



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ceilândia  
Curso de Farmácia**

**Wilcelly Machado da Silva**

**Polimorfismo gênico da enzima óxido nítrico sintase  
endotelial (eNOS) na evolução intra-hospitalar do infarto agudo do  
miocárdio.**

**BRASÍLIA-DF**

**2013**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Machado, Wilcelly Silva

Polimorfismo gênico da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na evolução intra-hospitalar do infarto agudo do miocárdio/ Wilcelly Machado da Silva. – 2013.

23f.

Orientação: Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega.

Monografia (Bacharel em Farmácia) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2013.

1. Genética humana. 2. Hemostasia. 3. Aterosclerose. 4. Reatividade vascular. 5. Infarto Agudo do Miocárdio.



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ceilândia  
Curso de Farmácia**

**Wilcelly Machado da Silva**

**Polimorfismo gênico da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na  
evolução intra-hospitalar do infarto agudo do miocárdio.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado na Faculdade de Ceilândia da  
Universidade Federal de Brasília – UnB,  
como parte dos requisitos necessários  
para obtenção do grau de bacharel em  
Farmácia.

Orientador: Professor Otávio de Tolêdo  
Nóbrega

**BRASÍLIA-DF**

**2013**

**Wilcelly Machado da Silva**

**Polimorfismo gênico da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)  
na evolução intra-hospitalar do infarto agudo do miocárdio.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado na Faculdade de Ceilândia da  
Universidade Federal de Brasília – UnB,  
como parte dos requisitos necessários  
para obtenção do grau de bacharel em  
Farmácia.

APROVADA: 08/07/2013.

**Dedico aos meus Familiares, Amigos e Mestres.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus e a minha família por toda a força e apoio nessa trajetória.

Ao Professor Otávio de Tolêdo Nóbrega, meu orientador, pela generosidade e paciência em compartilhar seu saber e tempo durante todos esses quatro anos; pelos momentos de orientação que foram de muito aprendizado, comprometimento e preocupação, fundamentais para a construção de tudo que já produzimos.

A toda a equipe do projeto pela colaboração e confiança.

A minha tia Virani, por todo o apoio e paciência na minha trajetória acadêmica, por todo carinho em todos os momentos, por sempre ajudar no que for preciso, e cuidar de mim como mãe.

Aos meus amigos, que me apoiaram com todo o carinho e paciência, sempre dispostos a me ouvir e compartilhar os momentos felizes e difíceis.

À Universidade de Brasília que, mesmo diante das dificuldades enfrentadas, não deixou de prestar seu ofício aos seus alunos.

A todos os professores da Faculdade de Ceilândia que colaboraram na minha formação.

## LISTA DE PALAVRAS E ABREVIATURAS

**DCV** – Doença Cardiovascular

**IAM** – Infarto Agudo do Miocárdio

**NO** – Óxido Nítrico

**NOx** – Óxido Nítrico sérico

**eNOS** – Óxido Nítrico sintase endotelial

**nNOS** – Óxido Nítrico sintase neuronal

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

## Resumo

Variações na expressão da enzima óxido nítrico *sintase* endotelial (eNOS) determinadas por polimorfismos em seu gene foram implicadas no risco de recorrência de eventos após o infarto do miocárdio (IM). Neste estudo investigamos a relação entre variantes alélicas da sequência Glu298Asp (ou +894 G/T ou rs1799983) da eNOS e dados clínicos e bioquímicos representativos de risco de recidiva no período pós-infarto.

Pacientes (n=371) admitidos nas primeiras 24h por IAM com supra desnivelamento do segmento ST foram avaliados quanto a aspectos antropométricos, clínicos e bioquímicos à admissão, e quanto à vasodilatação ao 30º dia após o IAM. Medidas plasmáticas de óxido nítrico foram obtidas à admissão e ao 5º dia. Alelos obtidos por amplificação por PCR de segmento contendo o sítio polimórfico, seguido por digestão enzimática.

Portadores do alelo T\_ foram agrupados, apresentaram valores médios dos níveis da fração MB da creatina fosfoquinase (CK-MB) 13,3% mais elevado ( $p = 0,010$ ) e maior reserva arterial no 30º dia pós-IAM, tanto por ensaio de dilatação fluxo-mediada (FMD;  $p=0,037$ ) quanto pelo teste mediado por óxido nítrico (DNM;  $p=0,04$ ). Níveis absolutos de óxido nítrico à admissão e ao 5º dia pós-infarto não diferiram entre genótipos, porém a magnitude de variação entre tempos foi maior para o grupo T ( $p<0,001$ ).

Nossos resultados apontam para uma associação entre a presença do alelo T do SNP rs1799983 da eNOS e maior pico de CK-MB, bem como uma melhor função arterial (dependente e independente do endotélio) no período após o IAM.

**Palavras-chave:** genética humana, hemostasia, aterosclerose, reatividade vascular, infarto agudo do miocárdio.



## Abstract

Variations in the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) determined by polymorphisms in its gene have been implicated in the risk of recurrent events after myocardial infarction (AMI). We investigated the relationship between allelic variants of the sequence *Glu298Asp* (or +894 G / T or rs1799983) eNOS and clinical and biochemical data representative risk of relapse in the post-infarction.

