Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Romulo Vianna de Melo Oliveira

Estudo de polimorfismo do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca

Rio de Janeiro

2016

Romulo Vianna de Melo Oliveira

Estudo de polimorfismo do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Profª. Drª. Dayse Aparecida da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Romulo Vianna de Melo.

Estudo de polimorfismo do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca. – 2016.
98 f.

Orientadores: Profª. Drª. Dayse Aparecida da Silva.
Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Insuficiência cardíaca – Teses. 2. Polimorfismo genético – Teses. 3. Hereditariedade – Teses. 4. Óxido nítrico – Teses. 5. Marcadores genéticos. 6. Grupo com ancestrais do continente africano. 7. Grupo com ancestrais do continente europeu. I. Silva, Dayse Aparecida da. II. Carvalho, Elizeu Fagundes de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12-008

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Romulo Vianna de Melo Oliveira

Estudo de polimorfismo do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2016

Orientadores:

Profª. Drª. Dayse Aparecida da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho (Coorientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Profª. Drª. Maria Leonor Botelho de Gusmão
Programa de Pós-Graduação em Biologia – UERJ

_____

Profª. Drª. Carmen Lucia Antão Paiva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Ricardo Mourilhe Rocha
Pós-Graduação em Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro
2016

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dayse, por todo o apoio e ensinamento passado ao longo de boa parte da minha vida acadêmica.

Ao meu coorientador Elizeu, pela confiança e oportunidade depositadas durante a graduação e mestrado.

A todos os meus companheiros de LDD pelos momentos vividos juntos durante todos esses anos. Em especial as companheiras de pós-graduação e ciência ao meio-dia: Jannuzzi, Anna, Ju e Filipa que sempre invejaram minha marmita.

Aos meus pais e irmã Romildo, Leila e Sarah que mesmo morando longe não deixaram de estar presente no meu dia-a-dia.

Aos meus familiares e amigos pela presença constante e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Além do orgulho que a maioria tem ao falar sobre mim e de como é ter um filho/sobrinho/primo/neto biólogo e futuro mestre em Biociências.

E um agradecimento futuro aos que lerão essa dissertação de mestrado, seja para usar como referência em técnicas ou resultados, ou até mesmo para apreciar o trabalho de um velho conhecido.

RESUMO

VIANNA, R. *Estudo de polimorfismo do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca*. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa que se caracteriza por anormalidades no ventrículo esquerdo, resultando em menor ejeção de sangue para os vasos sanguíneos. Mesmo com o avanço da terapêutica, a IC continua sendo uma das maiores causas de mortalidade, internação hospitalar e limitação funcional no Brasil e no mundo. Diferentes estudos apontam para uma associação entre o polimorfismo G894T, localizado no gene responsável por codificar a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e o desenvolvimento de IC, em certas populações. Porém, as frequências dos alelos e dos genótipos para o polimorfismo G894T são bem variadas de acordo com as populações estudadas, e a associação do G894T com a IC só foi encontrada em populações bem definidas como europeia e afro-americana. Com base nisso, justifica-se a investigação numa população miscigenada como a brasileira, usando como ferramenta os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) em cada indivíduo do estudo para diminuir os efeitos de estruturação populacional recorrentes em estudos envolvendo a população brasileira, por fim, evitando uma associação espúria. Os objetivos deste estudo foram determinar as distribuições das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo G894T da eNOS em amostras de pacientes e de indivíduos saudáveis, considerando ancestralidade, e investigar uma possível associação deste polimorfismo à IC. O estudo incluiu 210 indivíduos pertencentes à coorte do estudo de pacientes com IC do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ e 106 indivíduos saudáveis. A sequência de DNA contendo o polimorfismo G894T do gene da eNOS foi amplificada por PCR e o alelo presente foi determinado utilizando uma enzima de restrição. A ancestralidade foi determinada utilizando 46 marcadores autossômicos AIMs, genotipados por PCR seguida de eletroforese capilar. Quanto ao perfil de ancestralidade, as amostras caso e controle apresentaram maior proporção de herança europeia, seguida de africana e ameríndia, sem diferença significativa entre as duas amostras. As frequências do genótipo homozigoto selvagem (GG) e do alelo variante (T) foram superiores em pacientes, quando comparadas com as dos indivíduos saudáveis. Essas diferenças demostraram significância estatística e um valor de *odds ratio* indicativo para chance aumentada de IC em portadores do genótipo GG e diminuída nos portadores do alelo T. As frequências de genótipos homozigotos (GG e TT) foram maiores em pacientes com IC não-grave do que naqueles com IC grave, sendo esta diferença significativa e indicando uma maior incidência de casos graves de IC naqueles com o genótipo GT. Esse estudo sugere uma associação do genótipo GG a uma maior incidência de IC e do alelo T a uma menor incidência.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca. Marcadores genéticos. Óxido nítrico sintase endotelial. Ancestralidade.

ABSTRACT

VIANNA, R. *A study of a polymorphism that encodes nitric oxide synthase enzyme (eNOS) and ancestry relations on heart failure patients.* 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

The heart failure (HF) is a complex syndrome characterized by an impairment of the left ventricle that causes a lower blood ejection to the blood vessels. Even with the therapeutic improvements, the HF is still one of the main causes of mortality, hospitalization, and functional limitation in Brazil and worldwide. Some studies suggest an association between the G894T polymorphism, located in the gene responsible for encoding endothelial nitric oxide synthase enzyme (eNOS) and HF prognosis in certain populations. However, the allelic and genotypic frequencies for the G894T polymorphism are very different according to the studied populations, and the association between G894T and HF was only found in well-defined populations such as European and African-American. Therefore, it is justified the investigation in a admixed population as Brazilian, using ancestry informative markers (AIMs) as a tool in each individual of the study in order to reduce the effects of population stratification, a recurrent problem in studies involving the Brazilian population, avoiding spurious association. The objectives of this study were to determine the allelic and genotypic frequency distributions for the G894T polymorphism, located inside the eNOS gene, in samples of patients and healthy individuals, considering the ancestral profiles, and to investigate an association between the polymorphism and the HF. The study included 210 individuals from the study cohort involving patients with HF from the Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ and 106 healthy individuals. The DNA sequence including the G894T polymorphism from the eNOS gene was amplified by PCR and genotyped by restriction analysis. The ancestry information was obtained from 46 AIMs autosomal markers, genotyped by PCR followed by capillary electrophoresis. Concerning the ancestry profile, both the patients and controls showed a major European contribution, followed by African and Native American, without a significant difference between the two groups. The frequencies of the wild homozygous (GG) and the variant allele (T) were higher in HF patients than in healthy individuals. These differences showed a statistical significance with an associative odds ratio value for increased chance for IC prognosis in subjects with GG genotype and a reduced chance for individuals with T allele. The frequencies of the homozygous genotypes (GG and TT) were higher in patients with a non-severe case of HF than in those with severe forms, a difference that was statistically significant and indicates a higher incidence of severe cases on subjects with GT genotype. This study suggests an association of GG genotype with a higher incidence of HF and a lower incidence in subjects with T allele.

Keywords: Heart failure. Genetic markers. Endothelial nitric oxide synthase. Ancestry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de óxido nítrico (NO) por ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tendo por substrato a L-arginina 16
Figura 2 – Localização dos polimorfismos do gene da eNOS 18
Figura 3 – Mutação pontual (SNP) que ocorre na posição G894T 19
Figura 4 – Esquema ilustrativo da disposição das fitas de DNA do gene da eNOS 32
Figura 5 – Esquema ilustrativo dos produtos de PCR do polimorfismo G894T.....33
Figura 6 – Distribuição dos casos não-graves e graves de IC entre grupos 41
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose para determinação do polimorfismo G894T.42
Figura 8 – Leitura de eletroforese em capilar dos marcadores AIMs 43
Figura 9 – Estimativas de ancestralidade individuais de pacientes de IC.....44
Figura 10 – Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes à amostra de pacientes de IC 45
Figura 11 – Estimativas de ancestralidade individuais de indivíduos saudáveis 46
Figura 12 – Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes à amostra de saudáveis46
Figura 13 – Gráfico MDS das amostras estudadas 51
Figura 14 – Histogramas de distribuição das ancestralidades genéticas africana, europeia e ameríndia, estratificadas entre pacientes com cor de pele autodeclarada 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo G894T em populações mundiais por patologia 22
Tabela 2 – Listagem dos AIMs utilizados 34
Tabela 3 – Listagem dos *primers* utilizados 36
Tabela 4 – Dados demográficos das amostras 40
Tabela 5 – Informações sobre cor de pele dos pacientes de IC 41
Tabela 6 – Proporções de ancestralidade em cada grupo de amostras 47
Tabela 7 – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs de populações de referência 48
Tabela 8 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs entre pacientes e saudáveis 48
Tabela 9 – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes segundo a cor de pele 49
Tabela 10 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes segundo a gravidade da IC 49
Tabela 11 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes segundo o gênero 49
Tabela 12 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de saudáveis segundo o gênero 50
Tabela 13 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes e saudáveis do sexo masculino 50

Tabela 14 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes e saudáveis do sexo feminino.....50
Tabela 15 – Distribuição das frequências do polimorfismo G894T em pacientes de IC e seus grupos 54
Tabela 16 – Distribuição das frequências do polimorfismo G894T em indivíduos saudáveis e seus grupos 55
Tabela 17 – Valores de p para o teste exato de comparação das frequências genotípicas do polimorfismo G894T das amostras e grupos 57
Tabela 18 – Valores de *odds ratio* e intervalos de confiança para associação de genótipos ao desenvolvimento de IC 59
Tabela 19 – Valores de *odds ratio* e intervalos de confiança para associação de genótipos ao desenvolvimento da forma grave da IC.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

95% IC	Intervalo de confiança de 95%
AIM	Marcador informativo de ancestralidade
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
G894T	Polimorfismo na posição 894 com troca de guanina por timina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
HA	Hipertensão arterial
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OR	*Odds ratio*
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STR	Repetição curta *in tandem*
T786C	Polimorfismo na posição 786 com troca de timina por citosina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Tampão Tris EDTA
VNTR 4a/b	Polimorfismo no íntron 4 do gene da óxido nítrico sintase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Ca^{2+}	Íons de cálcio
<	Menor que
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µL	Microlitro
mg	Miligrama
°C	Graus Celsius
M	Molar
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
±	Mais ou menos
=	Igual a

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	**OBJETIVOS**	27
1.1	**Objetivo geral**	27
1.2	**Objetivos específicos**	27
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	28
2.1	**Amostras**	28
2.1.1	Tipo de estudo	28
2.1.2	Local de realização	28
2.1.3	Amostra de pacientes de IC	29
2.1.3.1	Critérios de inclusão	30
2.1.3.2	Critérios de exclusão	30
2.1.4	Amostra de indivíduos saudáveis	30
2.2	**Extração de DNA**	31
2.3	**Análise do polimorfismo G894T do gene da eNOS**	31
2.4	**Estimativa de ancestralidade por AIMs**	33
2.5	**Análise estatística**	37
2.5.1	Critérios de agrupamento	37
2.5.2	Testes estatísticos	38
3	**RESULTADOS**	40
3.1	**Análise demográfica das amostras**	40
3.2	**Análise molecular**	42
3.3	**Identificação dos perfis de AIMs**	44
3.4	**Comparação dos perfis ancestrais**	48
3.5	**A cor de pele como indicador de ancestralidade**	51
3.6	**Levantamento das frequências do polimorfismo G894T**	53
3.7	**Comparações do polimorfismo G894T entre grupos**	56
3.8	**Testes de associação do polimorfismo G894T**	58
3.8.1	Associação do desenvolvimento de IC em controles	58
3.8.2	Associação do desenvolvimento da forma grave da IC em não-graves	59
4	**DISCUSSÃO**	61

4.1 **Dados gerais das amostras** 61
4.2 **Frequências do G894T entre indivíduos saudáveis e pacientes de IC** 63
4.3 **Frequências do G894T entre ancestralidades** 63
4.4 **Frequências do G894T entre gêneros** 64
4.5 **Frequências do G894T entre gravidades de IC** 65
4.6 **Impactos do polimorfismo G894T na IC** 66
4.7 **Poder de discriminação dos AIMs** 67
CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS 70
APÊNDICE A – Valores de distância FST das frequências alélicas dos marcadores AIMs das amostras e grupos 79
APÊNDICE B – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética FST das frequências alélicas dos marcadores AIMs das amostras e grupos 81
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto ... 83
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto ... 84
ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto ... 85
ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 88
ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 92
ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 96

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca

As doenças cardiovasculares (DCVs) são responsáveis pelo maior número de óbitos no Brasil (DATASUS, 2014) e no mundo (MOZAFFARIAN et al., 2015). Dentre as DCVs, destacam-se a doença arterial coronariana (DAC) e a insuficiência cardíaca (IC) como as mais frequentes. Por este motivo, ressalta-se a importância do aprofundamento no conhecimento das mesmas, visando uma melhor profilaxia da patologia.

A DAC é considerada a principal causa de IC no ocidente e uma das principais no mundo (MOZAFFARIAN et al., 2015). Esse número vem crescendo, conforme demonstrado pelo clássico estudo de Framingham (HO et al., 1993). O estudo apontou um crescimento de 41% a cada década nos casos de IC causados por DAC em homens e 25% em mulheres.

Além da DAC, outras doenças evoluem para um quadro de IC em seus estágios finais, tais como cardiopatia isquêmica, hipertensão arterial (HA), valvulopatias, doença de Chagas e miocardiopatias (LIBBY et al., 2007).

A IC é uma condição patológica cuja principal característica é a incapacidade do coração em bombear a quantidade de sangue necessária para o bom funcionamento do metabolismo (WIELENGA et al., 1997; MESQUITA et al., 2004). Essa incapacidade se reflete nas altas taxas de mortalidade nas formas mais avançadas da doença, podendo atingir 50% em um ano em pacientes com fração de ejeção do ventrículo esquerdo muito baixa, tornando-se maior naqueles que necessitam suporte inotrópico para sua compensação (BOCCHI, 1994).

A história natural da IC pode ser modificada com a correção da cardiopatia, controle dos fatores de agravamento da IC ou através de algumas medicações, mas também pode se agravar devido ao uso de outras drogas (SACKS et al., 2014). Além da fração de ejeção, outros fatores como gênero e raça têm sido observados e associados a uma maior propensão ao desenvolvimento da doença, em que homens (STROMBERG e MARTENSSON, 2003) e indivíduos afro-americanos são mais afetados (BAHRAMI et al., 2008).

Mesmo com os atuais avanços terapêuticos, a IC continua sendo uma das principais causas de mortalidade, internação hospitalar e limitação funcional no país e no mundo. No ano de 2012 houve cerca de 240 mil hospitalizações com diagnóstico de IC no Brasil. Já em

relação à mortalidade, 28,6% das mortes registradas pelo Sistema Único de Saúde foram causadas por DCVs no Brasil neste mesmo ano, sendo 39,1% dessas, decorrentes de quadros de IC (DATASUS, 2014).

Disfunção endotelial

Com a IC causando a ineficiência do sistema de bombeamento de sangue, o organismo busca mecanismos compensatórios, como a ativação do sistema nervoso central e a liberação de neurotransmissores, para manter a estabilidade hemodinâmica (FERREIRA et al., 2008). Porém, como consequência da ativação desses sistemas compensatórios, ocorrem mudanças prejudiciais em diversos tecidos como na musculatura esquelética (DREXLER et al., 1992) e no próprio coração (FERREIRA et al., 2008).

O principal prejuízo incidente na musculatura esquelética é a reduzida perfusão sanguínea que causa uma diminuição do aporte de oxigênio e de nutrientes aos vasos que suprem o músculo ativo. Consequentemente ocorrem alterações neuro-humorais que aumentam a resistência vascular periférica através da vasodilatação e mantém o sangue em constante movimento apesar da citada ineficiência do bombeamento cardíaco. Essas alterações neuro-humorais provocam também redução do fluxo sanguíneo (BERNJAK et al., 2008), aumento da atividade simpática (BERNJAK et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; MEDEIRO et al., 2008) e acúmulo de fatores vasoativos locais, como por exemplo, o lactato (TYNI-LENNÉ, GORDON, et al., 1999; TYNI-LENNÉ, JANSSON, et al., 1999).

A baixa perfusão sanguínea provocada pela IC dá origem à disfunção endotelial, que é um fenômeno caracterizado pela redução na disponibilidade sanguínea de um componente específico, o óxido nítrico (NO) (WISLØFF et al., 2007). O NO é um importante componente para a estabilidade hemodinâmica porque sua principal ação é a vasodilatação.

A produção de NO é mediada por estímulo físico consequente do intenso fluxo sanguíneo na parede do endotélio, viabilizando o aumento da luz dos vasos. Porém, os pacientes de IC possuem menores taxas de perfusão sanguínea e, por conta disso, a produção de NO é reduzida e sua ação é prejudicada (WISLØFF et al., 2007; DWORAKOWSKI et al., 2008). Outra justificativa que explica a baixa disponibilidade sanguínea de NO em pacientes de IC é apresentada num estudo que constata que espécies reativas de oxigênio e radicais

livres encontram-se mais disponíveis na circulação em pacientes e, com isso, ocorre oxidação de moléculas de NO e inibição de sua ação (DWORAKOWSKI et al., 2008).

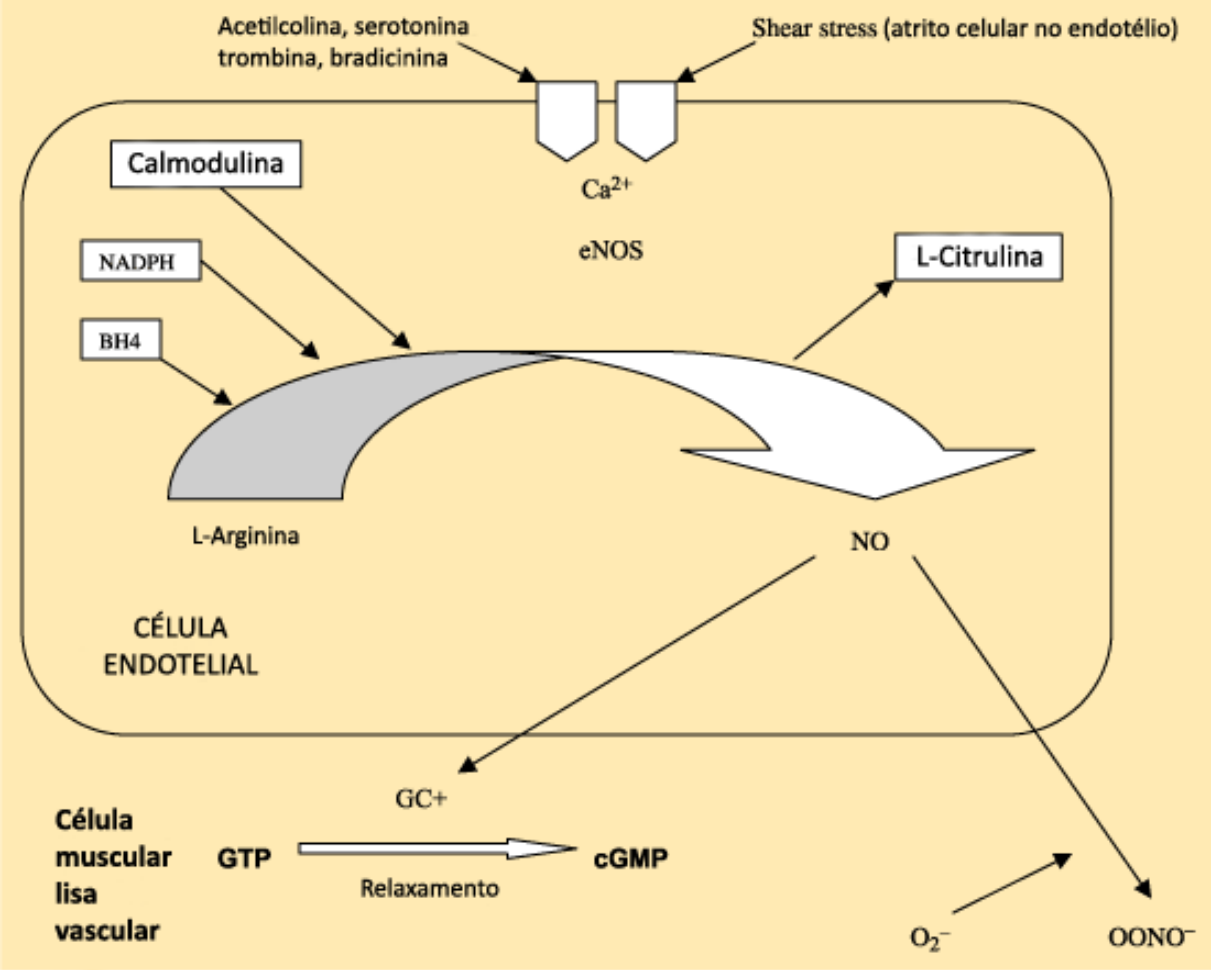
Síntese de NO

Em termos moleculares, a produção de NO resulta da reação de oxidação de um dos nitrogênios guanidino da molécula de L-arginina, que é convertida em NO e L-citrulina, numa reação que é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), conforme representado na figura 1. Diversas isoformas da enzima NOS têm sido identificadas em diferentes tecidos de mamíferos, sendo elas categorizadas em dois grupos: NOS constitutiva (cNOS) e NOS induzível (iNOS). Estudos bioquímicos determinaram que estas isoformas constituem uma família de proteínas codificadas por genes distintos (MARLETTA, 1994).

A cNOS e a iNOS diferenciam-se quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de mediar a síntese de NO (MARLETTA, 1994). A isoforma constitutiva abrange a NOS neuronal (nNOS), descrita e presente fundamentalmente nos neurônios (BREDT e SNYDER, 1989; KNOWLES et al., 1989), e a NOS endotelial (eNOS), presente nas células endoteliais vasculares (MONCADA et al., 1991) e nas plaquetas (RADOMSKI et al., 1990).

