose  $\geq 50\%$ . Todos os recursos foram utilizados, tais como: enxertos venosos ou condutos arteriais (artérias mamárias, artéria radial ou gastroepiplóicas), sendo que em 90% dos casos a mamária esquerda foi utilizada. A técnica cirúrgica foi utilizada de acordo com o procedimento padronizado, sob hipotermia e uso de solução cardioplégica (Kirklin *et al.* 1991) Não foi utilizada técnica cirúrgica sem circulação extra-corpórea.

Embora, a intervenção em todas as artérias possíveis de revascularização foi recomendada, a revascularização equivalente para os dois grupos não foi mandatória.

### **3.3 Definição de Variáveis para o Banco de Dados**

O estudo MASS II apresenta um amplo banco de dados que foi concebido no início deste estudo. Estes dados são coletados de forma contínua e prospectiva por toda equipe envolvida no estudo.

Este banco de dados conta com a dedicação integral de uma equipe composta por assistentes de pesquisa, enfermeiras e estatística; sob a coordenação e supervisão do pesquisador principal e idealizador do MASS II: Dr. Whady Hueb.

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 de angina;
- condição de fumante presente ou ausente;
- peso, altura e IMC;
- valores séricos em jejum de glicose, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicerídeos;
- fração de ejeção do VE;
- alocação para o grupo de tratamento;
- número de vasos acometidos;
- DNA genômico.

### **3.4 MASS II Genético**

O estudo MASS II consistiu em 611 pacientes, sendo que destes 540 tiveram material genético coletado na randomização e armazenado apropriadamente para análises futuras. Entretanto, apenas 518 apresentaram amostras adequadas para a análise. Esta população constitui a nossa população de estudo e será denominada MASS II genético.

#### **3.4.1 Preparação da amostra para análise dos polimorfismos**

Foram colhidos três tubos estéreis com cerca de 3,0 mL de sangue cada, dois destes contendo EDTA (Vacutainer BD, concentração final de 1 - 2 mg/mL) para a extração do plasma e outro com gel e ativador de agregação plaquetária para extração do soro de todos os pacientes pertencentes ao estudo MASS II no início do estudo.

As amostras foram colocadas imediatamente após a coleta em gelo para o posterior transporte até o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, onde foram centrifugadas a 3000 r.p.m. por 10 minutos em centrífuga clínica resfriada a 4°C. O precipitado (contendo leucócitos) do tubo contendo EDTA foi armazenado a -20°C para a extração do DNA.

### 3.4.2 Seleção dos SNPs

Foram estudados os cinco marcadores polimórficos mais descritos no gene da PON1. Todos estes estão localizados no cromossomo 7.

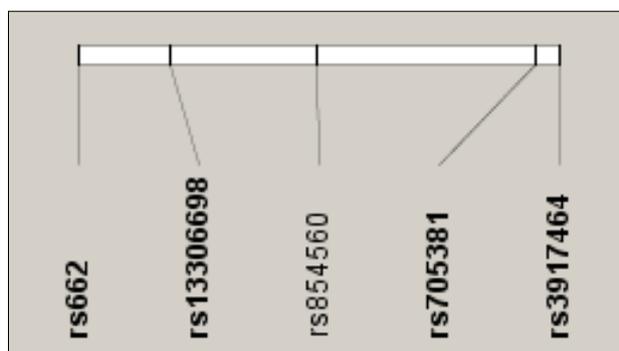
Os polimorfismos são identificados pelo número de referência do polimorfismo (rs) [RefSNP (rs) Number]. Alguns polimorfismos, usualmente os mais estudados, possuem um nome que o identifica além do rs.

A seguir, os polimorfismos da PON1 estudados, estão listados com o rs e nome do polimorfismo:

- a) R192Q: rs662;
- b) R160G: rs13306698;
- c) Leu55Met: rs854560;
- d) Promoter 161 ou P\_161: rs705381;
- e) rs3917464.

Dentre os polimorfismos selecionados para este estudo, apenas o último rs3917464 não apresenta um nome.

Estes polimorfismos estão na seguinte ordem no gene (Figura 3).



**Figura 3 - Sequência dos cinco polimorfismos do gene PON1 estudados**

Estes SNPs foram genotipados nos pacientes pertencentes ao estudo MASS II Genético.

A substituição de nucleotídeo envolvida nos polimorfismos estudados está listada na Tabela 1, representada por alelo não polimórfico e alelo polimórfico. As últimas duas colunas desta tabela, mostram a posição da proteína onde ocorre a troca de resíduo, em consequência do polimorfismo. Esta troca de resíduo e a posição na proteína, nos esclarece a origem de alguns nomes dados aos polimorfismos.

**Tabela 1 - Polimorfismos estudados no MASS II genético: substituição de nucleotídeos e relação destes com a proteína**

Polimorfismo	Troca alelo		Posição Proteína	Troca Resíduo
	Alelo não polimórfico	Alelo polimórfico		
R192Q	A	G	192	Q [Gln] → R [Arg]
R160G	A	G	160	R [Arg] → G [Gly]
Leu55Met	T	A	55	L [Leu] → M [Met]
Promoter 161	C	T	...	...
rs3917464	G	C	...	...

... dado não disponível

### 3.4.3 Polimorfismos da PON1: frequência no International HapMap Project

A Tabela 2 lista a referência dos cinco polimorfismos da PON1 selecionados para este estudo e as frequências dos genótipos e alelos destes polimorfismos na população caucasiana no banco de dados HapMap. O Projeto Internacional HapMap é um projeto público internacional resultado da parceria de agências de pesquisas do Canadá, China, Japão, Nigéria, Inglaterra e Estados Unidos, com o objetivo de ajudar pesquisadores a encontrarem genes associados com doenças e resposta terapêutica à medicamentos.

**Tabela 2 - Polimorfismos estudados: contexto genômico e referência no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) - Frequência na população caucasiana no banco de dados HapMap: Cromossomo 7 gene PON1**

Polimorfismo	Alelo ancestral	Genótipo	Alelos
R192Q	rs662	G	A G
		A/A A/G G/G	A G
		0.400 0.483 0.117	0.642 0.358
R160G	rs13306698	A	A G
		A/A A/G G/G	A G
		1.000	1.000
Leu55Met	rs854560	Não disponível	A T
		A/A A/T T/T	A T
		0.362 0.483 0.155	0.603 0.397
Promoter 161	rs705381	C	C T
		C/C C/T T/T	C T
		0.036 0.964	0.018 0.982
...	rs3917464	G	G C
		G/G G/C	G C
		1.000	1.000

### 3.4.4 Genotipagens

A metodologia de genotipagem, já amplamente utilizada no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, é por digestão enzimática com endonuclease após realização de reação de PCR amplificando a região polimórfica.

A análise é feita posteriormente por resolução de tamanho de fragmentos através de gel de agarose e as informações obtidas guardadas em formato digital.

A análise genética de cada polimorfismo irá nos informar para cada paciente quais são os alelos. O paciente pode apresentar apenas um alelo

polimórfico (heterozigoto), ou dois alelos polimórficos (homozigoto), ou ambos os alelos não polimórficos (homozigoto: “wild type”).

#### **3.4.5 Extração e processamento do DNA**

O DNA foi extraído das amostras de sangue, e armazenado utilizando o método de “salting-out”. O DNA extraído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e foi amplificado através de reações em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de “primers” desenhados para detectar as mutações dos genes estudados.

#### **3.4.6 Digestão com enzimas de restrição**

A técnica envolve uma reação em cadeia da polimerase, onde os produtos de amplificação para as mutações em questão são digeridos pelas respectivas enzimas de restrição, que diferencia os alelos alternativos.

Os produtos de digestão foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%.

Para a análise de cada polimorfismo, as condições de reação foram obedecidas conforme as instruções de cada fabricante para cada enzima. Em geral, 10 unidades de enzima foram usadas para cada  $1\ \mu\text{g}$  de DNA em temperatura ótima, por um tempo maior que três horas de incubação para que a digestão ocorresse com certeza.

### 3.5 Análise Estatística

Os pacientes foram divididos em três grupos conforme o genótipo de cada polimorfismo (ex: AA, AB e BB). Também foram feitas análises por análise genotípica de dominância e alélica aditiva.

Na análise genotípica de dominância foi considerado a presença ou não do alelo em análise. Por exemplo, a análise de dominância do alelo G no polimorfismo R192Q, considerou o alelo G presente nos pacientes com genótipo GG e GA e ausente nos pacientes AA e quando feita a análise de dominância do alelo A, este foi considerado presente nos pacientes AA / AG e ausente nos pacientes GG.

Nas análises alélicas aditivas, foi selecionado o alelo “alvo” e somou-se o número de alelos presentes nas posições de interesse para a análise.

As variáveis foram analisadas descritivamente, obtendo-se valores mínimos e máximos, cálculo da média  $\pm$  desvio padrão (DP) para variáveis contínuas; e valores de frequência absoluta e relativa para variáveis categóricas.

As características clínicas e demográficas dos pacientes foram analisadas nos genótipos apresentados nas posições estudadas.

As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Esta análise permite testar a igualdade entre os grupos. Este teste compara as frequências observadas e esperadas em cada categoria; quando a frequência esperada foi inferior à 5, foi utilizado o teste exato de Fisher ou teste de verossimilhança.

As diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos foram analisadas por ANOVA (três ou mais grupos) ou teste T Student (dois grupos).

Foi feita a verificação da distribuição gaussiana para todas as variáveis contínuas. As variáveis contínuas sem distribuição normal, foram submetidas à transformação logarítmica.

As variáveis contínuas sem distribuição gaussiana foram analisadas por teste não-paramétrico Mann-Whitney.

A análise estatística utilizada para as variáveis categóricas, qui-quadrado, não considera a natureza longitudinal (coorte) deste estudo. A população do estudo MASS II apresenta um acompanhamento de cinco anos e foi recrutada prospectivamente. Desta forma, para a análise complementar do desfecho primário (eventos combinados) e secundário (mortalidade geral, nova intervenção, AVE e IAM) levando em consideração o desenho deste estudo (coorte, longitudinal) foram feitas as curvas de Kaplan-Meier (tempo para o evento) no decorrer de cinco anos de acompanhamento dos pacientes do estudo MASS II. Foram feitas curvas a fim de mostrar a relação de cada polimorfismo com cada desfecho estudado nos cinco anos de estudo. Todas as curvas foram comparadas estatisticamente pelo teste de Log Rank. As curvas de Kaplan-Meier estão representadas pelas curvas de sobrevida (Survival Function).

O teste de Log Rank também pode ser chamado de teste de Cox-Mantel. Este teste tem como objetivo analisar duas ou mais curvas de sobrevida para determinar se há diferença estatística entre estas curvas.

O odds-ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%) está demonstrado para os desfechos analisados pela regressão logística.

A análise multivariada, regressão logística, foi feita para os desfechos clínicos de interesse neste estudo. Para a montagem do modelo de regressão logística, optou-se por uma abordagem conservadora, incluindo-se uma variável independente (preditora) para cada 10 eventos (variável dependente). As variáveis independentes foram selecionadas para o modelo de acordo com o valor de significância desta variável na análise univariada e principalmente se esta é considerada um fator confundidor para o desfecho clínico em questão.

Neste estudo foram considerados estatisticamente significativos os testes com erro tipo I,  $\alpha$ , menor que 0,05. Este valor foi estabelecido arbitrariamente e tem sido utilizado rotineiramente na literatura médica como valor de corte. Sendo o valor de  $p$  menor que 0,05 significa que existe uma chance menor do que 1 para 20 de que o resultado tenha sido obtido por chance.

Na apresentação dos resultados os testes com valor de  $p$  menor que 0,05 serão apresentados em destaque.

O software utilizado para estas análises foi o Statistical Package for the Social Sciences 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) em versão Windows.

As análises complementares de haplótipos e por alelos para os desfechos clínicos de interesse foram feitos no programa Haploview 4.0 versão para Mac, assim como a determinação dos desequilíbrios de ligação dos polimorfismos estudados.

## **4 RESULTADOS**

#### **4.1 Análise da População do MASS II Genético no Tempo Basal**

As características clínicas, demográficas, laboratoriais e as variáveis angiográficas dos 518 pacientes do MASS II Genético e dos grupos de tratamento aleatorizados no tempo basal, estão listadas na Tabela 3.

Apesar de o estudo MASS II Genético ter excluído 93 pacientes do estudo MASS II, acredita-se que esta perda foi randômica. Este fato é suportado pela manutenção do equilíbrio no número de pacientes nos três grupos de tratamento.

Apesar deste aparente equilíbrio no número absoluto de pacientes entre os grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento em três variáveis. No início do estudo, o DM estava diagnosticado em 44% dos pacientes do grupo médico vs. 42% do grupo cirúrgico, e 30,9% do grupo ATC. Conseqüentemente, os valores de glicemia de jejum também foram diferentes entre os grupos ( $p=0,035$ ). Os valores de glicemia foram concordantes com a presença de diabetes, sendo que o grupo médico apresentou a média de glicemia mais elevada (137,5 mg/dL).

O Infarto do Miocárdio prévio também apresentou diferença entre os grupos ( $p = 0,029$ ). Os pacientes do grupo ATC foram os que apresentaram maior percentual de IAM prévio (52,2%), seguido pelo grupo cirúrgico (45,4%) e grupo médico (38%).

**Tabela 3 - Características dos 518 Pacientes do Projeto MASS II Genético nos Respectivos Grupos de Tratamento**

Características Clínicas Laboratoriais e Angiográficas	Projeto MASS II			Valor de significância (p) entre os grupos de tratamento	
	Material genético (n = 518)	Grupo Tratamento Médico (n = 166)	Grupo Angioplastia (n=178)		Grupo Cirurgia (n = 174)
<b>Variável Clínica</b>					
Idade (anos)	59,68 ± 9,11	59,96 ± 9,74	59,58 ± 9,01	59,53 ± 8,63	0,890
Sexo Masculino (%)	67,8	66,3	67,4	69,5	0,806
Fumantes (%)	33,2	34,3	31,5	33,9	0,827
Hipertensão (%)	58,7	54,8	59,6	61,5	0,439
Diabetes Melito (%)	38,8	44,0	30,9	42,0	<b>0,026</b>
História de Infarto do Miocárdio (%)	45,4	38,0	52,2	45,4	<b>0,029</b>
Índice de Massa Corporal	27,17 ± 4,15	26,86 ± 4,25	27,44 ± 4,04	27,2 ± 4,19	0,420
<b>Variável Laboratorial</b>					
Colesterol Total (mg/dL)	224,26 ± 48,07	225,38 ± 43,19	229,11 ± 52,13	218,28 ± 47,82	0,924
Colesterol LDL (mg/dL)	149,28 ± 41,08	150,19 ± 37,83	152,24 ± 43,80	145,44 ± 41,28	0,752
Colesterol HDL (mg/dL)	37,48 ± 10,41	37,53 ± 10,69	37,13 ± 9,59	37,78 ± 10,97	0,921
Triglicérides (mg/dL)	193,47 ± 116,58	194,09 ± 120,49	200,17 ± 114,37	186,10 ± 115,23	0,374
Glicose (mg/dL)	127,84 ± 54,95	137,49 ± 65,27	123,41 ± 51,49	123,28 ± 46,22	<b>0,035</b>
<b>Variável Angiográfica</b>					
Biarteriais (%)	44,8	42,2	44,4	47,7	0,586
Triarteriais (%)	55,2	57,8	55,6	52,3	0,586

## 4.2 Polimorfismos da PON1 no MASS II Genético

A distribuição das variantes genéticas rs662(R192Q), rs13306698 (R160G), rs854560 (Leu55Met), rs705381 (Promoter\_161) e rs3917464, em relação às características clínicas basais e o tipo de tratamento dos pacientes do projeto MASS II encontram-se listadas no Anexo D. Nestas características basais estão incluídas características demográficas como sexo e raça; características clínicas como tabagismo, diabetes mellitus, síndrome metabólica e o tipo de lesão coronária (biarterial ou triarterial) e o grupo de tratamento para o qual o paciente foi alocado no estudo MASS II.

Dois polimorfismos (Promoter\_161 e rs3917464) não apresentaram qualquer diferença entre os genótipos.

A variável que apresentou maior diferença nos polimorfismos estudados foi a raça. Dois polimorfismos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os genótipos estudados na distribuição da raça (R160G e Leu55Met). A população do estudo MASS II constitui-se predominantemente por pacientes da raça branca. A raça amarela e negra apresenta número de paciente bem menor do que a raça branca, fato que gera uma distribuição não homogênea dos pacientes entre as raças.

O polimorfismo R160G apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0437$ ) entre as lesões coronárias biarteriais e triarteriais, porém este polimorfismo foi extremamente raro nesta população estudada. Apenas cinco pacientes eram portadores do alelo G, sendo 492 não portadores deste alelo polimórfico.

A incidência do tabagismo apresentou diferença significativa entre os alelos dos polimorfismos estudados apenas no polimorfismo PON1 R192Q ( $p = 0,0352$ ).

#### **4.3 Características dos Pacientes em Relação às Variantes Genéticas e Uso de Drogas**

Neste estudo foram analisadas três classes de drogas que são rotineiramente utilizadas no manejo clínico da doença arterial coronária: estatinas, anti-hipertensivos e antiplaquetários.

O uso destas medicações pode ser um fator confundidor na análise da associação entre os polimorfismos e os desfechos clínicos, por isso é fundamental a análise da distribuição do uso destas medicações entre os genótipos estudados.

A distribuição das variantes genéticas rs662(R192Q), rs13306698 (R160G), rs854560 (Leu55Met), rs705381 (Promoter\_161) e rs3917464, em relação ao uso de drogas anti-hipertensivas, estatinas e anti-plaquetária no tempo basal dos pacientes do projeto MASS II encontram-se listadas no Anexo E. O uso das drogas não apresentou diferença entre os diferentes genótipos nos cinco polimorfismos estudados.

#### **4.4 Características Lipídicas Laboratoriais dos Pacientes em Relação às Variantes Genéticas no Tempo Basal**

A distribuição das variantes genéticas rs662(R192Q), rs13306698 (R160G), rs854560 (Leu55Met), e rs3917464, em relação à concentração sérica no tempo basal de Colesterol Total, LDL-c, HDL-c e triglicérides foram homogêneas e sem diferença estatística entre os genótipos (Anexo F).