Patients (n = 371) admitted within the first 24 hours for AMI with ST segment elevation were evaluated for aspects anthropometric, clinical and biochemical data on admission and on the vasodilatation to the 30th day after AMI. Measurements of plasma nitric oxide were obtained at admission and at 5<sup>o</sup> day. Alleles obtained by PCR amplification of the segment containing the polymorphic site, followed by enzymatic digestion.

Allele were grouped T<sub>+</sub>, had mean levels of creatine phosphokinase MB fraction (CK-MB) 13.3% higher (p = 0.010) and increased reserves blood at day 30 post-AMI, both flow-dilation test mediated (FMD, p = 0.037) as the test mediated by nitric oxide (MND, p = 0.04). Absolute levels of nitric oxide at admission and at day 5 post-infarction did not differ between genotypes, but the magnitude of variation between days was higher for the group T (p <0.001).

Our results show an association between the presence of the T allele of SNP rs1799983 of eNOS and higher peak CK-MB, as well as better arterial function (dependent and endothelium-independent) in the period following AMI.

Keywords: polymorphism, homeostasis, atherosclerosis, vascular reactivity, acute myocardial infarction.

## Sumário

Introdução .....	1
Objetivo .....	2
Objetivo geral .....	3
Objetivos específicos .....	3
Metodologia.....	3
Amostra.....	3
Avaliação antropométrica, clínica e bioquímica .....	3
Análise do polimorfismo <i>Glu298Asp</i> do Gene da eNOS .....	4
Mensuração do NO/nitrito/nitrato total .....	4
Avaliação da hiperemia reativa .....	5
Análise estatística .....	5
Resultados .....	6
Discussão.....	8
Conclusão .....	10
Referências .....	15
Anexo I .....	17

## Introdução

Conforme as projeções da Organização Mundial de Saúde para as próximas décadas, as doenças cardiovasculares, em especial o infarto agudo do miocárdio (IAM), ampliarão sua liderança mundial como a maior causa de morte<sup>1</sup>. No Brasil, as taxas de mortalidade por DCV apresentam redução, mas permanecem como responsáveis por mais de um terço dos óbitos ocorridos nos últimos anos<sup>2</sup>. Dentro do grande grupo das doenças cardiovasculares, as doenças isquêmicas do coração são as mais incidentes, dentre as quais se destaca o IAM como causa isolada responsável pela maior proporção de mortes por etiologia orgânica em homens e mulheres<sup>3</sup>. Segundo dados obtidos a partir dos Indicadores e Dados Básicos (IDB-Brasil -2010) do portal do Ministério da Saúde, ocorreram 962.931 mortes por doenças cardiovasculares, sendo 95673 óbitos por doenças isquêmicas do coração e 75735 por infarto agudo do miocárdio em indivíduos de ambos os gêneros e com mais de 30 anos no período de 2006<sup>4</sup>.

A incidência de eventos coronarianos agudos aumenta cerca de 12 vezes até o final do primeiro ano após evento primário de IAM (pós-IAM), quando o risco cumulativo se iguala ao dos pacientes com doença coronariana sem eventos<sup>5</sup>. No entanto, as características clínicas e laboratoriais que influenciam esse risco são pouco conhecidas. Em verdade, inexistem coortes prospectivas especificamente dedicadas ao tema, e os conhecimentos existentes são oriundos de registros e de estudos transversais ou caso-controle.

Na última década, houve um aumento de interesse sobre a fisiologia do endotélio vascular enquanto tecido que mantém propriedades antiplaquetárias, vasodilatadoras e ateroprotetoras intrínsecas, sobretudo por meio da liberação de mediadores<sup>6; 7</sup>. Neste contexto, o óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais vasculares constitui mediador-chave na regulação vascular em virtude de seu eminente potencial vasodilatador<sup>8; 9</sup>. Enquanto mediador de vida curta, a disponibilidade do NO periférico é regulado ao nível de sua síntese *de novo* por ação da enzima óxido nítrico *sintase* endotelial (eNOS). Variações de expressão e atividade desta enzima são aspectos considerados candidatos para explicar, ao menos em parte, a fisiopatologia das doenças cardiovasculares<sup>10</sup>.

Estudos em genética populacional tem demonstrado importante associação entre o polimorfismo G894T do gene da eNOS com a ocorrência do IAM<sup>11; 12; 13</sup>, a despeito de evidências em contrário<sup>14</sup>. Esta inconsistência tem sido atribuída a fatores ambientais, alelos independentes, interação entre genes e variabilidades em fenótipos clínicos, o que pode refletir diferenças de morbi-mortalidade entre grupos geneticamente homogêneos, mas com estilos de vida diferentes<sup>15; 16; 17</sup>. Este cenário marcado por heterogeneidade e inconsistência nos resultados produzidos até aqui constitui campo aberto para a condução de novos estudos que busquem, sobretudo, o seguimento prospectivo de pacientes assim como o controle estatístico e experimental de variáveis de controle, sendo esta a motivação para a condução do presente estudo.