Enquanto a cNOS produz baixas quantidades de NO e sua ativação depende da interação molecular com a calmodulina, controlada por níveis de cálcio, a iNOS não é produzida em condições normais, e sim por ação de citocinas em uma variedade de células, como linfócitos T, miócitos, hepatócitos, células endoteliais, neutrófilos e plaquetas (MONCADA et al., 1991). O nível de NO produzido por essa segunda isoforma é bem maior que o produzido pela cNOS, porém a iNOS demanda algumas horas para que comece a ser expressa e sua inibição só ocorre quando ocorre há depleção de L-arginina e cofatores de produção no meio intracelular ou em caso de morte celular (DUSTING e MACDONALD, 1995).

Figura 1 – Produção de óxido nítrico (NO) por ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tendo por substrato a L-arginina



Nota: Cofatores como a tetrahidrobiopterina (BH4), a calmodulina e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) estão envolvidos no processo. A estimulação da eNOS por agonistas vasodilatores ou *shear stress* (atrito celular no endotélio) é mediada pelo aumento de cálcio intracelular (Ca^{2+}). O NO pode ser degradado por radicais livres (O^{2-}), produzindo peroxinitrito ($OONO^-$), que é vasoativo. O NO atua nas células musculares lisas vasculares causando relaxamento por ativação a guanilato ciclase (GC), então elevando o nível de guanosina monofosfato cíclica intracelular (cGMP).
Fonte: BRAUNWALD et al, 2001(com modificações).

Metabolismo da eNOS

A eNOS, pertencente à classe das cNOS, possui um papel fundamental no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Esse relaxamento decorre da ativação dos receptores da membrana das células endoteliais por estímulos solúveis ou quando acontece um aumento no atrito ocasionado pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), causando

a ativação da eNOS e, consequentemente, a produção de NO por essas células (BUSCONI e MICHEL, 1993).

Por estar ancorada à membrana da célula endotelial, a eNOS favorece a disponibilidade de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às células sanguíneas circulantes. Em resposta a moléculas agonistas, como a bradicinina, ocorre a fosforilação da eNOS, ocasionando sua translocação para o citosol. Este mecanismo tem papel fundamental na regulação da produção de NO *in situ* e na sua atividade biológica. O NO sintetizado na célula endotelial difunde-se rapidamente para o miócito e para o lúmen vascular. Esta difusão ocorre rapidamente por conta de sua pequena dimensão e sua característica lipofílica (MICHEL et al., 1993).

No interior do miócito, o NO desempenha sua atividade ao interagir com a enzima guanilato ciclase, alterando sua conformação e ativando-a, tornando-se capaz de produzir guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento da célula, conforme pode ser visto ainda na figura 1. Esse relaxamento promove a redução da entrada de Ca^{2+} para a célula e o retículo endoplasmático deixa de liberar Ca^{2+}, passando apenas a capturar moléculas de Ca^{2+} para o seu interior (GEWALTIG e KOJDA, 2002).

Por outro lado, o NO que deixa a célula endotelial com destino à corrente sanguínea, pode penetrar nas plaquetas, principalmente naquelas que se encontram aderidas à parede do vaso, ou nas hemácias. No interior das plaquetas, o NO também promove aumento de GMPc e os níveis de Ca^{2+} livre são reduzidos, inibindo a ativação plaquetária (WOLIN, 2000).

Polimorfismos genéticos

Com o advento do projeto Genoma, acredita-se que cerca de 400 genes regulem os processos de função endotelial, inflamação, coagulação e metabolismo de macromoléculas. O uso de novas ferramentas da biologia molecular tem possibilitado desvendar mecanismos causadores e vias fisiológicas de várias doenças (MCNAMARA et al., 2003).

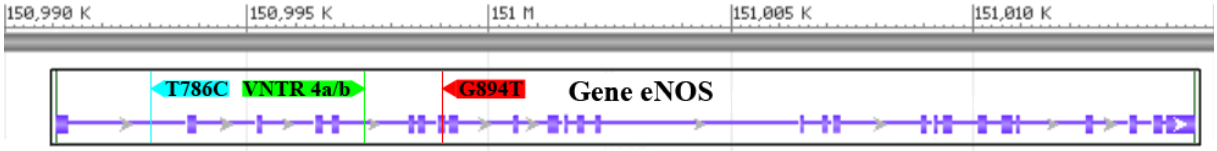
Frequentemente estudos de associação são realizados com o objetivo de identificar as bases genéticas de características quantitativas, como a susceptibilidade a doenças complexas (HIBI et al., 1998; SHIMASAKI et al., 1998; HINGORANI et al., 1999; MATSA et al., 2013; YAO et al., 2013). Além disso, a existência de polimorfismos genéticos – mutações genéticas

não-letais presentes em mais de 1% da população – pode ajudar a explicar as diferenças na evolução clínica e na resposta terapêutica entre pacientes com a mesma patologia e que utilizam as mesmas medicações.

Polimorfismos da eNOS

O gene que codifica a eNOS localiza-se na extremidade do braço longo do cromossomo 7 (7q36.2) e possui grande relevância no cenário de genética clínica. Esta relevância começa a se destacar a partir da década de 90, com o surgimento de estudos ressaltando a importância das alterações genéticas e sua responsabilidade pelo desenvolvimento da IC. Dentre os estudos, três polimorfismos da eNOS ganharam destaque em casos de associação com a IC: o T786C, o VNTR 4a/b e o G894T. A localização dos polimorfismos pode ser vista na figura 2.

Figura 2 – Localização dos polimorfismos do gene da eNOS



Legenda: Roxo (toda a extensão do gene eNOS); azul (localização do polimorfismo T786C: região promotora do gene eNOS); verde (localização do polimorfismo VNTR 4a/b: íntron 4 do gene eNOS); e vermelho (localização do polimorfismo G894T: exon 7 do gene eNOS).
Fonte: NCBI dbSNP, 2016 (com modificações).

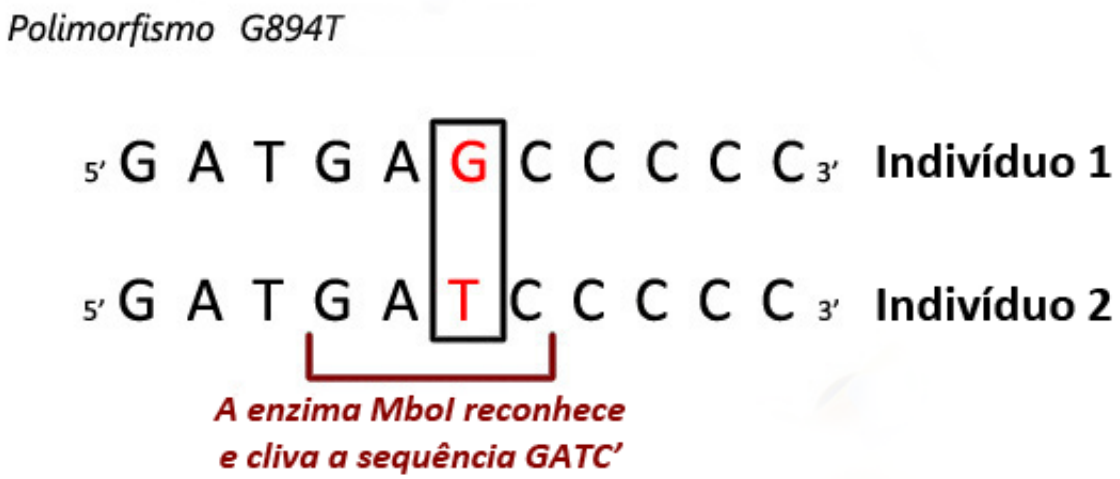
O polimorfismo T786C (*rs2070744*) é caracterizado por uma mutação pontual (SNP) na região promotora do gene da eNOS, em que há uma troca do nucleotídeo timina por uma citosina. Esse polimorfismo associa-se ao desenvolvimento de IC por estar relacionado com a redução da atividade da enzima eNOS em plaquetas (DOSENKO et al., 2006) e diminuição dos níveis de RNA mensageiro em cardiomiócitos (DOSHI, A. A. et al., 2010). Além disso, estudos indicaram uma associação dessa variante com quadros de doença coronariana (ROSSI et al., 2003) e hipertensão (CRUZ-GONZALEZ et al., 2009).

O VNTR 4a/b é um polimorfismo causado por uma repetição de 27 pb no íntron 4 do gene da eNOS. Esse polimorfismo está ligado a uma variação fisiológica das concentrações

plasmáticas dos metabólitos do NO (TSUKADA et al., 1998). Essa variação de concentração foi associada com a evolução da estenose coronária severa (WANG et al., 1996) e um risco aumentado de infarto do miocárdio (JEMAA et al., 2007).

O polimorfismo G894T (*rs1799983*) é um SNP que ocorre no exon 7 do gene, havendo substituição da base nitrogenada guanina por uma timina na posição 894 que resulta numa substituição do aminoácido glutamina por aspartato na posição 298 (Glu298Asp) na estrutura da eNOS (PHILIP et al., 1999). Esta substituição de nucleotídeos é identificada com base na técnica de enzima de restrição, especificamente com o uso da enzima *MboI*, conforme mostrado na figura 3. O aspartato na posição 298 ocasiona, em hipertensos, resistência à terapia anti-hipertensiva convencional, por não ativar corretamente a eNOS, e consequentemente, seu efeito vasodilatador (KELLY et al., 1996).

Figura 3 – Mutação pontual (SNP) que ocorre na posição G894T



Nota: Na mutação pontual ocorre a troca de guanina (G) por timina (T). Também é ilustrado na figura o sítio de ação da enzima de restrição *MboI* que cliva o DNA quando se faz presente o alelo T no gene, caracterizando a sequência GATC' que é o alvo da enzima.
Fonte: O autor, 2015.

Diversas doenças têm sido relacionadas com disfunções na eNOS causadas pelo polimorfismo G894T, e por isso destaca-se a importância dessa variante em especial. Dentre as investigações acerca do papel do G894T em doenças, figura um estudo populacional que associa fortemente o polimorfismo G894T à doença arterial coronariana (HINGORANI et al., 1999) e outro que associa o polimorfismo a uma maior propensão de desenvolvimento de acidente vascular cerebral isquêmico numa amostra da população asiática (YAO et al., 2013).

Além desses estudos, há um forte indício numa investigação na população indiana de que esse polimorfismo esteja intimamente associado ao desenvolvimento de um quadro de cardiomiopatia dilatada que é capaz de se agravar causando IC (MATSA et al., 2013).

Estudos envolvendo G894T e IC

Dois estudos com amostras bem distintas de pacientes de IC e indivíduos saudáveis possuem grande relevância no cenário investigativo que envolve o polimorfismo G894T e a IC. O primeiro estudo, denominado GRACE (*Genetic Risk Assessment of Cardiac Events*), utilizou amostras da população norte-americana exclusivamente de cor de pele branca e origem europeia. Enquanto o segundo, chamado de GRAHF (*Genetic Risk Assessment of Heart Failure*), baseou suas amostras em norte-americanos afrodescendentes.

O estudo GRACE consistiu na avaliação do impacto do polimorfismo G894T na sobrevida dos pacientes de IC. Os resultados indicaram uma associação do alelo mutado T com uma piora na sobrevida de pacientes com cardiomiopatia do tipo não-isquêmica (MCNAMARA et al., 2003).

O estudo GRAHF observou o perfil genotípico dos pacientes do banco de dados A-HEFT (*African-American Heart Failure Trial*) com base no polimorfismo G894T, verificando-se um predomínio do alelo G entre os pacientes autodeclarados afro-americanos, caracterizando o que foi chamado de polimorfismo étnico (MCNAMARA et al., 2009).

Há, contudo, um estudo norte-americano com amostra predominantemente caucasiana que evidencia que o alelo T do polimorfismo G894T não influencia na síntese de RNA mensageiro nem na expressão proteica, em termos de redução de biodisponibilidade de NO (DOSHI, A.A. et al., 2010).

Variações de frequência do polimorfismo G894T

O polimorfismo G894T sofre uma grande variação de suas frequências alélicas e genotípicas de acordo com a população estudada. Um grande exemplo disso encontra-se na comparação entre os valores de frequência dos estudos GRACE e GRAHF, realizados com amostras etnicamente bem distintas. Foi verificado que a frequência do alelo G é bem inferior em indivíduos com forte herança europeia do que naqueles de herança africana mais marcante (MCNAMARA et al., 2003; MCNAMARA et al., 2009).

Um estudo realizado na população brasileira, que conta com um elevado índice de miscigenação, aponta uma variação da distribuição do polimorfismo do gene a nível regional e verifica que a combinação de herança africana e genótipo GG estaria relacionada com o desenvolvimento de IC e HA (VELLOSO et al., 2010).

Estudos genéticos frequentemente investigam associação entre um gene suspeito e uma determinada doença através de uma estratégia denominada estudo de caso-controle, porém nem sempre as diferenças de frequências do polimorfismo encontradas entre os dois grupos de amostras estão associadas com a referida patologia. Em alguns casos, as diferenças de frequências encontradas podem ser o resultado de uma diferente ancestralidade dos indivíduos incluídos nas duas amostras. A tabela 1 apresenta valores de frequência para genótipos e alelos do polimorfismo G894T em populações de diferentes países e continentes. E conforme pode ser observado na tabela citada, as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo G894T variam de acordo com as populações (TIAN et al., 2006), tendo sido determinadas em estudos relacionados com diferentes patologias.

Tabela 1 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo G894T em populações mundiais por patologia

	n	Genótipos (%)			Alelos (%)				
População		**GG**	**GT**	**TT**	**G**	**T**	**Patologia**	**Tipo**	**Referência**
África									
Ovambos	123	90,2	9,8	0,0	95,2	4,8	Espasmo Coronariano	Paciente	1
Ghana	118	85,6	11,9	2,5	91,6	8,4	Espasmo Coronariano	Paciente	1
Xhosa	95	93,7	6,3	0,0	96,9	3,1	Espasmo Coronariano	Paciente	1
América									
Brasil - RS	585	47,0	42,0	11,0	68,0	32,0	Disfunção Cardiovascular	Paciente	2
Brasil - RJ	100	49,0	47,0	4,0	72,5	27,5	Insuficiência Cardíaca	Paciente	3
Brasil - RJ	103	35,0	49,5	15,5	59,7	40,3	Insuficiência Cardíaca	Controle	3
México	452	62,0	33,0	5,0	78,0	22,0	Síndrome Coronária Aguda	Paciente	4
México	283	61,0	34,0	5,0	78,0	22,0	Síndrome Coronária Aguda	Controle	4
EUA	5033	60,4	33,1	6,5	77,0	23,0	Hipertensão Arterial	Paciente	5
EUA	9318	51,8	39,7	8,5	71,7	28,3	Hipertensão Arterial	Controle	5
Ásia									
China	224	72,8	25,4	1,8	85,5	14,5	Trombose Venosa Profunda	Paciente	6
China	580	81,0	17,8	1,2	89,9	10,1	Trombose Venosa Profunda	Controle	6
Índia	100	56,0	30,0	14,0	71,0	29,0	Infarto Agudo do Miocárdio	Paciente	7
Índia	100	67,0	31,0	2,0	83,0	17,0	Infarto Agudo do Miocárdio	Controle	7
Europa									
Turquia	194	57,5	35,8	6,7	75,4	24,6	Espondilite Anquilosante	Paciente	8
Turquia	113	50,9	43,8	5,4	72,8	27,2	Espondilite Anquilosante	Controle	8
Alemanha	64	34,0	53,0	13,0	61,0	39,0	Pressão Irregular	Paciente	9
Alemanha	200	44,0	44,0	12,0	66,0	34,0	Pressão Irregular	Controle	9

Legenda: As referências representam os seguintes estudos: [1]FUJIHARA et al, 2011; [2]FRAGA et al, 2013; [3]VELLOSO et al, 2010; [4]VARGAS-ALARCON et al, 2013; [5]KINGAH et al, 2010; [6]QIN et al, 2013; [7]ANGELINE et al, 2010; [8]SARI et al, 2013; [9]WEISS et al, 2012.

Fonte: O autor, 2015.

Se uma frequência de um polimorfismo é bem superior em um grupo étnico do que em outro, e um destes grupos étnicos é mais prevalente numa amostra do que em outra, levando em consideração estudos de comparação de amostras caso e controle, essas diferenças nas frequências entre amostras podem ser erroneamente interpretadas como fator de associação quando na verdade são fruto de uma diferente ancestralidade entre as amostras. Essas associações errôneas são denominadas associações espúrias e ocorrem quando a estratificação populacional não consegue ser percebida durante a investigação (TIAN et al., 2006).

A estratificação populacional resultante de diferentes componentes étnicos é bem mais frequente em populações miscigenadas como a brasileira do que em populações bem definidas como a europeia ou a africana. A determinação da ancestralidade por autodeclaração de cor de pele ou etnia é bem menos eficiente do que a utilização de ferramentas moleculares. A estimativa da ancestralidade de cada indivíduo permite agrupá-los adequadamente a fim de minimizar as diferenças de ancestralidade entre amostras, evitando o aparecimento de associações espúrias.

Ancestralidade da população brasileira

A população brasileira é conhecida por possuir uma distribuição bastante heterogênea das três principais contribuições ancestrais que são os ameríndios, os europeus e os africanos. Estes três povos se relacionaram e deram origem a uma grande mistura genética de diferentes formas ao longo do tempo, gerando uma população bastante miscigenada e multiétnica.

Histórico

A colonização do Brasil pelos europeus teve seu início no século XVI através do litoral e expandiu-se ao interior do país ao longo do tempo. Antes da chegada dos europeus, o país era exclusivamente ocupado por povos ameríndios. Além dessas duas contribuições genéticas, a colonização europeia teve grande influência africana por conta da mão-de-obra escrava presente no período. Apesar desse padrão de contribuição tri-híbrida se fazer presente

ao longo de toda a extensão territorial do país, essas proporções se diferenciam dependendo da região, de acordo com o nível e tipo de colonização ocorrida (IBGE, 2000).

Esse processo complexo de colonização do país, que possui dimensões continentais, se reflete na heterogeneidade da composição genética da população ao longo das regiões do Brasil (CALLEGARI-JACQUES et al., 2003; GODINHO et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

Uso de marcadores genéticos

As primeiras tentativas de se estimar a diversidade étnica no Brasil foram realizadas baseando-se em grupos sanguíneos e marcadores proteicos. Os resultados demonstraram uma grande heterogeneidade étnica que existe associada a diferentes regiões geográficas do país (SCHNEIDER e SALZANO, 1979; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2002).

Com o avanço da tecnologia, novas ferramentas foram sendo utilizadas nos estudos de genética de populações com o objetivo de definir padrões de miscigenação no Brasil. Uma delas, a análise do DNA mitocondrial, teve grande relevância, pois permitiu identificar linhagens ancestrais com base nesse material genético que possui herança transmitida exclusivamente de forma materna (ALVES-SILVA et al., 2000). De forma complementar, a análise do cromossomo Y permitiu o desenho da linhagem paterna em diversas regiões do Brasil, pois se trata de um material genético de herança transmitida de forma paterna (SILVA et al., 2006).

Ultimamente, marcadores autossômicos passaram a ser utilizados na identificação de padrões de herança, visto que permitem uma abordagem biparental, ou seja, não se limitam a identificar unicamente a herança materna ou paterna como ocorre com DNA mitocondrial e cromossomo Y. Dentre os marcadores autossômicos, destaca-se o uso de marcadores de inserções e deleções (Indels) para a identificação de ancestralidade, os chamados AIMs (*Ancestry Informative Markers*) porque apresentam a facilidade de serem identificados de forma simples através de uma PCR seguida de uma eletroforese capilar e foram capazes de determinar ancestralidade em populações brasileiras (GODINHO et al., 2008; SANTOS et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

Justificativa

A IC continua sendo uma das principais causas de mortalidade, internação hospitalar e limitação funcional no país e no mundo. No ano de 2012, ocorreram cerca de 240 mil hospitalizações com diagnóstico de IC no Brasil, mesmo com o avanço do tratamento da doença (DATASUS, 2014).

Atualmente, esse tratamento se baseia em diversas medidas adotadas a partir das descobertas realizadas em grandes ensaios clínicos randomizados (ANAND e FLOREA, 2008). Porém, os benefícios advindos desse tipo de tratamento não conseguiram atingir sequer metade dos pacientes estudados, demonstrando uma resposta individualizada à terapia (JOHNSON e EVANS, 2002), e que essas diferenças de respostas ao tratamento são atreladas a vários fatores como interações medicamentosas, hábitos alimentares e fatores genéticos.

Ou seja, mesmo com a intensificação do tratamento, não foi possível beneficiar o paciente após certo estágio e ainda foram aumentados os riscos associados à terapêutica.

Com base nisso, justifica-se o uso da pesquisa envolvendo polimorfismos genéticos com o intuito de aperfeiçoar a abordagem individual em função do perfil genético do indivíduo e da gravidade da IC, com base em marcadores genéticos como o G894T da eNOS.

Além disso, salienta-se o fato de que o polimorfismo G894T possui frequências genotípicas e alélicas extremamente variáveis dependendo da ancestralidade do indivíduo (MCNAMARA et al., 2003; MCNAMARA et al., 2009) e por isso essas diferentes frequências por si só não podem ser assumidas como fatores de propensão ao prognóstico de IC sem uma análise criteriosa da homogeneidade amostral, principalmente no que se refere a ancestralidade. Em uma população tão miscigenada como a brasileira, que possui um histórico de colonização complexo a investigação analítica nessa direção requer ainda mais cuidado, o que ainda não foi feito em estudos brasileiros para esse polimorfismo.

Aliado ao conceito de variação de frequência do G894T, certas drogas utilizadas no tratamento da IC respondem de forma diferente em populações distintas. Por exemplo, a terapêutica com hidralazina e dinitrato de isossorbida possui resposta mais positiva em pacientes com ancestralidade africana do que europeia, devido à presença mais frequente do genótipo GG na população africana (CARSON et al., 1999).