Entre todos os polimorfismos e lipídeos analisados houve diferença apenas nas médias de HDL-c entre os genótipos do Promoter\_161(rs705381). O alelo T parece estar associado às concentrações mais baixas de HDL-c, visto que o heterozigoto (TC) apresentou média de HDL-c de 36,72 mg/dL e o TT 33,41 mg/dL. Em contraste os pacientes com genótipo CC apresentaram 37,94 mg/dL ( $p = 0,0369$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4 - Concentração de lipídeos no tempo basal em relação ao polimorfismo rs705381PON (Promoter 161)**

Variáveis	rs705381PON (promoter-161)								p
	CC		TC		TT		n	Média ± DP	
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP			
Colesterol Total	296	221,09 ± 46,38	161	227,86 ± 48,65	28	235,43 ± 63,65	28	235,43 ± 63,65	0,3359
LDL-Colesterol	280	147,76 ± 40,28	150	151,1 ± 42,62	25	150,40 ± 43,13	25	150,40 ± 43,13	0,7291
HDL-Colesterol	282	37,94 ± 10,17	157	36,72 ± 10,88	27	33,41 ± 8,08	27	33,41 ± 8,08	<b>0,0369*</b>
Triglicérides	296	186,89 ± 102,52	162	199,23 ± 122,51	28	245,36 ± 205,06	28	245,36 ± 205,06	0,4179

Teste de Kruskal-Wallis

#### **4.5 Comportamento do Colesterol Total no Período do Estudo (cinco anos) em Relação às Variantes Genéticas**

Foram feitas as análises de evolução de Colesterol total, LDL-c, HDL-c e Triglicérides nos tempos: basal, 12 meses, 36 meses e 60 meses. Não houve interferência do genótipo nos cinco polimorfismos estudados no comportamento evolutivo destes lipídeos no período de cinco anos.

Em todos os perfis houve melhora ao longo dos cinco anos de estudo de forma significativa ( $p < 0,001$ ), porém sem diferença entre os genótipos.

O Anexo G mostra o comportamento do colesterol total nos diferentes genótipos no decorrer dos cinco anos de estudo.

Os dados evolutivos de LDL-c, HDL-c e Triglicérides, não estão demonstrados.

#### **4.6 Avaliação dos Níveis de Lipídeos no Decorrer de Cinco Anos por Análise Genotípica de Dominância**

Na análise genotípica de dominância foi considerada a presença ou não do alelo em análise. Por exemplo, a análise de dominância do alelo G no polimorfismo R192Q, considerou o alelo G presente nos pacientes com genótipo GG e GA e ausente nos pacientes AA e quando feita a análise de dominância do alelo A, este foi considerado presente nos pacientes AA / AG e ausente nos pacientes GG.

Esta análise foi feita nos polimorfismos: R192Q, Leu55Met e Promoter 161. Não foi feita nos polimorfismos R160G e rs3917464, visto o pequeno número de pacientes portadores do alelo polimórfico. No polimorfismo

rs3917464, apenas 11 pacientes são portadores do alelo C na forma heterozigota. No polimorfismo R160G, 5 pacientes são portadores do alelo polimórfico G, sendo quatro pacientes na forma heterozigota AG e um paciente na forma homozigota GG.

As médias de colesterol total não apresentaram diferença significativa pela presença do alelo G ou A na posição R192Q no decorrer dos cinco anos de estudo. O comportamento do colesterol nos grupos foi paralelo nas duas análises alélicas (Anexo H).

A análise de dominância do alelo T e A, na posição Leu55Met, não apresentaram relação com os níveis de colesterol total (Anexo I).

O alelo T, na posição Promoter\_161, também não se relacionou com os níveis de colesterol total ( $p = 0,197$ ) e o comportamento do colesterol foi paralelo entre os grupos ( $p = 0,169$ ).

No decorrer do estudo houve queda significativa dos níveis de colesterol, independentemente dos alelos e polimorfismos analisados ( $p < 0,001$ ).

#### **4.7 Avaliação dos Níveis de Colesterol total, HDL-c, LDL-c e Triglicérides por Alelos de Dominância nos Pacientes Sem Uso de Estatina no Tempo Basal**

Fizemos esta análise das concentrações de lipídeos no tempo basal nos pacientes sem uso de estatina, pois talvez este subgrupo de paciente nos permita avaliar uma influência mais realística dos polimorfismos da PON1 nos lipídeos séricos.

Na análise por dominância, a presença dos alelos G ou A na posição R192Q, T ou A na posição Leu55Met, ou T (Promoter\_161) não teve interferência nas concentrações séricas de Colesterol Total, LDL-c, HDL-c e Triglicérides no tempo basal nos pacientes sem uso de estatina (Anexo J).

#### **4.8 Eventos nos Pacientes do Projeto MASS II Genético**

Durante o seguimento de cinco anos dos 518 pacientes do projeto MASS II genético, 74 pacientes (14,29%) morreram, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento ( $p = 0,768$ ).

No período de cinco anos de acompanhamento do estudo, houve 166 eventos combinados, que apresentaram diferença significativa entre os grupos de tratamento ( $p < 0,001$ ). O grupo angioplastia foi o que apresentou maior incidência de eventos combinados (40,45%), seguido pelo grupo clínico (34,94%). O grupo de cirurgia apresentou 20,69% de eventos combinados, o que significa metade da taxa de eventos quando comparado ao grupo angioplastia.

A taxa de nova intervenção também apresentou diferença entre os três grupos de tratamento ( $p < 0,001$ ). O grupo cirúrgico foi o que apresentou menor taxa de nova intervenção, 3,45%.

O infarto agudo do miocárdio acometeu 41 pacientes (7,92%) no período do estudo. O grupo cirúrgico foi o que apresentou menor taxa de eventos 3,45%, seguido pelo grupo médico 8,43% e o grupo de angioplastia foi o que apresentou a maior taxa de IAM, 11,8%. A análise estatística demonstrou que esta diferença é significativa,  $p = 0,014$ .

O acidente vascular encefálico não apresentou diferença entre os três grupos de tratamento ( $p = 0,117$ ), porém vale ressaltar que apenas 18 pacientes (3,47%) apresentaram AVE no período do estudo (Tabela 5).

**Tabela 5 - Ocorrência de eventos no estudo MASS II genético nos três grupos de tratamento: médico, angioplastia e cirurgia**

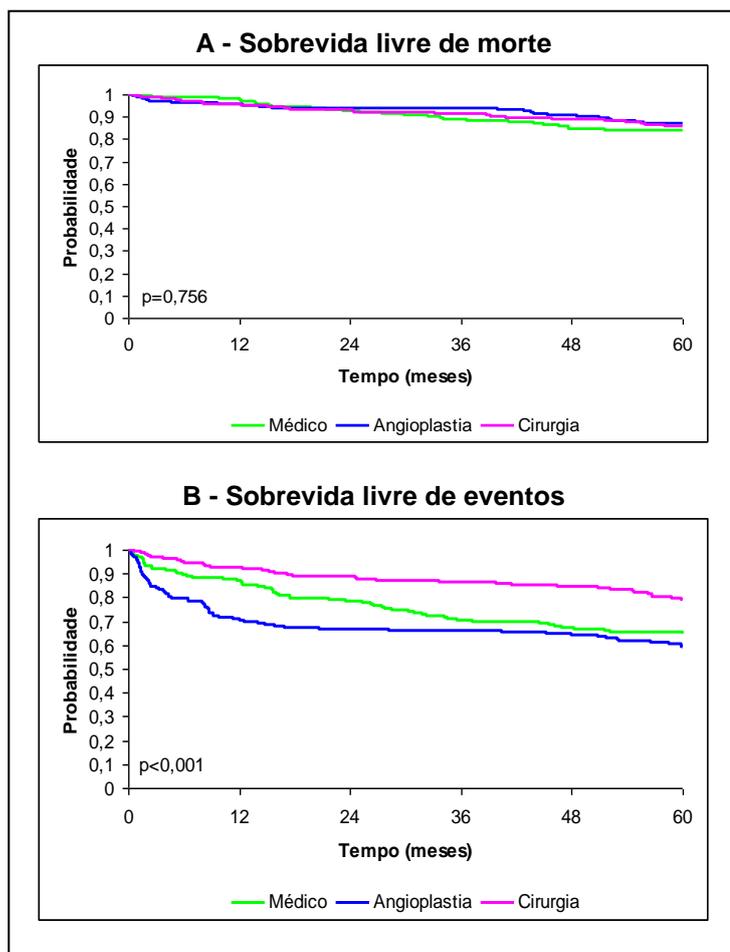
Eventos	Médico		Angioplastia		Cirurgia		p
	n	%	n	%	n	%	
Óbito geral	26	15,6	23	12,9	25	14,3	0,768
<b>Eventos combinados</b>	58	34,9	72	40,4	36	20,7	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Nova Intervenção</b>	39	23,5	48	26,9	6	3,4	<b>&lt; 0,001</b>
<b>IAM</b>	14	8,4	21	11,8	6	3,4	<b>0,014</b>
<b>AVE</b>	3	1,8	5	2,8	10	5,7	0,117

Análise Estatística: Qui-quadrado

#### 4.9 Sobrevida Livre de Morte e Eventos

Os 518 pacientes do projeto MASS II Genético apresentaram sobrevida livre de morte durante o período de cinco anos do estudo semelhante entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos e não foi constatada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,756$ ). Porém, a sobrevida livre de eventos apresenta uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento: angioplastia, cirurgia e clínico ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 1).

**Gráfico 1 - Eventos em cinco anos: MASS II Genético**



#### 4.10 Polimorfismos PON1 e Eventos Clínicos

Neste tópico dos resultados, estão demonstradas as primeiras análises feitas para atender ao objetivo primário e secundário (a) deste estudo que é: investigar o valor preditivo de cinco polimorfismos da PON1 para:

- eventos combinados (IAM, mortalidade geral e nova intervenção);
- mortalidade geral;
- nova intervenção;
- AVE;
- IAM.

Todos estes eventos foram analisados pelo número absoluto e relativo de eventos (teste do qui-quadrado ou verossimilhança) e complementarmente para óbito e IAM foram construídas as curvas de Kaplan-Meier que foram comparadas pelo Log-Rank.

A distribuição das variantes genéticas rs662 (R192Q), rs13306698 (R160G), rs854560 (Leu55Met), rs705381 (Promoter\_161) e rs3917464 em relação à ocorrência de eventos no período de cinco anos, serão apresentadas a seguir.

#### 4.10.1 R192Q

O polimorfismo R192Q apresentou diferença entre os grupos genotípicos na revascularização do miocárdio ( $p = 0,016$ ). Quando analisadas as taxas de revascularização entre os genótipos parece existir uma influência do alelo G, visto que o aumento é progressivo entre os genótipos com a adição do alelo G: AA (5,08%), AG (9,26%) e GG (15,48%). Porém não houve diferença quando analisada a nova intervenção entre os genótipos. Os outros desfechos analisados não apresentaram diferença entre os grupos genotípicos na posição R192Q (Tabela 6).

As curvas de Kaplan-Meier para eventos combinados e óbito não apresentaram diferença entre os genótipos (Gráfico 2).

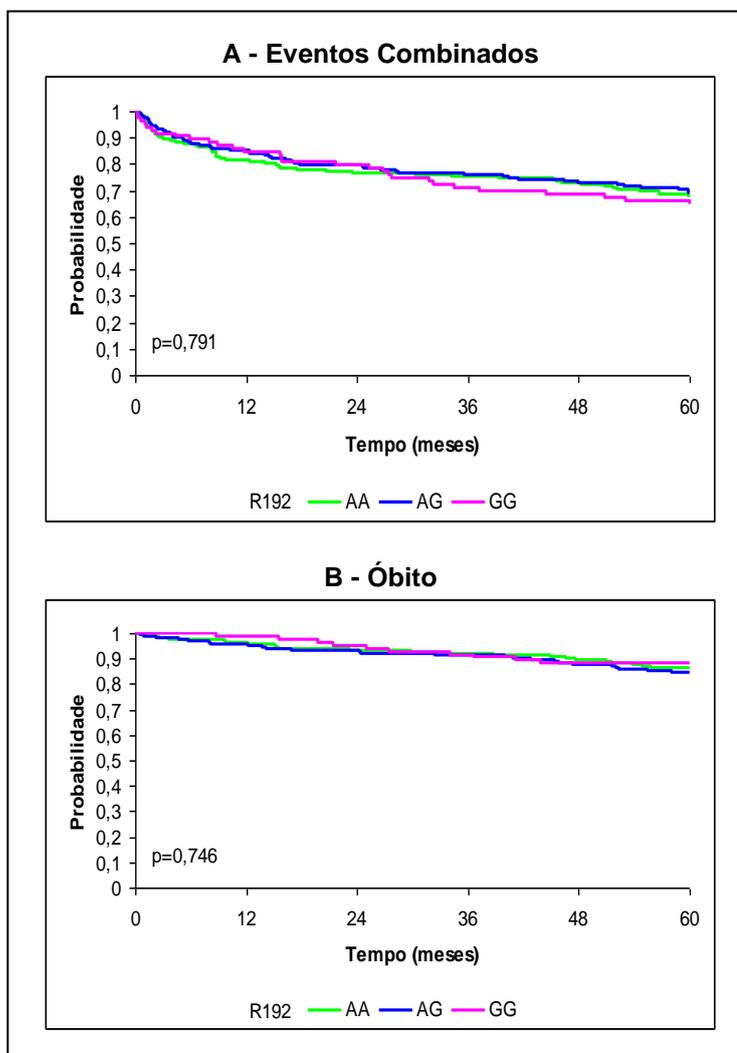
**Tabela 6 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo R192Q**

Eventos	AA	AG	GG	Total	p
<b>Óbito geral</b>	27 (13,71)	33 (15,28)	10 (11,9)	70 (14,08)	0,738
<b>Eventos combinados</b>	63 (31,98)	66 (30,56)	29 (34,52)	158 (31,79)	0,801
<b>Revascularização Miocárdio</b>	10 (5,08)	20 (9,26)	13 (15,48)	43 (8,65)	<b>0,016</b>
<b>Angioplastia</b>	27 (13,71)	20 (9,26)	11 (13,1)	58 (11,67)	0,337
<b>Nova Intervenção</b>	32 (16,24)	36 (16,67)	20 (23,81)	88 (17,71)	0,273
<b>Infarto Agudo do Miocárdio</b>	16 (8,12)	15 (6,94)	9 (10,71)	40 (8,05)	0,559
<b>Acidente vascular encefálico</b>	8 (4,06)	6 (2,78)	4 (4,76)	18 (3,62)	0,650

Teste estatístico: Qui-quadrado

Variáveis representadas em número absoluto de eventos (%)

**Gráfico 2 - Curva de kaplan-meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo PON1: R192Q**



Dentre as características basais, a incidência do tabagismo foi diferente entre os genótipos do polimorfismo R192Q ( $p=0,0352$ ). Dado a importância da interação entre genes e ambiente, sendo o tabagismo um importante fator de risco para DAC e já previamente descrito na literatura a associação do polimorfismo R192Q e tabagismo; decidimos fazer uma

análise estratificada dos eventos entre tabagistas (n=166) e não tabagistas (n=331) no tempo basal.

Esta análise estratificada por status de tabagismo não apresentou diferença entre os genótipos do R192Q para a ocorrência de eventos em cinco anos (Anexo K).

#### **4.10.2 R160G**

O polimorfismo R160G não apresentou diferença entre os genótipos na ocorrência de eventos no teste de verossimilhança (Tabela 7).

Em virtude do baixo número de pacientes com os genótipos: AG e GG as curvas de Kaplan-Meier apresentam quedas abruptas quando ocorre um evento neste genótipo. O teste de log-rank encontrou diferença estatisticamente significativa entre os genótipos para óbito ( $p = 0,007$ ). (Gráficos 3)

O alelo G parece estar associado à mortalidade, visto que 100% dos pacientes GG morreram, 25% dos pacientes AG e apenas 13,82% dos AA. No teste de verossimilhança esta diferença não foi significativa ( $p = 0,118$ ).

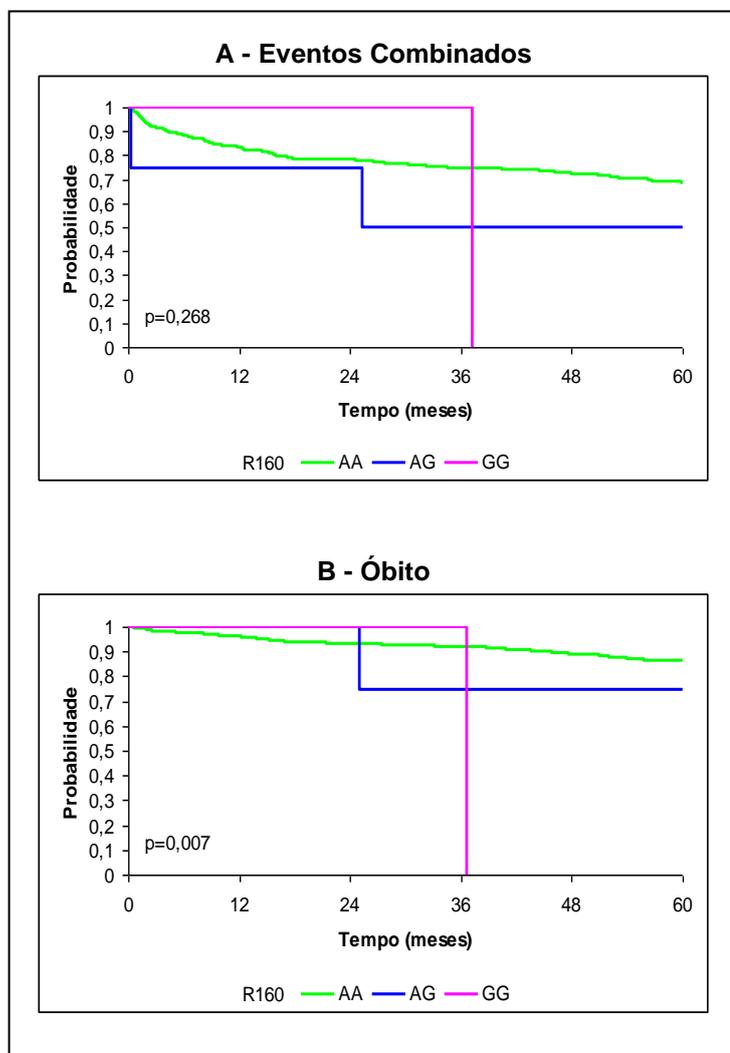
**Tabela 7 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo R160G**

<b>Eventos</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>Total</b>	<b>p</b>
<b>Óbito geral</b>	68 (13,82)	1 (25)	1 (100)	70 (14,08)	0,118
<b>Eventos combinados</b>	155 (31,5)	2 (50)	1 (100)	158 (31,79)	0,237
<b>Revascularização Miocárdio</b>	42 (8,54)	1 (25)	0 (0)	43 (8,65)	0,569
<b>Angioplastia</b>	58 (11,79)	0 (0)	0 (0)	58 (11,67)	0,536
<b>Nova Intervenção</b>	87 (17,68)	1 (25)	0 (0)	88 (17,71)	0,770
<b>Infarto Agudo do Miocárdio</b>	40 (8,13)	0 (0)	0 (0)	40 (8,05)	0,656
<b>Acidente vascular encefálico</b>	18 (3,66)	0 (0)	0 (0)	18 (3,62)	0,831

Teste estatístico: Razão de verossimilhança

Variáveis representadas em número absoluto de eventos (%)

**Gráfico 3 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo PON1: R160G**



### 4.10.3 Leu55Met

Os polimorfismos Leu55Met não apresentaram diferença entre os grupos genotípicos em nenhum dos desfechos estudados (Tabela 8 e Gráfico 4).