## **Objetivo**

### ***Objetivo geral***

O objetivo geral foi investigar a associação das variantes alélicas de eNOS produzidas pela variação Glu298Asp (também denominado +894 G/T ou rs1799983) com o comportamento de variáveis clínicas e bioquímicas representativas de risco de recidiva no período pós-infarto.

### ***Objetivos específicos***

Avaliação da associação entre as variáveis independentes supracitadas com o comportamento das seguintes avaliações e eventos clínicos:

- Comportamento das principais variáveis bioquímicas (hemoglobina glicada, insulina, glicemia, peptídeo C, colesterol total, triglicérides, proteína C reativa de alta sensibilidade, uréia e creatinina) na fase aguda do IAM.
- Avaliação médica da evolução clínica e avaliação funcional da reatividade vascular do endotélio nos pacientes após 1 mês de seguimento.

## **Metodologia**

### ***Amostra***

Amostra composta por participantes da Coorte Brasília, na qual casos consecutivos de pacientes com IAM atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), admitidos desde maio de 2005, foram acompanhados por período mínimo de 1 mês por equipe multidisciplinar. Para este estudo, foram considerados critérios de inclusão: (i) menos de 24 horas desde o início dos sintomas de IAM, (ii) supra desnivelamento do segmento ST de pelo menos 1 mm (plano frontal) ou 2 mm (plano horizontal) em duas derivações contíguas, (iii) comprovação de necrose miocárdica pela elevação da CK-MB e troponina, e (iv) ausência de incompetência cognitiva que impossibilite a resposta verbal aos questionários médico. A razão da escolha desse tipo de IAM foi relacionada à acuidade diagnóstica para a inclusão de pacientes em circunstância compatível com o quadro agudo do infarto miocárdico.

O projeto ao qual o estudo fez parte foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal, sob o Ofício nº 82/2006. O componente genômico a que esta proposta se destina encontra-se amparada por ofício adicional, concedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal, sob o nº 354/2011. Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

### ***Avaliação antropométrica, clínica e bioquímica***

Nas primeiras 24 horas após início do IAM, foi aferido índice de massa corporal (IMC; em kg/m<sup>2</sup>) e circunferência abdominal (cm) além da história pregressa de diabetes, hipertensão, sedentarismo, tabagismo, IAM prévio e histórico familiar de doença coronariana. Foi definido como sedentarismo a prática de atividades físicas por menos de 30 minutos em 4 dias da semana, enquanto tabagismo consistiu no consumo declarado de > 100 cigarros ao longo da vida. Na mesma ocasião foram feitas coletas de sangue para dosagens específicas: hemoglobina glicada, glicemia, triglicérides, HDL colesterol, LDL-colesterol, creatinina e fração MB da creatina quinase. No quinto dia pós-IAM foi realizada nova coleta e as dosagens específicas consistiram basicamente no perfil lipêmico (glicemia, triglicérides, HDL colesterol e

LDL-colesterol). As amostras foram encaminhadas a laboratório privado de análises clínicas certificado pelo Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica onde foram realizadas todas as análises bioquímicas.

Também quinto dia pós-IAM foi realizada avaliação médica da evolução intra-hospitalar pelo estadiamento clínico de cada paciente conforme classificação de Killip e avaliação das medicações utilizadas no período. Caso o paciente evoluísse a óbito no período de 30 dias a partir do evento infarto, seus dados seriam excluídos da base de dados para esta análise.

### ***Análise do polimorfismo Glu298Asp do Gene da eNOS***

Para a extração do DNA foram utilizadas amostras de creme leucocitário obtido e estocadas no ato da coleta. A técnica é padronizada e segue o protocolo descrito no manual do Kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brasil). A verificação do material obtido com a extração foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,6%.

A amplificação do gene da eNOS (rs1799983) foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase seguida de restrição enzimática específica (PCR-RFLP) baseado em protocolo desenvolvido originalmente<sup>18</sup> e adaptado para este estudo, utilizado os primers: sense (eNOS-F1: 5'AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA3') e antisense (eNOS-R1: 5'CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA3'). Cada reação de PCR (25 µl) foi composta por 100 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8), KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 mg / ml de ovalbumina e 0,5U de Taq polimerase (Phoneutria, Minas Gerais, Brasil). Após 1 min de arranque a quente a 80 ° C, o programa de amplificação foi composto por um passo de desnaturação inicial a 96 ° C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de: desnaturação a 96 ° C durante 30 segundos; anelamento a 56 ° C durante 1 minuto, extensão a 72 ° C durante 1 minuto; e uma etapa de extensão final a 72 ° C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,6% para verificar a amplificação dos produtos e esgotamento dos primers, constatada pela presença da banda de 248 pares de base (pb). As digestões enzimáticas dos produtos amplificados foram realizadas a 37 ° C overnight, em um volume total de 15 µL, utilizando 0,5 U da endonuclease de restrição Mbol (Jena

Bioscience, Alemanha). Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,2% e identificados, sob um padrão de peso molecular de DNA. O alelo T gera dois fragmentos, de 190pb e 58pb, pois há na posição 894 da cadeia nucleotídica uma timina e o alelo G gera um fragmento de 248pb, pois há na mesma posição uma guanina, não havendo, portanto digestão pela endonuclease de restrição. Os indivíduos foram assim classificados de acordo com o genótipo em: G/G, T/G, T/T.