A fim de identificar o perfil de ancestralidade de cada indivíduo e, assim, reduzir possíveis associações espúrias numa população miscigenada como a brasileira, o uso de marcadores de ancestralidade do tipo AIM-Indels surge com uma ferramenta indispensável.

O estabelecimento de associação entre alguns atributos, tais como genótipo do G894T, gravidade da IC, gênero, cor de pele, faixa etária e ancestralidade pode indicar um horizonte de susceptibilidade à IC.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi avaliar o polimorfismo G894T do gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial em uma amostra de pacientes com insuficiência cardíaca e uma amostra de indivíduos saudáveis da população do estado do Rio de Janeiro, considerando seus variados atributos, incluindo a ancestralidade, que possui impacto relevante nas frequências deste polimorfismo.

1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo G894T do gene eNOS em uma amostra caracterizada por ancestralidade molecular, visando minimizar associações espúrias causadas por heterogeneidade de ancestralidades das amostras.

Além de comparar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo G894T entre os grupos de cada amostra, estratificando-os por critérios demográficos (idade, gênero e cor de pele), clínicos (gravidade da IC) e de ancestralidade, para análise de associação genética.

E comparar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo G894T entre pacientes de IC e indivíduos saudáveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

O presente trabalho faz parte de uma linha de pesquisa envolvendo medicina genômica que conta com amostras coletadas por três diferentes projetos aprovados no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto sob os números CAAE: 12144313.8.0000.5259, 2541-CEP/HUPE – CAAE: 0176.0.228.000-09 e 2549-CEP/HUPE – CAAE: 0175.0.228.000-09 (Anexos A, B e C). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo D) foi elaborado e aprovado pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética, sendo aplicado aos participantes do estudo antes de qualquer procedimento. Os pacientes foram orientados quanto à participação do estudo, à coleta laboratorial de sangue e ao uso do seu histórico médico, e só participaram após a assinatura do TCLE.

Dois grupos de indivíduos foram selecionados para participação no presente estudo: pacientes acometidos por IC e indivíduos saudáveis.

2.1.1 Tipo de estudo

Estudo de coorte observacional, retrospectivo (desde o início de acompanhamento médico do paciente no serviço de cardiologia) e prospectivo (a partir do início do trabalho em 2011).

2.1.2 Local de realização

a) Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE);
b) Policlínica Piquet Carneiro (PPC);
c) Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

2.1.3 Amostra de pacientes de IC

A amostra de pacientes com IC foi composta por 210 indivíduos que foram acompanhados e selecionados a partir da coorte de pacientes em acompanhamento médico, no ambulatório de IC do Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), através de equipe multidisciplinar formada por médicos clínicos cardiologistas, enfermeiros, nutricionista e biólogo. A escolha dos pacientes foi realizada respeitando a metodologia.

Atualmente, os pacientes são orientados quanto às medidas não farmacológicas e tratamento medicamentoso conforme orientações das diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia, da *American Heart Association* e diretrizes internacionais.

Visto que a maioria desses indivíduos já era previamente acompanhada na clínica de IC, optou-se por fazer uma análise retrospectiva do prontuário para a coleta de dados dessa coorte. Desse modo, obtiveram-se dados clínicos e laboratoriais de todos os pacientes desde início do acompanhamento.

A caracterização do paciente como acometido pela IC foi definida a partir do julgamento clínico do médico assistente, o qual normalmente é definido a partir da exclusão das causas mais comuns como doença coronariana, Doença de Chagas, entre outras.

Os dados coletados foram: gênero, cor de pele, idade, fração de ejeção do ventrículo esquerdo, data de diagnóstico, tempo de acompanhamento no serviço, etiologia da IC, classe funcional, uso e dose de betabloqueadores, uso e dose de indutor de enzima conversora de angiotensinogênio, uso e dose de diurético, uso de Espironolactona/Digital/Amiodarona, frequência cardíaca e pressão arterial ao final do acompanhamento, índice de massa corporal, número de hospitalizações, presença de comorbidades, presença de arritmia, adesão ao tratamento e condição socioeconômica. Já os utilizados no presente estudo foram: gênero, cor de pele, idade e gravidade da IC.

Os exames complementares foram realizados a partir do julgamento clínico do médico assistente sem frequência periódica estabelecida. Esses dados foram coletados pelos médicos do ambulatório da clínica de IC.

A análise genética foi possível a partir da coleta de amostra de sangue realizada por bióloga especializada e armazenamento para posterior transporte para o Laboratório de

Diagnósticos por DNA (LDD) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, onde as análises genéticas foram realizadas.

2.1.3.1 Critérios de inclusão

a) Indivíduos maiores de 18 anos;
b) Diagnóstico de IC através dos critérios de Framingham/Boston;
c) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo <50% ao Ecocardiograma;
d) Informação médica incluindo exames laboratoriais e ecocardiográficos disponíveis no prontuário da Clínica IC-HUPE;
e) Tempo de seguimento ambulatorial na Clínica IC-HUPE superior a um ano;
f) Assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido após leitura e compreensão do documento.

1.2.1.2 Critérios de exclusão

a) Indivíduos menores de 18 anos;
b) Pacientes sem registro médico adequado.

2.1.4 Amostra de indivíduos saudáveis

A amostra de saudáveis corresponde a 106 indivíduos que voluntariamente concordaram em participar do estudo sendo selecionados pelo Setor de Hipertensão Arterial do Serviço de Cardiologia do HUPE/UERJ e que não apresentaram nenhum histórico de IC e tampouco foram diagnosticados com alguma DCV. Desse modo, foram agrupados e determinados como saudáveis para a doença alvo em estudo.

Ao contrário do ocorrido na formação da amostra de pacientes de IC, em que os próprios possuíam um extenso prontuário no ambulatório de IC com uma vasta gama de informações contidas, na formação da amostra de indivíduos saudáveis, a quantidade de informações disponíveis era menor, e por este motivo, não foi utilizada a informação de cor de pele na amostra controle. Os dados utilizados foram gênero e idade, apenas.

2.2 **Extração de DNA**

Para ambas as amostras da população estudada, a técnica de extração de DNA utilizada foi *salting-out* (MILLER et al., 1988).

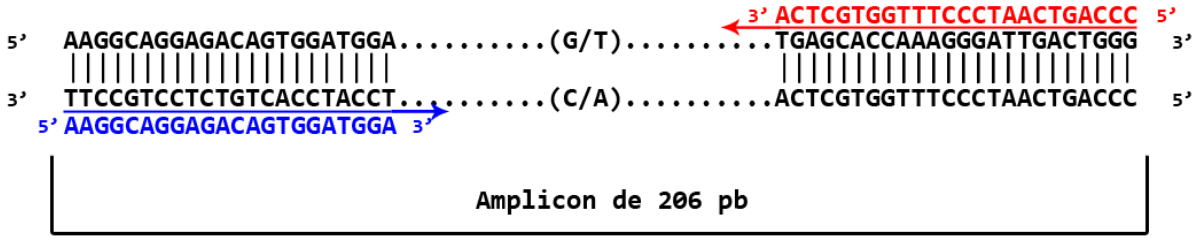
Primeiramente, uma alíquota de sangue total (2 mL) foi transferida para um tubo cônico. Adicionou-se 2 mL de tampão de lise de hemácias (NH_4Cl 155 mM, $KHCO_3$ 10 mM e EDTA 1 mM), homogeneizando-se a solução contida no tubo e centrifugando-a a 3.000 rpm por 5 minutos. Terminada a centrifugação descartou-se o sobrenadante. Observou-se a presença de um pellet que foi desprendido manualmente e a este foram acrescentados 500 µL de tampão de lise de célula e 30 µL de proteinase K 20mg/mL. Homogeneizou-se o tubo manualmente e incubou-se a 37 ºC por 12 horas. Após a digestão, adicionou-se 300 µL de NaCl 6 M e fez-se o agito da solução por cerca de 30 segundos. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico, adicionou-se a este 1 mL de etanol gelado, homogeneizou-se o tubo, descartou-se o etanol. Observando a precipitação de DNA após o descarte do álcool. Ao precipitado foram adicionados 300 µL de TE (Tris pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1,0 mM) e a amostra foi mantida a -20 ºC em freezer.

2.3 **Análise do Polimorfismo G894T do gene da eNOS**

Um produto de 206 pb do gene do eNOS, incluindo o polimorfismo G894T, foi amplificado através de PCR utilizando os *primers* flanqueadores do gene eNOS F 5'- CAT GAG GCT CAG CCC CAG AAC -3' e eNOS R 5'- AGT CAA TCC CTT TGG TCA C -3' (Figura 4). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 96 ºC por 2

minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 1 minuto, anelamento a 63 ºC por 1 minuto, extensão a 72 ºC por 2 minutos e uma extensão final a 72 ºC por 10 minutos, realizado em termociclador modelo Veriti (ThermoFisher Scientific). Ambas informações de *primers* e condições de PCR foram idênticas ao descrito por Borroni e colaboradores (2006).

Figura 4 – Esquema ilustrativo da disposição das fitas de DNA do gene da eNOS

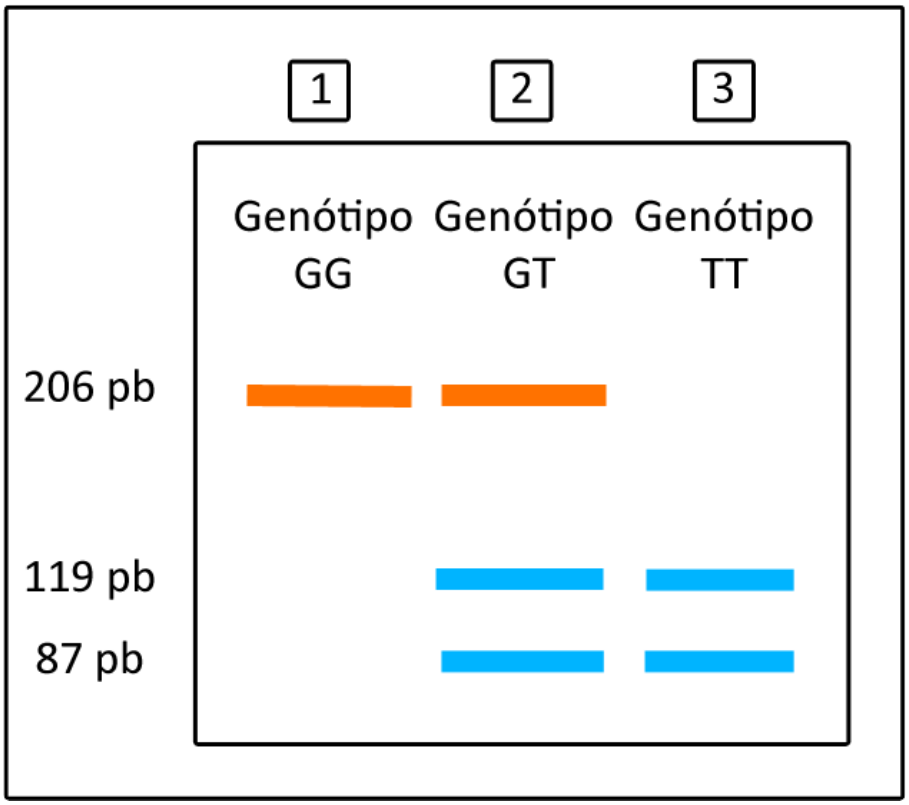


Legenda: Sequência em azul (*primer forward* para amplificação da região-alvo); sequência em vermelho (*primer reverse* para amplificação da região-alvo); região entre parênteses (mutação pontual do polimorfismo G894T).
Nota: A figura ilustra o posicionamento dos *primers* em cada fita de DNA e ainda explicita o tamanho do fragmento resultante da reação, de 206 pb.
Fonte: O autor, 2015.

O volume total de reação foi 20 µL utilizando-se: 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (QIAGEN); 5 µL de tampão Platinum (QIAGEN) 4X contendo $MgCl_2$ 1,5mM; 2 µL de DNA (2 ng/mL); 4 µL dos *primers* flanqueadores a 10 µM; e 8,8 µL de água. O produto da PCR foi separado através de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta a 312 nm, observando-se a presença de uma banda de 206 pares de base (pb).

Para a determinação do polimorfismo G894T, todo o produto da amplificação por PCR (20 µL) foi submetido à análise de restrição com 1 unidade da enzima *MboI* em tampão específico N3 (Fermentas). A mistura foi incubada e a digestão foi feita a 37ºC, por 12 horas. Os fragmentos de restrição foram separados em agarose 3%, detectados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de ultravioleta em comprimento de onda a 254 nm. A leitura do genótipo foi realizada a partir do padrão de separação dos fragmentos, conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5 – Esquema ilustrativo dos produtos de PCR do polimorfismo G894T



Nota: A figura indica os padrões de leitura do polimorfismo G894T. Na coluna 1 encontra-se indicado o genótipo selvagem GG com apenas uma banda de 206 pb; na coluna 2, o genótipo GT é determinado pela presença de três bandas de diferentes tamanhos: 206 pb, 119 pb e 87 pb; e na coluna 3, o genótipo TT é indicado pela presença de duas bandas de 119 pb e 87 pb.

Fonte: O autor, 2015.

2.4 **Estimativa de ancestralidade por AIMs**

Com o objetivo de estimar a ancestralidade de cada indivíduo do presente estudo, foi utilizado o sistema multiplex AIMs descrito por Pereira et al (2012), que inclui 46 marcadores (Tabela 2) com frequências alélicas significativamente diferentes entre africanos, europeus, asiáticos e ameríndios, e por isso, são altamente informativos para cada um dos quatro grupos populacionais.

Tabela 2 – Listagem dos AIMs utilizados

Código rs	MID	Cromossomo	Posição (pb)	Alelos descritos no dbSNP
rs2307666	MID-1470	11	64729920	-/GTTAC
rs1610863	MID-777	16	6551830	-/GAA
rs16635	MID-196	6	99789775	-/CAT
rs1610965	MID-881	5	79746093	-/ACTT
rs35451359	MID-3122	18	45110983	-/ATCT
rs140837	MID-548	6	3708909	-/CT
rs1160893	MID-659	2	224794577	-/CT
rs2308203	MID-2011	2	109401291	-/CTAGA
rs33974167	MID-2929	8	87813725	-/TA
rs1160852	MID-593	6	137345857	-/TT
rs1610884	MID-798	5	56122323	-/GGGAAA
rs2067280	MID-1193	5	89818959	-/AT
rs2308067	MID-1871	7	127291541	-/TT
rs4183	MID-17	3	3192524	-/TAAC
rs3054057	MID-2538	15	86010538	-/AACA
rs2307840	MID-1644	1	36099090	-/GT
rs60612424	MID-3854	6	84017514	-/TCTA
rs3033053	MID-2275	14	42554496	-/TCAGCAG
rs16384	MID-94	22	42045009	-/AAC
rs34611875	MID-3072	18	67623917	-/GCCCCCA
rs1610859	MID-772	5	128317275	-/TAG
rs3045215	MID-2313	1	234740917	-/ATTATAACT
rs25621	MID-397	6	139858158	-/TTCT
rs2307832	MID-1636	1	55590789	-/AA
rs16343	MID-51	4	17635560	-/TTTAT
rs3031979	MID-2431	8	73501951	-/ATTG
rs34122827	MID-2264	13	63778778	-/AAGT
rs133052	MID-2256	22	41042364	-/CAT
rs6490	MID-128	12	108127168	-/ATT
rs4181	MID-15	2	42577803	-/AAATACACAC
rs3030826	MID-2241	6	67176774	-/GTCCAATA
rs140708	MID-419	6	170720016	-/AATGGCA
rs1611026	MID-943	5	82545545	-/TGAT
rs16438	MID-159	20	25278470	-/CCCCA
rs2308161	MID-2005	10	69800909	-/AACAAT
rs16687	MID-250	7	83887882	-/CA
rs2307998	MID-1802	5	7814345	-/GGA
rs2307803	MID-1607	3	108981031	-/TG
rs2307930	MID-1734	6	84476378	-/CCAT
rs25630	MID-406	6	14734341	-/AG
rs2307582	MID-1386	1	247768775	-/AAACTATTCATTTTTCCT
rs2307922	MID-1726	1	39896964	-/CAAGAACTATAAT/CACTATCTATTAT
rs11267926	MID-3626	15	45526069	-/AATATAATTTCTCCA
rs25584	MID-360	12	112145217	-/AA
rs2307799	MID-1603	5	70828427	-/TTGT
rs34541393	MID-2719	20	30701405	-/AACT

Legenda: Identificação do marcador genético no banco de dados dbSNP versão 132 (Código rs); nomenclatura do marcador de acordo com o banco de dados Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms (MID).

Fonte: Pereira et al, 2012.

Na PCR foi utilizado o QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN). A mistura de reagentes consistiu em 2 ng de DNA genômico, 1 µL de *primer mix* a 2 µM cada *primer* (relação completa na tabela 3) e 5 µL *master mix* 2x concentrado num volume final de 10 µL. As condições de temperatura foram: etapa inicial de 95°C por 15 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 45 segundos; e 72°C por uma hora de extensão final. A reação foi executada no termociclador modelo Veriti (ThermoFisher Scientific).

Tabela 3 – Listagem dos *primers* utilizados

Código rs	**MID**	***Primer* marcado com fluorescência**	***Primer* não-marcado**
rs2307666	MID-1470	6FAM-GAGTCTGACCCTTCATAAGC	gCCATGGTGATATTACGTCCC
rs1610863	MID-777	6FAM-TGGAAGACACGTCCTAAGAG	gTATTCCTCCAGGCTCTTTGC
rs16635	MID-196	6FAM-CCAAGTTCTAGCCATATGGA	gtttcttGACTATCTTCTCTGACCATC
rs1610965	MID-881	6FAM-TTGGCTCCCTATGATAATCC	gtttcTTGTGTTCCCAAAGTTCTCC
rs35451359	MID-3122	6FAM-TCACAAGTCCGGAATACCAG	gAGTTATGGGATGGGAAGGAG
rs140837	MID-548	6FAM-AGTCAGGACTGAAGAAACCC	gtttCAGTAAAACAAGAGCCCGTG
rs1160893	MID-659	6FAM-CACTGCATCAGACTGACTTC	gtttcttGGCTGCTTTGCTTTGAATTG
rs2308203	MID-2011	6FAM-TGAGAAACTAGGAGCTCTGG	gtTTCCTAAGAGCCACTGACAT
rs33974167	MID-2929	6FAM-TGTGATGTGGATAGGCAAGG	gAGGCTCCATTTGTTAAGAGG
rs1160852	MID-593	6FAM-TGCTCACTTTAGTGGAGACC	gtTTGCGTTTAGGTCCCTTCTG
rs1610884	MID-798	6FAM-ACGACAGTGTTCACAAAGAG	gCTGTTGTCTGACCTGTGAAG
rs2067280	MID-1193	6FAM-GCTGGGTAGTTTTTTCCTCC	gtTCCACCATCTACCTTCTATG
rs2308067	MID-1871	6FAM-TTGTAGTCAGAGAGTGTGCC	gAGCCTTTTCCCTAACGTCAC
rs4183	MID-17	6FAM-AGAAACTGCAACCCTCCAAG	GATCCCAGACACTGAAGATG
rs3054057	MID-2538	6FAM-CTCGCAAAGTAGGCAAGTTC	gACACCAACAATCTTGGCACC
rs2307840	MID-1644	6FAM-ACACCACTGAAGATCTGACC	GGTCTAAAGTCAGTGCACAG
rs60612424	MID-3854	VIC-TCACCCTTATTCAGGGTTGC	GCCAGGGATTTAGTGTAGAG
rs3033053	MID-2275	VIC-CTACCTGACTACCACCTATG	gACCCAGCCTATCTGACTTTG
rs16384	MID-94	VIC-TGGTGGCTCATGCACTTTTG	gtttACAGGGTCTCGCTATGATGC
rs34611875	MID-3072	VIC-AGCTTTTTCCGGCAACTCTC	gttTGGATGTGTCTGAGCTCAAC
rs1610859	MID-772	VIC-GTCTCRTTTTCCTGCAGTAG	gtttcttATCCTTCTGCTCACTCTACC
rs3045215	MID-2313	VIC-GCACACATGCAGAAATGCAG	GTTGTAACATCTGTGAGGTC
rs25621	MID-397	VIC-TGGGCTTCTTCTGGGAAAAC	gCCACATTCAGGCGTTTTGTC
rs2307832	MID-1636	VIC-TTAGGAAGAGGTGCTATGGG	gCCTCCTTTGAAGACACACAG
rs16343	MID-51	VIC-AAGATTGGAGGGAAAAGTGC	gCGTCCTCCACCTTCTTTTTC
rs3031979	MID-2431	VIC-AGGAGGAGCTGATAGACTTC	GCAGTGTTGCAACTGATACG
rs34122827	MID-2264	VIC-CTTTGGCTATCCTGTCTCAC	GTAGGAGACCACTCACATTC
rs133052	MID-2256	NED-ATCGAACCGTTCCTAAGGAC	GCAAGAAAAGGAATCCAGGC
rs6490	MID-128	NED-ATCAGGAGACAATCCAGCAG	gTCCAGCCATTCAGACAAAGG
rs4181	MID-15	NED-GGGTTATTTGCCTCATCTCC	gtttctAGGTATTCTCTGTTCCCACG
rs3030826	MID-2241	NED-ACATACACGTGGAAGACTGC	gttACTGTCGACTGATCCAATAG
rs140708	MID-419	NED-CAGGAAAGTATGGCCCATTC	GTCCATGTTTTCTTTGAGCATC
rs1611026	MID-943	NED-TCTTCCTACCCCTGTTAGTG	GACAAGATCACTAGCTTGAC
rs16438	MID-159	NED-ACCAGAGCACTACAGCCTTT	gCAAGGYAGTAACAATGAGGG
rs2308161	MID-2005	NED-TGTAGCGGCAATATAGGCAG	GAAAGTTGTGGCTTAACTGG
rs16687	MID-250	NED-ATGGAGCAGTAAAGCAGCAC	GTCACTTTGGTTTTTGCAGG
rs2307998	MID-1802	NED-ACGGTCAACTTTGTAGCTCC	gCCAGTTGAGAATCACTGCAC
rs2307803	MID-1607	NED-TGTTGCAGAAGAACTCAACC	GATAAGCACCTAACTCCCAG
rs2307930	MID-1734	PET-TTCGTGTTCTCACACTGTCC	GTGCATCCCATACAACTGAC
rs25630	MID-406	PET-TGGCTGCTGTAGATTGTAGG	gACAAATGGACAACGGCCAAG
rs2307582	MID-1386	PET-AGAGGATCATGGAGACCAAC	gtttATGTTCCAAGTCAGCAGCAC
rs2307922	MID-1726	PET-GGTCCAAATGCACCACAATC	GCTCTGCTATTTTGGTTTGC
rs11267926	MID-3626	PET-TGTTGGTTCTCTCCTTTTCC	GGTGACCCCTTCTTTATCTC
rs25584	MID-360	PET-AGATCAACTGCCAATCTGGG	gCTCAAGTGACCAACCCACCT
rs2307799	MID-1603	PET-TTACAATTTCAAGCCTCCGC	GGAGCTGTTAGTCTGAGTAG
rs34541393	MID-2719	PET-GTCAGGAGTCTAGAAACTTC	GGGTGATGAAATGTTCCGAA

Legenda: Identificação do marcador genético no banco de dados dbSNP versão 132 (Código rs); nomenclatura do marcador de acordo com o banco de dados Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms (MID).