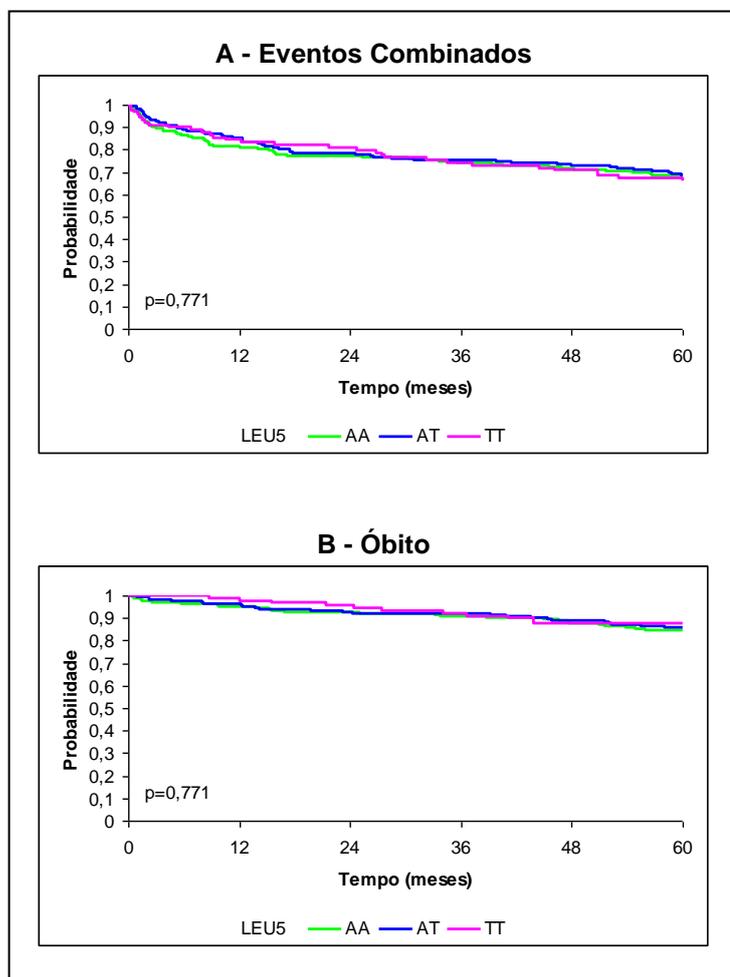
**Tabela 8- Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo Leu55Met**

<b>Eventos</b>	<b>AA</b>	<b>AT</b>	<b>TT</b>	<b>Total</b>	<b>p</b>
<b>Óbito geral</b>	32 (15,38)	31 (14,09)	11 (12,36)	74 (14,31)	0,786
<b>Eventos combinados</b>	66 (31,73)	69 (31,36)	30 (33,71)	165 (31,91)	0,920
<b>Revascularização Miocárdio</b>	11 (5,29)	22 (10)	10 (11,24)	43 (8,32)	0,116
<b>Angioplastia</b>	26 (12,5)	23 (10,45)	14 (15,73)	63 (12,19)	0,432
<b>Nova Intervenção</b>	33 (15,87)	40 (18,18)	20 (22,47)	93 (17,99)	0,396
<b>Infarto Agudo do Miocárdio</b>	17 (8,17)	16 (7,27)	7 (7,87)	40 (7,74)	0,940
<b>Acidente vascular encefálico</b>	8 (3,85)	6 (2,73)	4 (4,49)	18 (3,48)	0,695

Teste Estatístico: Qui-Quadrado

Variáveis representadas em número absoluto de eventos (%)

**Gráfico 4 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e Sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo Leu55Met**



#### 4.10.4 Promoter\_161

A análise de associação entre o Promoter\_161 e eventos foi feita de duas formas. Inicialmente foi feita com os três genótipos (CC, TC e TT) e a seguir com a combinação dos genótipos TC e TT; visto que 300 pacientes apresentam o genótipo CC, enquanto 163 o genótipo TC e apenas 28 TT.

Os genótipos e a combinação dos genótipos no Promoter\_161 não apresentaram diferença em nenhum dos desfechos clínicos estudados (Tabelas 9 e 10; Gráfico 5).

**Tabela 9 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo PON1: Promoter\_161**

<b>Eventos</b>	<b>CC</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>	<b>Total</b>	<b>p</b>
<b>Óbito geral</b>	41 (13,67)	26 (15,95)	3 (10,71)	70 (14,26)	0,685
<b>Eventos combinados</b>	92 (30,67)	53 (32,52)	11 (39,29)	156 (31,77)	0,625
<b>Revascularização Miocárdio</b>	28 (9,33)	11 (6,75)	2 (7,14)	41 (8,35)	0,613
<b>Angioplastia</b>	34 (11,33)	15 (9,2)	6 (21,43)	55 (11,2)	0,165
<b>Nova Intervenção</b>	53 (17,67)	24 (14,72)	7 (25)	84 (17,11)	0,377
<b>Infarto Agudo do Miocárdio</b>	24 (8)	13 (7,98)	2 (7,14)	39 (7,94)	0,987
<b>Acidente vascular encefálico</b>	8 (2,67)	7 (4,29)	2 (7,14)	17 (3,46)	0,360

Teste estatístico: Qui-quadrado

Variáveis representadas em número absoluto de eventos (%)

**Tabela 10 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo Promoter\_161 com combinação de Genótipos**

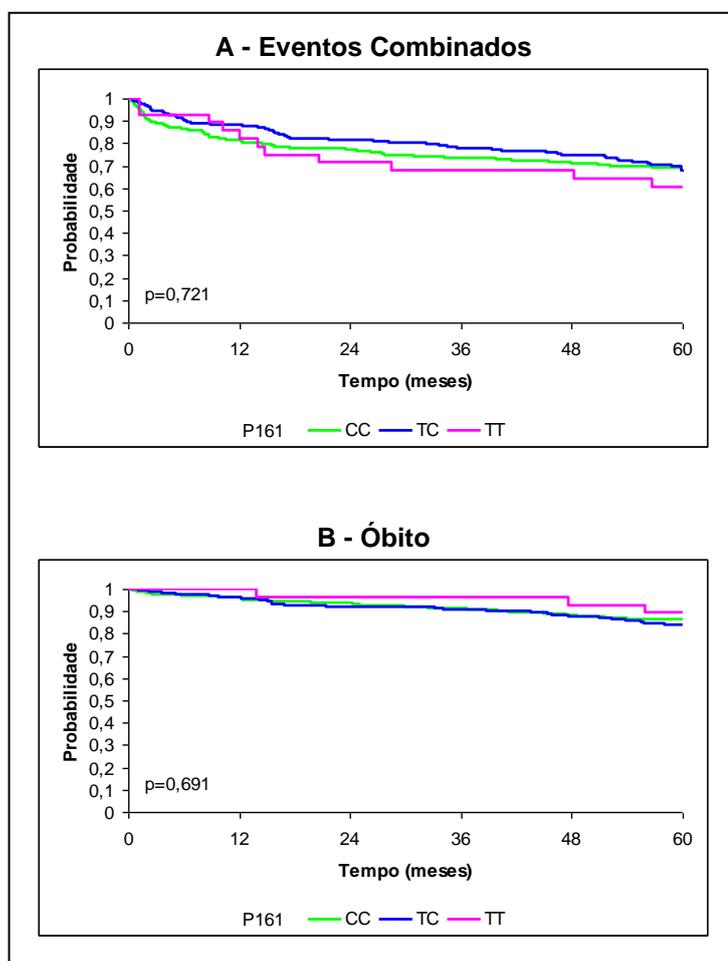
	CC		CT + TT		p
	n	%	n	%	
Óbito Geral	41	13,7%	29	15,2%	0,639
Eventos combinados	92	30,7%	64	33,5%	0,510
Revascularização Miocárdio	28	9,3%	13	6,8%	0,324
Angioplastia	34	11,3%	21	11,0%	0,908
Nova Intervenção	53	17,7%	31	16,2%	0,680
Infarto Agudo do Miocárdio	24	8,0%	15	7,9%	0,953
Acidente Vascular Cerebral	8	2,7%	9	4,7%	0,227

Variáveis categóricas estão representadas por n eventos e percentual

Valores percentuais calculados por genótipos

Teste estatístico: Qui-quadrado

**Gráfico 5 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo Promoter\_161**



Este polimorfismo, Promoter\_161, apresentou diferença significativa entre os genótipos em relação aos valores de HDL ( $p = 0,0369$ ). As médias de HDL-c reduzem progressivamente com a presença do alelo T. Diante deste fato, fizemos uma análise estratificada de eventos por HDL-c. O HDL-c foi categorizado com risco ou sem risco de acordo com os valores de corte estabelecidos na definição de Síndrome Metabólica:  $< 40$  mg/dL em homens e  $< 50$  mg/dL em mulheres (IDF, 2006)

Não houve diferença na taxa de eventos nesta análise estratificada por HDL para os genótipos do Promoter\_161 (Anexo L).

#### 4.10.5 rs3917464

Este polimorfismo não apresentou diferença em nenhum dos desfechos clínicos analisados (Tabela 11 e Gráfico 6).

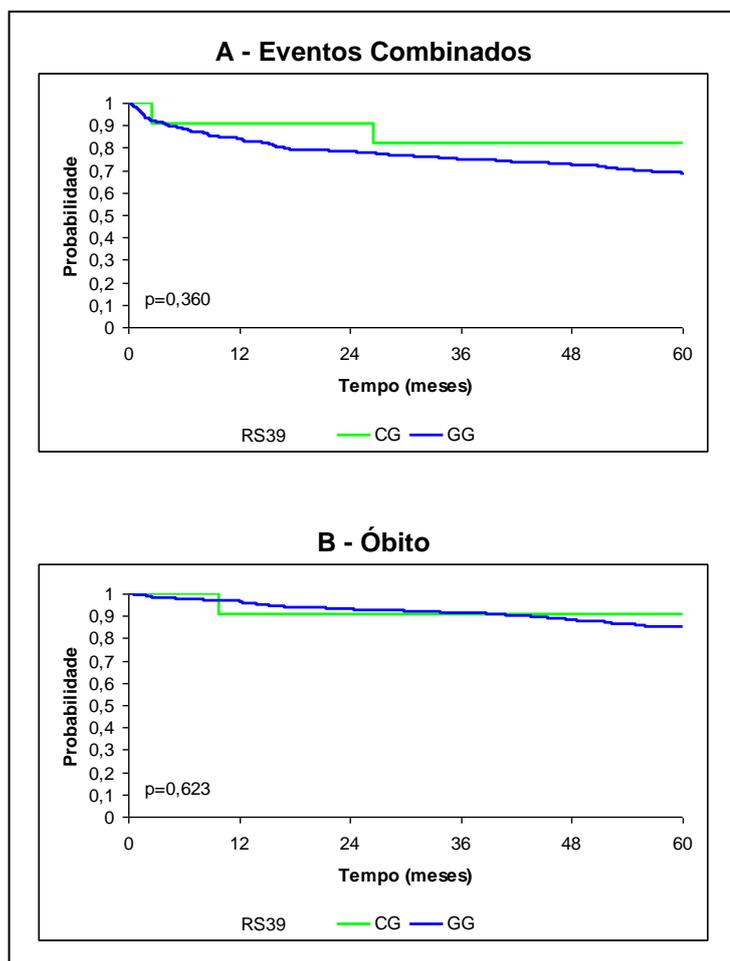
**Tabela 11 - Ocorrência de eventos em relação ao polimorfismo PON1 (rs3917464)**

<b>Eventos</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	<b>Total</b>	<b>p</b>
<b>Óbito geral</b>	1 (9,09)	70 (14,77)	71 (14,64)	1,000
<b>Eventos combinados</b>	2 (18,18)	151 (31,86)	153 (31,55)	0,515
<b>Revascularização Miocárdio</b>	2 (18,18)	39 (8,23)	41 (8,45)	0,236
<b>Angioplastia</b>	0 (0)	54 (11,39)	54 (11,13)	0,620
<b>Nova Intervenção</b>	2 (18,18)	81 (17,09)	83 (17,11)	1,000
<b>Infarto Agudo do Miocárdio</b>	0 (0)	39 (8,23)	39 (8,04)	1,000
<b>Acidente vascular encefálico</b>	0 (0)	17 (3,59)	17 (3,51)	1,000

Teste Exato de Fisher

Variáveis representadas em número absoluto de eventos (%)

**Gráfico 6 - Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados e sobrevida livre de morte em relação ao polimorfismo PON1: rs391764**

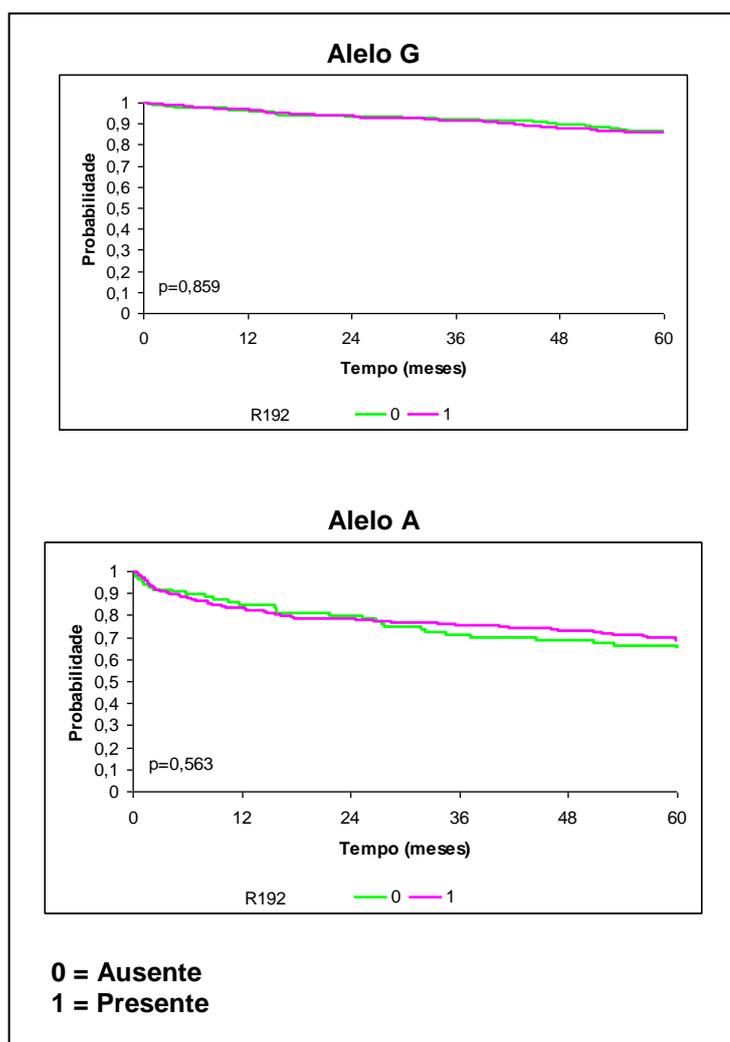


#### 4.11 Análise de Eventos Combinados por Alelos de Dominância

Nesta análise de dominância alélica, a curva de Kaplan-Meier foi feita baseada na presença ou não dos alelos G e A na posição R192Q. A análise demonstrou que não houve diferença ao longo dos cinco anos de estudo na ocorrência de eventos combinados em virtude da presença ou ausência do alelo G ( $p = 0,859$ ) ou do alelo A ( $p=0,563$ ) (Gráfico 7).

Esta mesma análise de dominância alélica foi feita para o polimorfismo: Leu55Met e não houve associação destes alelos com a ocorrência de eventos combinados na nossa população, tanto nas curvas de Kaplan-Meier, quanto no teste do qui-quadrado. (resultados não demonstrados)

**Gráfico 7- Curva de Kaplan-Meier: tempo para eventos combinados na análise por dominância alelo polimórfico G e alelo A: R192Q**



#### 4.11.1 Frequência Polimorfismos no MASS II Genético e determinação dos alelos de risco

Os polimorfismos Leu55Met e R192Q são os polimorfismos da PON1 mais extensamente estudados. Adicionalmente são os que apresentam maior frequência do polimorfismo na nossa população. Conseqüentemente, ambos apresentam um número de pacientes considerável nos três genótipos possíveis. Em contraste, os outros três polimorfismos estudados (R160G, Promoter\_161 e rs3917464) apresentam genótipos com número muito baixo de pacientes (Tabela 12).

**Tabela 12 - Número absoluto e percentual de pacientes nos genótipos dos polimorfismos da PON1 no estudo MASS II Genético**

<b>Polimorfismo</b>	<b>Número (%) de pacientes nos genótipos</b>		
<b>Leu55Met</b>	AA: 208 (40,23%)	AT: 220 (42,5%)	TT:89 (17,21%)
<b>R160G</b>	AA: 492 (98,99%)	AG:4 (0,80%)	GG:1 (0,20%)
<b>R192Q</b>	AA:197 (39,64%)	AG:216 (43,46%)	GG:84 (16,90%)
<b>rs3917464</b>	GG:474 (97,73%)	GC:11 (2,27%)	
<b>Promoter_161</b>	CC:300 (61%)	CT:163 (33,19%)	TT:28 (5,7%)

Inicialmente fizemos um levantamento dos alelos e sua associação com eventos cardiovasculares na nossa população e na literatura. Estes dados nos permitem fazer uma inferência sobre qual é o alelo de risco para estes eventos. Estes dados não estão disponíveis para todos os polimorfismos e existem dados divergentes sobre qual é o alelo de risco em diferentes populações (Tabela 13).