### ***Mensuração do NO/nitrito/nitrato total***

Para quantificação dos níveis séricos totais do mediador óxido nítrico (NO<sub>x</sub>), foi empregado do ensaio enzimático de conversão do nitrato em nitrito (NO<sup>-2</sup>) por ação da nitrato *redutase*, seguida de detecção colorimétrica pela reação de diazotização de Griess, realizado conforme instruções de conjunto específico (R&D Systems Inc, MN, USA). As leituras das reações colorimétricas foram realizadas em aparelho Biotek ELX 800 (DeMorellis, SP, Brasil) em comprimento de onda de 540nm.

### ***Avaliação da hiperemia reativa***

A avaliação funcional da reatividade vascular do endotélio foi estudada no trigésimo dia pós-IAM, seguindo o protocolo descrito por Correti e cols.<sup>19</sup>, realizada sempre pelo mesmo avaliador com experiência em ultrassonografia vascular. Os pacientes foram solicitados a não fazer uso nas 24h anteriores ao exame de substâncias estimulantes, álcool, vitamina C; não praticarem exercício; e as mulheres realizarem o exame fora do período menstrual.

A medida da dilatação fluxo-mediada (DFM) foi obtida com os pacientes na posição supina. Um manguito pneumático foi colocado 5 cm acima da fossa cubital. Utilizando Eco-Doppler bidimensional de alta resolução (modelo IE33; Bothel, WA, EUA) equipado com transdutor vascular linear, de alta frequência e *software* para imagem e monitorização eletrocardiográfica onde se obteve: a medida do diâmetro longitudinal da artéria braquial em condições basais, seguido pela oclusão da artéria durante 5 minutos quando da insuflação do manguito em 50 mmHg acima da PAS, e medida do diâmetro arterial após 45 a 60 segundos da liberação da oclusão. As análises foram realizadas *off-line*, procedendo-se a mensuração do diâmetro da

artéria braquial, no final da diástole (no pico da onda R do eletrocardiograma). A análise foi realizada em vários pontos ao longo do vaso, com o auxílio de sistemas de computador específicos para mensuração de imagens ecográficas. Após 10 minutos de repouso e o restabelecimento das condições basais, foram registradas novas medidas antes e 5 minutos após a administração oral de dinitrato de isorsobida 5 mg, com intuito de avaliar a vasodilatação independente do endotélio vascular e portanto para verificar a integridade do sistema da muscular dos vasos avaliados. Foram obtidas 3 medidas na fase basal (em repouso, antes da interrupção do fluxo) e 3 medidas durante a hiperemia reativa, sendo tomada a média de cada momento e expressa a dilatação final pela divisão da subtração do diâmetrofinal pelo diâmetro inicial sobre o diâmetro inicial , expressos em porcentagem.

### ***Análise estatística***

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado por meio do teste exato de Fisher. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição normal dos dados de variáveis contínuas. Os dados foram apresentados como médias±desvio padrão (DP) ou frequências relativas (%). Modelos de regressão linear geral ou o teste t de Student foram usados para comparar valores médios das variáveis contínuas entre grupos genotípicos. Associação de genótipos com variáveis categóricas foi investigada pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Quando necessário, diferenças fenotípicas entre genótipos foram testadas para a influência de fatores de confusão (idade e IMC) por análise de covariância. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows (versão 10.0). Foi adotado como limiar de significância  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Dados referentes a 371 pacientes admitidos entre 2005 e 2012 foram analisados quanto à progressão clínica do quadro pós-infarto, com exames realizados tanto à admissão quanto ao 5º e 30º dias após ocorrência do evento. As frequências dos alelos de eNOS foram consistentes com o equilíbrio de Hardy-



Weinberg ( $p > 0,05$ ) nesta amostra. Para fins de análise, portadores do genótipo minoritário TT ( $n = 34$ ) foram agrupados aos indivíduos heterozigotos, contabilizando frequência de 50,6% para os portadores do alelo T. A Tabela 1 demonstra as características antropométricas e histórico clínico e familiar conforme os grupos genótipos confirmados. Como esperado, os pacientes apresentavam elevada prevalência de fatores predisponentes ao IAM, com elevada prevalência de histórico clínico de dislipidemia (>35%), de hipertensão arterial sistêmica (>60%), e de tabagismo (>37%), entre outros fatores. Cabe ressaltar que não houve prevalência diferencial destes fatores de risco entre os genótipos de eNOS.