Nota: Os *primers* marcados com fluorescência foram divididos em quatro canais (6FAM, VIC, NED e PET). As letras minúsculas dos *primers* não-marcados representam sequências de caudas adicionadas aos *primers*.

Fonte: Pereira et al, 2012.

Os produtos resultantes da reação *multiplex* de PCR foram submetidos à separação em eletroforese capilar no aparelho automático ABI 3500, após adicionar 8,8 µL de formamida e 0,2 µL de padrão de tamanho GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (ThermoFisher Scientific) a 1 µL do produto de PCR.

A análise dos resultados da eletroforese capilar e a leitura dos alelos foram feitas através do software GeneMapper ID v4.1 (ThermoFisher Scientific).

2.5 **Análise estatística**

2.5.1 Critérios de agrupamento

A amostra de pacientes de IC foi dividida em vários grupos, em função de alguns atributos candidatos a fatores de risco coletados dos indivíduos, como gênero (masculino ou feminino), cor de pele (branco, pardo ou negro), faixa etária (acima ou até 60 anos) e gravidade da IC (não-grave ou grave). Após a análise dos AIMs, os pacientes foram também agrupados por ancestralidade (africana, europeia, ameríndia ou miscigenada)

A cor da pele dos indivíduos foi definida segundo autodeclaração dos mesmos em relação à sua cor, sendo identificadas três classes: brancos, pardos e negros.

A idade de corte escolhida foi de 60 anos por se tratar da média de idade encontrada na amostra da população estudada. E os grupos separados por faixa etária foram comparados apenas com relação à incidência de casos graves e não-graves, já que as frequências do polimorfismo G894T e dos AIMs não sofrem influência de acordo com a idade do indivíduo.

O critério utilizado para agrupar indivíduos com IC grave ou não-grave foi a fração de ejeção de sangue no ventrículo esquerdo de cada indivíduo. Foram considerados não-graves os indivíduos com valores iguais ou superiores a 35%. Enquanto aqueles com valores inferiores a 35% foram julgados graves.

O agrupamento segundo a ancestralidade levou em conta a maior proporção de ancestralidade de cada indivíduo. Aqueles com alguma proporção de ancestralidade (africana, europeia ou ameríndia) superior a 70% foram incluídos no grupo nomeado segundo a respectiva ancestralidade. Já aqueles em que nenhuma das três proporções de ancestralidade foram maiores que 70%, foram agrupados como miscigenados.

A amostra de indivíduos saudáveis foi dividida em grupos com base nos atributos gênero (masculino ou feminino) e ancestralidade (africana, europeia, ameríndia ou miscigenada). Visto que os dados de cor de pele não foram coletados para essa amostra e a divisão por faixa etária não foi necessária por ser uma amostra para comparações meramente genéticas.

2.5.2 Testes estatísticos

Os testes realizados para verificar homogeneidade das amostras e diferenças em distribuição de proporções tais como o qui-quadrado de Pearson e o F de ANOVA foram processados através do *software* IBM SPSS v20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Os cálculos das frequências alélicas e genotípicas observadas para os 46 marcadores de ancestralidade e para o polimorfismo G894T, bem como, as análises de diversidade genética, teste exato, distância genética (F_{ST}) par a par, e o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados a partir do *software* Arlequin v3.5 (EXCOFFIER et al., 2005).

O teste exato foi a ferramenta utilizada para apontar a probabilidade de dois grupos comparados serem representativos da mesma população e com isso suas diferentes frequências alélicas do polimorfismo G894T serem frutos de amostragem e não de populações diferentes. Este teste foi descrito por Raymond e Rousset (1995) e Goudet et al. (1996) e foi executado através do Arlequin v3.5.

A fim de associar um alelo ou genótipo do polimorfismo G894T com o prognóstico de IC ou o desenvolvimento da doença para uma forma mais grave, foi utilizado o teste de *odds ratio* (OR) no *software* IBM SPSS v20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp) que gerou valores de chance de acontecimento da doença nos determinados genótipos e seus intervalos de confiança de 95% (95% IC).

As distâncias genéticas (F_{ST}) par a par, bem como os correspondentes valores de probabilidade de não-diferenciação, foram obtidos levando em consideração os 46 marcadores AIMs, segundo método descrito por Reynolds et al. (1983), tal como implementado no *software* acima descrito.

As estimativas das proporções de ancestralidade individual e global das amostras estudadas neste trabalho foram obtidas usando *software* STRUCTURE v2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). Esta análise foi feita com base nos perfis genéticos obtidos para os marcadores informativos de ancestralidade, tendo-se utilizado como referências populações africana, europeia e ameríndia do painel de diversidade HGDP-CEPH (H952) (PEREIRA et al., 2012).

Para obter uma representação gráfica das distâncias (F_{ST}) dos grupos das amostras comparadas, foi realizada a análise do escalonamento multidimensional (MDS), utilizando o *software* IBM SPSS v20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp).

3 RESULTADOS

Análise demográfica das amostras

A média de idade observada em pacientes com IC foi de 62,58 ± 12,79 anos. A média para os pacientes com IC não-grave foi de 62,96 ± 13,74 anos, próxima da média observada para o grupo com IC grave de 62,17 ± 11,78 anos. Já a média de idade dos indivíduos saudáveis incluídos no estudo foi de 42,71 ± 12,68 anos, conforme pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4 – Dados demográficos das amostras

Amostra	**n**	**Média de idade ± dp (anos)**	**Homens (%)**
Pacientes de IC	210	62,58 ± 12,79	66,2
IC Não-grave	107	62,96 ± 13,74	64,5
IC Grave	103	62,17 ± 11,78	68,0
Saudáveis	106	42,71 ± 12,68	39,6

Legenda: desvio padrão (dp).
Nota: A tabela apresenta os valores médios de idade das amostras caso e controle em anos e também informa o percentual de homens presente em cada amostra estudada.
Fonte: O autor, 2015.

Com o intuito de verificar a homogeneidade das amostras, o teste F de ANOVA foi realizado e a diferença de média de idade entre as amostras caso e controle possui significância de p=0,001.

Os perfis de gênero das amostras caso e controle também foram testados para suas proporções. A amostra de pacientes de IC foi composta por 66,2% de homens e 33,8% de mulheres. Enquanto a amostra de indivíduos saudáveis teve um maior percentual de indivíduos do sexo feminino (60,4%) quando comparado aos do sexo masculino (39,6%). Segundo o teste qui-quadrado de Pearson, a diferença dos perfis de gênero encontrada possui significância com o valor de p=0,001.

Dentre os pacientes de IC, que tiveram as respectivas informações de cor de pele coletadas, o maior percentual foi de pessoas de cor de pele branca (60,0%), seguido de negros (25,7%) e pardos (14,3%), como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5 – Informações sobre cor de pele dos pacientes de IC

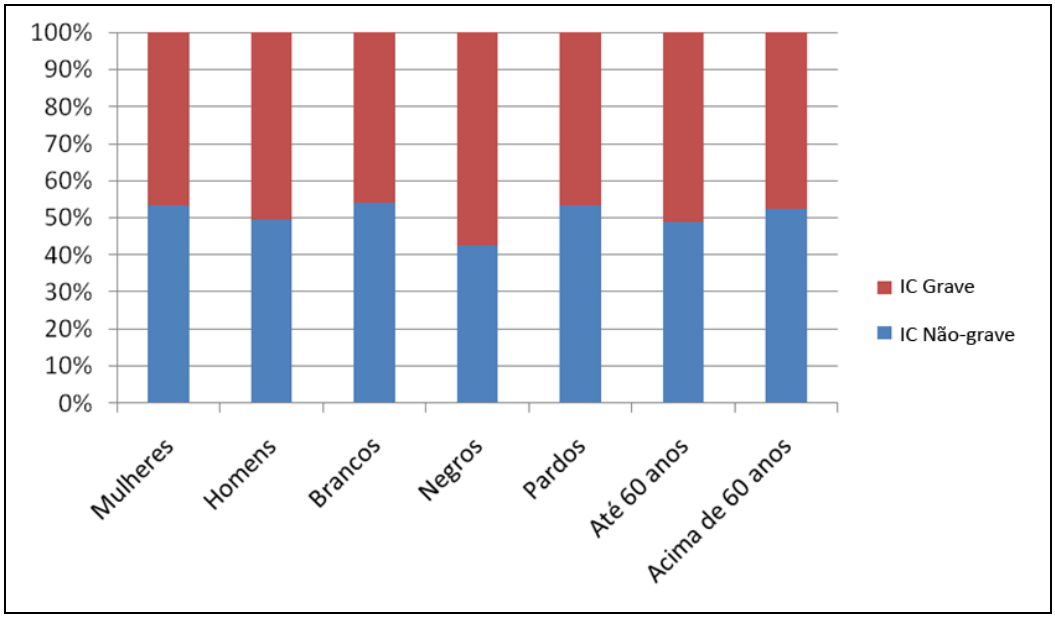
Cor de pele	Pacientes de IC	IC Não-grave	IC Grave
Branca	60,0% (126)	63,6% (68)	56,3% (58)
Negra	25,7% (54)	21,5% (23)	30,1% (31)
Parda	14,3% (30)	15,0% (16)	13,6% (14)
Total	100,0% (210)	100,0% (107)	100,0% (103)

Nota: A tabela indica os percentuais de indivíduos com cor de pele branca, negra ou parda e o número absoluto em parênteses. Nas colunas encontram-se a amostra de pacientes de IC e seus grupos separados por gravidade da doença.
Fonte: O autor, 2015.

O teste de qui-quadrado de Pearson foi realizado para determinar se houve diferença significativa nos perfis de cor de pele dos grupos de IC de gravidades distintas. O resultado do teste apontou a ausência de significância na diferença com o um valor de p=0,361.

Com relação às proporções de casos de IC não-grave e grave nos grupos classificados por gênero, cor de pele e faixa etária, testes de qui-quadrado de Pearson também foram executados. Os resultados não indicaram significância nas diferenças de proporções, que podem ser vistas na figura 6.

Figura 6 – Distribuição dos casos não-graves e graves de IC entre grupos

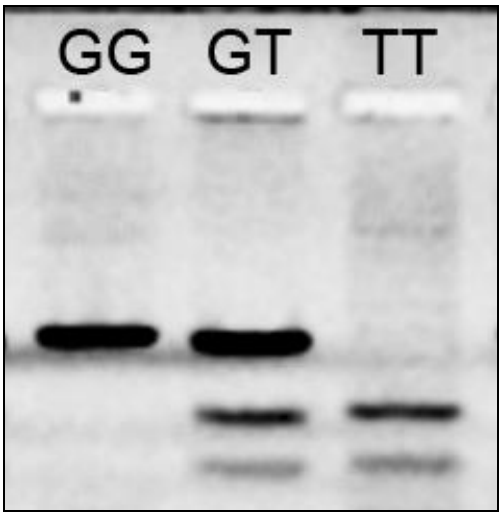


Nota: A figura representa as proporções dos casos de IC grave (vermelho) e não-grave (azul) em cada grupo organizado por gênero, cor de pele e faixa etária.
Fonte: O autor, 2015.

3.2 **Análise molecular**

Todas os indivíduos das amostras de pacientes e controles tiveram seus genótipos para o polimorfismo G894T detectados através da visualização em eletroforese em gel de agarose conforme pode ser visto na figura 7.

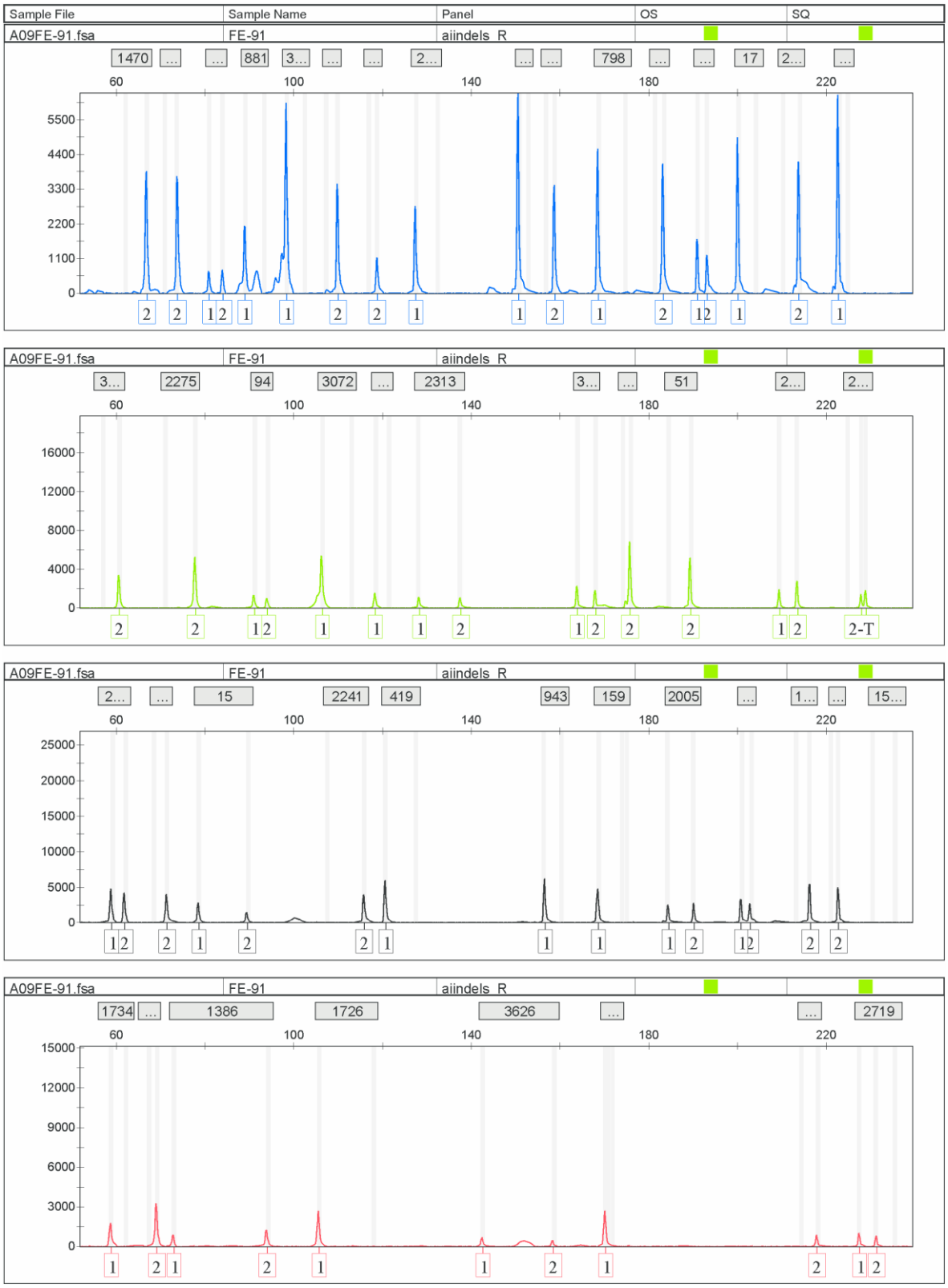
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose para determinação do polimorfismo G894T



Nota: Resultado de uma eletroforese em gel de agarose 3,5% dos produtos de amplificação do polimorfismo G894T do gene eNOS, digeridos pela enzima de restrição *MboI*. Na coluna da esquerda, o fragmento único (206 pb) indica o genótipo GG; na coluna do meio, os três fragmentos (206 pb, 119 pb e 87 pb) indicam o genótipo GT; e na coluna da direita, os dois fragmentos (119 pb e 87 pb) indicam a presença do genótipo TT.
Fonte: O autor, 2015.

Já a detecção dos alelos dos AIMs foi feita através de PCR *multiplex* seguida de eletroforese em capilar no aparelho ABI 3500 (ThermoFisher Scientific) e leitura no *software* de análise GeneMapper v4.1 (ThermoFisher Scientific), conforme pode ser visto na figura 8.

Figura 8 – Leitura de eletroforese em capilar dos marcadores AIMs



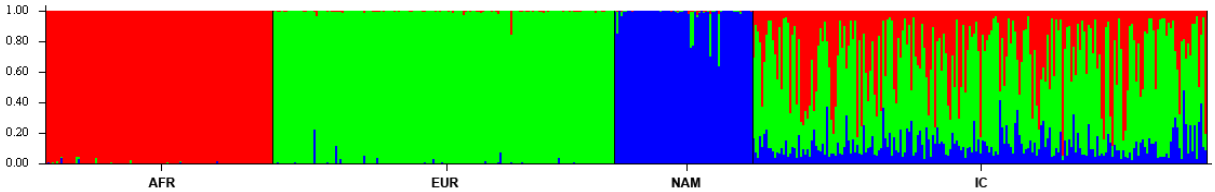
Nota: A figura ilustra a representação dos alelos presentes nos 46 marcadores de ancestralidade feita pelo *software* GeneMapper v4.1. O eixo X representa o tamanho dos fragmentos e, o eixo Y, a intensidade da fluorescência. As quatro linhas com picos em cores diferentes indicam o uso de diferentes fluorescências. As caixas em cor cinza indicam a localização de cada *locus*. Os picos indicam a presença do alelo específico em cada *locus*.

Fonte: O autor, 2015.

3.3 **Identificação dos perfis de AIMs**

Após a interpretação da leitura dos alelos dos marcadores AIMs, as informações alélicas de cada indivíduo foram processadas pelo *software* STRUCTURE v2.3.4, comparando cada perfil alélico a três populações referências (africana, europeia e ameríndia). Os resultados das amostras caso e controle podem ser vistos nas figuras de 9 a 12.

Figura 9 – Estimativas de ancestralidade individuais de pacientes de IC

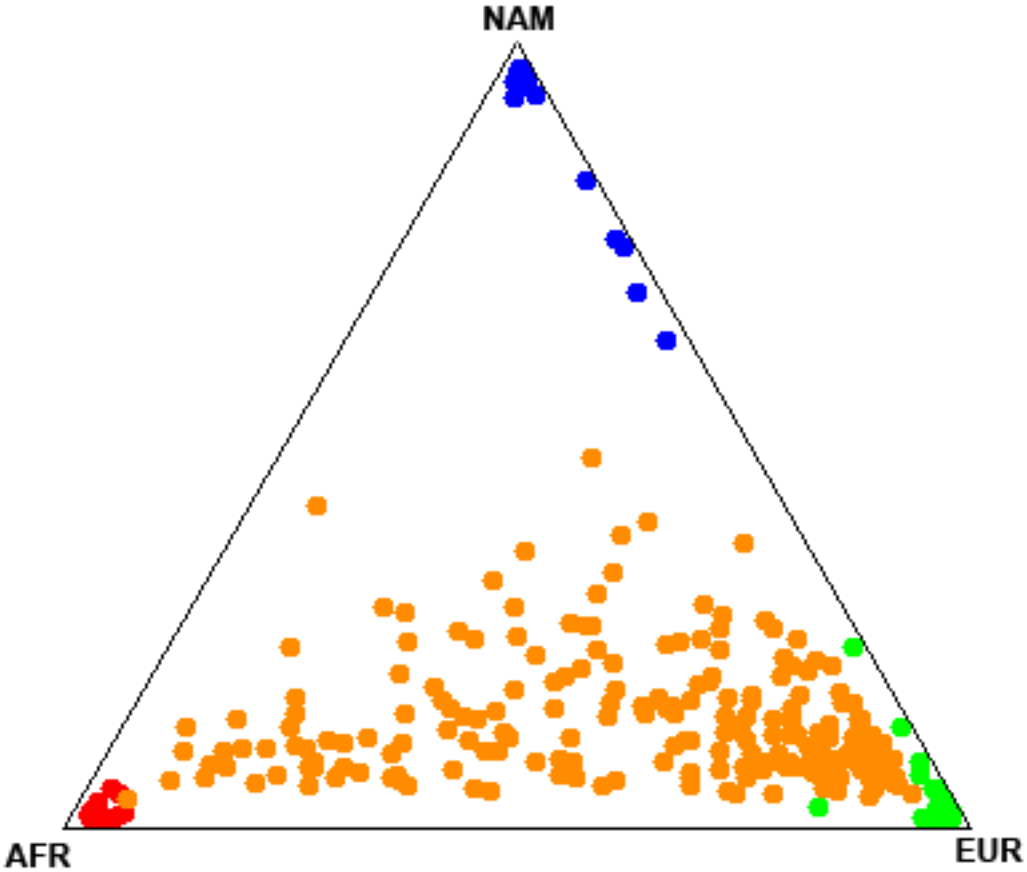


Legenda: População referência de africanos (AFR); população referência de europeus (EUR); população referência de ameríndios (NAM); amostra de pacientes de IC (IC).