**Tabela 13 - Polimorfismos da PON1: alelos de risco na literatura e no estudo MASS II**

Polimorfismo	Alelos		Alelo relacionado à risco de DAC		
	Não polimórfico	Polimórfico	Literatura	MASS II: Tendência de associação	
				Óbito	Eventos combinados
Leu55Met	A	T	A***	A	T
R160G	A	G	A**	G	G
R192Q	A	G	A* G**	A	G
rs3917464	G	C		G	G
Promoter_161	C	T		C	T

\* Estudo realizado em mulheres americanas (Chen *et al.*, 2003)

\*\* Estudo realizado na população chinesa (Wang *et al.*, 2005)

\*\*\* Estudos na população europeia e brasileira (Watzinger *et al.*, 2002)

#### 4.11.2 Análise combinada de polimorfismos para eventos

Diante destes fatos anteriormente expostos, foram feitas análises da combinação dos polimorfismos Leu55Met e R192Q na predição de eventos cardiovasculares.

A primeira análise feita considerou a presença do alelo de risco para óbito na posição R192Q (alelo A) ou Leu55Met (alelo A). Nesta estratificação, a grande maioria dos pacientes apresentou o alelo de risco em uma das posições, porém não houve associação com a ocorrência de eventos cardiovasculares (Tabela 14).

**Tabela 14 Presença do alelo de Risco (A) na posição R192Q ou Leu55Met e eventos cardiovasculares**

Eventos cardiovasculares	Alelo de risco: R192Q ou Leu55Met				p
	Não (n=60)		Sim (n=437)		
	n	%	n	%	
<b>Eventos Combinados</b>	23	38,3%	135	30,9%	0,246
<b>Nova Intervenção (ATC + RM)</b>	15	25,0%	73	16,7%	0,114
<b>Nova Revascularização Miocárdio</b>	9	15,0%	34	7,8%	0,062
<b>Nova Angioplastia</b>	10	16,7%	48	11,0%	0,199
<b>Infarto Agudo Miocárdio</b>	6	10,0%	34	7,8%	0,553
<b>Acidente Vascular Cerebral</b>	3	5,0%	15	3,4%	0,542
<b>Óbito Geral</b>	8	13,3%	62	14,2%	0,858

Variáveis categóricas estão representadas por n eventos (percentual)

Valores percentuais calculados por genótipos

Teste estatístico: Qui-quadrado

A seguir, fizemos a análise aditiva entre os genótipos. O paciente recebeu pontuação 2, quando apresentava o alelo de risco nas duas posições: R192Q e Leu55Met. Quando o alelo de risco estava presente em apenas uma das posições (R192Q ou Leu55Met) a pontuação foi 1 e zero quando o alelo de risco não estava presente em nenhuma das posições. Esta combinação de alelos risco também não apresentou relação com os eventos cardiovasculares estudados (Tabela 15).

**Tabela 15 - Eventos cardiovasculares e combinação aditiva da presença de pelo menos 1 alelo de risco na posição R192Q e Leu55Met**

	Alelo de risco na posição R192Q e Leu55Met						p
	0 (n=60)		1 (n=46)		2 (n=391)		
	n	%	n	%	n	%	
Eventos Combinados	23	38,3%	11	23,9%	124	31,7%	0,286
Nova Intervenção (ATC + RM)	15	25,0%	8	17,4%	65	16,6%	0,285
Nova Revascularização							
Miocárdio	9	15,0%	5	10,9%	29	7,4%	0,129
Nova Angioplastia	10	16,7%	3	6,5%	45	11,5%	0,266
Infarto Agudo Miocárdio	6	10,0%	4	8,7%	30	7,7%	0,815
Acidente Vascular Cerebral	3	5,0%	2	4,3%	13	3,3%	0,781
Óbito Geral	8	13,3%	3	6,5%	59	15,1%	0,282

Variáveis categóricas estão representadas por n eventos (percentual)

Valores percentuais calculados por genótipos

Teste estatístico: Qui-quadrado

Para finalizar esta análise combinada dos polimorfismos da PON1 R192Q e Leu55Met, fizemos uma análise aditiva dos alelos de risco para óbito. Ou seja, pontuamos a presença do alelo A nos códons 55 e 192, sendo possível pontuar de 0 a 4 (0= ausência do alelo A e 4= homocigoto para o alelo A nas duas posições estudadas).

Nesta análise de regressão logística para óbito, as variáveis independentes foram estas possibilidades alélicas anteriormente explicadas. Estas combinações alélicas não foram preditivas de óbito nesta população (Tabela 16).

**Tabela 16 - Regressão Logística para óbito: análise alélica aditiva para o alelo A (risco para óbito) nos códons 55 e 192**

Adição Alelos A: códons 55 e 192	p	OR	IC <sub>95%</sub>	
			Inferior	Superior
0 alelos	0,925			
1 alelo	0,580	1,84	0,21	16,19
2 alelos	0,852	0,92	0,39	2,14
3 alelos	0,837	1,12	0,37	3,31
4 alelos	0,691	0,84	0,35	1,98

Pacientes sem alelos A (0 alelos) foram o grupo de referência.

#### 4.12 Análise Multivariada

Após todas estas análises por meio das curvas de Kaplan-Meier, teste do Log-Rank e qui-quadrado (ou verossimilhança) para os desfechos clínicos deste estudo, foi feita a análise multivariada: regressão logística para óbito. O intuito desta análise é definir se o polimorfismo R160G prediz de forma independente óbito nesta população.

O modelo construído para a regressão logística incluiu todas as características demográficas e clínicas basais que apresentaram diferença < 10% ( $p < 0,01$ ) na análise univariada (teste Log-Rank) para óbito (Tabela 17).

**Tabela 17 - Análise univariada para óbito nos pacientes MASS II genético**

Variável	p (Teste Log Rank)
Grupo de Tratamento	0,576
Idade: < / > 65 anos	<b>&lt; 0,001</b>
Sexo	0,833
Raça: Branca vs. Não Branca	<b>0,060</b>
Tabagismo	0,926
Diabetes	<b>0,051</b>
Biarterial <i>versus</i> Triarterial	<b>0,032</b>
IAM prévio	<b>0,037</b>
Uso de estatina no tempo basal	<b>0,052</b>
Hipertensão Arterial	<b>0,002</b>
Uso de antiplaquetário no tempo basal	0,139

O polimorfismo R160G havia apresentado diferença na curva de Kaplan-Meier, teste de Log-Rank, mostrando associação do alelo G com óbito ( $p = 0,007$ ). A análise multivariada para óbito, objetiva determinar se este alelo mantém sua associação com óbito após ajuste para todas as outras variáveis relacionadas ao óbito nesta população.

O polimorfismo R160G foi o único polimorfismo incluído nesta análise, visto que nenhum outro havia apresentado significância estatística nas análises univariadas. O R160G foi incluído de forma binária: alelo G presente ou não.

Esta análise de regressão logística para óbito não encontrou significância estatística no polimorfismo R160G após o ajuste para todas as variáveis incluídas na análise (Tabela 18). O odds ratio para o alelo G foi de 5,09, porém com um intervalo de confiança muito amplo: 0,67 - 38,35 ( $p = 0,114$ ).

O IAM prévio e a idade maior do que 65 anos foram fatores de risco independentes para óbito nesta análise. Como seria esperado, os pacientes com mais de 65 anos apresentaram risco aumentado para óbito em 2,94 vezes, em relação ao grupo com menos de 65 anos; e os pacientes com IAM prévio apresentaram o risco aumentado em 2,15 vezes para óbito, quando comparado ao grupo de pacientes sem IAM prévio. Todas as outras variáveis clínicas, incluídas neste modelo de regressão logística, não mantiveram significância estatística para prever óbito.

**Tabela 18 - Regressão Logística para óbito no MASS II Genético**

	B	Sig.	OR	IC <sub>95%</sub>	
				Inferior	Superior
<b>Idade &gt; 65 anos</b>	1,079	<b>0,000</b>	2,94	1,69	5,11
<b>IAM prévio</b>	0,768	<b>0,008</b>	2,15	1,22	3,80
<b>Hipertensão Arterial</b>	0,352	0,312	1,42	0,71	2,81
<b>Raça branca</b>	-0,569	0,115	0,56	0,27	1,14
<b>Diabetes</b>	-0,056	0,680	0,94	0,72	1,23
<b>Lesão Triarterial</b>	0,341	0,247	1,40	0,78	2,51
<b>Estatina Basal</b>	-0,555	0,207	0,57	0,24	1,35
<b>R160G alelo G</b>	1,628	0,114	5,09	0,67	38,35
<b>Constante</b>	-0,333	0,778	0,71		

Os polimorfismos da PON1, estudados neste trabalho, não mostraram efeito preditivo para eventos combinados na análise univariada, e desta forma não foram construídos modelos de regressão logística para eventos combinados.

#### **4.12.1 Análise univariada no grupo médico**

Como estratégia analítica inicial optou-se por estudar todos os grupos de tratamento do estudo MASS II, porém considerando que apenas no grupo médico não houve interferência na história natural da DAC, análises da associação entre eventos e os polimorfismos foram realizadas separadamente no grupo médico.

Inicialmente foi feita uma análise exploratória univariada entre as principais variáveis clínicas e genéticas versus os desfechos clínicos: óbito, IAM, nova intervenção e eventos combinados.

A Tabela 19 contém todos os valores de  $p$  obtidos nas análises univariadas, teste do qui-quadrado ou verossimilhança.

**Tabela 19 - Valor de p na análise univariada de variáveis clínicas e eventos no grupo de tratamento médico do estudo MASS II genético**

Variáveis clínicas e Genéticas	Óbito Geral	Eventos		
		IAM	Nova Intervenção	Combinados
Hipertensão Arterial	<b>0,001</b>	0,465	0,203	<b>0,011</b>
Raça (branca e não branca)	<b>0,002</b>	0,831	0,864	0,116
Diabetes	0,475	0,507	0,133	0,424
Sexo	0,728	0,871	0,744	0,881
Tabagismo	0,386	0,208	0,815	0,754
Lesão (bi ou triarterial)	0,2	0,957	0,344	0,611
IAM prévio	0,168	<b>0,034</b>	0,113	<b>0,045</b>
Idade (> e < 65 anos)	<b>0,001</b>	0,061	0,137	<b>0,027</b>
R192Q	<b>0,014</b>	<b>0,053</b>	0,081	0,054
Leu55Met	0,064	0,937	0,279	0,41
Promoter_161	0,305	0,192	0,469	0,082
rs3917464	0,827	0,333	0,397	0,822
R192Q: alelo G	0,152	0,089	<b>0,033</b>	0,411
R192Q: alelo A	0,108	<b>0,036</b>	0,122	<b>0,016</b>
Leu55Met: alelo A	0,258	0,786	0,736	0,186
R160G: alelo G	<b>0,042</b>	0,462	0,199	0,257
R160G: alelo A	0,051	0,672	0,46	0,145
Promoter_161: alelo T	0,34	0,14	0,667	0,66
rs3917464: alelo C	0,827	0,333	0,397	0,822
Leu55Met: alelo T	0,167	0,918	0,118	0,486

Teste estatístico: Qui-quadrado ou verossimilhança quando a frequência esperada mínima não foi obtida no qui-quadrado

Nova intervenção = angioplastia e revascularização do miocárdio  
polimorfismos analisados de acordo com os genótipos, quando não especificados os alelos

As variáveis clínicas, hipertensão arterial, IAM prévio e idade, apresentaram associação estatisticamente significativa com dois desfechos clínicos. Em contraste, de forma surpreendente diabetes e tabagismo não apresentaram associação significativa com nenhum dos eventos estudados.

As variáveis genéticas foram incluídas nesta análise de duas formas: genótipos e alelos.

O polimorfismo R192Q na análise genotípica apresentou associação significativa com dois desfechos: óbito ( $p = 0,014$ ) e tendência com IAM ( $p = 0,053$ ). Na análise alélica, a presença do alelo A, correlacionou-se com IAM.

O outro polimorfismo que apresentou relação estatisticamente significativa com os desfechos clínicos estudados foi o R160G. De forma concordante com as análises prévias do grupo MASS II Genético total, o alelo G associou-se significativamente ao óbito neste subgrupo de tratamento médico ( $p = 0,042$ ).

Não houve associação significativa entre os outros três polimorfismos estudados (Promoter\_161, Leu55Met e rs3917464) e os desfechos clínicos estudados em cinco anos.

#### **4.12.2 Análise multivariada no grupo médico do MASS II Genético**

Para explorar o efeito dos polimorfismos e dos outros fatores de risco como preditores para os desfechos clínicos estudados, foi realizada a análise multivariada. Esta etapa é de suma importância, pois proporcionará informação sobre a independência ou não do marcador genético na predição de eventos.

Para esta análise foi feita a regressão logística, visto que todos os eventos foram analisados como binários (sim ou não). Na construção do modelo de regressão logística todas as variáveis clínicas importantes e as que haviam apresentado diferença na análise univariada (tabela acima) foram incluídas no modelo como variáveis independentes, ou seja, preditoras.

#### 4.12.2.1 Regressão logística para IAM: MASS II Genético clínico

A regressão logística confirmou os resultados encontrados na análise univariada para o polimorfismo R192Q. Após o ajuste para todas as variáveis incluídas no modelo, o genótipo GG apresentou risco aumentado em 3,55 vezes para IAM, quando comparado ao grupo com genótipo AA na posição 192 ( $p = 0,017$ ). A idade (maior 65 anos) e IAM prévio também mantiveram o efeito preditivo estatisticamente significativo para novo evento: IAM. O resultado final do modelo de regressão logística para IAM está representado na Tabela 20.

**Tabela 20 - Regressão logística para IAM no MASS II Genético clínico**

	B	p	OR	IC <sub>95%</sub>	
				Inferior	Superior
<b>Idade &gt; 65 anos</b>	1,269	<b>0,037</b>	3,557	1,08	11,70
<b>R192Q: GG</b>	1,876	<b>0,017</b>	6,528	1,39	30,46
<b>R192Q: AG</b>	0,917	0,239	2,502	0,54	11,50
<b>IAM prévio</b>	1,334	<b>0,029</b>	3,796	1,14	12,59
<b>Constante</b>	-4,475	0,000	0,011		

R192Q: AA foi determinado como grupo referência

Fato interessante é que a presença de dois alelos G na posição R192Q conferiu o maior odds ratio para novo evento: IAM, sendo superior à idade e ao IAM prévio. O odds ratio para o genótipo GG foi de 6,53; enquanto que para idade foi 3,55 e 3,79 para IAM prévio.

#### 4.12.2.2 Regressão logística para óbito: MASS II Genético clínico

Nesta regressão logística para óbito, foram incluídos dois polimorfismos: R192Q e R160G, visto que estes apresentaram relação significativa na análise univariada. Dentre as variáveis clínicas, foram incluídas: hipertensão arterial, raça e idade. (todas estas apresentaram p significativo na análise univariada (Tabela 21).

O alelo G na posição R160G, não manteve seu valor preditivo para óbito, após ser incluído neste modelo com as outras variáveis independentes anteriormente listadas. Em contrapartida, o R192Q (Genótipo GG) apresentou odds ratio de 7,69 para óbito ( $p = 0,009$ ), quando comparado aos pacientes com genótipo AA.

A raça não branca foi a variável que apresentou o maior risco para óbito nesta análise (8,65: IC<sub>95%</sub> 2,35 - 31,74). A idade maior que 65 anos também apresentou elevado risco, 6,24 vezes maior do que os pacientes com menos de 65 anos ( $p = 0,0001$ ).

**Tabela 21 - Regressão logística para óbito no Grupo MASS II genético clínico**

Variáveis independentes	B	p	OR	IC <sub>95%</sub>	
				Inferior	Superior
<b>Raça</b>	2,158	<b>0,001</b>	8,65	2,35	31,74
<b>Hipertensão Arterial</b>	-0,396	0,460	0,67	0,23	1,92
<b>Idade &gt;65 anos</b>	1,831	<b>0,001</b>	6,24	2,13	18,20
<b>R192Q: AG</b>	-0,039	0,952	0,96	0,26	3,43
<b>R192Q: GG</b>	2,041	<b>0,009</b>	7,69	1,65	35,76
<b>R160G: alelo G</b>	0,063	0,966	1,06	0,06	18,81
<b>Constante</b>	-1,197	0,416	0,30		

R192Q: AA foi determinado como grupo referência

#### 4.12.2.3 Regressão logística para eventos combinados: MASS II Genético clínico

Finalmente fizemos a regressão logística para eventos combinados. Fato interessante é que para este desfecho clínico o alelo que se associou à maior incidência de eventos foi o alelo A. Em contraste com os eventos anteriormente descritos: óbito e IAM, onde foi o alelo G ou genótipo GG que foi o preditor destes eventos.

Para esta análise multivariada, incluímos no modelo de regressão logística as seguintes variáveis: Hipertensão Arterial, IAM prévio, Idade e o R192Q alelo A.

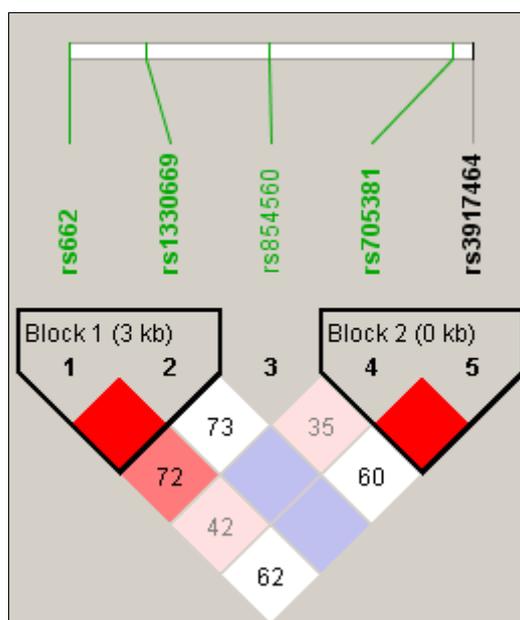
A hipertensão arterial foi a única variável que não manteve a significância estatística após a inclusão no modelo. O alelo A, R192Q foi a variável que apresentou maior risco para eventos combinados. A presença deste alelo, aumenta o risco para eventos combinados em três vezes (IC<sub>95%</sub> 1,2 a 7,07) (Tabela 22).