Tabela 1. Características antropométricas, clínicas, hemodinâmicas e bioquímicas.

	eNOSrs179983		<i>P</i>
	GG	GT +TT	
N	183	188	
Idade, anos	62±11	62±11	0,99
Homens, %	76	75	0,80
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	27,0±4	26,8±4	0,64
Circunferência da cintura, cm	95,4±11	95,9±12	0,71
Diabéticos ou Hb1Ac>7, %	32	34	0,72
HbA1c, %	6,58±1,6	6,72±2,1	0,53
Hipertensos, %	64	59	0,30
IAM prévio, %	10	11	0,75
Histórico familiar de DAC, %	39	41	0,52
Dislipidêmicos, %	36	34	0,64
Sedentários, %	57	57	1,00
Fumantes, %	38	37	0,81
Glicemia no 5 <sup>o</sup> dia, mg/dL	126 ± 50	129 ± 55	0,58

\*  $p$  determinado por qui-quadrado para dados categóricos, por ANCOVA ajustado para sexo e idade para variáveis paramétricas e teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição normal de dados de variáveis contínuas. Os dados expressos como médias±desvio padrão para variáveis paramétricas e ou frequências relativas para não paramétricas. Hb1Ac: hemoglobina glicada.

Quanto às variáveis bioquímicas e clínicas representativas para IAM e seu curso, demonstrados na Tabela 2, houve diferença significativa entre níveis da fração MB da creatina fosfoquinase (CK-MB), onde portadores do alelo T apresentaram valores médios 13,3% mais elevados ( $p = 0,010$ ). No entanto, outros

marcadores associados ao IAM não mostraram diferir entre os grupos genotípicos, a exemplos dos escores de classificação de Killip-Kimbal e de massa infartada.

Tabela 2. Características clínicas, hemodinâmicas e bioquímicas na admissão e no 5º dia pós-IAM.

	eNOS rs1799983		P
	GG	GT +TT	
N	183	188	
Killip-Kimbal classe I, %	92	88	0,50
Pressão Sistólica, mmHg	137±31	137±27	0,83
Pressão Diastólica, mmHg	85,0±19,0	87,0±17,0	0,33
GFR, mL.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	70,4±23,0	70,4±25,0	0,99
Pico de CK-MB	180(87;298)	204(117;427)	0,01
Massa Infartada (C-NMR), g	12,8(9;20)	13,0(10;21)	0,72
Trombólise ou PCIprimária %	77	81	0,36
Uso de Beta-bloqueador, %	66	65	0,80
Uso de Sinvastatina, %	68	65	0,56
Sinvastatina dose, mg/dia	26±25	27±27	0,69
LDL-C na admissão, mg/dL	121 ± 48	125 ± 43	0,45
LDL-C no 5º dia, mg/dL	101 ± 39	93 ± 34	0,08
HDL-C na admissão, mg/dL	38,2 ± 11	38,1 ± 11	0,95
HDL-C at 5º day, mg/dL	35,2 ± 11	33,7 ± 9	0,17
Triglicerídeos na admissão, mg/dL	165 ± 120	154 ± 108	0,37
Triglicerídeos no 5º dia, mg/dL	166 ± 90	146 ± 61	0,09
Glicemia na admissão, mg/dL	146 ± 71	147 ± 69	0,90
Glicemia no 5º dia, mg/dL	126 ± 50	129 ± 55	0,58

\* p determinado por qui-quadrado para dados categóricos, por ANCOVA ajustado para sexo e idade para variáveis paramétricas e teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição normal de dados de variáveis contínuas. Os dados expressos como médias±desvio padrão para variáveis paramétricas e ou frequências relativas para não paramétricas. GFR: taxa de filtração glomerular determinada pela formula MDRD, CK-MB: fração MB da creatina fosfoquinase, C-NMR: ressonância nuclear magnética cardíaca; PCI: intervenção coronariana percutânea, LDL: lipoproteína de baixa densidade, HDL: lipoproteína de alta densidade.

Ademais, observou-se que, após 30 dias decorridos do IAM, a reserva arterial se mostrou maior entre portadores do alelo T, tanto por ensaio dilatação fluxo-mediada (DFM; p=0, 037) quanto pelo teste mediado por óxido nítrico (DNM; p=0,04). Níveis absolutos de óxido nítrico à admissão e ao 5º dia pós-infarto não diferiram entre genótipos, porém a magnitude de variação entre tempos foi maior para o grupo T\_ (p<0,001) (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da vasodilatação fluxo-mediada (DFM) e nitrato-mediada (DNM) 30 dias pós-IAM e medida de óxido nítrico sérico (NOx) na admissão e no 5º dia pós-IAM, de acordo com os genótipos da eNOS.

	eNOS		P
	GG	GT + TT	
Vasodilatação fluxo-mediada, mm	7,2 ± 4,6	7,6 ± 5,9	0,037
Vasodilatação nitrato-mediada, mm	18,9 ± 9	19,5 ± 11	0,040
NOx,			
Admissão	19,8 ± 9	19,1 ± 8	0,55
5ºDia	25,7 ± 13	25,5 ± 13	0,99
Delta	4,23(-5,4; 12)	4,93(0,4;15)	<0, 001

\* p determinado por ANCOVA, ajustado para sexo e idade; Dados expressos como média ± DP para variáveis paramétricas e expressos como mediana (intervalo interquartil) para variáveis não paramétricas.