Nota: Ilustração gerada pelo STRUCTURE v2.3.4 a partir da comparação das informações alélicas de cada indivíduo com três populações bem estabelecidas como referência pelo painel HGDP-CEPH. O eixo X indica a proporção de ancestralidade. Cada coluna indica um indivíduo da amostra analisada. Essa coluna pode ser segmentada em três cores (vermelho: ancestralidade africana; verde: ancestralidade europeia; e azul: ancestralidade ameríndia) de acordo com os valores de proporções de ancestralidade de cada indivíduo.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 10 – Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes à amostra de pacientes de IC

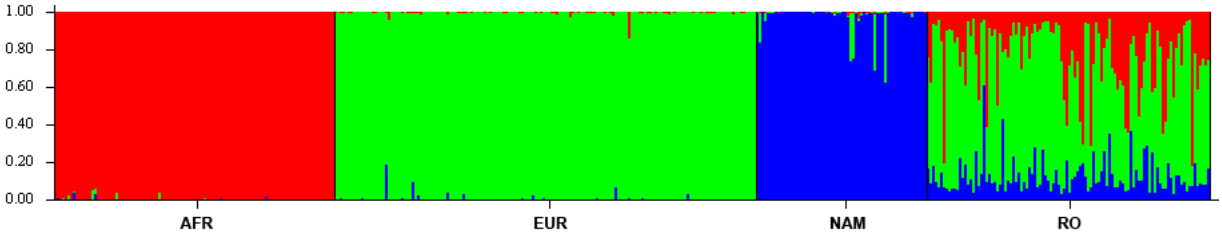


Legenda: População referência de africanos (AFR); população referência de europeus (EUR); população referência de ameríndios (NAM). Indivíduos da população referência africana estão representados em vermelho; europeus em verde; ameríndios em azul; e pacientes de IC em laranja.

Nota: Ilustração gerada pelo STRUCTURE v2.3.4 a partir da comparação das informações alélicas de cada indivíduo com três populações bem estabelecidas como referência pelo painel HGDP-CEPH. A proximidade a cada vértice do triângulo indica o grau de similaridade com a população referência.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 11 – Estimativas de ancestralidade individuais de indivíduos saudáveis

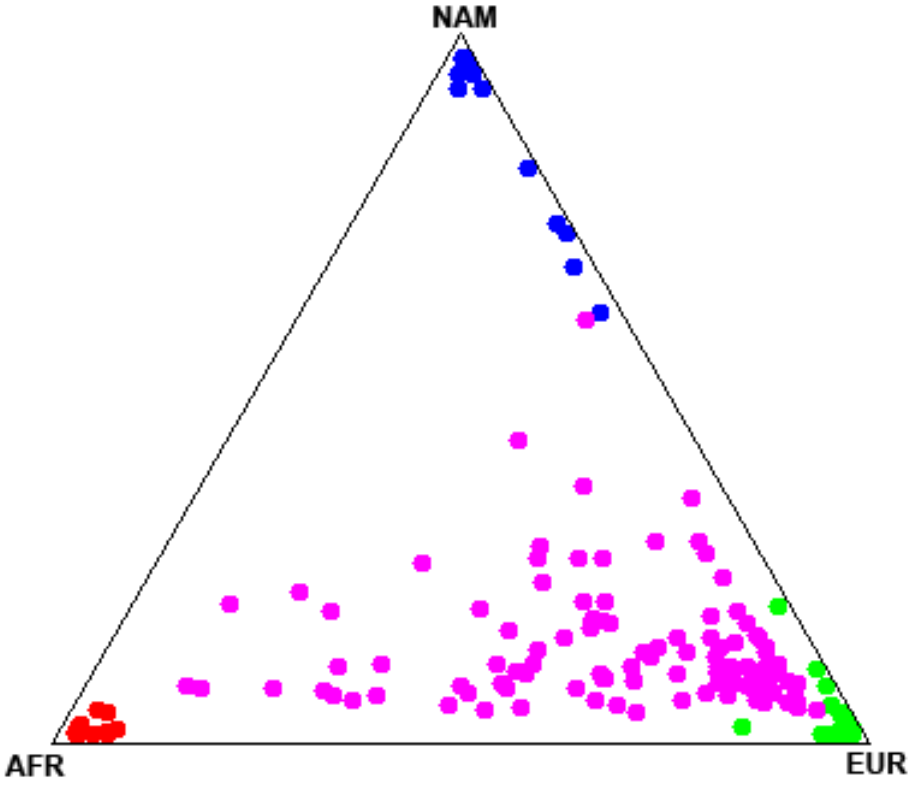


Legenda: População referência de africanos (AFR); população referência de europeus (EUR); população referência de ameríndios (NAM); amostra de indivíduos saudáveis (RO).

Nota: Ilustração gerada pelo STRUCTURE v2.3.4 a partir da comparação das informações alélicas de cada indivíduo com três populações bem estabelecidas como referência pelo painel HGDP-CEPH. O eixo X indica a proporção de ancestralidade. Cada coluna indica um indivíduo da amostra analisada. Essa coluna pode ser segmentada em três cores (vermelho: ancestralidade africana; verde: ancestralidade europeia; e azul: ancestralidade ameríndia) de acordo com os valores de proporções de ancestralidade de cada indivíduo.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 12 – Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes à amostra de saudáveis



Legenda: População referência de africanos (AFR); população referência de europeus (EUR); população referência de ameríndios (NAM). Indivíduos da população referência africana estão representados em vermelho; europeus em verde; ameríndios em azul; e indivíduos saudáveis em violeta.

Nota: Ilustração gerada pelo STRUCTURE v2.3.4 a partir da comparação das informações alélicas de cada indivíduo com três populações bem estabelecidas como referência pelo painel HGDP-CEPH. A proximidade a cada vértice do triângulo indica o grau de similaridade com a população referência.

Fonte: O autor, 2015.

A amostra de pacientes de IC teve por média dos indivíduos incluídos na amostra, 57,1% de ancestralidade europeia, seguida de 30,2% e 12,7% de ancestralidades africana e ameríndia, respectivamente. Já a amostra de indivíduos saudáveis apresentou 63,2% de ancestralidade europeia, 24,0% africana e 12,8% ameríndia (tabela 6).

Tabela 6 – Proporções de ancestralidade em cada grupo de amostras

	N	Ancestralidade Africana	Ancestralidade Europeia	Ancestralidade Ameríndia
Pacientes	210	30,2%	57,1%	12,7%
Brancos	126	19,0%	68,3%	12,7%
Negros	54	56,8%	31,0%	12,3%
Pardos	30	29,3%	57,2%	13,5%
GG	134	33,1%	53,9%	13,0%
GT	67	26,1%	61,5%	12,4%
TT	9	17,1%	72,4%	10,5%
Homens	139	27,3%	59,7%	13,0%
Mulheres	71	35,8%	52,1%	12,1%
IC Não-grave	107	27,6%	59,4%	13,0%
IC Grave	103	32,9%	54,7%	12,4%
Saudáveis	106	24,0%	63,2%	12,8%
GG	51	27,2%	58,9%	13,9%
GT	49	21,1%	67,0%	12,0%
TT	6	20,6%	69,5%	9,9%
Homens	42	25,7%	61,8%	12,6%
Mulheres	64	22,9%	64,2%	12,9%

Nota: A tabela indica em percentuais as ancestralidades das amostras caso e controle e respectivos subgrupos determinados por cor de pele, genótipo do polimorfismo G894T, gênero e gravidade da IC.
Fonte: O autor, 2015.

3.4 **Comparação dos perfis ancestrais**

Com base nas informações alélicas dos marcadores AIMs das amostras de pacientes de IC e de indivíduos saudáveis, o cálculo de distanciamento genético F_{ST} foi realizado com o uso do *software* Arlequin v3.5. A tabela suplementar com todos os valores de distância pode ser vista no apêndice A. Além disso, valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs foram obtidos para comparações de grupos de interesse a fim de inferir se um grupo possui distância significativa de outro grupo analisado, conforme demonstrado nas tabelas 7 a 14.

Tabela 7 – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs de populações de referência

	Africanos	**Europeus**	**Ameríndios**
Africanos		+	+
Europeus	<0,01		+
Ameríndios	<0,01	<0,01	

Legenda: População referência do painel HGDP-CEPH da África (africanos); população referência do painel HGDP-CEPH da Europa (europeus); população referência do painel HGDP-CEPH de nativos americanos (ameríndios); + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Segundo os valores de probabilidade de não-diferenciação com base nas distâncias genéticas F_{ST}, as amostras caso e controle não apresentaram diferenças significativas (p=0,28), vide tabela 8.

Tabela 8 – Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs entre pacientes e saudáveis

	Pacientes de IC	**Indivíduos Saudáveis**
Pacientes de IC		-
Indivíduos Saudáveis	0,23	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Tabela 9 – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes segundo a cor de pele

	IC Brancos	**IC Negros**	**IC Pardos**
IC Brancos		+	-
IC Negros	<0,01		+
IC Pardos	0,27	<0,01	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Tabela 10 –Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes segundo a gravidade da IC

	Pacientes de IC Não-grave	**Pacientes de IC Grave**
Pacientes de IC Não-grave		-
Pacientes de IC Grave	0,50	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Tabela 11 –Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes segundo o gênero

	Pacientes Homens	**Pacientes Mulheres**
Pacientes Homens		+
Pacientes Mulheres	0,01	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Tabela 12 –Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de saudáveis segundo o gênero

	Homens Saudáveis	**Mulheres Saudáveis**
Homens Saudáveis		-
Mulheres Saudáveis	0,80	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Tabela 13 –Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes e saudáveis do sexo masculino

	Pacientes Homens	**Homens Saudáveis**
Pacientes Homens		-
Homens Saudáveis	0,64	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

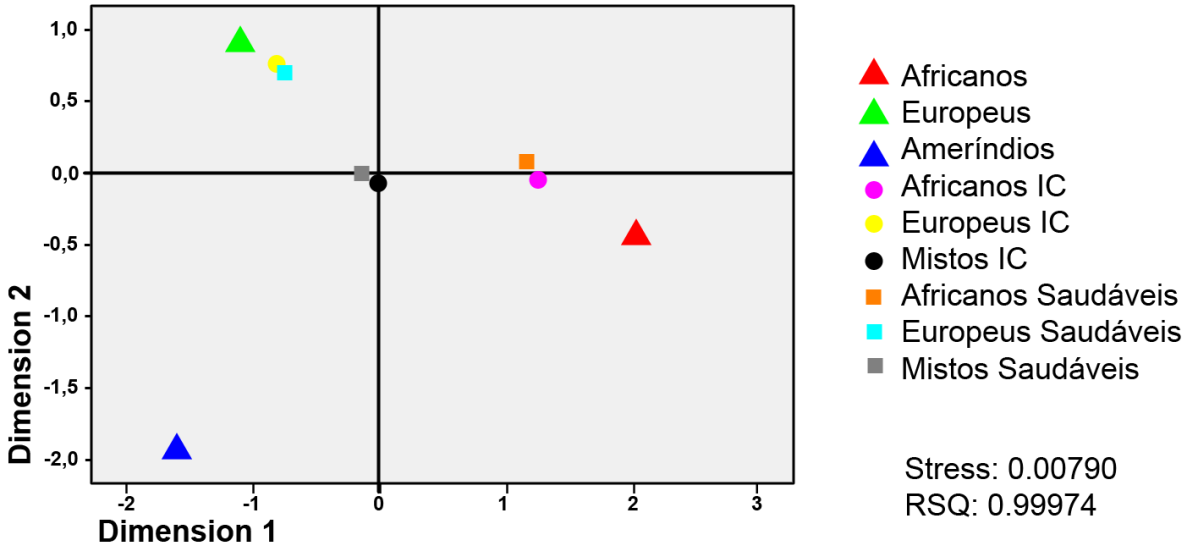
Tabela 14 –Valor de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs dos grupos de pacientes e saudáveis do sexo feminino

	Pacientes Mulheres	**Mulheres Saudáveis**
Pacientes Mulheres		+
Mulheres Saudáveis	<0,01	

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não-significativa).
Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.
Fonte: O autor, 2015.

Os valores de F_{ST} entre as populações referência do painel HGDP-CEPH da África, Europa e Nativos Americanos, além dos grupos de pacientes de IC e indivíduos saudáveis ambos classificados por ancestralidade (africana, europeia ou miscigenada) foram processados pelo *software* IBM SPSS v20 para construção de um gráfico multidimensional de escalonamento (MDS), conforme pode ser visto na figura 13. A medida de stress, utilizada para mensurar a qualidade do ajuste da análise do MDS, foi de 0,00790.

Figura 13 – Gráfico MDS das amostras estudadas



Legenda: População referência do painel HGDP-CEPH da África (africanos); população referência do painel HGDP-CEPH da Europa (europeus); população referência do painel HGDP-CEPH de nativos americanos (ameríndios); grupo de pacientes de IC com mais de 70% de ancestralidade africana (africanos IC); grupo de pacientes de IC com mais de 70% de ancestralidade europeia (europeus IC); grupo de pacientes de IC sem uma ancestralidade superior a 70% (mistos IC); grupo de indivíduos saudáveis com mais de 70% de ancestralidade africana (africanos saudáveis); grupo de indivíduos saudáveis com mais de 70% de ancestralidade europeia (europeus saudáveis); grupo de indivíduos saudáveis sem uma ancestralidade superior a 70% (mistos saudáveis).

Nota: Gráfico de escalonamento multidimensional (MDS) gerado pelo IBM SPSS v20 a partir da comparação dos valores de distância genética F_{ST} dos AIMs..

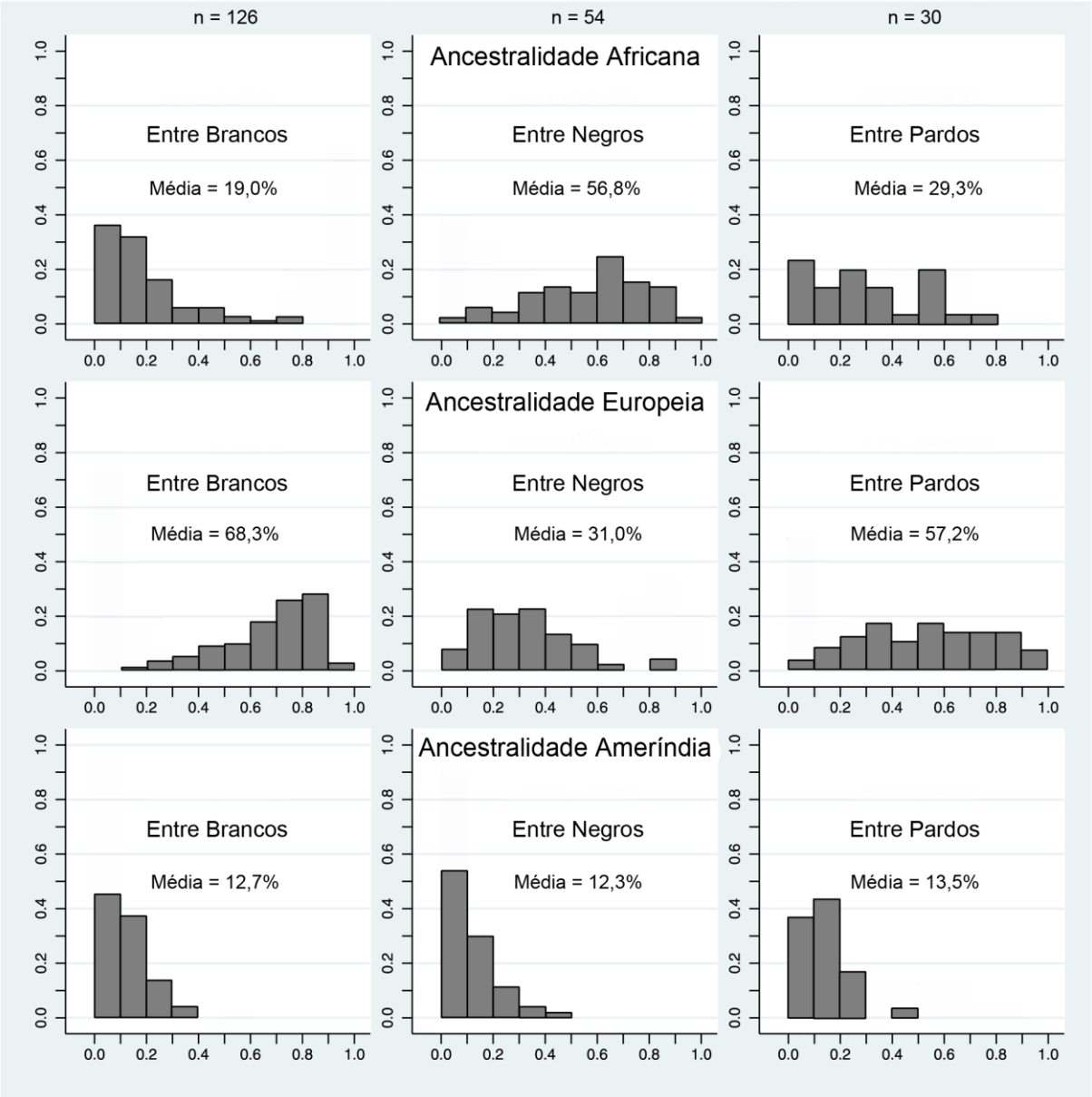
Fonte: O autor, 2015.

3.5 **A cor de pele como indicador de ancestralidade**

Na amostra de pacientes de IC, em que a informação de autodeclaração de cor de pele esteve presente, foi possível tentar estabelecer um paralelo entre a cor de pele e as proporções de ancestralidade, conforme demonstrado na figura 14. Nela pode ser observado que entre pacientes de cor de pele branca, as ancestralidades africana e ameríndia apresentaram valores baixos, tendo a maioria dos indivíduos compreendidos na faixa de 0% a 20%, enquanto que a europeia foi mais prevalente dentre os pacientes brancos, estando em sua maioria compreendida na faixa de 70% a 90%. Já em negros, a ancestralidade africana foi mais predominante possuindo valores mais frequentes entre 60% e 70%, seguida da europeia, frequente no intervalo de 10% a 40% e da ameríndia, em que a maior parte dos pacientes negros apresentou valores baixos de 0% a 10%. Os pacientes autodeclarados pardos demonstraram um padrão de forte miscigenação no histograma apresentado pela figura 14, em

que a ancestralidade africana foi bem distribuída na faixa de 0% a 60%, a europeia entre 20% e 90% e a ameríndia foi mais frequente em baixas proporções de 0% a 20%.

Figura 14 – Histogramas de distribuição das ancestralidades genéticas africana, europeia e ameríndia estratificadas entre pacientes com cor de pele autodeclarada



Nota: Os nove histogramas apresentados pela figura representam em cada barra o percentual de pacientes do grupo (eixo Y) que possui a proporção da determinada ancestralidade compreendida num intervalo de 10% cada (eixo X). Os três histogramas da esquerda representam os pacientes autodeclarados brancos, os três do meio, negros, e os três da direita, pardos. Os três histogramas da parte superior indicam frequências de ancestralidade africana entre pacientes, os três do meio, ancestralidade europeia, e os três inferiores, ancestralidade ameríndia.

Fonte: O autor, 2015.

Apesar de indicar uma tendência de ancestralidade, os dados de cor de pele em muitos momentos da figura 14 apresentam sobreposição de valores de ancestralidade especialmente no que se refere aos pacientes autodeclarados pardos e com relação a indicador de ancestralidade ameríndia.

3.6 **Levantamento das frequências do polimorfismo G894T**

Com base nos resultados de genotipagem, foi possível determinar as frequências alélicas e genotípicas, conforme observado nas tabelas 15 e 16. As frequências alélicas do polimorfismo G894T para os alelos G e T foram de 79,76% e 20,24% para os pacientes com IC e de 71,23% e 28,77% para os indivíduos saudáveis, respectivamente. Já as frequências genotípicas foram de 63,81% para o genótipo GG, 31,90% para GT e 4,29% para TT em pacientes de IC. Em indivíduos saudáveis, o genótipo GG foi um pouco menos frequente (48,11%), seguido de GT (46,23%) e TT (5,66%).

As genotipagens obtidas também foram empregadas para cálculos de parâmetros estatísticos de diversidade genética e comparação populacional, utilizando o software Arlequin v3.5. Os parâmetros de diversidade gênica das amostras de pacientes com IC são também apresentados nas tabelas 15 e 16. As heterozigosidades observadas e esperadas para o locus, de acordo com o teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg, não apresentaram diferenças significativas para os agrupamentos estabelecidos.

Tabela 15 –Distribuição das frequências do polimorfismo G894T em pacientes de IC e seus grupos

Pacientes de IC			Frequências genotípicas			Frequências alélicas		Diversidade gênica/ EHW (E)		
Grupos		**N**	**GG**	**GT**	**TT**	**G**	**T**	**HE**	**HO**	**p**
Geral		210	63,81%	31,90%	4,29%	79,76%	20,24%	32,36%	31,90%	0,83
Sexo	**Mulheres**	71	67,61%	28,17%	4,22%	81,69%	18,31%	30,13%	28,17%	0,69
	Homens	139	61,87%	33,81%	4,32%	78,78%	21,22%	33,56%	33,81%	1,00
Etnia	**Brancos**	126	59,52%	35,71%	4,76%	77,38%	22,62%	35,14%	35,71%	1,00
	Negros	54	72,22%	24,07%	3,70%	84,26%	15,74%	26,77%	24,07%	0,60
	Pardos	30	66,67%	30,00%	3,33%	81,67%	18,33%	30,45%	30,00%	1,00
Gravidade	**IC não-grave**	107	67,29%	25,23%	7,48%	79,91%	20,09%	32,26%	25,23%	0,33
	IC grave	103	60,19%	38,84%	0,97%	79,61%	20,39%	32,62%	38,83%	0,07
Ancestralidade	**Africana**	20	80,00%	20,00%	0,00%	90,00%	10,00%	18,46%	20,00%	1,00
	Europeia	82	54,88%	37,80%	7,32%	73,78%	26,22%	38,93%	37,80%	0,78
	Miscigenada	108	67,59%	29,63%	2,78%	82,41%	17,59%	29,13%	29,63%	1,00

Legenda: Número de indivíduos na amostra (N); parâmetros de diversidade gênica (HE: heterozigosidade esperada; HO: heterozigosidade observada); valor de significância para teste exato de Fisher (E) para equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (p).