**Tabela 22 - Regressão logística para eventos combinados no grupo MASS II Genético clínico**

Variáveis independentes	B	p	OR	IC <sub>95%</sub>	
				Inferior	Superior
<b>Idade &gt; 65 anos</b>	0,927	<b>0,012</b>	2,528	1,226	5,214
<b>IAM prévio</b>	0,749	<b>0,038</b>	2,116	1,043	4,290
<b>Hipertensão Arterial</b>	0,691	0,056	1,997	0,984	4,053
<b>R192Q: alelo A</b>	1,109	<b>0,010</b>	3,030	1,298	7,079
<b>Constante</b>	-1,569	0,005	0,208		

#### 4.13 Distribuição das variantes genéticas no gene PON1

Os cinco polimorfismos da PON1 analisados neste estudo estão localizados no mesmo gene, portanto para estes cinco polimorfismos foram feitas as análises de haplótipos e alélica para os eventos de interesse neste estudo (Figura 4).



**Figura 4 - Gene PON1 com os dois blocos de haplótipos formados pelos cinco polimorfismos. Os polimorfismos rs662 e rs13306698 formam um haplótipo (bloco 1) e os polimorfismos rs705381 e rs3917464 formam um outro haplótipo (bloco 2)**

A análise dos haplótipos nos permitiu demonstrar a presença de dois blocos, sendo que em cada bloco há dois polimorfismos em desequilíbrio de ligação. R192Q: rs662 e R160G: rs13306698 no bloco 1 e Promoter\_161:rs705381 e rs3917464 no bloco 2.

A figura 3 mostra a formação dos blocos entre os polimorfismos na população do estudo MASS II Genético. Os blocos vermelhos representam forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos, fato que gera a

formação dos haplótipos. O polimorfismo rs854560 (Leu55Met) não está em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos estudados nesta população.

Desequilíbrio de ligação é a associação não ao acaso de alelos entre diferentes locos. O desequilíbrio de ligação é a medida estatística da associação entre alelos de diferentes locos.

Foram feitas as análises de haplótipos para IAM, AVE, Nova intervenção, eventos combinados e óbito. Na análise estatística casos *versus* Controle não houve  $p < 0,005$  para estes desfechos clínicos estudados.

As Tabelas 23 e 24 mostram as análises estatísticas dos haplótipos para os desfechos clínicos: eventos combinados e óbito. A primeira coluna de frequência destas tabelas apresenta a frequência de cada genótipo. Nestas tabelas constam as frequências para casos e controles de cada evento nos blocos (1 e 2) e o valor de  $p$  resultante da análise estatística casos *versus* controle.

A análise por alelos para eventos combinados nos polimorfismos estudados não apresentou dados significativos (Tabela 25).

**Tabela 23 - Associação dos haplótipos (blocos 1 e 2): eventos combinados**

Eventos Combinados Associação Haplótipo	Frequência	Frequência de Casos/Controles	N de Casos/Controles	Qui-quadrado	p
<b>Bloco 1</b>					
AA	0,614	0,619/0,612	168,2:103,8/449,2:284,8	0,036	0,8495
GA	0,380	0,381/0,380	103,7:168,3/278,8:455,2	0,0020	0,9624
<b>Bloco 2</b>					
CG	0,777	0,747/0,788	201,7:68,3/575,0:155,0	1,872	0,1713
TG	0,212	0,246/0,200	66,3:203,7/145,8:584,2	2,48	0,1153
TC	0,011	0,007/0,013	2,0:268,0/9,3:720,7	0,491	0,4833

Tabela 24 - Associação dos haplótipos (blocos 1 e 2): óbito

Óbito Associação Haplótipo	Frequência	Frequência de Casos/Controles	N de Casos/Controles	Qui-quadrado	p
<b>Bloco 1</b>					
AA	0,614	0,621/0,612	88,2:53,8/529,2:334,8	0,041	0,84
GA	0,380	0,358/0,384	50,8:91,2/331,8:532,2	0,363	0,5468
<b>Bloco 2</b>					
CG	0,777	0,769/0,778	109,1:32,9/667,6:190,4	0,063	0,8023
TG	0,212	0,224/0,210	31,9:110,1/180,2:677,8	0,15	0,6983
TC	0,011	0,007/0,012	1,0:141,0/10,3:847,7	0,264	0,6076

**Tabela 25 - Associação de eventos combinados com os alelos do polimorfismo do gene da PON1**

	Marcador	Alelo	Eventos Combinados			p
			Frequência de Casos/Controles	Casos/Controles	N de	
R192Q	rs662	A	0,619/0,612	167:103/443:281	0,037	0,8483
R160G	rs13306698	A	1,000/0,992	268:0/718:6	2,235	0,135
Leu55Met	rs854560	T	0,385/0,380	104:166/279:455	0,022	0,8833
Promoter 161	rs705381	T	0,254/0,212	67:197/152:564	1,914	0,1665
	rs3917464	G	0,992/0,987	258:2/701:9	0,422	0,5161

Na análise alélica para óbito, o alelo G presente no polimorfismo R160G apresentou relação com óbito ( $p = 0,0113$ ). Os pacientes que faleceram tiveram uma frequência de 0,021 para o alelo G, enquanto os pacientes controle (não falecidos) tiveram uma frequência de 0,004 deste alelo (Tabela 26).

A análise alélica também foi feita para IAM, AVE e novas intervenções e não foi encontrada correlação entre estes desfechos clínicos e os alelos dos polimorfismos estudados (resultados não mostrados).

Tabela 26 - Associação de óbito com os alelos do polimorfismo do gene da PON1

	Marcador	Alelo	Óbito			p
			Frequência de Casos/Controles	N de Casos/Controles	Qui-quadrado	
R192Q	rs662	A	0,621/0,612	87:53/523:331	0,041	0,8391
R160G	rs13306698	G	0,021/0,004	17/03,3	6,414	<b>0,0113</b>
Leu55Met	rs854560	A	0,641/0,615	91:51/530:332	0,349	0,5546
Promoter 161	rs705381	T	0,232/0,222	32:106/187:655	0,066	0,7979
	rs3917464	G	0,993/0,988	141:1/818:10	0,274	0,6006

## **5 DISCUSSÃO**

## 5.1 Considerações Gerais

A DAC é uma doença complexa, poligênica que provavelmente resulta da interação de múltiplas variantes genéticas com fatores ambientais tais como obesidade e vida sedentária, além de depender das características genéticas de cada população estudada. Em se tratando do código genético, com aproximadamente dois milhões de polimorfismos já identificados, avaliar o efeito isolado de um determinado alelo é um desafio, pois a DAC é muito susceptível a interações gene-gene e gene-ambiente. A expressão de variações específicas em um sistema biológico complexo é sujeito a modificações de outros genes envolvidos no mesmo processo fisiológico, o que prejudica, por exemplo, a identificação real do papel de um determinado polimorfismo na homeostase do sistema. Em contrapartida, um traço herdado pode ser modificado ou manifestado por influências do meio ambiente quando uma única mutação responde por uma síndrome genética ou diversos polimorfismos, aparentemente de pouca influência em condições basais, gerando um fenótipo alternativo após sofrerem influências ambientais.

O impacto da caracterização genética de uma patologia como determinante de risco e resposta terapêutica começa a apresentar resultados em diversas áreas.

Na literatura, já foram conduzidos muitos estudos de associação envolvendo genes candidatos relacionados a fenótipos de dislipidemias e DAC, sendo que das associações já encontradas, recentemente grande atenção tem sido dada à PON1. Embora alguns estudos tenham demonstrado a relação dos polimorfismos com a concentração plasmática lipídicas, acredita-se que variações herdadas na concentração plasmática dos níveis de LDL-c, são o reflexo de variações alélicas presentes em mais de um gene, cada um isoladamente tendo efeitos discretos à moderados sob as suas concentrações plasmáticas. Vários destes polimorfismos, associados ao metabolismo lipídico, também tem sido relacionados ao risco de doença cardiovascular. Uma vez que estes polimorfismos representam um índice de exposição presente ao longo da vida de níveis alterados de lipoproteínas, enquanto medidas séricas feitas em momentos isolados sofrem influência de fatores como dieta, exercício, jejum, etc. Desta forma a tendência atual é considerar que o valor preditivo dos polimorfismos é mais consistente do que medidas séricas isoladas de lipídeos.

Este estudo possibilita a análise de marcadores genéticos que estão relacionados com o processo de aterogênese numa população específica, associada a uma incidência aumentada de eventos cardiovasculares. Desta forma, é possível identificar novos parâmetros de risco, permitindo que um novo paradigma possa ser implementado: a individualização terapêutica conforme as características susceptíveis de um indivíduo, aprimorando a aplicabilidade da genética na abordagem clínica.

## **5.2 Características Basais dos Pacientes do Estudo MASS II em Relação aos Polimorfismos**

A característica demográfica que apresentou diferença estatisticamente significativa mais freqüentemente foi a raça. A raça neste estudo foi classificada por autodenominação. Os pacientes denominaram-se pertencentes às três raças: branca, amarela e negra. A grande maioria dos pacientes denominou-se branca (n = 443), enquanto 34 denominaram-se negros e 40 amarelos. Dentre os cinco polimorfismos estudados, dois polimorfismos apresentaram diferença na distribuição entre as raças. Esta diferença estatística provavelmente deve-se à diferença do tamanho dos grupos raciais. Para determinar o impacto real das raças e polimorfismos na nossa população seriam necessários estudos futuros com grupos raciais amarelos e negros com maior número de pacientes.

A terapia medicamentosa conforme descrito anteriormente foi oferecida de acordo com os protocolos e recomendações para DAC em vigência na data do estudo. A terapia medicamentosa (estatina, anti-hipertensivo e antiplaquetário) foi equivalente entre os polimorfismos estudados. Consideramos este resultado, ausência de diferença, de suma importância, pois diferenças na terapia medicamentosa entre os genótipos poderiam ser um fator confundidor na nossa análise.

### 5.3 Polimorfismos e Níveis Séricos de Lipídeos

A oxidação do LDL e a sua associação no desenvolvimento da célula espumosa (“foam cell”) na parede arterial são consideradas o início do processo aterosclerótico (Witztum e Steinberg, 1991). Quando o PON foi descrito como gene com propriedade antioxidante, tornou-se gene candidato ao desenvolvimento da doença cardiovascular. Porém até o momento os dados na literatura são conflitantes.

Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem que o PON está correlacionado com a não oxidação do LDL-colesterol (Aviran *et al.*, 1998), diversos estudos não conseguiram demonstrar relação entre polimorfismo e dosagem sérica de lipídeos (Wang *et al.*, 2003; Wang, 2005).

Em nosso estudo houve associação estatisticamente significativa entre apenas um polimorfismo da PON 1 (promoter\_161) e os valores séricos de HDL-c ( $p = 0,0369$ ). O alelo T parece ter efeito de risco nos pacientes carreadores deste alelo, visto que os pacientes com o polimorfismo (alelo T) apresentaram valores mais baixos de HDL colesterol e mais altos de Triglicérides de forma progressiva. Apesar dos níveis de triglicérides apresentarem padrão ascendente com a presença do alelo T na posição Promoter\_161: CC (189,89 mg/dL), TC (199,23 mg/dL) e TT (245,36 mg/dL) a análise estatística não foi significativa ( $p = 0,419$ ).

Fato interessante, foi que os polimorfismos mais estudados, R192Q e Leu55Met, não apresentaram impacto algum nas concentrações séricas de lipídeos. Este polimorfismos são os que sabidamente alteram a atividade enzimática sérica da paraoxonase e conseqüentemente seria esperado

maior efeito e relação com as concentrações de lipídeos e DAC. Em contrapartida, a ausência de relação entre estes polimorfismos e as concentrações séricas de lipídeos não gera surpresa. Diversos estudos já mostraram que o polimorfismo não está necessariamente relacionado às concentrações séricas de lipídeos.

Nesta análise de lipídeos no tempo basal do estudo, decidimos fazer uma sub-análise na população que não estava em uso de estatina no momento da inclusão deste estudo. Postulamos que esta análise poderia nos fornecer dados sobre a real influência dos polimorfismos nas concentrações séricas de lipídeos, porém mesmo esta sub-população do MASS II Genético não apresentou diferença nas concentrações séricas de lipídeos entre os genótipos e alelos.

Neste estudo além da concentração basal de lipídeos foram feitas análises evolutivas ao longo de cinco anos. Este é o primeiro estudo que investigou o efeito dos polimorfismos da PON1 na evolução dos lipídeos.

Em todos os perfis analisados houve queda significativa no decorrer do estudo ( $p < 0,001$ ), porém sem diferença entre os genótipos estudados. Esta melhora no perfil lipídico é um dado de extrema importância, pois é uma confirmação do adequado manejo clínico desta população.

Visto a importância em determinar se há influência dos polimorfismos no comportamento dos lipídeos, foram feitas análises complementares por alelos de dominância, além das análises genotípicas.

Todas estas análises nos mostram que os polimorfismos estudados da PON1 não apresentam relação com as concentrações basais de lipídeos ou com o comportamento evolutivo dos lipídeos nesta população.

#### **5.4 Características Basais dos Pacientes do Estudo MASS II e Desfechos Clínicos**

A idade foi preditora de óbito de forma independente, após ajuste para todas as variáveis incluídas na regressão logística para óbito que foram: IAM prévio, hipertensão arterial, raça, diabetes, lesão angiográfica, uso de estatina no tempo basal e alelo G na posição R160G. Este modelo de regressão logística foi construído com a inclusão de todas as variáveis que eram clinicamente importantes para a predição de óbito e que apresentaram significância na análise univariada.

Os pacientes com mais de 65 anos apresentam risco 2,94 vezes maior de morte quando comparados aos pacientes com menos de 65 anos ( $p < 0,001$ ).

Nesta mesma regressão logística a outra variável que manteve a significância estatística para prever óbito foi o IAM prévio, com um risco de morte aumentado em 2,15 vezes ( $p = 0,008$ ). Todas as outras variáveis incluídas neste modelo não mantiveram significância estatística.

Dentre as características clínicas basais analisadas na nossa população (síndrome metabólica, diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo e número de artérias coronárias acometidas) nenhuma foi preditora independente de eventos combinados na nossa população.

A utilização das drogas no tempo basal deste estudo também não foi preditora de eventos combinados e óbito. Inicialmente este fato não nos gera surpresa, porém o uso de medicamentos no tempo basal poderia ser considerado um marcador indireto de gravidade da DAC.

## **5.5 Polimorfismos e Desfechos Cardiovasculares**

### **5.5.1 Eventos combinados**

O objetivo primário deste estudo foi investigar o valor preditivo de cinco polimorfismos localizados no gene da PON1 para eventos combinados (infarto agudo do miocárdio, mortalidade ou necessidade de nova intervenção devido à angina refratária) no período de cinco anos.

Os eventos combinados foi um desfecho clínico utilizado na publicação original do MASSII e sendo este estudo um sub-estudo do MASS II, decidimos manter este desfecho clínico no presente estudo.

Os cinco polimorfismos estudados não apresentaram associação com eventos combinados.

Desta forma, podemos afirmar em resposta ao nosso objetivo primário que os polimorfismos não foram preditivos de eventos combinados no MASS II Genético.

Este desfecho combinado, especificamente, é uma característica do estudo MASS II, portanto não há dados na literatura sobre a associação destes polimorfismos e estes eventos combinados.

### 5.5.2 Acidente vascular encefálico

Diversos estudos descreveram a associação entre os polimorfismos do gene PON1 e fenótipos cardiovasculares. O polimorfismo Gln192Arg (PON1) apresentou correlação positiva com o risco de AVE em pacientes com IAM prévio (Ranade *et al.*, 2005). Em nossa população não houve correlação entre os polimorfismos estudados e AVE, porém vale ressaltar que a incidência de AVE não foi alta em nossa população. No decorrer do estudo houve apenas 18 casos de AVE (3,48%) o que faz com que o estudo não tenha poder suficiente para determinar o valor preditivo dos polimorfismos para este desfecho clínico.

### 5.5.3 Nova intervenção

A necessidade de nova intervenção (angioplastia e revascularização cirúrgica do miocárdio) não apresentou associação com nenhum dos polimorfismo estudados da PON1. Apenas a revascularização cirúrgica do miocárdio apresentou diferença entre os genótipos estudados.

O alelo G na posição R192Q aparentemente está relacionado à maior taxa de revascularização do miocárdio; visto que os pacientes que não apresentavam o alelo G (AA) tiveram 5,08% de revascularização, enquanto 9,26% dos pacientes AG e 15,48% dos GG. O teste do qui-quadrado mostrou que existe diferença significativa entre estes grupos ( $p = 0,016$ ).

Este dado é novo na literatura médica, visto que não há dados publicados até o momento sobre a influência dos polimorfismos na evolução dos pacientes com DAC estabelecida.

#### 5.5.4 Óbito

A análise por alelos no Haploview dos polimorfismos do gene da PON1 mostrou relação entre o alelo G no rs13306698 (R160G) e óbito ( $p = 0,0113$ ). Esta associação confirmou-se na análise univariada (teste Log Rank)  $p = 0,007$ . O alelo G foi raro na nossa população, apenas cinco pacientes eram carreadores do alelo G. A baixa ocorrência deste genótipo faz com que este achado deva ser observado com cautela.

A regressão logística para óbito foi feita com o intuito de determinar se este alelo G era preditor independente para óbito nesta população. Após incluirmos todas as variáveis clínicas importantes e que haviam apresentado diferença na análise univariada, este alelo G não se manteve como preditor de óbito nos pacientes deste estudo.

Este mesmo alelo, já foi descrito anteriormente como protetor para DAC. Em um estudo feito na população chinesa, verificou-se que os pacientes com genótipo GG apresentavam menor risco de DAC (Odds ratio 0,61). Este mesmo estudo demonstrou que este polimorfismo não havia alterado a atividade sérica da paraoxonase, assim como não havia relação com os níveis séricos de HDL-c (Wang *et al.*, 2003). Este mesmo grupo de autores apresentam publicações posteriores onde esta associação foi confirmada (Wang *et al.* 2005).

Vale a pena ressaltar que estes estudos citados mostram relação do alelo G com menor risco de DAC; contrariamente, o nosso estudo mostrou relação do alelo G com óbito.