## Discussão

Buscamos neste trabalho investigar a associação das variantes alélicas de eNOS, produzidas pela variação Glu298Asp, com o comportamento de variáveis clínicas e bioquímicas representativas no período do pós-infarto. Nossos resultados apontaram associação do alelo T da eNOS com uma importante variável bioquímica representativa deste risco, a CK-MB. Contrainstintivamente, o alelo T aparenta ter proporcionado melhor função arterial tardia em pacientes pós-IAM.

O IAM reflete a morte celular secundária à isquemia miocárdica decorrente do desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio no tecido. Em linha, a necrose miocárdica é acompanhada pela liberação de macromoléculas intracelulares e proteínas estruturais no interstício cardíaco. Neste sentido, a elevação sérica da CK-MB constitui um dos componentes bioquímicos de melhor relação custo-benefício para o diagnóstico do IAM em estágio inicial<sup>20</sup>. Níveis de CK-MB são sugestivos da intensidade do infarto, apesar de não ser possível estabelecer uma relação direta

entre sua medida quantitativa e a dimensão da necrose<sup>21; 22</sup>, o que a princípio pode justificar a não associação encontrada entre genótipos e a massa cardíaca infartada. Por se saber que níveis de CK-MB no pós-IAM podem sofrer efeito dos procedimentos clínicos associados ao quadro tais como reperfusão, uso de medicamentos e do perfil bioquímico/metabólico<sup>23; 24</sup>, os autores acreditam que os resultados apresentados em nosso estudo refletem uma associação genuína entre genótipo de eNOS e a intensidade do IAM, haja vista tais variáveis interferentes se mostrarem homogêneas entre os indivíduos<sup>25; 26</sup>.

No pós-IAM, tanto a anatomia quanto a histologia cardíacas sofrem processos de remodelação que incluem hipertrofia, fibrose e apoptose teciduais, assim como aumento da massa e volume das câmaras cardíacas, com ênfase para a mudança na forma do ventrículo esquerdo (VE), proporcionais à extensão do IAM<sup>27</sup>. Estudos com modelo *in vivo* sugerem que a elevação da biossíntese do NOx produzido pela eNOS reduz os efeitos deste processo<sup>28</sup>. Nossos resultados apontaram para uma associação entre o alelo T e uma melhor função arterial, visto que portadores deste alelo apresentaram melhores respostas vasodilatadoras por ensaios de DFM e DNM no período pós-infarto, o que poderia estar relacionado com comportamento mais benéfico diante do processo de remodelação cardíaca. Estudos anteriores já associaram o alelo T com melhor elasticidade arterial<sup>29</sup>. Ademais, modelos experimentais demonstraram que a ausência da expressão das isoformas nNOS e eNOS<sup>30</sup> e em animais infartados resultou em aumento da mortalidade e redução do desempenho cardíaco após IAM, por impedimento da expressão de NOx<sup>31</sup>. Nestes termos, NOx tem demonstrado contribuir para o processo de remodelação diminuindo seu efeitos da hipertrofia e fibrose<sup>32; 33</sup>, e a maior expressão da eNOS protegendo contra um remodelamento patológico<sup>32</sup>. A associação encontrada em nosso estudo por estar relacionada com um melhor desempenho do alelo T frente aos mecanismos que envolvem o NO e suas isoformas no processo de remodelação cardíaca no pós-infarto contribuindo pra a melhor função arterial observada nos portadores deste alelo.

## Conclusão

Nossos resultados apontam para uma associação entre a presença do alelo T do SNP rs1799983 da eNOS e maior pico de CK-MB, bem como uma melhor função arterial (dependente e independente do endotélio) no período após o IAM.

## Limitações

Não foram analisadas as possíveis interferências da dieta nutricional, bem como a contribuição das estatinas na função endotelial. Também não foram consideradas e exploradas possíveis influências de determinantes socioculturais.

## Referências

- <sup>1</sup> Organization. WH: The world health report 2012. Disponível em: <Http://www.Who.Int/whr>. Acesso em 24 de setembro de 2012.
- <sup>2</sup> MENDES, M. J. F. D. L. et al. Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, p. s49-s54, 2006. ISSN 1519-3829. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-38292006000500007&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292006000500007&nrm=iso) >.
- <sup>3</sup> BAENA, C. P. et al. Tendência de mortalidade por infarto agudo do miocárdio em Curitiba (PR) no período de 1998 a 2009. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, p. 211-217, 2012. ISSN 0066-782X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2012000300003&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2012000300003&nrm=iso) >.
- <sup>4</sup> SAÚDE, M. D. **Sistema de informação sobre mortalidade (sim)**. [http://www.tabnet.datasus.gov.br/tabela/sim/dados/cid10\\_indicehtmDATASUS](http://www.tabnet.datasus.gov.br/tabela/sim/dados/cid10_indicehtmDATASUS).
- <sup>5</sup> SOARES, J. D. S. et al. Tratamento de uma coorte de pacientes com infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST. **Arquivos Brasileiros de**

**Cardiologia**, v. 92, p. 464-471, 2009. ISSN 0066-782X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2009000600009&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2009000600009&nrm=iso) >.