Nota: Padrão de heterozigosidade, teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores de significância também estão mostrados na tabela.

Fonte: O autor, 2015.

Tabela 16 –Distribuição das frequências do polimorfismo G894T em indivíduos saudáveis e seus grupos

Indivíduos Saudáveis			**Frequências genotípicas**			**Frequências alélicas**		**Diversidade gênica/ EHW (E)**		
Grupos		**N**	**GG**	**GT**	**TT**	**G**	**T**	**HE**	**HO**	**p**
Geral		106	48,11%	46,23%	5,66%	71,23%	28,77%	41,18%	46,23%	0,24
Sexo	**Mulheres**	64	42,19%	48,44%	9,37%	66,41%	33,59%	44,97%	48,44%	0,58
	Homens	42	57,14%	42,86%	0,00%	78,57%	21,43%	34,08%	42,86%	0,16
Ancestralidade	**Africana**	4	75,00%	25,00%	0,00%	87,50%	12,50%	25,00%	25,00%	1,00
	Europeia	48	45,83%	47,92%	6,25%	69,79%	30,21%	42,61%	47,92%	0,50
	Miscigenada	54	48,15%	46,30%	5,56%	71,30%	28,70%	41,31%	46,30%	0,51

Legenda: Número de indivíduos na amostra (N); parâmetros de diversidade gênica (HE: heterozigosidade esperada; HO: heterozigosidade observada); valor de significância para teste exato de Fisher (E) para equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (p).

Nota: Padrão de heterozigosidade, teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores de significância também estão mostrados na tabela.

Fonte: O autor, 2015.

3.7 **Comparações do polimorfismo G894T entre grupos**

O teste exato foi utilizado com o intuito de se avaliar possíveis níveis de diferenciação entre as amostras e os grupos, com base nas distribuições das frequências genotípicas do polimorfismo G894T. Os resultados do teste evidenciaram diferença significativa entre diversos pares, destacando-se: casos x controles (p=0,03); mulheres com IC x mulheres saudáveis (p=0,01); e entre pacientes com IC não-grave x IC grave (p=0,01). Os valores podem ser observados na tabela 17.

Tabela 17 –Valores de p para o teste exato de comparação das frequências genotípicas do polimorfismo G894T das amostras e grupos

	IC Geral	**IC Mulheres**	**IC Homens**	**IC Brancos**	**IC Negros**	**IC Pardos**	**IC Não-grave**	**IC Grave**	**IC Africanos**	**IC Europeus**	**IC Mistos**	**RJ Saudáveis**	**RJ Mulheres**	**RJ Homens**	**RJ Africanos**	**RJ Europeus**	**RJ Mistos**
IC Geral		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
IC Mulheres	0,88		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
IC Homens	0,94	0,71		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IC Brancos	0,76	0,55	0,93		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IC Negros	0,52	0,89	0,43	0,27		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
IC Pardos	1,00	1,00	0,93	0,88	0,83		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IC Não-grave	0,29	0,71	0,25	0,19	0,68	0,78		+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
IC Grave	0,20	0,15	0,29	0,26	0,09	0,34	0,01		-	-	-	-	+	-	-	-	-
IC Africanos	0,40	0,62	0,34	0,26	0,87	0,71	0,51	0,27		-	-	+	+	-	-	+	+
IC Europeus	0,27	0,27	0,45	0,66	0,14	0,58	0,17	0,09	0,13		-	-	-	-	-	-	-
IC Mistos	0,74	0,87	0,61	0,42	0,72	1,00	0,27	0,26	0,66	0,13		+	+	-	-	+	+
RJ Saudáveis	0,03	0,04	0,11	0,21	0,01	0,17	0,01	0,06	0,03	0,52	0,01		-	-	-	-	-
RJ Mulheres	0,01	0,01	0,02	0,06	0,01	0,10	<0,01	0,01	0,01	0,31	<0,01	0,55		-	-	-	-
RJ Homens	0,23	0,15	0,34	0,41	0,06	0,23	0,03	0,79	0,09	0,23	0,21	0,27	0,08		-	-	-
RJ Africanos	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,74	1,00	0,69	0,55	0,63		-	-
RJ Europeus	0,06	0,05	0,14	0,26	0,02	0,20	0,02	0,06	0,04	0,55	0,03	0,96	0,84	0,25	0,69		-
RJ Mistos	0,08	0,07	0,21	0,33	0,03	0,29	0,03	0,10	0,05	0,67	0,04	1,00	0,69	0,32	0,69	1,00	

Legenda: Pacientes de IC do estudo (IC geral); mulheres com IC (IC mulheres); homens com IC (IC homens); pacientes com IC de cor de pele branca (IC brancos); pacientes negros com IC (IC negros); pacientes pardos com IC (IC pardos); pacientes com IC de gravidade não-grave (IC não-grave); pacientes com IC grave (IC grave); pacientes de IC com ancestralidade africana (IC africanos); pacientes de IC com ancestralidade europeia (IC europeus); pacientes de IC com ancestralidade miscigenada (IC mistos); indivíduos saudáveis do estudo (RJ saudáveis); mulheres saudáveis (RJ mulheres); homens saudáveis (RJ homens); indivíduos saudáveis com ancestralidade africana (RJ africanos); indivíduos saudáveis com ancestralidade europeia (RJ europeus); indivíduos saudáveis com ancestralidade miscigenada (RJ mistos).

Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância com base no teste exato para diferenciação populacional. Todos os valores de p<0,05 encontrados nos testes múltiplos tiveram o teste exato refeito para uma comparação exclusiva 2x2 entre os grupos e todas as significâncias foram mantidas.

Fonte: O autor, 2015.

3.8 **Testes de associação do polimorfismo G894T**

3.8.1 Associação do desenvolvimento de IC em controles

O teste foi realizado em função da ausência (GG) ou presença (GT+TT) do alelo T porque o número de indivíduos com o genótipo TT presentes no estudo foi muito baixo, impossibilitando a análise de OR por genótipos (GG, GT ou TT) em alguns casos. Pelo mesmo motivo, não foi realizado o teste de OR para ausência (TT) ou presença (GT+GG) do alelo G. O valor de frequência de indivíduos TT só pôde ser testado para OR quando combinado com GG ou GT.

A frequência do genótipo GG quando foi combinada com a frequência de TT não apresentou níveis de associação com IC (homozigotos GG+TT x heterozigoto GT). Já quando a frequência do genótipo TT foi combinada com a de GT, os resultados do teste de OR para amostras de pacientes e de controles evidenciaram uma chance aumentada de IC em indivíduos com genótipo GG (OR: 1,901; 95% IC: 1,184-3,054). Enquanto que naqueles com genótipos GT e TT, a chance é diminuída (OR: 0,526; 95% IC: 0,327-0,845).

O teste foi ajustado para as variáveis disponíveis que são gênero e ancestralidade. Quando ajustado para gênero, a associação manteve-se apenas nas mulheres (GG OR: 2,860; 95% IC: 1,417-5,772). Já quando ajustado para ancestralidade, a associação manteve-se apenas nos indivíduos pertencentes aos grupos denominados miscigenados (GG OR: 2,246; 95% IC: 1,151-4,384). Todos os valores encontrados no teste podem ser observados na tabela 18.

Tabela 18 –Valores de *odds ratio* e intervalos de confiança para associação de genótipos ao desenvolvimento de IC

	GG		GT+TT	
	OR	**95% IC**	**OR**	**95% IC**
Geral	1,901	1,184-3,054	0,526	0,327-0,845
Africanos	1,333	0,108-16,480	0,750	0,061-9,270
Europeus	1,437	0,703-2,939	0,696	0,340-1,422
Miscigenados	2,246	1,151-4,384	0,445	0,228-0,869
Homens	1,217	0,604-2,452	0,822	0,408-1,655
Mulheres	2,860	1,417-5,772	0,350	0,173-0,706

Legenda: OR: valor de *odds ratio*; 95% IC: valores referentes ao intervalo de 95% de confiança do teste.
Nota: A tabela indica os valores de OR e seus respectivos intervalos de confiança para associação do genótipo com a IC. Valores de OR inferiores a 1 indicam chance diminuída do desenvolvimento da doença no respectivo genótipo, valores superiores a 1, chance aumentada. Intervalos de confiança que não abranjam o valor 1 indicam significância do OR ($p<0,05$).
Fonte: O autor, 2015.

3.8.2 Associação do desenvolvimento da forma grave da IC em não-graves

Da mesma forma como na associação do desenvolvimento de IC em controles, o genótipo TT precisou ser analisado pelo OR em conjunto com outro genótipo, seja ele GT ou GG, devido a sua baixa frequência na amostra estudada.

O genótipo TT ao ser analisado em conjunto com GT, contra o genótipo GG, não apresentou associação significativa a uma maior chance de agravamento do quadro de IC. Contudo, quando realizado em conjunto com o genótipo GG, o teste de OR resultou em valores de chance aumentada de IC grave em pacientes com genótipo GT (OR: 1,881; 95% IC: 1,044-3,391) e diminuída para aqueles portadores dos genótipos GG+TT (OR 0,532; 95% IC: 0,295-0,958). Porém, ao realizar os testes nos grupos separados pelas variáveis de gênero e ancestralidade, a significância foi perdida, conforme visualizado na tabela 19.

Tabela 19 –Valores de *odds ratio* e intervalos de confiança para associação de genótipos ao desenvolvimento da forma grave da IC

	GG+TT		GT	
	OR	**95% IC**	**OR**	**95% IC**
Geral	0,532	0,295-0,958	1,881	1,044-3,391
Africanos	1,000	0,112-8,947	1,000	0,112-8,947
Europeus	0,449	0,181-1,117	2,226	0,895-5,537
Miscigenados	0,497	0,211-1,171	2,012	0,854-4,741
Homens	0,570	0,279-1,162	1,754	0,860-3,577
Mulheres	0,467	0,163-1,339	2,143	0,747-6,149

Legenda: OR: valor de *odds ratio*; 95% IC: valores referentes ao intervalo de 95% de confiança do teste.

Nota: A tabela indica os valores de OR e seus respectivos intervalos de confiança para associação do genótipo ao desenvolvimento da forma grave da IC. Valores de OR inferiores a 1 indicam proteção do genótipo à forma grave da IC, valores superiores a 1, risco aumentado. Intervalos de confiança que não abranjam o valor 1 indicam significância do OR ($p<0,05$).

Fonte: O autor, 2015.

4 **DISCUSSÃO**

Polimorfismos genéticos são alvos de frequentes estudos que visam estabelecer associação com susceptibilidade e prognósticos de doenças em geral. Os relatos na literatura envolvendo polimorfismos e IC são cada vez mais numerosos (MCNAMARA et al., 2003; MCNAMARA et al., 2009; VELLOSO et al., 2010; MARTINELLI et al., 2012; TARDIN et al., 2013). O polimorfismo genético que tem sido o maior alvo é o G894T, presente no gene que codifica a enzima eNOS. Recentes resultados demonstraram que as frequências dos alelos do marcador G894T variam dependendo da população analisada (RAI et al., 2014). Visto que os principais trabalhos realizados são baseados em populações bem definidas e com pouca miscigenação como, por exemplo, os estudos GRAHF e GRACE (MCNAMARA et al., 2003; MCNAMARA et al., 2009), o presente estudo utilizou-se dos marcadores genéticos AIMs, ferramenta capaz de discriminar indivíduos por ancestralidade, visando evitar associação espúria entre o G894T e a IC decorrente de possíveis variações de ancestralidade entre as amostras do estudo.

Adicionalmente, com o objetivo de avaliar a associação entre o G894T e a IC na população brasileira, o presente estudo investigou as frequências alélicas e genotípicas do G894T numa amostra de 210 indivíduos com IC, acompanhados pela seção de cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, e 106 indivíduos saudáveis sem registro de IC ou DCVs. Ciente de que as DCVs possuem padrão multifatorial quanto a sua origem, um estudo dessa natureza visa contribuir para a identificação de variáveis genéticas que expliquem os mecanismos moleculares envolvidos com o desenvolvimento da IC e com o padrão de resposta individual à doença.

Os resultados obtidos nesse trabalho apontaram algumas diferenças significativas que serão abordadas e discutidas em seções a seguir.

4.1 **Dados gerais das amostras**

As amostras de pacientes com IC e de indivíduos saudáveis tiveram diferentes médias de idade ($p<0,05$). A chance dessa seleção de amostras com características diferentes quanto à idade diminuir o impacto da associação é pouco provável, pois mesmo o número de internações por IC sendo maior na faixa etária da amostra de pacientes (50 a 69 anos), o

percentual de indivíduos da população do Estado do Rio de Janeiro que foram internados é de apenas 0,32%, segundo dados cruzados do IBGE e do DATASUS para o ano de 2010. Isso representa uma probabilidade muito baixa de associação espúria na amostra de saudáveis do presente estudo que conta com 106 indivíduos, apesar da IC ser uma doença que possui incidência maior em idades mais avançadas (JUGDUTT, 2010).

Indivíduos do sexo masculino estiveram em maioria na amostra de pacientes de IC (66,2%), enquanto a amostra de saudáveis foi composta majoritariamente de mulheres (60,2%), verificando-se diferença significativa nos dois perfis de amostras ($p<0,05$). Visto que não houve preferência de gênero no acolhimento dos indivíduos para o estudo, os percentuais da amostra de indivíduos saudáveis acompanharam o perfil da população geral do estado do Rio de Janeiro em que as mulheres na faixa etária de 30 a 49 anos são a maioria da população (52,7%) segundo o IBGE (2010). Além disso, na amostra de pacientes, observa-se que os resultados para a frequência de gênero observados corroboram com a literatura que indica uma maior incidência IC em homens (STROMBERG e MARTENSSON, 2003).

Apenas indivíduos pertencentes à amostra de pacientes de IC tiveram a informação de cor de pele colhida. Dentre os mesmos, não foi encontrada diferença significativa quanto às ancestralidades segundo os AIMs ($p>0,05$), reafirmando a população brasileira, mais especificamente do Rio de Janeiro, como um resultado de forte miscigenação, conforme já destacado na literatura (SANTOS et al., 2010; MANTA et al., 2013).

A distribuição de casos não-graves e graves de IC variou entre os grupos estudados, apresentando a maior proporção de não-graves em brancos (54,0%) e o maior percentual de casos graves em negros (57,4%). No entanto, após análises estatísticas, concluiu-se que as diferenças encontradas entre os grupos não foram significativas ($p>0,05$). Esse resultado é similar ao já descrito na literatura por um recente estudo na população norte-americana em que observa-se uma leve prevalência dos casos mais graves em pacientes negros, porém sem significância na diferença e sem uma justificativa bem fundamentada, sugerindo apenas uma diferente resposta à terapia medicamentosa como possibilidade (DICKSON et al., 2015).

4.2 **Frequências do G894T entre indivíduos saudáveis e pacientes de IC**

Os resultados da análise do polimorfismo G894T indicaram uma frequência genotípica do homozigoto selvagem (GG) significativamente mais elevada em pacientes (63,8%) do que em indivíduos saudáveis (48,1%). Similar ao resultado obtido por Velloso e colaboradores (VELLOSO et al., 2010) em que também ao comparar os genótipos de amostras saudáveis e controles da população do Rio de Janeiro, encontrou uma maior prevalência de GG em pacientes, porém sem significância estatística.

Esta diferença significativa entre amostras de pacientes e controles sugere um modelo recessivo, em que a ausência do alelo variante T no polimorfismo G894T da enzima eNOS esteja associada com uma maior chance de desenvolvimento de IC na população brasileira através da elevada expressão de NO, conforme sugerem estudos (VELLOSO et al., 2010; MARTINELLI et al., 2012). Em termos de valores, o teste de OR encontrou 1,901, o que indica uma chance aumentada em 90,1% de indivíduos portadores do genótipo GG desenvolverem IC. Além disso, o teste também encontrou o valor de 0,526 para a presença dos genótipos GT ou TT, sugerindo uma chance reduzida em 47,4% nos indivíduos portadores desses genótipos em desenvolver IC.

Contudo, por se tratar de uma população com altos índices de miscigenação como a brasileira, esse resultado significativo entre frequências observadas poderia ser fruto de variação das ancestralidades entre as amostras. Por esse motivo, no atual estudo, marcadores de ancestralidade foram utilizados e as frequências do polimorfismo foram também comparadas levando em conta o perfil de ancestralidade das amostras.

4.3 **Frequências do G894T entre ancestralidades**

O polimorfismo G894T apresentou variações da frequência dos seus alelos entre os grupos discriminados por ancestralidade, de acordo com o que já havia sido descrito na literatura (MCNAMARA et al., 2003) em que foi relatada uma baixa frequência do genótipo GG em pacientes de IC brancos, de origem europeia, quando comparada à frequência descrita por outro estudo que analisou uma amostra de pacientes de IC negros, de origem afro-americana (MCNAMARA et al., 2009).

No presente estudo, o genótipo GG foi mais frequente em pacientes de IC com forte ancestralidade africana (80,0%) do que naqueles com ancestralidade miscigenada (67,6%) ou europeia (54,9%). O mesmo padrão foi observado na amostra controle, em que o GG foi mais prevalente em africanos (75,0%) do que em miscigenados (48,1%) ou europeus (45,8%).

Um estudo brasileiro realizado por Velloso e colaboradores (VELLOSO et al., 2010) também comparou a frequência do G894T entre grupos étnicos, porém utilizando o critério de autodeclaração de cor de pele. Apesar de subjetivo, este critério foi responsável por também indicar uma maior prevalência de GG em indivíduos negros do que em brancos, corroborando os dados encontrados no atual estudo.

Sabendo que o Brasil possui uma população bastante miscigenada, a utilização do agrupamento por ancestralidade para comparar as frequências entre pacientes e controles se faz necessária para minimizar erros e associações espúrias. Com base nisso, viu-se através dos resultados que a diferença significativa nos perfis genotípicos entre pacientes e controles não se manteve nem para os grupos separados por ancestralidade africana ($p=1,00$) e tampouco europeia ($p=0,55$). Mas entre os indivíduos de ancestralidade miscigenada, chamados assim por não apresentarem uma ancestralidade majoritária com valor superior a 70%, a diferença significativa entre os perfis genotípicos do G894T para pacientes e controles se manteve ($p<0,05$), continuando a apontar uma chance aumentada de desenvolvimento de IC naqueles com genótipo GG (OR: 2,246; 95% IC: 1,151-4,384) e diminuída naqueles com o alelo T presente (OR: 0,445; 95% IC: 0,228-0,869). A associação da IC com o grupo de miscigenados é importante visto que se trata do grupo mais representativo de ambas amostras, fazendo parte deles, 51% dos indivíduos de cada amostra.

4.4 **Frequências do G894T entre gêneros**

As frequências do polimorfismo G894T variaram em relação ao gênero dos indivíduos saudáveis e controles, porém a única diferença significativa encontrada ($p=0,01$) foi entre a frequência genotípica das pacientes de IC do sexo feminino e a frequência das mulheres saudáveis. As pacientes de IC tiveram a frequência do genótipo selvagem GG maior (67,6%) do que as mulheres saudáveis do estudo (42,2%).

Apesar do resultado indicar uma prevalência maior do genótipo selvagem GG em mulheres com IC, sugerindo uma tendência maior ao desenvolvimento da doença conforme o

observado na amostra total, essa diferença no perfil genotípico é explicada a partir da análise de ancestralidade de ambas as amostras de mulheres. A amostra de pacientes de IC do sexo feminino possui em sua composição ancestral 35,8% de contribuição africana, 52,1% europeia e 12,1% ameríndia. Já a amostra de mulheres saudáveis possui 22,9% de contribuição africana, 64,2% europeia e 12,9% ameríndia. Ao comparar ambas amostras, o valor de probabilidade de não-diferenciação por F_{ST} foi inferior a 0,01, indicando uma diferença significativa em relação aos perfis de ancestralidade dessas duas amostras.

Visto que indivíduos com herança genética africana e europeia diferem significativamente nas frequências genotípicas do polimorfismo G894T (MCNAMARA et al., 2003; MCNAMARA et al., 2009), é possível afirmar que a diferença significativa indicada nos grupos de mulheres com IC e mulheres saudáveis é resultado dos diferentes padrões de ancestralidade dos grupos e não de um possível fator de susceptibilidade ao desenvolvimento da IC pelos valores de GG.

4.5 **Frequências do G894T entre gravidades de IC**

As frequências genotípicas do polimorfismo G894T variaram significativamente entre o grupo de pacientes de IC com a forma não-grave e grave da doença (p=0,01). No grupo de pacientes com IC não-grave, a frequência do genótipo heterozigoto GT foi menor (25,2%) do que no grupo de pacientes graves (38,8%). Essa diferença nas frequências foi apontada pelo teste de OR como o genótipo GT associado a uma maior chance de agravamento dos quadros de IC (OR: 1,881; 95% IC: 1,044-3,391).

O resultado sugere que apesar do alelo T estar ligado a uma menor chance de desenvolvimento de IC, quando um indivíduo possui um genótipo heterozigoto, ou seja, com as cópias do alelo G e T, a chance de IC grave é aumentada em relação aos outros genótipos. Uma explicação para que o genótipo GG, ligado a maior chance de IC, não seja também relacionado para uma chance aumentada dos casos de IC grave é uma melhor resposta medicamentosa dos indivíduos GG comparados com aqueles com genótipo GT. McNamara e colaboradores (MCNAMARA et al., 2009) relataram um impacto positivo de um tratamento com dose-fixa de uma combinação de dinitrato isossorbida e hidralazina em pacientes com genótipo GG em relação aos demais, resultando num remodelamento reverso.