Este tipo de divergência não é incomum em estudos de polimorfismos, visto que o efeito do polimorfismo na doença está sujeito à interações gene-gene e gene-ambiente; assim como a expressão do polimorfismo em populações específicas. Tendo estes fatores listados, vale a pena ressaltar as diferenças culturais, raciais e até mesmo no biótipo entre a população chinesa e a população brasileira abordada neste estudo. Estes fatores poderiam justificar em parte esta diferença encontrada: o alelo G parece ser protetor para DAC na população chinesa e risco para óbito na população brasileira com DAC estabelecida. Também é preciso ressaltar que além das diferenças raciais e culturais, o estudo chinês mostrou relação do polimorfismo com DAC e este estudo mostrou relação deste alelo com o óbito em uma população com DAC estabelecida.

## **5.6 Fenótipos e Genótipos e Eventos**

Dado a importância da interação entre genes e ambiente, e de prováveis fenótipos serem marcadores dos polimorfismos, fizemos análises específicas para tabagismo e HDL-c. Estas duas variáveis foram escolhidas, pois apresentaram diferença na distribuição entre os genótipos no tempo basal.

Um estudo caso-controle feito na população da Costa Rica, mostrou que o polimorfismo R192Q está associado ao risco de IAM entre não-tabagistas (Sen-Banerjee *et al.*, 2000).

Coincidentemente com a literatura, houve diferença na incidência do tabagismo entre os genótipos do polimorfismo R192Q ( $p = 0,0352$ ). Diante

desta diferença , fizemos uma análise estratificada de eventos por status de tabagismo. Esta análise não foi significativa.

O polimorfismo Promoter\_161 apresentou diferença no tempo basal nas concentrações de HDL-c ( $p = 0,0369$ ). Diante deste fato fizemos uma análise estratificada para os eventos cardiovasculares por HDL-c de risco ou não. Para esta análise o HDL-c foi categorizado em risco ou não de acordo com os valores de corte estabelecidos na definição da Síndrome Metabólica (IDF, 2006). Esta análise estratificada também não evidenciou diferença entre os genótipos estudados.

### **5.7 Análise combinada de polimorfismos: R192Q e Leu55Met**

Os polimorfismos ,R192Q e Leu55Met, são os que foram primeiramente descritos no gene da PON1 e até hoje são os mais estudados. Também foram os polimorfismos mais freqüentes na nossa população. Adicionalmente, estes polimorfismos não estão em desequilíbrio de ligação na nossa população quando analisados os haplótipos. Considerando todos estes pontos, nós optamos por fazer uma análise combinada destes polimorfismos para os eventos cardiovasculares.

Para esta análise combinada consideramos a presença do alelo A nestas duas posições. Este alelo parece estar associado ao maior risco para óbito. Para esta análise combinada montamos três modelos de adição alélica. Em todas estas análises realizadas estas combinações alélicas dos polimorfismos, R192Q e Leu55Met, não foram preditivas de eventos cardiovasculares.

## 5.8 Grupo MASSII Genético Médico

Considerando que este grupo clínico foi o que sofreu menor interferência do tratamento na história natural da DAC, talvez, por este motivo, estes pacientes estariam mais expostos aos riscos dos polimorfismos e conseqüentemente conseguiríamos mostrar a relação dos polimorfismos com os desfechos clínicos.

Baseados nestes fatos, nós decidimos analisar de forma mais profunda a ocorrência dos eventos cardiovasculares e sua distribuição entre os polimorfismos estudados. Após a realização de análises univariadas, fizemos a seleção das variáveis para a construção de modelos de regressão logística.

O genótipo GG na posição R192Q conferiu risco aumentado em 6,5 vezes para a ocorrência de IAM (novo evento). É de extrema importância destacar que este genótipo conferiu maior risco para novo IAM do que IAM prévio (OR: 3,79).

Estes dados são coincidentes com outros estudos na literatura que associam este alelo como fator de risco independente para IAM (Osei-Hyiaman *et al.*, 2001) É importante ressaltar que os dados encontrados neste estudo destacam-se e somam-se aos estudos anteriores, pois está demonstrando a associação deste SNP com IAM em uma população com DAC estabelecida.

Na análise de regressão logística para eventos combinados, o alelo que associou-se de forma independente foi o Alelo A na posição R192Q. Este alelo foi a variável preditora que apresentou o maior OR no modelo de

regressão logística. Surpreendentemente, o risco para eventos combinados conferido pelo alelo A superou o risco do IAM prévio e da Idade > 65 anos.

Observando nossos resultados, a posição R192Q apresenta forte relação com eventos cardiovasculares neste subgrupo de pacientes. Porém houve associação de forma independente tanto do alelo A, quanto do alelo G com os desfechos estudados.

Esta associação do polimorfismo R192Q com eventos cardiovasculares em uma população com DAC estabelecida são concordantes com os resultados de um estudo publicado recentemente. Este estudo é de extrema importância nesta área da literatura médica, visto a grande lacuna que existe; porém apresenta algumas limitações que devem ser consideradas: foram incluídos apenas pacientes do sexo masculino e caucasianos; os eventos foram obtidos através de registros nacionais, ou seja, esta população não foi acompanhada nos 10 anos do estudo. Este último fato pode ser considerado uma limitação, visto que os desfechos foram obtidos por fontes terciárias e estavam sujeitos à adequada classificação da doença pelo Código Internacional de Doenças (CID-10) por médicos e profissionais de saúde não ligados ao estudo (Regieli *et al.*, 2009).

Por outro lado, este estudo reforça os resultados que encontramos neste grupo clínico de paciente do MASS II, pois incluiu pacientes que haviam sido randomizados para um estudo clínico de estatinas, o que se aproxima ao manejo clínico deste trabalho.

## 5.9 Limitações do Estudo

Evidências sugerem que a atividade da paraoxonase pode prever a doença cardiovascular de forma mais precisa do que o genótipo isoladamente (Jarvik *et al.*, 2000). Entretanto, sabemos que a atividade da paraoxonase é em parte determinada pelo genótipo, estando desta forma estes dois fatores correlacionados entre si (Robertson *et al.*, 2003).

Neste estudo não foi possível dosar a atividade de paraoxonase, fato que pode em parte explicar os nossos resultados. Estudos futuros nesta área devem considerar esta análise bioquímica/fenotípica, visto que, a combinação genótipo e fenótipo podem nos fornecer neste caso uma melhor estimativa de risco.

Este estudo apresenta outras limitações que são inerentes do desenho deste estudo (coorte retrospectiva). As amostras de DNA foram colhidas na randomização/inclusão destes pacientes no estudo MASS II. Infelizmente não são todos os pacientes que possuem o DNA armazenado e dentre os pacientes que colheram o DNA, algumas amostras não estão adequadas para a análise.

Sendo um estudo coorte retrospectiva o número de pacientes já foi previamente estabelecido, e os dados clínicos e demográficos previamente coletados o que não permite análise de novos fatores/características.

A raça é uma característica importante a ser analisada nos estudos genéticos, visto a influência das raças na ocorrência dos polimorfismos. Porém a raça branca é predominante no estudo MASS II, com baixo número de pacientes da raça amarela e negra o que impossibilita a análise

estratificada dos polimorfismos pela raça. Também vale ressaltar o viés que pode ocorrer na auto-denominação da raça.

### **5.10 Considerações Finais**

Um aspecto importante a ser considerado quando comparamos o presente estudo com os dados de literatura, são as características da população estudada. A grande maioria dos estudos publicados demonstra correlação entre o gene PON1 com o desenvolvimento de DAC e não com a incidência de novos eventos cardiovasculares.

Este estudo foi realizado em uma população de alto risco, com doença coronária estabelecida, que foi acompanhada por um período mínimo de cinco anos. Neste cenário, o risco atribuível, de um marcador genético específico, para um novo evento cardiovascular pode estar perfeitamente reduzido diante de tantos fatores já conhecidos. Porém, o estudo de marcadores genéticos capazes de estratificar indivíduos de alto-risco para DAC pode ser extremamente relevante em termos de intervenções terapêuticas e na análise custo-benefício.

## **6 CONCLUSÕES**

Os dados apresentados neste estudo permitem-nos concluir que nos pacientes do projeto MASS II ao longo de cinco anos de observação:

- O alelo G do polimorfismo rs13306698 (R160G) do gene da PON1, presente em cinco pacientes, está associado ao óbito na população MASS II no período de cinco anos.
- Os polimorfismos estudados não foram preditores de nova intervenção, acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio e eventos combinados (infarto agudo do miocárdio, morte e nova intervenção).
- Os níveis de colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérides não tiveram influência dos polimorfismos da PON1 no tempo basal e no decorrer do estudo.

No grupo clínico do estudo MASSII Genético:

- O genótipo GG na posição R192Q foi preditor independente de novo infarto do miocárdio.
- O alelo A na posição R192Q é um preditor independente de eventos combinados (infarto agudo do miocárdio, morte e nova intervenção).

## **7 ANEXOS**

## Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo D

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(Instruções para preenchimento no verso)

---

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

**1. NOME DO PACIENTE** : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

**2. RESPONSÁVEL LEGAL** .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

---

**II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

**“Avaliação das variantes genéticas relacionadas ao metabolismo lipídico em pacientes diabéticos e não diabéticos com doença arterial coronariana”**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Whady Armino Hueb

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25.249

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Coronariopatia Crônica

**3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**

SEM RISCO  RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

**4 DURAÇÃO DA PESQUISA:** 6 meses

---

### III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Este termo de consentimento pode conter palavras técnicas que você talvez não conheça. Por favor, em caso de dúvida pergunte ao seu médico o significado destas palavras.

#### NATUREZA E OBJETIVO DESTE ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de um subprojeto de pesquisa do estudo MASS.

Este projeto tem como objetivo estudar suas características genéticas relacionadas ao metabolismo de gorduras no sangue (exemplo: colesterol, triglicérides), que podem estar envolvidos com a doença que você tem no coração que é a doença coronariana.

Como você já participa do projeto MASS, este subestudo não lhe trará nenhum desconforto uma vez que o seu sangue foi colhido no início do estudo MASS e está armazenado no hospital (InCor).

Após você ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, vamos estudar uma parte do seu material genético (DNA) que pode explicar porque você (ou alguém de sua família) tem a doença coronariana. Para isto precisaremos extrair o seu DNA da amostra de sangue já coletada. Este sangue está armazenado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor onde será realizada a extração do DNA e análise do sangue para identificar algumas características genéticas que podem estar relacionadas com a evolução mais rápida da doença coronariana, portanto, sabendo desta associação podemos fazer melhor prevenção da doença coronariana.

Você continuará a tomar todos os remédios que vem fazendo uso, ou a critério de seu médico estes poderão ser modificados no futuro se o seu médico julgar mais apropriado, portanto não acarretará quaisquer alterações em seu tratamento médico em nossa instituição.

#### ALTERNATIVAS:

Sua participação é totalmente voluntária. Você poderá solicitar o seu desligamento deste projeto a qualquer momento. Poderá também solicitar a destruição das amostras de DNA que estarão armazenadas no nosso laboratório.

#### POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DO PROJETO DE PESQUISA

Sua participação nesta pesquisa poderá, através dos conhecimentos adquiridos, ajudar outras pessoas com a doença coronariana como você.

#### • Estudo MASS

O estudo MASS foi preparado para avaliar a cirurgia de revascularização miocárdica realizada com e sem auxílio de coração/pulmão artificial (circulação extracorpórea) em pacientes portadores de angina pectoris e doença arterial coronária estáveis, objetivando conhecer os benefícios avaliados através destas 2 técnicas após acompanhamento de 6 meses e determinar qual é a melhor opção de tratamento neste grupo selecionado de pacientes.

Embora esteja estabelecido que a cirurgia de revascularização miocárdica realizada com auxílio do coração/pulmão artificial oferece benefícios conclusivos aos pacientes portadores de isquemia miocárdica, aliviando os sintomas e melhorando a qualidade de vida em determinados subgrupos de pacientes, não se tem observado um consenso quanto aos resultados sem circulação extra corpórea.

#### Explicações sobre o MASS

Esta pesquisa selecionou pacientes com idade entre 35 e 75 anos, portadores de angina estável e função ventricular preservada, e com indicação para realização eletiva de cirurgia de revascularização miocárdica.

Todos os pacientes com avaliação bimestral e, durante as consultas o paciente faz avaliação clínica e exames rotineiros previstos e coronariografia de controle após 6 meses do procedimento.

Por se tratar de alternativa técnica para um mesmo procedimento (cirurgia de revascularização miocárdica), objetivamos avaliar todos os benefícios de cada uma das alternativas.

O objetivo do MASS é determinar qual o melhor benefício para cirurgia de revascularização miocárdica com e sem circulação extracorpórea para este grupo selecionado de pacientes, ao qual você pertence.

---

#### IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

#### CUSTOS:

Não existem custos para participação neste estudo você continuará tendo acesso a exames e consultas rotineiras ou extras previsto no projeto. Não será feito nenhum pagamento ao paciente pela participação neste estudo.

#### CONFIDENCIALIDADE:

As informações deste estudo serão entregues aos médicos responsáveis que poderão verificar seu prontuário o que lhe identificará através de um acrônimo invertido reconhecido somente pelo investigador principal. Exemplo: Antonio da Silva: junta-se as três primeiras letras do sobrenome com as duas primeiras letras do nome principal ficando assim um acrônimo invertido SILAN.

O consentimento assinado também poderá ser verificado pelas autoridades sanitárias locais. Ainda que haja necessidade de liberar informações para estas partes, garantimos o absoluto sigilo e confidencialidade dos dados. Os resultados deste estudo podem ser apresentados em reuniões ou publicações, entretanto, sua identidade será mantida confidencial nestas reuniões.

#### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA / RETIRADA DO ESTUDO:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Caso você se recuse a participar deste estudo, você não sofrerá nenhuma penalidade ou perderá qualquer benefício que porventura você tenha com seu médico ou instituição.

#### TÉRMINO DO ESTUDO:

Sua participação neste estudo pode ser encerrada sob as seguintes circunstâncias:

- Você tenha se mudado para outra área e, portanto, não vai mais se consultar com seu médico;
- Seu médico considera benéfico para sua saúde a sua saída do estudo;

- O patrocinador decida encerrar o estudo;
- As autoridades locais decidam interromper o estudo.

---

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

Caso o paciente apresente problemas médicos relacionados a enfermidade, encontra-se disponível médico e telefone do projeto de pesquisa para orientá-lo.

InCor - Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 - Cerqueira Cesar - São Paulo/SP

Médico: Dr. Whady Armindo Hueb Telefone: (011) 3069 5032

---

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES.**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,                    de                    de 20                    .

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome Legível)

**Anexo B - Aprovação na Comissão Científica do Instituto do Coração**

Mem. CC. 0808

São Paulo, 19 de maio de 2005.

Ao  
Prof. Dr. Whady Hueb**Ref.: Protocolo de Pesquisa SDC 2623/05/043**

A Comissão Científica do Instituto do Coração, apreciou na sessão 472/05/08 de 19.5.2005, a aprovação "ad referendum" do Protocolo de Pesquisa SDC 2623/05/043 "**Avaliação das Variantes Genéticas Relacionadas ao Metabolismo Lipídico em Pacientes Diabéticos e não Diabéticos com Doença Arterial Coronariana**", e foi o seguinte o parecer: "**Ciente**".

Atenciosamente,

  
Selma C. Quaiá Fortunato  
Secretária da Comissão Científica  
InCor - HC.FMUSP

**Obs.:** Lembramos que de acordo com a Res. 196 de 10/10/96, inciso IX.1 e 2, a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais e cabe ao pesquisador apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa.

## Anexo C - Aprovação da CAPPesq

### **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.10.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **416/05**, intitulado: "Avaliação das variantes genéticas relacionadas ao metabolismo lipídico em pacientes diabéticos e não diabéticos com doença arterial coronariana" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Whady Armino Hueb

Pesquisador (a) Executante: Dra. Leticia de Araújo Funari Ferri

CAPPesq, 13 de Outubro de 2005.