<sup>6</sup> BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 2, p. 168-75, Feb 1 2003. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588755> >.

<sup>7</sup> STRIJDOM, H.; CHAMANE, N.; LOCHNER, A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. **Cardiovasc J Afr**, v. 20, n. 5, p. 303-10, Sep-Oct 2009. ISSN 1995-1892 (Print) 1015-9657 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19907806> >.

<sup>8</sup> SCHULZ, E. et al. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 6, p. 1115-26, Jun 2008. ISSN 1523-0864 (Print) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321209> >.

<sup>9</sup> OTANI, H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 8, p. 1913-28, Aug 2009. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203224> >.

<sup>10</sup> DIETZ, N. M. et al. Evidence for nitric oxide-mediated sympathetic forearm vasodilatation in humans. **J Physiol**, v. 498 ( Pt 2), p. 531-40, Jan 15 1997. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032700> >.

<sup>11</sup> ANTONIADES, C. et al. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 46, n. 6, p. 1101-9, Sep 20 2005. ISSN 1558-3597 (Electronic) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16168297> >.

- <sup>12</sup> LI, Y. Y. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis involving 11,248 subjects. **Intern Med**, v. 50, n. 19, p. 2099-106, 2011. ISSN 1349-7235 (Electronic) 0918-2918 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963726> >.
- <sup>13</sup> GAD, M. Z. et al. Endothelial nitric oxide synthase (G894T) gene polymorphism in a random sample of the Egyptian population: comparison with myocardial infarction patients. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 16, n. 7, p. 695-700, Jul 2012. ISSN 1945-0257 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22731641> >.
- <sup>14</sup> ANDRIKOPOULOS, G. K. et al. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. **BMC Med Genet**, v. 9, p. 43, 2008. ISSN 1471-2350 (Electronic) 1471-2350 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495009> >.
- <sup>15</sup> DIAS, R. G. et al. Glu298Asp eNOS gene polymorphism causes attenuation in nonexercising muscle vasodilatation. **Physiol Genomics**, v. 37, n. 2, p. 99-107, Apr 10 2009. ISSN 1531-2267 (Electronic) 1094-8341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158254> >.
- <sup>16</sup> DIPPLE, K. M.; MCCABE, E. R. Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. **Am J Hum Genet**, v. 66, n. 6, p. 1729-35, Jun 2000. ISSN 0002-9297 (Print) 0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793008> >.
- <sup>17</sup> WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Mol Genet Metab**, v. 70, n. 4, p. 241-51, Aug 2000. ISSN 1096-7192 (Print) 1096-7192 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993711> >.
- <sup>18</sup> PULKKINEN, A. et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with

coronary heart disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 78, n. 7, p. 372-9, 2000. ISSN 0946-2716 (Print) 0946-2716.

- <sup>19</sup> CORRETTI, M. C. et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, n. 2, p. 257-65, Jan 16 2002. ISSN 0735-1097 (Print) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788217> >.
- <sup>20</sup> BONACA, M. P. et al. American College of Cardiology/American Heart Association/European Society of Cardiology/World Heart Federation universal definition of myocardial infarction classification system and the risk of cardiovascular death: observations from the TRITON-TIMI 38 trial (Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition With Prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction 38). **Circulation**, v. 125, n. 4, p. 577-83, Jan 31 2012. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22199016> >.
- <sup>21</sup> GRANDE, P.; CHRISTIANSEN, C.; ALSTRUP, K. Comparison of ASAT, CK, CK-MB, and LD for the estimation of acute myocardial infarct size in man. **Clin Chim Acta**, v. 128, n. 2-3, p. 329-35, Mar 14 1983. ISSN 0009-8981 (Print) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6851141> >.
- <sup>22</sup> NORDLANDER, R.; NYQUIST, O.; SYLVEN, C. Estimation of infarct size by creatine kinase. A comparison between maximal value, planimetry and computer calculation. **Cardiology**, v. 68, n. 4, p. 201-5, 1981. ISSN 0008-6312 (Print) 0008-6312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7326667> >.
- <sup>23</sup> LADEIRA, R. T. et al. Unrecognized diabetes and myocardial necrosis: predictors of hyperglycemia in myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol**, v. 100, n. 5, p. 404-411, May 2013. ISSN 1678-4170 (Electronic) 0066-782X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598457> >.