Por outro lado, um recente estudo realizado com uma população europeia indica uma pior sobrevida dos pacientes de genótipo GG, justificando essa diferença à resposta terapêutica da administração de nitrato exógeno nesses indivíduos, que resulta em altos níveis de expressão de NO e uma ação deletéria num caso avançado de IC. No mesmo estudo, a melhor sobrevida dos pacientes está associada ao genótipo TT (AZZAM et al., 2015).

Muitos dos pacientes acompanhados no estudo, receberam algum tipo de medicamento durante os últimos anos e por conta disso, podem ter estabilizado a IC num quadro ainda não-grave, ou até mesmo ter apresentado alguma evolução de um quadro grave para não-grave quando portadores de algum genótipo homozigoto, seja ele GG (MCNAMARA et al., 2009) ou TT (AZZAM et al., 2015). Apesar disso, o papel do polimorfismo G894T em termos moleculares e na evolução da IC ainda é controverso como visto nos estudos apresentados.

4.6 **Impactos do polimorfismo G894T na IC**

O polimorfismo G894T foi investigado com relação à IC levando em consideração sua possível influência nos níveis de NO de acordo com o genótipo. As variações nos níveis de NO podem ocorrer, inclusive, no meio intracelular (PHILIP et al., 1999). Entretanto, o polimorfismo G894T pode não ser o único agente a alterar esses níveis, tendo outros polimorfismos associados em conjunto. O resultado encontrado de que a ausência do alelo T, representado pelo genótipo GG, estaria ligada a uma maior chance de ocorrência de IC pode ser ampliado e ter diferentes consequências quando combinado com variantes dos polimorfismos T786C e VNTR 4a/b também localizados no gene da eNOS, por exemplo. Tanto o polimorfismo T786C como o VNTR 4a/b já foram associados por estudos a variações nos níveis de NO e, consequentemente, a doenças (WANG et al., 1996; ROSSI et al., 2003; JEMAA et al., 2007; CRUZ-GONZALEZ et al., 2009).

Um estudo realizado com a população canadense investigou a associação da combinação entre diversos polimorfismos, incluindo o G894T e o T786C, e o prognóstico de IC, porém nenhuma associação significativa foi encontrada (ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK et al., 2008). Já no Brasil, um estudo realizado recentemente analisou os polimorfismos G894T, T786C e VNTR 4a/b combinados como haplótipos e encontrou uma associação para maior ocorrência de IC entre indivíduos afrodescendentes com o genótipo GG para G894T, somado ao genótipo TT para T786C e homozigoto 4a no polimorfismo VNTR 4a/b (MARTINELLI et

al., 2012). Esse resultado reforça a ideia de que o polimorfismo G894T possui impacto nos níveis de NO e no desenvolvimento de IC, porém não é o único agente e sofre influência de outros polimorfismos.

4.7 **Poder de discriminação dos AIMs**

O conjunto de 46 marcadores genéticos de inserção e deleção para estimativa de ancestralidade humana descrito por Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2012) já haviam sido testado e comprovado sua eficácia em populações de diferentes regiões do Brasil (MANTA et al., 2013), porém nesse atual estudo foi utilizado pela primeira vez para caracterizar amostras caso e controle quanto a proporções de ancestralidade.

O resultado positivo dessa ferramenta pôde ser visto nas tabelas 8 a 14 e no apêndice B em que foram demonstrados os valores de significância para o distanciamento genético dos grupos. Os valores apontaram diferença significativa entre os grupos de pacientes de IC com ancestralidade africana, europeia e miscigenada, indicando um agrupamento satisfatório. A significância também foi observada entre os grupos de indivíduos saudáveis com ancestralidade africana, europeia e miscigenada.

Além disso, quando esses seis grupos classificados por ancestralidade foram comparados a três populações referências do painel HGDP-CEPH, houveram diferenças significativas em todas as comparações par a par realizadas, indicando que mesmo quando agrupadas por ancestralidade, as amostras estudadas, do Rio de Janeiro, são de indivíduos bem miscigenados e diferentes de populações referências com ancestralidade bem definidas.

O critério de autodeclaração de cor de pele foi capaz de discriminar com significância as ancestralidades nas comparações de pacientes de IC brancos x negros ($p<0,01$) e negros x pardos ($p<0,01$), porém na comparação de brancos x pardos, essa diferença não obteve significância ($p=0,27$). O grupo de pacientes de IC autodeclarados negros apresentou 56,8% de ancestralidade africana, já os brancos tiveram seu maior percentual pertencente à ancestralidade europeia com 68,3%. Esses dados corroboram com resultados recentes de um estudo realizado com amostras dos estados de Ceará e Bahia em que indivíduos autodeclarados negros tiveram sua maior porcentagem de ancestralidade africana e brancos, europeia quando analisados marcadores genéticos de ancestralidade (MAGALHAES DA SILVA et al., 2014).

No entanto, mesmo os grupos de pacientes de IC autodeclarados negros e brancos terem apresentado cada um deles uma ancestralidade mais prevalente, esses percentuais não atingiram o valor de 70% utilizados como ponto de corte no agrupamento no presente estudo e em outro estudo envolvendo associação em população miscigenada (AL-ALEM et al., 2014). Por este motivo, apesar de um bom indicador de ancestralidade, a ferramenta de autodeclaração de cor de pele apresenta algumas falhas de caracterização que são corrigidas em sua totalidade com o uso dos marcadores AIMs (LINS et al., 2011).

CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados no presente estudo, podemos concluir que:

a) O critério de autodeclaração de cor de pele demonstrou ter menor eficiência em classificar os indivíduos por ancestralidade do que os AIMs nas amostras colhidas de pacientes do Rio de Janeiro;
b) As frequências do polimorfismo G894T variam dentro da amostra de indivíduos do Rio de Janeiro conforme seu padrão de ancestralidade, sendo o genótipo GG mais prevalente em indivíduos com forte ancestralidade africana e menos prevalente em europeia;
c) Apesar da forte influência da ancestralidade nas frequências alélicas encontradas para o polimorfismo G894T, foi constatada uma associação do genótipo GG a uma maior chance de desenvolvimento de IC nos indivíduos com ancestralidade miscigenada, a predominante na amostra total. E, opostamente, os genótipos possuindo o alelo T demonstraram uma redução nessa chance;
d) O genótipo GT apresentou uma incidência maior em pacientes de casos graves de IC em relação aos outros genótipos, podendo a resposta à terapia medicamentosa estar ligada a esse resultado.

Este trabalho contribuiu para a caracterização do polimorfismo G894T na população do estado do Rio de Janeiro, associando-o à IC, com baixa possibilidade de associação espúria devido ao uso de ferramentas moleculares de ancestralidade.

Tendo em posse os resultados promissores de associação genética trazidos por este estudo, a perspectiva do projeto é incluir novos polimorfismos de regiões alvos de estudos em populações de outros países e verificar a possibilidade de associação à IC na população do Rio de Janeiro, utilizando-se dos marcadores de ancestralidade para tal.

REFERÊNCIAS

AL-ALEM, U. et al. Association of genetic ancestry with breast cancer in ethnically diverse women from Chicago. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e112916, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423363 >.

ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*, v. 67, n. 2, p. 444-61, Aug 2000. ISSN 0002-9297 (Print)
0002-9297 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873790 >.

ANAND, I. S.; FLOREA, V. G. Traditional and novel approaches to management of heart failure: successes and failures. *Cardiol Clin*, v. 26, n. 1, p. 59-72, vi, Feb 2008. ISSN 0733-8651 (Print)
0733-8651 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18312906 >.

ANGELINE, T.; ISABEL, W.; TSONGALIS, G. J. Endothelial nitric oxide gene polymorphisms, nitric oxide production and coronary artery disease risk in a South Indian population. *Exp Mol Pathol*, v. 89, n. 3, p. 205-8, Dec 2010. ISSN 1096-0945 (Electronic)
0014-4800 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828555 >.

AZZAM, N. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism and prognosis in systolic heart failure patients. *Nitric Oxide*, v. 47, p. 91-96, Apr 23 2015. ISSN 1089-8611 (Electronic)
1089-8603 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917853 >.

BAHRAMI, H. et al. Differences in the incidence of congestive heart failure by ethnicity: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arch Intern Med*, v. 168, n. 19, p. 2138-45, Oct 27 2008. ISSN 1538-3679 (Electronic)
0003-9926 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955644 >.

BERNJAK, A. et al. Low-frequency blood flow oscillations in congestive heart failure and after [beta] 1-blockade treatment. *Microvascular research*, v. 76, n. 3, p. 224-232, 2008. ISSN 0026-2862.

BOCCHI, E. Situação atual das indicações e resultados do tratamento cirúrgico da insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*, v. 63, n. 6, 1994.

BORRONI, B. et al. Endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) polymorphism is an independent risk factor for migraine with aura. *Headache*, v. 46, n. 10, p. 1575-9, Nov-Dec 2006. ISSN 0017-8748 (Print)
0017-8748 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115991 >.

BRAUNWALD, E.; BAUGHMAN, K. L.; CURRENT MEDICINE INC. Essential atlas of heart diseases. 2nd. New York: McGraw-Hill, 2001. ix, 334 p. ISBN 0071376453 (alk. paper). Disponível em: < http://www.loc.gov/catdir/bios/mh041/00047323.html http://www.loc.gov/catdir/description/mh021/00047323.html >.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A***,** v. 86, n. 22, p. 9030-3, Nov 1989. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573074 >.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem***,** v. 268, n. 12, p. 8410-3, Apr 25 1993. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682550 >.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol***,** v. 15, n. 6, p. 824-34, Nov-Dec 2003. ISSN 1042-0533 (Print)
1042-0533 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595874 >.

CARSON, P. et al. Racial differences in response to therapy for heart failure: analysis of the vasodilator-heart failure trials. Vasodilator-Heart Failure Trial Study Group. *J Card Fail***,** v. 5, n. 3, p. 178-87, Sep 1999. ISSN 1071-9164 (Print)
1071-9164 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496190 >.

CRUZ-GONZALEZ, I. et al. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord***,** v. 9, p. 35, 2009. ISSN 1471-2261 (Electronic)
1471-2261 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650939 >.

DATASUS. Incidência de morbidade no Brasil. 2014. Disponível em: < http://www.datasus.gov.br >. Acesso em: 11/01/14.

DICKSON, V. V. et al. Racial differences in clinical treatment and self-care behaviors of adults with chronic heart failure. *J Am Heart Assoc***,** v. 4, n. 4, 2015. ISSN 2047-9980 (Electronic)
2047-9980 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870187 >.

DOSENKO, V. E. et al. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol***,** v. 53, n. 2, p. 299-302, 2006. ISSN 0001-527X (Print)
0001-527X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16733564 >.

DOSHI, A. A. et al. A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium. *J Card Fail***,** v. 16, n. 4, p. 314-9, Apr 2010. ISSN 1532-8414 (Electronic)
1071-9164 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350698 >.

DOSHI, A. A. et al. A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium. *J Card Fail***,** v. 16, n. 4, p. 314-319, 2010. ISSN 1071-9164.

DREXLER, H. et al. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation***,** v. 85, n. 5, p. 1751, 1992.

DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann Med*, v. 27, n. 3, p. 395-406, Jun 1995. ISSN 0785-3890 (Print) 0785-3890 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546630 >.

DWORAKOWSKI, R. et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*, v. 51, n. 14, p. 1349-56, Apr 8 2008. ISSN 1558-3597 (Electronic) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18387435 >.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, v. 1, p. 47-50, 2005. ISSN 1176-9343 (Electronic) 1176-9343 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325852 >.

FERREIRA, J. et al. The role of local and systemic renin angiotensin system activation in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 294, n. 1, p. R26, 2008. ISSN 0363-6119.

FRAGA, L. R. et al. More severe clinical course of cardiovascular dysfunction in intensive care unit patients with the 894TT eNOS genotype. *Genet Mol Res*, v. 12, n. 1, p. 562-8, 2013. ISSN 1676-5680 (Electronic) 1676-5680 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512673 >.

FUJIHARA, J. et al. First survey of the three gene polymorphisms (PON1 Q192R, eNOS E298D and eNOS C-786T) potentially associated with coronary artery spasm in African populations and comparison with worldwide data. *Cell Biochem Funct*, v. 29, n. 2, p. 156-63, Mar 2011. ISSN 1099-0844 (Electronic) 0263-6484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287574 >.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, v. 55, n. 2, p. 250-60, Aug 1 2002. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12123764 >.

GODINHO, N. M. O. et al. Regional patterns of genetic admixture in South America. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 1, n. 1, p. 329-330, 2008. ISSN 1875-1768. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875176808001005 >.

GOUDET, J. et al. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, v. 144, n. 4, p. 1933-40, Dec 1996. ISSN 0016-6731 (Print) 0016-6731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978076 >.

HIBI, K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, v. 32, n. 3, p. 521-6, Sep 1998. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740620 >.

HINGORANI, A. D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, v. 100, n. 14, p. 1515-20, Oct 5 1999. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510054 >.

HO, K. K. et al. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*, v. 22, n. 4 Suppl A, p. 6A-13A, Oct 1993. ISSN 0735-1097 (Print) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376698 >.

IBGE. Brasil: 500 anos de povoamento/Brazil-500 years of settlement. Rio de Janeiro: IBGE: 232. 2000.

_____. Censo 2010. 2010. Disponível em: < http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=26&uf=33 >. Acesso em: 14/02/2016.

JEMAA, R. et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in Tunisian patients. *Clin Chem Lab Med*, v. 45, n. 11, p. 1476-80, 2007. ISSN 1434-6621 (Print) 1434-6621 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17970703 >.

JOHNSON, J. A.; EVANS, W. E. Molecular diagnostics as a predictive tool: genetics of drug efficacy and toxicity. *Trends in molecular medicine*, v. 8, n. 6, p. 300-305, 2002. ISSN 1471-4914.

JUGDUTT, B. I. Heart failure in the elderly: advances and challenges. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, v. 8, n. 5, p. 695-715, May 2010. ISSN 1744-8344 (Electronic) 1477-9072 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450303 >.

KELLY, R. A.; BALLIGAND, J. L.; SMITH, T. W. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*, v. 79, n. 3, p. 363-80, Sep 1996. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781470 >.

KIMURA, L. et al. Multilocus family-based association analysis of seven candidate polymorphisms with essential hypertension in an african-derived semi-isolated brazilian population. *Int J Hypertens*, v. 2012, p. 859219, 2012. ISSN 2090-0392 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056922 >.

KINGAH, P. L. et al. Association of NOS3 Glu298Asp SNP with hypertension and possible effect modification of dietary fat intake in the ARIC study. *Hypertens Res*, v. 33, n. 2, p. 165-9, Feb 2010. ISSN 1348-4214 (Electronic) 0916-9636 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19960019 >.

KNOWLES, R. G. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 13, p. 5159-62, Jul 1989. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2567995 >.

LIBBY, P. et al. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine (single volume). Saunders, 2007.

LINS, T. C. et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol*, v. 21, n. 4, p. 240-5, 2011. ISSN 1349-9092 (Electronic) 0917-5040 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498954 >.

MAGALHAES DA SILVA, T. et al. The correlation between ancestry and color in two cities of Northeast Brazil with contrasting ethnic compositions. *Eur J Hum Genet*, Oct 8 2014. ISSN 1476-5438 (Electronic)
1018-4813 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25293718 >.

MANTA, F. S. et al. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol*, v. 40, n. 1, p. 94-8, Jan 2013. ISSN 1464-5033 (Electronic)
0301-4460 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151124 >.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, v. 78, n. 6, p. 927-30, Sep 23 1994. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522970 >.

MARTINELLI, N. C. et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis. *Nitric Oxide*, v. 26, n. 3, p. 141-7, Mar 31 2012. ISSN 1089-8611 (Electronic)
1089-8603 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290017 >.

MATSA, L. S. et al. Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e70523, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23923002 >.

MCNAMARA, D. M. et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*, v. 107, n. 12, p. 1598-602, Apr 1 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668492 >.

MCNAMARA, D. M. et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Card Fail*, v. 15, n. 3, p. 191-8, Apr 2009. ISSN 1532-8414 (Electronic)
1071-9164 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327620 >.

MEDEIRO, A. et al. Effect of exercise training and carvedilol treatment on cardiac function and structure in mice with sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, n. 9, p. 812-817, 2008. ISSN 0100-879X.

MESQUITA, E. T. et al. Insuficiência cardíaca com função sistólica preservada. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 82, p. 494-500, 2004. ISSN 0066-782X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2004000500014&nrm=iso >.

MICHEL, T.; LI, G. K.; BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 13, p. 6252, 1993. ISSN 0027-8424.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988. ISSN 0305-1048 (Print)
0305-1048 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216 >.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991. ISSN 0031-6997 (Print)
0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852778 >.

MOZAFFARIAN, D. et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the american heart association. *Circulation*, v. 131, n. 4, p. 434-41, Jan 27 2015. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25623128 >.

NCBI. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1799983. 2016. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799983 >. Acesso em: 14/02/2016.

PEREIRA, R. et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*, v. 7, n. 1, p. e29684, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272242 >.

PHILIP, I. et al. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation*, v. 99, n. 24, p. 3096-8, Jun 22 1999. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377070 >.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-59, Jun 2000. ISSN 0016-6731 (Print)
0016-6731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835412 >.

QIN, J. et al. Genetic polymorphism of NOS3 with susceptibility to deep vein thrombosis after orthopedic surgery: a case-control study in Chinese Han population. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e70033, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922896 >.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, n. 13, p. 5193-7, Jul 1990. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695013 >.

RAI, H. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e113363, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409023 >.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics***,** v. 105, n. 3, p. 767-79, Nov 1983. ISSN 0016-6731 (Print)
0016-6731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17246175 >.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. et al. Dissimilarities in the process of formation of Curiau, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region. *Am J Hum Biol***,** v. 14, n. 4, p. 440-7, Jul-Aug 2002. ISSN 1042-0533 (Print)
1042-0533 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112565 >.

ROSSI, G. P. et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol***,** v. 41, n. 6, p. 930-7, Mar 19 2003. ISSN 0735-1097 (Print)
0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651036 >.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics***,** v. 140, n. 4, p. 1413-9, Aug 1995. ISSN 0016-6731 (Print)
0016-6731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498780 >.

SACKS, C. A.; JARCHO, J. A.; CURFMAN, G. D. Paradigm shifts in heart-failure therapy--a timeline. *N Engl J Med***,** v. 371, n. 11, p. 989-91, Sep 11 2014. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184412 >.

SANTOS, N. P. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat***,** v. 31, n. 2, p. 184-90, Feb 2010. ISSN 1098-1004 (Electronic)
1059-7794 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953531 >.

SARI, I. et al. Is there a relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and ankylosing spondylitis? *Clinics (Sao Paulo)***,** v. 68, n. 3, p. 305-9, 2013. ISSN 1980-5322 (Electronic)
1807-5932 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23644848 >.

SCHNEIDER, H.; SALZANO, F. M. Gm allotypes and racial admixture in two Brazilian populations. *Hum Genet***,** v. 53, n. 1, p. 101-5, 1979. ISSN 0340-6717 (Print)
0340-6717 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/295040 >.

SHIMASAKI, Y. et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol***,** v. 31, n. 7, p. 1506-10, Jun 1998. ISSN 0735-1097 (Print)
0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626827 >.

SILVA, D. A. et al. Y-chromosome genetic variation in Rio de Janeiro population. *Am J Hum Biol***,** v. 18, n. 6, p. 829-37, Nov-Dec 2006. ISSN 1042-0533 (Print)
1042-0533 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17039481 >.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics***,** v. 139, n. 1, p. 457-62, Jan 1995. ISSN 0016-6731 (Print)
0016-6731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705646 >.

STROMBERG, A.; MARTENSSON, J. Gender differences in patients with heart failure. *Eur J Cardiovasc Nurs*, v. 2, n. 1, p. 7-18, Apr 2003. ISSN 1474-5151 (Print)
1474-5151 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622644 >.

TARDIN, O. M. et al. Genetic polymorphism G894T and the prognosis of heart failure outpatients. *Arq Bras Cardiol*, v. 101, n. 4, p. 352-8, Oct 2013. ISSN 1678-4170 (Electronic)
0066-782X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23949326 >.

TIAN, C. et al. A genomewide single-nucleotide-polymorphism panel with high ancestry information for African American admixture mapping. *Am J Hum Genet*, v. 79, n. 4, p. 640-9, Oct 2006. ISSN 0002-9297 (Print)
0002-9297 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960800 >.

TSUKADA, T. et al. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 245, n. 1, p. 190-3, Apr 7 1998. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535806 >.

TYNI-LENNÉ, R. et al. Aerobic training involving a minor muscle mass shows greater efficiency than training involving a major muscle mass in chronic heart failure patients* 1. *J Card Fail*, v. 5, n. 4, p. 300-307, 1999. ISSN 1071-9164.

TYNI-LENNÉ, R.; JANSSON, E.; SYLVÉN, C. Female-related skeletal muscle phenotype in patients with moderate chronic heart failure before and after dynamic exercise training. *Cardiovascular research*, v. 42, n. 1, p. 99, 1999. ISSN 0008-6363.

VARGAS-ALARCON, G. et al. The -974 C>A (rs3087459) gene polymorphism in the endothelin gene (EDN1) is associated with risk of developing acute coronary syndrome in Mexican patients. *Gene*, Sep 12 2013. ISSN 1879-0038 (Electronic)
0378-1119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035903 >.

VELLOSO, M. W. et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnical population with heart failure and controls. *Nitric Oxide*, v. 22, n. 3, p. 220-5, Apr 1 2010. ISSN 1089-8611 (Electronic)
1089-8603 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079452 >.

WANG, X. L. et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, v. 2, n. 1, p. 41-5, Jan 1996. ISSN 1078-8956 (Print)
1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564837 >.