**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

## Anexo D

### Características dos pacientes (MASS II) em relação ao polimorfismo R192Q

Variável	AA		AG		GG		p
	N	%	N	%	N	%	
Número de Pacientes	197		216		84		
Sexo: Masculino	136	69,04%	145	67,13%	55	65,48%	0,8271 <sup>(*)</sup>
<b>Raça</b>							
Amarelo	12	6,09%	19	8,80%	9	10,71%	0,0824 <sup>(*)</sup>
Branco	178	90,36%	181	83,80%	66	78,57%	
Negro	7	3,55%	16	7,41%	9	10,71%	
Tabagismo	54	27,41%	85	39,35%	27	32,14%	<b>0,0352<sup>(*)</sup></b>
Síndrome Metabólica	105/192	54,69%	94/213	44,13%	43/82	52,44%	0,0904 <sup>(*)</sup>
Diabetes Mellitus	68	34,52%	55	25,46%	31	36,90%	0,0591 <sup>(*)</sup>
Hipertensão Arterial	117	59,4%	122	56,50%	53	63,10%	0,564 <sup>(**)</sup>
IAM prévio	92	46,7%	95	44,00%	40	47,60%	0,794 <sup>(**)</sup>
<b>Grupo de tratamento</b>							
Angioplastia	68	34,52%	72	33,33%	28	33,33%	0,2391 <sup>(**)</sup>
Cirurgia	59	29,95%	83	38,43%	24	28,57%	
Médico	70	35,53%	61	28,24%	32	38,10%	
<b>Lesão</b>							
Biarterial	91	46,19%	90	41,67%	36	42,86%	0,6427 <sup>(**)</sup>
Triarterial	106	53,81%	126	58,33%	48	57,14%	

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Características dos pacientes (MASS II) em relação ao polimorfismo R160G

Variável	R160G				p
	AA	AG	GG		
Número de Pacientes	492	4	1		
Sexo: Masculino	328	4	1	100,00%	0,1334 <sup>(*)</sup>
<b>Raça</b>					
Amarelo	39	0	0	0,00%	<b>0,0223<sup>(*)</sup></b>
Branco	422	2	0	0,00%	
Negro	31	2	1	100,00%	
Tabagismo	165	1	0	0,00%	0,6218 <sup>(*)</sup>
Síndrome Metabólica	241/482	2	0	0,00%	0,5005 <sup>(*)</sup>
Diabetes Mellitus	150	2	1	100,00%	0,2214 <sup>(*)</sup>
Hipertensão Arterial	288	2	0	0,00%	0,392 <sup>(*)</sup>
IAM prévio	225	0	0	0,00%	<b>0,048<sup>(*)</sup></b>
<b>Grupo de tratamento</b>					
Angioplastia	165	1	0	0,00%	0,6321 <sup>(**)</sup>
Cirurgia	166	1	0	0,00%	
Médico	161	2	1	100,00%	
<b>Lesão</b>					
Biarterial	216	0	1	100,00%	<b>0,0437<sup>(**)</sup></b>
Triarterial	276	4	0	0,00%	

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Características dos pacientes (MASS II) em relação ao polimorfismo Leu55Met

Variável	Leu55Met			P
	AA	AT	TT	
Número de Pacientes	208	220	89	
Sexo: Masculino	136	154	60	67,42% 0,5926 <sup>(*)</sup>
<b>Raça</b>				
Amarelo	11	20	9	10,11% <b>0,0375<sup>(*)</sup></b>
Branco	190	181	72	80,90%
Negro	7	19	8	8,99%
Tabagismo	61	82	28	31,46% 0,2049 <sup>(*)</sup>
Síndrome Metabólica	108/201	100/217	46/87	52,87% 0,2562 <sup>(*)</sup>
Diabetes Mellitus	66	65	28	31,46% 0,8757 <sup>(*)</sup>
Hipertensão Arterial	123	129	51	57,3% 0,958 <sup>(**)</sup>
IAM prévio	98	94	42	47,20% 0,609 <sup>(**)</sup>
<b>Grupo de tratamento</b>				
Angioplastia	71	79	27	30,34% 0,8672 <sup>(**)</sup>
Cirurgia	68	75	31	34,83%
Médico	69	66	31	34,83%
<b>Lesão</b>				
Biarterial	88	99	45	50,56% 0,4243 <sup>(**)</sup>
Triarterial	120	121	44	49,44%

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Características dos pacientes (MASS II) em relação ao polimorfismo Promoter -161

Variável	Promoter 161			p
	CC	CT	TT	
Número de Pacientes	300	163	28	
Sexo: Masculino	204	114	16	0,4212 <sup>(*)</sup>
<b>Raça</b>				
Amarelo	21	14	4	0,5956 <sup>(*)</sup>
Branco	257	141	22	78,57%
Negro	22	8	2	7,14%
Tabagismo	100	54	12	42,86% 0,5910 <sup>(*)</sup>
Síndrome Metabólica	137/292	86/160	14/28	50,00% 0,3798 <sup>(*)</sup>
Diabetes Mellitus	100	42	9	32,14% 0,2327 <sup>(*)</sup>
Hipertensão Arterial	165	100	21	75,00% 0,075 <sup>(**)</sup>
IAM prévio	132	77	17	60,70% 0,220 <sup>(**)</sup>
<b>Grupo de tratamento</b>				
Angioplastia	98	54	12	42,86% 0,8066 <sup>(**)</sup>
Cirurgia	104	53	9	32,14%
Médico	98	56	7	25,00%
<b>Lesão</b>				
Biarterial	135	65	13	46,43% 0,5366 <sup>(**)</sup>
Triarterial	165	98	15	53,57%

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Características dos pacientes (MASS II) em relação ao polimorfismo rs3917464

Variável	RS3917464				p
	CG		GG		
Número de Pacientes	11		474		
Sexo: Masculino	10	90,91%	319	67,30%	0,1833 <sup>(*)</sup>
<b>Raça</b>					
Amarelo	2	18,18%	35	7,38%	0,4616 <sup>(*)</sup>
Branco	8	72,73%	409	86,29%	
Negro	1	9,09%	30	6,33%	
Tabagismo	2	18,18%	159	33,54%	0,4558 <sup>(*)</sup>
Síndrome Metabólica	9	81,82%	228/464	49,14%	0,0661 <sup>(*)</sup>
Diabetes Mellitus	4	36,36%	145	30,59%	0,9364 <sup>(*)</sup>
Hipertensão Arterial	8	72,70%	275	58,00%	0,374 <sup>(***)</sup>
IAM prévio	5	45,50%	218	46,00%	0,972 <sup>(**)</sup>
<b>Grupo de tratamento</b>					
Angioplastia	2	18,18%	159	33,54%	0,5133 <sup>(**)</sup>
Cirurgia	4	36,36%	161	33,97%	
Médico	5	45,45%	154	32,49%	
<b>Lesão</b>					
Biarterial	3	27,27%	207	43,67%	0,4370 <sup>(**)</sup>
Triarterial	8	72,73%	267	56,33%	

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

(\*\*\*) Teste exato de Fisher

**Anexo E**  
**Uso de drogas no tempo basal em relação ao polimorfismo R192Q**

Variável	R192Q			p			
	AA	AG	GG				
Estatina	101/197	51,27%	103/216	47,69%	45/84	53,57%	0,6016 <sup>(**)</sup>
Anti-Hipertensivo	193/197	97,97%	210/216	97,22%	82/84	97,62%	0,8848 <sup>(**)</sup>
Anti-Plaquetário	196/197	99,49%	212/216	98,15%	83/84	98,81%	0,4315 <sup>(*)</sup>

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

**Uso de drogas no tempo basal em relação ao polimorfismo R160G**

Variável	R160G			p			
	AA	AG	GG				
Estatina	250/492	50,81%	2/4	50,00%	0/1	0,00%	0,5970 <sup>(**)</sup>
Anti-Hipertensivo	480/492	97,56%	4/4	100,00%	1/1	100,00%	0,9394 <sup>(**)</sup>
Anti-Plaquetário	486/492	98,78%	4/4	100,00%	1/1	100,00%	0,9408 <sup>(*)</sup>

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Uso de drogas no tempo basal em relação ao polimorfismo Leu55Met

Variável	Leu55Met			p
	AA	AT	TT	
Estatina	105/208	103/220	49/89	0,4060 <sup>(**)</sup>
Anti-Hipertensivo	205/208	213/220	87/89	0,4893 <sup>(**)</sup>
Anti-Plaquetário	208/208	216/220	87/89	0,0432 <sup>(*)</sup>

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Uso de drogas no tempo basal em relação ao polimorfismo Promoter 161

Variável	Promoter 161			p
	CC	CT	TT	
Estatina	150/300	79/163	17/28	0,4875 <sup>(**)</sup>
Anti-Hipertensivo	292/300	159/163	28/28	0,6825 <sup>(**)</sup>
Anti-Plaquetário	297/300	160/163	28/28	0,5309 <sup>(*)</sup>

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

### Uso de drogas no tempo basal em relação ao polimorfismo rs3917464

Variável	RS3917464				p
	CG		GG		
Estatina	5/11	45,45%	239/474	50,42%	0,7446 <sup>(**)</sup>
Anti-hipertensivo	11/11	100,00%	462/474	97,47%	0,5931 <sup>(**)</sup>
Antiplaquetário	11/11	100,00%	469/474	98,95%	1,0000 <sup>(*)</sup>

(\*) Razão de verossimilhança

(\*\*) Teste do qui-quadrado

**Anexo F**  
**Concentração lipídicos no tempo basal em relação ao polimorfismo rs662 PON1(R192Q)**

Variáveis	rs662 PON1(R192Q)						p
	AA		AG		GG		
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Colesterol Total	195	222,52 ± 46,62	214	226,02 ± 50,32	82	219,32 ± 44,91	0,6054
LDL-Colesterol	184	148,05 ± 40,66	204	148,82 ± 41,07	74	149,08 ± 40,83	0,9961
HDL-Colesterol	189	37,19 ± 9,87	208	37,22 ± 11,23	76	37,82 ± 9,93	0,8341
Triglicérides	195	189,41 ± 115,29	214	196,95 ± 118,96	83	193,57 ± 117,85	0,7358

Teste de Kruskal-Wallis

**Concentração lipídicos no tempo basal em relação ao polimorfismo rs13306698 PON1(R160G)**

Variáveis	rs13306698 PON1(R160G)						p
	AA		AG		GG		
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média	
Colesterol Total	486	224,85 ± 48,35	4	182,50 ± 28,69	1	233	0,1415
LDL-Colesterol	457	149,70 ± 41,25	4	124,50 ± 20,34	1	138	0,3591
HDL-Colesterol	468	37,42 ± 10,53	4	34,75 ± 4,86	1	34	0,9128
Triglicérides	487	194,18 ± 117,09	4	116,75 ± 43,52	1	307	0,0717

Teste de Kruskal-Wallis

**Concentração lipídeos no tempo basal em relação ao polimorfismo rs854560 PON1(Leu55Met)**

Variáveis	rs854560 PON1(Leu55Met)							
	AA		AT		TT		p	
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	N	Média ± DP		
Colesterol Total	206	223,31 ± 46,34	218	222,99 ± 47,63	87	229,94 ± 53,31	0,7320	
LDL-Colesterol	191	147,91 ± 41,14	208	148,09 ± 39,94	80	155,89 ± 43,87	0,4195	
HDL-Colesterol	197	37,71 ± 10,54	212	36,91 ± 10,15	82	38,45 ± 10,88	0,6063	
Triglicérides	206	192,44 ± 119,2	218	194,72 ± 115,55	88	192,81 ± 114,85	0,8467	

Teste de Kruskal-Wallis

**Concentração lipídeos no tempo basal em relação ao polimorfismo rs3917464 PON1**

Variáveis	rs3917464 PON1				p
	CG		GG		
	N	Média ± DP	n	Média ± DP	
Colesterol Total	11	232,64 ± 31,14	468	223,15 ± 48,63	0,3024
LDL-Colesterol	10	158,40 ± 30,43	442	148,38 ± 41,40	0,3004
HDL-Colesterol	10	38,60 ± 5,64	451	37,08 ± 10,36	0,2284
Triglicérides	11	183,91 ± 74,18	469	193,51 ± 115,53	0,7944

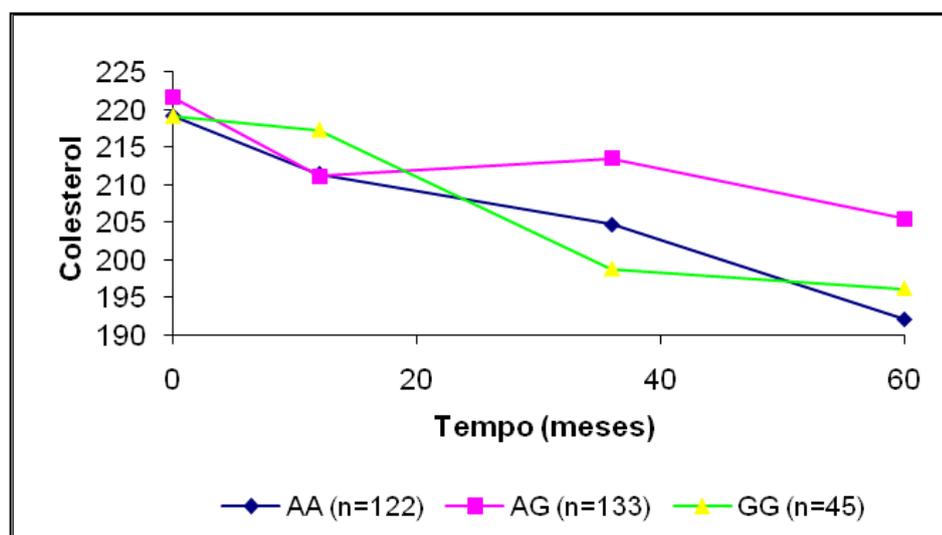
Teste de Kruskal-Wallis

## Anexo G

### Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo R192Q

Tempo (meses)	R192Q					
	AA (n=122)		AG (n=133)		GG (n=45)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	219,11	46,99	221,56	46,38	219,18	47,39
12	211,45	39,06	211,11	41,80	217,36	48,18
36	204,70	38,45	213,53	41,70	198,80	51,25
60	192,17	37,10	205,56	46,75	196,18	39,06

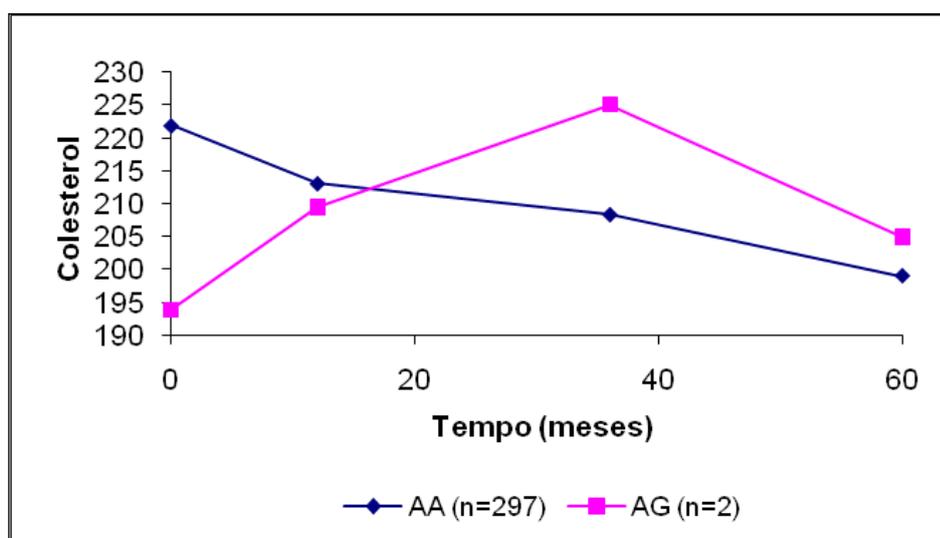
### Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo R192Q



**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo R160G**

Colesterol	R160G			
	AA (n=297)		AG (n=2)	
	Média	DP	Média	DP
Tempo (meses)				
0	221,90	47,18	194,00	43,84
12	213,06	41,51	209,50	16,26
36	208,34	42,33	225,00	7,07
60	199,01	42,19	205,00	66,47

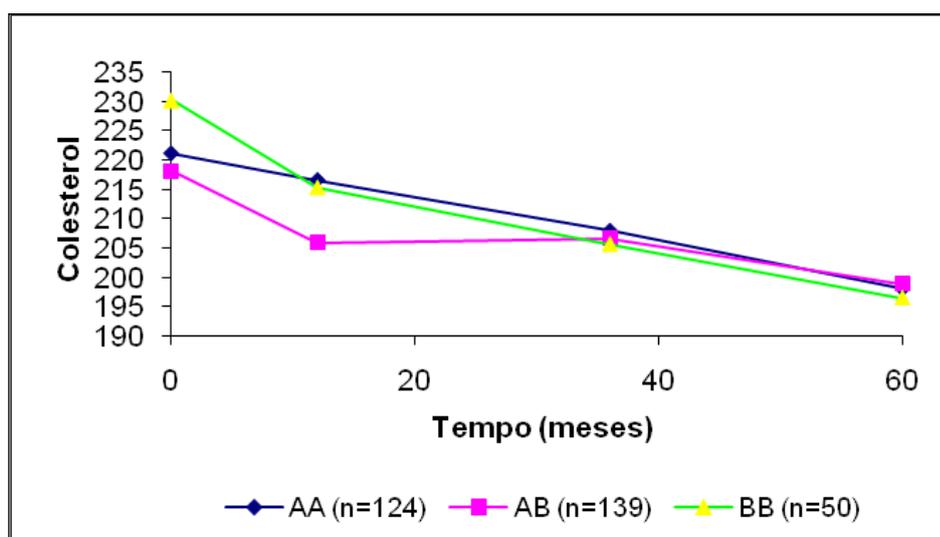
**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo R160G**



**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo Leu55Met**

Tempo (meses)	Leu55Met					
	AA (n=124)		AT (n=139)		TT (n=50)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	221,08	45,98	218,10	45,27	230,22	52,98
12	216,56	40,66	205,96	39,71	215,36	47,42
36	207,98	40,32	206,65	41,92	205,68	48,75
60	198,10	39,02	198,95	44,73	196,52	41,47

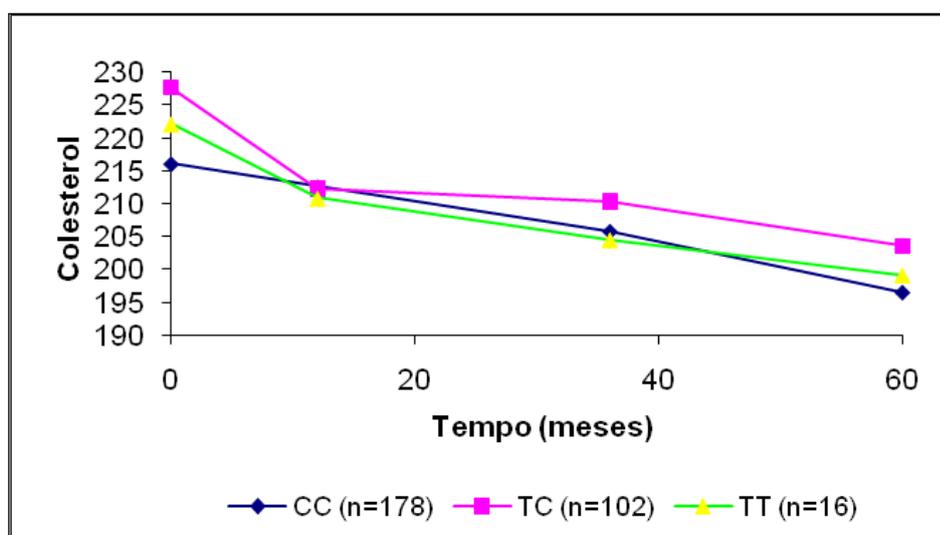
**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo Leu55Met**



**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo Promoter\_161**

Promoter_161						
Colesterol	CC (n=178)		CT (n=102)		TT (n=16)	
Tempo (meses)	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	216,07	44,67	227,62	48,06	222,13	55,97
12	212,57	43,09	212,37	40,80	210,88	31,27
36	205,80	42,27	210,44	41,87	204,56	36,70
60	196,52	39,09	203,69	47,91	199,19	29,94