- 24 MA, Y. et al. Analysis of factors related to short-term prognosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. **Exp Ther Med**, v. 5, n. 4, p. 1206-1210, Apr 2013. ISSN 1792-0981 (Print) 1792-0981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596491> >.
- 25 DISSMANN, R.; LINDERER, T.; SCHRODER, R. Estimation of enzymatic infarct size: direct comparison of the marker enzymes creatine kinase and alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase. **Am Heart J**, v. 135, n. 1, p. 1-9, Jan 1998. ISSN 0002-8703 (Print) 0002-8703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453514> >.
- 26 HORIE, M. et al. A new approach for the enzymatic estimation of infarct size: serum peak creatine kinase and time to peak creatine kinase activity. **Am J Cardiol**, v. 57, n. 1, p. 76-81, Jan 1 1986. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3942080> >.
- 27 SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 215-62, Jan 1999. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922372> >.
- 28 SMITH, R. S., JR. et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. **Life Sci**, v. 76, n. 21, p. 2457-71, Apr 8 2005. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763077> >.
- 29 CHEN, W. et al. Nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) influences arterial stiffness in adults: The Bogalusa Heart Study. **Am J Hypertens**, v. 17, n. 7, p. 553-9, Jul 2004. ISSN 0895-7061 (Print) 0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233973> >.
- 30 LIU, Y. et al. Nitric oxide synthase-3 deficiency results in hypoplastic coronary arteries and postnatal myocardial infarction. **Eur Heart J**, Oct 9 2012. ISSN 1522-

9645 (Electronic) 0195-668X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23048191> >.

<sup>31</sup> SARAIVA, R. M. et al. Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. **Circulation**, v. 112, n. 22, p. 3415-22, Nov 29 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301341> >.

<sup>32</sup> PASSERI, J.; BLOCH, K. D. Nitric oxide and cardiac remodeling. **Heart Fail Clin**, v. 1, n. 2, p. 275-86, Jul 2005. ISSN 1551-7136 (Print) 1551-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386852> >.

<sup>33</sup> ZIOLO, M. T.; KOHR, M. J.; WANG, H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, n. 5, p. 625-32, Nov 2008. ISSN 1095-8584 (Electronic) 0022-2828 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722380> >.

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário (a), da pesquisa sobre infarto do miocárdio no Distrito Federal. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, você tem a opção de aceitar ou não fazer parte do estudo. Caso opte por participar, assine o documento de consentimento em duas vias. Uma delas é sua e outra é do pesquisador responsável.

Compreenderemos a aceitaremos a sua recusa e tal decisão não acarretará em prejuízo no tratamento e atendimento.

Em caso de dúvidas você pode procurar o pesquisador Dr. Quinágua, pelo telefone: 9981.8585 ou 3325.4443.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título de projeto: REGISTRO DE SÍNDROMES CORONÁRIAS AGUDAS NO DF.

Pesquisador responsável: Dr. José Carlos Quinágua e Silva.

HRT- Dr. Ricardo Alvarenga

INCOR-DF- Dr. Luciano Vacanti.

HBDF- Dr. José Carlos Quinágua e Silva.

Co-pesquisadores: 1- Daniel Batista Munhóz

2 -Antonio Carlos Tanajura de Macedo.

3 -Tiago Nóbrega Morato

4 -Augusto Gurgel Faria Araujo

#### Descrições da pesquisa:

A pesquisa a ser realizada procura conhecer a prevalência de infarto agudo do miocárdio no DF nos hospitais de Base de Brasília, Hospital Regional de Taguatinga e no Instituto do Coração do Distrito Federal. Os resultados das pesquisas poderão fornecer subsídios para uma política de saúde mais direcionada à prevenção, buscando melhorar a qualidade de vida da população.

#### Observações importantes:

Serão feitas várias perguntas sobre suas doenças anteriores, tratamento que vinha sendo feito e outras sobre seu estado psicológico e nutricional com duração de mais ou menos quarenta minutos.

Será colhido sangue para exames e uma parte desse material será armazenado para outras possíveis pesquisas. Em acontecendo novas pesquisas elas serão planejadas e só serão realizadas com o seu consentimento por escrito, bem como do Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF e do INCOR/DF.

Na coleta do sangue o Sr. (a) sentirá uma picada da agulha em uma das veias da parte interna do braço, como são feitas as demais coletas, onde poderá ficar pequeno hematoma.

A pesquisa não testará nenhuma medicação nova e não envolverá riscos à saúde, integridade física ou moral do paciente que será sujeito à pesquisa. O pesquisador não receberá nenhuma remuneração por este trabalho, sendo que qualquer encargo financeiro da pesquisa estará sob sua responsabilidade. As Instituições e o paciente estão livres de qualquer ônus financeiro. A coleta de dados deverá ser autorizada e os resultados obtidos, com os dados coletados, poderão ser comunicados aos interessados, caso assim o desejarem. Os dados da pesquisa serão posteriormente apresentados em eventos científicos e publicados em revistas científicas, sem que sejam divulgados dados de quaisquer paciente.

Nome e Assinatura do pesquisador(a):

Nome e Assinatura do pesquisado(a):

Em caso de paciente analfabeto será necessário assinatura de uma testemunha:

Local e Data: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: (61) 3325-4955.