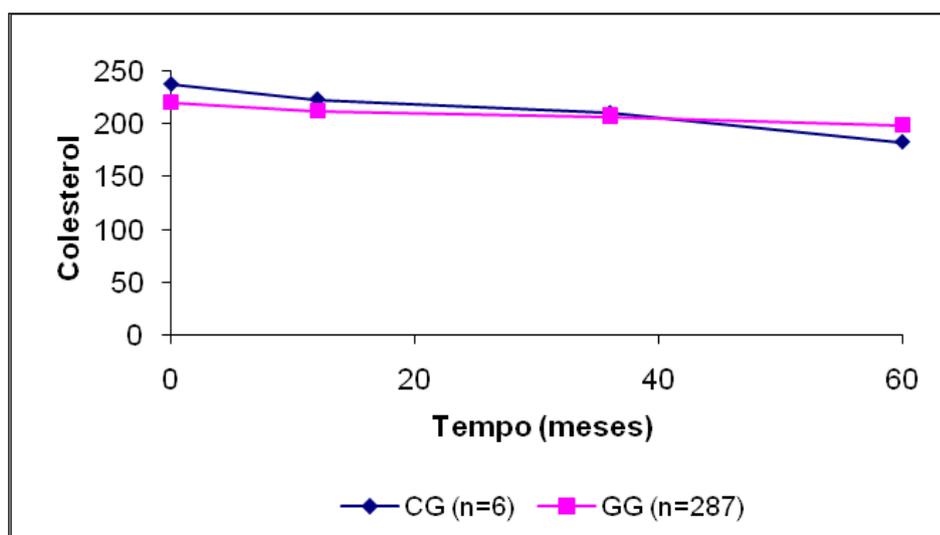
**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo Promoter\_161**



**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo rs3917464**

PON1: rs3917464				
Colesterol	CG (n=6)		GG (n=287)	
Tempo (meses)	Média	DP	Média	DP
0	237,67	33,90	219,74	47,40
12	223,33	39,80	212,24	42,09
36	210,33	12,82	207,42	42,54
60	182,67	43,78	199,01	41,67

**Colesterol total nos tempos: 0, 12, 36 e 60 meses em relação ao polimorfismo rs3917464**



## Anexo H

**Níveis de colesterol nos tempos basal, 1, 3 e 5 anos na análise genotípica de dominância do alelo G e A na posição R192Q**

Tempo	R192Q: alelo G					
	Presente: GG e GA			Ausente: AA		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Basal	122	219,11	46,99	178	220,96	46,51
1 ano	122	211,45	39,06	178	212,69	43,44
3 anos	122	204,70	38,45	178	209,80	44,62
5 anos	122	192,17	37,10	178	203,19	45,01

Tempo	R192Q: alelo A					
	Presente: AA e AG			Ausente: GG		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Basal	45	219,18	47,39	255	220,38	46,60
1 ano	45	217,36	48,18	255	211,27	40,43
3 anos	45	198,80	51,25	255	209,31	40,34
5 anos	45	196,18	39,06	255	199,15	42,85

## Anexo I

### Níveis de colesterol Basal nos tempos basal, 1, 3 e 5 anos na análise genotípica de dominância do alelo T e A:Leu55Met

Tempo	Leu55Met: alelo T					
	Presente			Ausente		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Basal	124	221,08	45,98	189	221,31	47,59
1 ano	124	216,56	40,66	189	208,45	41,96
3 anos	124	207,98	40,32	189	206,39	43,70
5 anos	124	198,10	39,02	189	198,31	43,80

Tempo	Leu55Met: alelo A					
	Presente			Ausente		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Basal	50	230,22	52,98	263	219,51	45,54
1 ano	50	215,36	47,42	263	210,96	40,44
3 anos	50	205,68	48,75	263	207,27	41,10
5 anos	50	196,52	41,47	263	198,55	42,06

## Anexo J

### Níveis de colesterol Basal nos tempos basal, 1, 3 e 5 anos na análise genotípica de dominância do alelo T: Promoter\_161

Tempo	Promoter_161: alelo T					
	Presente			Ausente		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Basal	178	216,07	44,67	118	226,87	48,98
1 ano	178	212,57	43,09	118	212,17	39,53
3 anos	178	205,80	42,27	118	209,64	41,11
5 anos	178	196,52	39,09	118	203,08	45,81

### Níveis de lipídes no tempo basal na análise de dominância do alelo G e A na posição R192Q nos pacientes sem uso de estatina no tempo basal

Lipídeos Basais	R192Q: alelo G					
	Presente			Ausente		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Colesterol total	96	215,69	44,10	140	217,39	44,17
LDL	89	143,87	38,56	132	145,86	37,36
HDL	87	37,01	9,08	136	36,37	9,65
Triglicérides	94	184,27	136,15	141	188,69	112,16

Lipídeos basais	R192Q: alelo A					
	Presente			Ausente		
	N	Média	DP	N	Média	DP
Colesterol Total	33	210,39	41,36	203	217,72	44,49
LDL	30	146,37	36,90	191	144,85	38,00
HDL	31	35,35	9,19	192	36,82	9,46
Triglicérides	33	179,12	108,77	202	188,19	124,29

**Níveis de lipídeos no tempo basal na análise de dominância do alelo T e A:Leu55Met nos pacientes sem uso de estatina no tempo basal**

Lipídeos Basais	Leu55Met: alelo T						p
	Presente			Ausente			
	N	Média	DP	N	Média	DP	
Colesterol Total	98	217,22	42,16	150	218,14	45,79	0,609
LDL	90	144,99	36,36	142	146,91	39,18	0,668
HDL	89	37,24	9,16	144	36,85	9,68	0,763
Triglicérides	97	189,45	140,11	149	182,13	106,17	0,096

Lipídeos Basais	Leu55Met: alelo A						p
	Presente			Ausente			
	N	Média	DP	N	Média	DP	
Colesterol Total	35	226,23	51,81	213	216,39	42,93	0,544
LDL	33	158,12	44,06	199	144,18	36,70	0,355
HDL	34	38,12	11,59	199	36,81	9,07	0,334
Triglicérides	35	166,37	69,42	211	188,11	126,83	0,113

**Níveis de lipídeos no tempo basal na análise de dominância do alelo T: promoter 161 nos pacientes sem uso de estatina no tempo basal**

Lipídeos Basais	Promoter 161: alelo T						p
	Presente			Ausente			
	N	Média	DP	N	Média	DP	
Colesterol Total	140	213,67	44,81	94	223,37	44,77	0,126
LDL	140	153,15	46,73	94	149,18	40,70	0,456
HDL	136	36,94	9,05	85	36,49	9,92	0,796
Triglicérides	142	181,23	108,98	91	197,07	142,12	0,897

## Anexo K

### Análise estratificada por tabagismo para o R192Q

<b>Tabagistas (n=166)</b>							
	Genótipos R192Q						p
	AA		AG		GG		
	n	%	n	%	n	%	
Eventos Combinados	16	29,6%	24	28,2%	11	40,7%	0,461
Nova Intervenção (PCI + RM)	7	13,0%	14	16,5%	8	29,6%	0,166
Nova Revascularização Miocárdio	2	3,7%	9	10,6%	4	14,8%	0,200
Nova Angioplastia	5	9,3%	8	9,4%	5	18,5%	0,374
Infarto Agudo Miocárdio	6	11,1%	8	9,4%	4	14,8%	0,732
Acidente Vascular Cerebral	1	1,9%	4	4,7%	0	0,0%	0,382

<b>Não tabagistas (n=331)</b>							
	Genótipos R192Q						p
	AA		AG		GG		
	n	%	n	%	n	%	
Eventos Combinados	47	32,9%	42	32,1%	18	31,6%	0,981
Nova Intervenção (PCI + RM)	25	17,5%	22	16,8%	12	21,1%	0,774
Nova Revascularização Miocárdio	8	5,6%	11	8,4%	9	15,8%	0,065
Nova Angioplastia	22	15,4%	12	9,2%	6	10,5%	0,266
Infarto Agudo Miocárdio	10	7,0%	7	5,3%	5	8,8%	0,670
Acidente Vascular Cerebral	7	4,9%	2	1,5%	4	7,0%	0,150

Variáveis categóricas estão representadas por n eventos e percentual  
Valores percentuais calculados por genótipos  
Teste estatístico: Qui-quadrado

## Anexo L

## Eventos estratificados por HDL: Promoter\_161

	HDL-c sem risco n=291		p	HDL-c com risco n= 175		p
	CC	CT+TT		CC	CT+TT	
Eventos						
Combinados	47 (28,5)	45 (35,7)	0,189	38 (32,5)	19 (32,8)	0,970
Nova Intervenção (PCI + RM)	27 (16,4)	22 (17,5)	0,804	22 (18,8)	9 (15,5)	0,592
Nova Revascularização						
Miocárdio	12 (7,3)	10 (7,9)	0,832	13 (11,1)	3 (5,2)	0,199
Nova Angioplastia	18 (10,9)	13 (10,3)	0,871	15 (12,8)	8 (13,8)	0,858
Infarto Agudo						
Miocárdio	12 (7,3)	11 (8,7)	0,648	10 (8,5)	4 (6,9)	0,705
Acidente Vascular						
Cerebral	4 (2,4)	6 (4,8)	0,278	3 (2,6)	3 (5,2)	0,372

Variáveis categóricas estão representadas por n eventos (percentual)

Valores percentuais calculados por genótipos

Teste estatístico: Qui-quadrado

## **8 REFERÊNCIAS**

Ajjan RA, Grant PJ. Cardiovascular disease prevention in patients with type 2 diabetes: The role of oral anti-diabetic agents. *Diab Vasc Dis Res.* 2006; 3(3):147-58.

Alexandre CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. *Diabetes.* 2003; 52(5):1210-4.

Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; American Heart Association Stroke Council; Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation.* 2007; 115(22):2878-901.

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18(10):1617-24.

Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses in vitro and in vivo in relation to cardiovascular diseases. *Methods Mol Biol.* 2008; 477:259-76.

Aynacioglu AS, Kepekci Y. The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2000; 74(1):33-7.

Baroni MG, Berni A, Romeo S, Arca M, Tesorio T, Sorropago G, Di Mario U, Galton DJ. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Med Genet.* 2003; 4:8.

Beaglehole R, Magnus P. The search for new risk factors for coronary heart disease: occupational therapy for epidemiologists? *Int J Epidemiol.* 2002; 31(6):1117-22.

Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem.* 1993; 211(3):871-9.

Bourassa MG, Yeh W, Holubkov R, Sopko G, Detre KM. Long-term outcome of patients with incomplete vs complete revascularization after multivessel PTCA. A report from the NHLBI PTCA Registry. *Eur Heart J.* 1998; 19(1):103-11.

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

Chaitman BR, Rosen AD, Williams DO, Bourassa MG, Aguirre FV, Pitt B, Rautaharju PM, Rogers WJ, Sharaf B, Attubato M, Hardison RM, Srivatsa S, Kouchoukos NT, Stocke K, Sopko G, Detre K, Frye R. Myocardial infarction and cardiac mortality in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) randomized trial. *Circulation.* 1997; 96(7):2162-70.

Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Sopko G, Pauly DF, Merz CN, Kamboh MI; WISE Study Group. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(1):13-22.

Clayton D, McKeigue PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet.* 2001; 358(9290):1356-60.

Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 1996; 14(3):334-6.

Dodge HT, Sandler H, Baxley WA, Hawley RR. Usefulness and limitations of radiographic methods for determining left ventricular volume. *Am J Cardiol.* 1966; 18(1):10-24.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(4):473-80.

Freeman AM, Abbott JD, Jacobs AK, Vlachos HA, Selzer F, Laskey WK, Detre KM, Williams DO. Marked improvements in outcomes of contemporary percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus. *J Interv Cardiol.* 2006; 19(6):475-82.

Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis.* 2005; 180(1):55-61

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

Ganesh SKK, Skelding A, Mehta L, O'Neill K, Joo J, Zheng G, Goldstein J, Simari R, Billings E, Geller NL, Holmes D, O'Neill WW, Nabel EG. Rationale and study design of the CardioGene Study: genomics of in-stent restenosis. *Pharmacogenomics.* 2004; 5(7):952-1004.

Gibbons RJ. Noninvasive diagnosis and prognosis assessment in chronic coronary artery disease: stress testing with and without imaging perspective.

*Circ Cardiovasc Imaging*. 2008; 1(3):257-69.

Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence.

*Biochemistry*. 1991; 30(42):10141-9.

Hueb W, Lopes NH, Gersh BJ, Soares P, Machado LA, Jatene FB, Oliveira SA, Ramires JA. Five-year follow-up of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS II): a randomized controlled clinical trial of 3 therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1082-9.

IDF - International Diabetes Federation, 2006. The IDF consensus worldwide definition of the METABOLIC SYNDROME. Disponível em: <[http://www.idf.org/webdata/docs/IDF\\_Meta\\_def\\_final.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf)>. Acesso em 27 out 2009.

Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(11):2441-7.

Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, Hirschhorn JN, Berglund G, Hedblad B, Groop L, Altshuler DM, Newton-Cheh C, Orho-Melander M. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2008; 358(12):1240-9.

King SB 3rd. Five-year follow-up of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS-II): prologue to COURAGE. *Circulation.* 2007; 115(9):1064-6.

Kirklin JW, Frye RL, Blackstone EH, Naftel DC. Some comments on the indications for the coronary artery bypass graft operation. *Int J Cardiol.* 1991; 31(1):23-30.

Kraft P, Yen IC, Stram DO, Morrison J, Gauderman WJ. Exploiting gene-environment interaction to detect genetic associations. *Hum Hered.* 2007; 63(2):111-9.

La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1988; 43(3):227-9.

Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000; 95(5):1517-32

Lawlor DA, Day IN, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, Kiessling M, Timpson N, Smith GD, Ebrahim S. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genet.* 2004; 5:17.

Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med*. 2003; 81(12):766-79.

Lin HF, Boden-Albala B, Juo SH, Park N, Rundek T, Sacco RL. Heritabilities of the metabolic syndrome and its components in the Northern Manhattan Family Study. *Diabetologia*. 2005; 48(10):2006-12.

Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB S, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PW, O'Donnell CJ. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA*. 2004b; 291(18):2204-11.

Lloyd-Jones DM, Wilson PW, Larson MG, Beiser A, Leip EP, D'Agostino RB, Levy D. Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2004a; 94(1):20-4.

Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(9):1451-7.

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*. 1998; 31(3):329-36.

Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(9):1317-23.

Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 1993; 104(1-2):129-35.

Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 1995; 115(2):243-53.

Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Stranieri C, Trabetti E, Pizzolo F, Friso S, Tenuti I, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2004; 34(1):14-20.

Merikangas KR, Low NC, Hardy J. Commentary: understanding sources of complexity in chronic diseases--the importance of integration of genetics and epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2006; 35(3):590-2.

Mitchell BD, C M, Kammerer, Blangero J, Mahaney MC, Rainwater DL, Dyke B, Hixson JE, Henkel RD, Sharp RM, Comuzzie AG, VandeBerg JL, Stern MP, MacCluer JW. Genetic and environmental contributions to cardiovascular risk factors in Mexican Americans. The San Antonio Family Heart Study. *Circulation*. 1996; 94(9):2159-70.

Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA*. 2007; 297(14):1551-61.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Piori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT.. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003a; 108(14):1664-72.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Piori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*. 2003b; 108(15):1772-8.

Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000; 41(9):1495-508.

Osei-Hyiaman D, Hou L, Mengbai F, Zhiyin R, Zhiming Z, Kano K. Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene (Q192R) polymorphism? *Eur J Endocrinol.* 2001; 144(6):639-44.

Pfohl M, Koch M, Enderle MD, Kuhn R, Fullhase J, Karsch KR, Häring HU. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999; 48(3):623-7.

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996; 33(3):498-507.

Ranade K, Kirchgessner TG, Iakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P, Tsuchihashi Z, Sacks FM, Sabatine MS, Braunwald E, White TJ, Shaw PM, Dracopoli NC. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke.* 2005; 36(11):2346-50.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(4):542-7.

Regieli JJ, Jukema JW, Doevendans PA, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Grobbee DE, van der Graaf Y. Paraoxonase variants relate to 10-year risk in coronary artery disease: impact of a high-density lipoprotein-bound antioxidant in secondary prevention. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(14):1238-45.

Ridker PM, Chasman DI, Zee RY, Parker A, Rose L, Cook NR, Buring JE; Women's Genome Health Study Working Group. Rationale, design, and methodology of the Women's Genome Health Study: a genome-wide association study of more than 25,000 initially healthy american women. *Clin Chem.* 2008; 54(2):249-55.

Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Northwick Park Heart Study II. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1639(3):203-12.

Ryan TJ, Bauman WB, Kennedy JW, Kereiakes DJ, King SB 3rd, McCallister BD, Smith SC Jr, Ulliyot DJ. 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.* 1993; 88(6):2987-3007.

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 89(3).

Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(9):2120-6.

Smith SC Jr, Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, Grundy SM, Hiratzka L, Jones D, Krumholz HM, Mosca L, Pearson T, Pfeffer MA, Taubert KA. 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.* 2006; 47(10):2130-9.

Sones FM Jr. Cine-coronary arteriography. *Ohio Med.* 1962; 58:1018-9.

Srinivas VS, Brooks MM, Detre KM, King SB 3rd, Jacobs AK, Johnston J, Williams DO. Contemporary percutaneous coronary intervention versus balloon angioplasty for multivessel coronary artery disease: a comparison of the National Heart, Lung and Blood Institute Dynamic Registry and the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) study. *Circulation.* 2002; 106(13):1627-33.

Unal B, Critchley JA, Capewell S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. *Circulation.* 2004; 109(9):1101-7.

Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(2):216-29.

Wallace HM. A model of gene-gene and gen-environment interactions and its implications for targeting environmental interventions by genotype. *Theor Biol Med Model.* 2007; 3:35.

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

Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J, Hui R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Gu D. Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(2):328-34.

Wang XL, Fan ZJ, Huang JF, Su SY, Zhao JG, Gu DF. Association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese. *Yi Chuan Xue Bao.* 2005; 32(7):675-81.

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

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995; 96(6):2882-91.

Watzinger N, Schmidt H, Schumacher M, Schmidt R, Eber B, Fruhwald FM, Zweiker R, Kostner GM, Klein W. Human paraoxonase 1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community-based study. *Cardiology.* 2002; 98(3):116-22.

WHO - World Health organization. *The global burden of disease: 2004 update*. Suíça: WHO Press, 2008.

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998; 97(18):1837-47.

Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991; 88(6):1785-92.

Yamada Y, Ichihara S, Izawa H, Tanaka M, Yokota M. Genetic risk for coronary artery disease in individuals with or without type 2 diabetes. *Mol Genet Metab*. 2004; 81(4):282-90.

Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet*. 2006; 367(9511):651-8.