WEISS, J. et al. No difference in genotype frequencies of polymorphisms of the nitric oxide pathway between Caucasian normal and high tension glaucoma patients. *Mol Vis*, v. 18, p. 2174-81, 2012. ISSN 1090-0535 (Electronic)
1090-0535 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919264 >.

WIELENGA, R. P. et al. The role of exercise training in chronic heart failure. *Heart*, v. 78, n. 5, p. 431-6, Nov 1997. ISSN 1355-6037 (Print)
1355-6037 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414999 >.

WISLØFF, U. et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. *Circulation***,** v. 115, n. 24, p. 3086-3094, 2007. ISSN 0009-7322.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology***,** v. 20, n. 6, p. 1430-1442, 2000. ISSN 1079-5642.

YAO, Y. S. et al. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: Three well-characterized polymorphisms with ischemic stroke. *Gene***,** v. 528, n. 2, p. 84-92, Oct 10 2013. ISSN 1879-0038 (Electronic)
0378-1119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845784 >.

ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK, M. et al. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol***,** v. 65, n. 5, p. 742-51, May 2008. ISSN 1365-2125 (Electronic)
0306-5251 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279468 >.

APÊNDICE A – Valores de distância F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs das amostras e grupos (continua)

	Africanos	Europeus	Ameríndios	IC Geral	IC Brancos	IC Negros	IC Pardos	IC GG	IC GT	IC TT	IC Homens	IC Mulheres	IC Não-grave	IC Grave	IC Africanos	IC Europeus	IC Mistos	RJ Saudáveis	RJ GG	RJ GT	RJ TT	RJ Homens	RJ Mulheres	RJ Africanos	RJ Europeus	RJ Mistos
Africanos																										
Europeus	0,366																									
Ameríndios	0,438	0,297																								
IC Geral	0,194	0,047	0,225																							
IC Brancos	0,259	0,021	0,237	0,003																						
IC Negros	0,089	0,155	0,282	0,032	0,067																					
IC Pardos	0,226	0,049	0,247	-0,004	0,002	0,038																				
IC GG	0,184	0,059	0,231	-0,002	0,008	0,023	-0,002																			
IC GT	0,230	0,037	0,242	-0,001	-0,001	0,045	-0,003	0,004																		
IC TT	0,307	0,006	0,287	0,005	-0,006	0,077	-0,001	0,013	0,001																	
IC Homens	0,215	0,040	0,231	-0,002	0,001	0,041	-0,004	0,001	-0,003	-0,001																
IC Mulheres	0,178	0,069	0,243	-0,001	0,013	0,017	0,001	-0,002	0,005	0,018	0,005															
IC Não-grave	0,207	0,045	0,231	-0,002	0,002	0,035	-0,004	-0,001	-0,002	0,001	-0,003	0,002														
IC Grave	0,196	0,053	0,238	-0,002	0,005	0,028	-0,004	-0,002	-0,001	0,010	-0,001	-0,002	0,001													
IC Africanos	0,023	0,253	0,368	0,092	0,143	0,012	0,100	0,079	0,114	0,164	0,106	0,070	0,096	0,089												
IC Europeus	0,326	0,004	0,284	0,022	0,004	0,111	0,019	0,031	0,013	-0,005	0,016	0,040	0,021	0,026	0,204											
IC Mistos	0,164	0,077	0,215	0,001	0,016	0,014	0,001	-0,001	0,006	0,022	0,005	-0,002	0,002	0,001	0,065	0,046										

APÊNDICE A – Valores de distância F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs das amostras e grupos (conclusão)

	Africanos	Europeus	Ameríndios	IC Geral	IC Brancos	IC Negros	IC Pardos	IC GG	IC GT	IC TT	IC Homens	IC Mulheres	IC Não-grave	IC Grave	IC Africanos	IC Europeus	IC Mistos	RJ Saudáveis	RJ GG	RJ GT	RJ TT	RJ Homens	RJ Mulheres	RJ Africanos	RJ Europeus	RJ Mistos
RJ Saudáveis	0,232	0,032	0,232	0,001	0,001	0,049	0,001	0,003	0,001	-0,005	0,001	0,006	0,001	0,001	0,118	0,013	0,009									
RJ GG	0,225	0,043	0,240	0,001	0,005	0,040	0,001	0,003	0,002	-0,004	0,002	0,003	0,001	0,001	0,107	0,021	0,007	-0,004								
RJ GT	0,257	0,026	0,249	0,002	-0,003	0,059	-0,002	0,005	0,001	-0,005	-0,001	0,009	0,001	0,003	0,129	0,008	0,013	-0,004	0,004							
RJ TT	0,285	0,032	0,287	0,002	-0,001	0,059	0,004	0,007	0,001	-0,002	0,001	0,009	0,006	-0,001	0,152	0,010	0,013	-0,004	0,001	0,003						
RJ Homens	0,238	0,036	0,251	0,001	0,001	0,046	-0,001	0,002	0,001	-0,005	-0,001	0,005	-0,001	0,001	0,114	0,016	0,007	-0,005	-0,005	-0,004	-0,001					
RJ Mulheres	0,242	0,032	0,237	0,001	-0,001	0,050	-0,001	0,003	0,001	-0,006	0,001	0,006	0,001	0,001	0,121	0,011	0,010	-0,005	-0,004	-0,004	-0,006	-0,002				
RJ Africanos	0,041	0,235	0,367	0,071	0,120	0,005	0,075	0,058	0,094	0,136	0,085	0,048	0,076	0,067	-0,008	0,185	0,043	0,093	0,076	0,110	0,142	0,083	0,100			
RJ Europeus	0,326	0,004	0,280	0,019	0,002	0,104	0,017	0,027	0,013	-0,010	0,014	0,035	0,018	0,021	0,198	-0,005	0,041	0,007	0,015	0,004	0,003	0,010	0,005	0,180		
RJ Mistos	0,189	0,065	0,225	0,001	0,012	0,025	0,001	0,001	0,005	0,011	0,004	-0,001	0,002	0,001	0,077	0,038	0,001	0,001	-0,003	0,004	0,005	-0,002	0,001	0,055	0,032	

Legenda: população referência do painel HGDP-CEPH da África (africanos); população referência do painel HGDP-CEPH da Europa (europeus); população referência do painel HGDP-CEPH de nativos americanos (ameríndios); pacientes de IC do estudo (IC geral); pacientes com IC de cor de pele branca (IC brancos); pacientes negros com IC (IC negros); pacientes pardos com IC (IC pardos); pacientes de IC com genótipo GG para o polimorfismo G894T (IC GG); pacientes de IC com genótipo GT (IC GT); pacientes de IC com genótipo TT (IC TT); homens com IC (IC homens); mulheres com IC (IC mulheres); pacientes com IC de gravidade não-grave (IC não-grave); pacientes com IC grave (IC grave); pacientes de IC com mais de 70% de ancestralidade africana (IC africanos); pacientes de IC com mais de 70% de ancestralidade europeia (IC europeus); pacientes de IC sem uma ancestralidade superior a 70% (IC mistos); indivíduos saudáveis do estudo (RJ saudáveis); indivíduos saudáveis com genótipo GG para o polimorfismo G894T (RJ GG); indivíduos saudáveis com genótipo GT (RJ GT); indivíduos saudáveis com genótipo TT (RJ TT); homens saudáveis (RJ homens); mulheres saudáveis (RJ mulheres); indivíduos saudáveis com ancestralidade africana superior a 70% (RJ africanos); indivíduos saudáveis com ancestralidade europeia superior a 70% (RJ europeus); indivíduos saudáveis sem uma ancestralidade superior a 70% (RJ mistos).

Fonte: O autor, 2015.

APÊNDICE B – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs das amostras e grupos (continua)

	Africanos	Europeus	Ameríndios	IC Geral	IC Brancos	IC Negros	IC Pardos	IC GG	IC GT	IC TT	IC Homens	IC Mulheres	IC Não-grave	IC Grave	IC Africanos	IC Europeus	IC Mistos	RJ Saudáveis	RJ GG	RJ GT	RJ TT	RJ Homens	RJ Mulheres	RJ Africanos	RJ Europeus	RJ Mistos
Africanos		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Europeus	<0,01		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ameríndios	<0,01	<0,01		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IC Geral	<0,01	<0,01	<0,01		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
IC Brancos	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
IC Negros	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
IC Pardos	<0,01	<0,01	<0,01	0,96	0,27	<0,01		-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
IC GG	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	<0,01	<0,01	0,91		+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
IC GT	<0,01	<0,01	<0,01	0,77	0,72	<0,01	0,85	0,01		-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
IC TT	<0,01	0,21	<0,01	0,29	0,80	<0,01	0,50	0,07	0,53		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IC Homens	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	0,38	<0,01	0,98	0,41	0,98	0,56		+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
IC Mulheres	<0,01	<0,01	<0,01	0,57	<0,01	<0,01	0,44	0,97	0,03	0,07	0,01		-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
IC Não-grave	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	0,06	<0,01	0,96	0,90	0,91	0,37	0,99	0,18		-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
IC Grave	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	<0,01	<0,01	0,93	0,99	0,59	0,17	0,75	0,95	0,41		+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
IC Africanos	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
IC Europeus	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,77	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
IC Mistos	<0,01	<0,01	<0,01	0,08	<0,01	<0,01	0,38	0,84	<0,01	<0,01	<0,01	0,92	0,03	0,48	<0,01	<0,01		+	+	+	-	+	+	+	+	-

APÊNDICE B – Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética F_{ST} das frequências alélicas dos marcadores AIMs das amostras e grupos (conclusão)

	Africanos	Europeus	Ameríndios	IC Geral	IC Brancos	IC Negros	IC Pardos	IC GG	IC GT	IC TT	IC Homens	IC Mulheres	IC Não-grave	IC Grave	IC Africanos	IC Europeus	IC Mistos	RJ Saudáveis	RJ GG	RJ GT	RJ TT	RJ Homens	RJ Mulheres	RJ Africanos	RJ Europeus	RJ Mistos
RJ Saudáveis	<0,01	<0,01	<0,01	0,28	0,52	<0,01	0,53	0,01	0,39	0,74	0,55	<0,01	0,32	0,17	<0,01	<0,01	<0,01		-	-	-	-	-	+	+	-
RJ GG	<0,01	<0,01	<0,01	0,20	0,02	<0,01	0,28	0,09	0,14	0,64	0,14	0,12	0,24	0,28	<0,01	<0,01	<0,01	0,99		-	-	-	-	+	+	-
RJ GT	<0,01	<0,01	<0,01	0,17	0,97	<0,01	0,63	0,02	0,38	0,69	0,56	0,02	0,26	0,13	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	0,05		-	-	-	+	-	+
RJ TT	<0,01	0,01	<0,01	0,40	0,52	<0,01	0,33	0,31	0,50	0,46	0,40	0,23	0,31	0,59	<0,01	0,17	0,05	0,66	0,42	0,36		-	-	+	-	-
RJ Homens	<0,01	<0,01	<0,01	0,51	0,44	<0,01	0,56	0,24	0,50	0,70	0,71	0,05	0,67	0,43	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	0,98	0,95	0,60		-	+	+	-
RJ Mulheres	<0,01	<0,01	<0,01	0,38	0,77	<0,01	0,58	0,02	0,42	0,83	0,55	<0,01	0,31	0,44	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	0,97	0,99	0,61	0,77		+	+	-
RJ Africanos	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,32	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	0,68	<0,01	<0,01	0,01	0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01		+	+
RJ Europeus	<0,01	0,03	<0,01	<0,01	0,14	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,86	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	<0,01	<0,01	<0,01	0,10	0,23	<0,01	0,01	<0,01		+
RJ Mistos	<0,01	<0,01	<0,01	0,23	<0,01	<0,01	0,33	0,49	0,03	0,05	0,05	0,62	0,20	0,43	<0,01	<0,01	0,34	0,39	0,89	0,04	0,31	0,83	0,34	<0,01	<0,01	

Legenda: população referência do painel HGDP-CEPH da África (africanos); população referência do painel HGDP-CEPH da Europa (europeus); população referência do painel HGDP-CEPH de nativos americanos (ameríndios); pacientes de IC do estudo (IC geral); pacientes com IC de cor de pele branca (IC brancos); pacientes negros com IC (IC negros); pacientes pardos com IC (IC pardos); pacientes de IC com genótipo GG para o polimorfismo G894T (IC GG); pacientes de IC com genótipo GT (IC GT); pacientes de IC com genótipo TT (IC TT); homens com IC (IC homens); mulheres com IC (IC mulheres); pacientes com IC de gravidade não-grave (IC não-grave); pacientes com IC grave (IC grave); pacientes de IC com mais de 70% de ancestralidade africana (IC africanos); pacientes de IC com mais de 70% de ancestralidade europeia (IC europeus); pacientes de IC sem uma ancestralidade superior a 70% (IC mistos); indivíduos saudáveis do estudo (RJ saudáveis); indivíduos saudáveis com genótipo GG para o polimorfismo G894T (RJ GG); indivíduos saudáveis com genótipo GT (RJ GT); indivíduos saudáveis com genótipo TT (RJ TT); homens saudáveis (RJ homens); mulheres saudáveis (RJ mulheres); indivíduos saudáveis com ancestralidade africana superior a 70% (RJ africanos); indivíduos saudáveis com ancestralidade europeia superior a 70% (RJ europeus); indivíduos saudáveis sem uma ancestralidade superior a 70% (RJ mistos).

Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste não-diferenciação com base na distância genética F_{ST}.

Fonte: O autor, 2015.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Wille Oigman
Para: Aut. Felipe Neves de Albuquerque
Orient. Profª. Andréa de Araújo Brandão

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2541-CEP/HUPE – CAAE: 0176.0.228.000-09) "AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE A MORBIDADE E MORTALIDADE CARDIOVASCULARES EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DE ETIOLOGIA NÃO-ISQUÊMICA", aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUPE/UERJ

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Wille Oigman
Para: Aut. Gustavo Salgado Duque
Orient. Profª. Dayse Aparecida da Silva

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2549-CEP/HUPE – CAAE: 0175.0.228.000-09) "AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NO PROGNÓSTICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DE ETIOLOGIA ISQUÊMICA", aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto (continua)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/
UNIVERSIDADE DO ESTADO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos genéticos do metabolismo lipídico, variáveis pressóricas, antropométricas e laboratoriais em indivíduos jovens

Pesquisador: Rossana Ghessa Andrade de Freitas

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 12144313.8.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 293.134

Data da Relatoria: 15/05/2013

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo, dados publicados pela ONU em 2011 revelam que das 57 milhões de mortes ocorridas no mundo no ano de 2008, 17 milhões foram devidas as DCVs, isto corresponde a 48% de todas as mortes ocorridas no mundo. No Brasil, as DCVs concentram 29,4% do total de óbitos declarados no ano de 2007, segundo dados da Saúde Brasil. Diante destes dados, a detecção precoce de indivíduos de alto risco e o estabelecimento de estratégias de prevenção é de fundamental importância para a redução dos índices de morbidade e mortalidade e todos os esforços devem ser feitos para prevenir o primeiro evento cardiovascular, pois ele pode ser fatal, incapacitante, além de representar um alto custo com cuidados médicos. No entanto, os maiores desafios atualmente estão relacionados com o estabelecimento de critérios que permitam determinar novos marcadores de risco que possam ser incorporados à prática clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a relação entre variáveis clínicas, antropométricas, laboratoriais e polimorfismos genéticos do metabolismo Lipídico em indivíduos jovens

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto (continuação)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/
UNIVERSIDADE DO ESTADO

Continuação do Parecer: 293.134

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: De acordo com a metodologia proposta, entende-se que não há risco nenhum associado a condução deste projeto em relação aos individuos avaliados e estudados. O único desconforto está relacionado à retirada de sangue venoso, entretanto, esta técnica é utilizada usualmente na prática clínica. Benefícios: Os benefícios deste estudo relacionam-se com o conhecimentos destes polimorfismos na população brasileira, associados às contribuições para detecção precoce de alterações no metabolismo lipídico e de doenças cardiovasculares em individuos jovens, baseado nos dados laboratoriais das frações lipídicas estudadas e na análise genética dos polimorfismos realizadas no presente estudo que irá possibilitar uma intervenção precoce e preventiva, possibilitando um menor tempo de internação e menor gasto em saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está condizente com boas práticas em pesquisa

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi alterado corretamente

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto está apto para sua realização.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto (conclusão)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/
UNIVERSIDADE DO ESTADO

Continuação do Parecer: 293.134

RIO DE JANEIRO, 04 de Junho de 2013

Assinador por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continua)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO POR ESCRITO

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

PROJETO DE PESQUISA:

Avaliação da importância do polimorfismo genético no prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca.

Professor responsável: Prof. Felipe Neves de Albuquerque

Colaboradores: Prof. Gustavo Salgado Duque, Profª Drª Dayse Aparecida da Silva, Prof. Dr. Ricardo Mourilhe Rocha e Prof. Dr. Denilson Campos de Albuquerque

Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto, Faculdade de Ciências Médicas | UERJ – Disciplina/Serviço de Cardiologia e Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia

O QUE É INSUFICIÊNCIA CARDÍACA?

A insuficiência cardíaca é uma doença que se caracteriza pela falha no funcionamento normal do coração. A função de bomba exercida normalmente é prejudicada pelo aumento de tamanho do coração, causando cansaço, falta de ar, inchaço nas pernas e dificuldade para realizar as tarefas comuns. São várias as causas, mas a principal é a doença arterial coronariana (ex: infarto agudo do miocárdio).

QUAL É O PAPEL DA GENÉTICA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA?

O papel atual da genética no tratamento da insuficiência cardíaca é cada vez maior. O estudo do perfil genético de pacientes com insuficiência cardíaca já possibilitou a identificação de alguns marcadores diretamente ligado a esta doença. Assim, indivíduos com determinadas características genéticas tem maior chance de apresentar e evoluir com insuficiência cardíaca. O mesmo acontece com o tratamento: alguns indivíduos tem melhor resposta do que outros utilizando o mesmo tratamento.

Você está sendo convidado (a) para participar de um estudo. Antes de você decidir participar, é importante que você entenda porque a pesquisa está sendo feita, quais são as etapas do estudo e os possíveis benefícios e riscos que pode causar. Leia com calma as informações abaixo e converse com seu médico esclarecendo todas as dúvidas que tiver. O seu médico discutirá estas informações com você e, se for necessário, explicará todas as suas dúvidas.

Se, depois de ler e entender todas as informações, você decidir participar, favor assinar o termo de consentimento no local indicado. Você receberá uma cópia deste documento de consentimento.

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continuação)

1) FUNDAMENTO E OBJETIVO DESTE ESTUDO

Esse estudo pretende verificar se as pessoas acompanhadas na Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto por insuficiência cardíaca apresentam alterações genéticas responsáveis pela evolução e diferença de resposta ao tratamento, que favoreçam a piora da doença ou que possam alterar o tratamento da mesma.

2) VOLUNTARIEDADE

Você tem o direito de não participar deste estudo ou de se retirar do estudo a qualquer momento. Sua não participação não prejudicará o seu atendimento e o tratamento de sua doença neste hospital em qualquer momento.

3) RISCOS E DESCONFORTOS

Este estudo não oferece quaisquer riscos ao paciente ou dificuldades adicionais à rotina assistencial de um paciente com insuficiência cardíaca, além do desconforto relacionado a coleta de sangue.

4) BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Aquele que participar deste estudo contribuirá para melhorar o conhecimento da influência genética na insuficiência cardíaca. Adicionalmente, há a possibilidade, após a comprovação da relação entre genética e resposta terapêutica, de individualização do tratamento permitindo a adequação do seu tratamento para uso apenas de fármacos comprovadamente com benefícios.

5) CONFIDENCIALIDADE

Qualquer informação relacionada a esse projeto com respeito ao senhor(a), tais como, história médica, exame físico, resultados de exames complementares, serão mantidos em sigilo e apenas as pessoas envolvidas neste estudo e o seu médico assistente terão acesso.

6) CUSTOS

A participação neste estudo não tem objetivo de submeter você a um tratamento, e não terá custo para você. **Pelo fato deste projeto de acompanhamento ser voluntário, nem você ou os médicos que dele participam receberão qualquer compensação financeira.**

7) DIREITOS PELA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO

Você entende que a participação neste estudo é voluntária e que se decidir não participar, você não sofrerá nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Se resolver participar, você poderá mudar de idéia sobre continuar no estudo. Caso isso aconteça, você entende que terá de informar seu médico sobre esta decisão imediatamente. Está ciente de que tal decisão de sua parte não terá nenhuma influência sobre a disponibilidade de cuidados médicos futuros ou outros benefícios aos quais você tem direito, independente de sua participação neste grupo.

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continuação)

8) AS INFORMAÇÕES COLETADAS NO ESTUDO SERÃO CONFIDENCIAIS?

Sim. Você está ciente de que todos os registros médicos e materiais de pesquisa que poderiam identificá-lo (a) serão mantidos em segredo e que, dentro do que é permitido pelas leis e/ou regulamentos aplicáveis, não estarão disponíveis publicamente. Você compreende que se os resultados deste estudo forem publicados na literatura médica, sua identidade não será revelada.

9) CONTATO

Se você tiver alguma dúvida durante o estudo, entre em contato com os médicos da Disciplina de Cardiologia **na Av. 28 de Setembro, 77 – 2º andar - cardiologia e no telefone (21) 2587-6684.**
Se você tiver dúvidas em relação aos seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com do **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto na Av. 28 de Setembro, 77 – Térreo e no telefone (21) 2587-6775.**

O QUE ACONTECERÁ COM VOCE SE DECIDIR PARTICIPAR?

O médico irá ler este Termo de Consentimento com você. Após a assinatura do mesmo, será feita uma coleta única de aproximadamente 10 (dez) mililitros de sangue por um profissional especializado. Esta coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o seu tratamento. Esta amostra será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Geral onde será guardado e utilizado no período de dois anos, período este da pesquisa.

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (conclusão)

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

PROJETO DE PESQUISA:

Avaliação da importância do polimorfismo genético no prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca.

Investigador Principal: Dr. Felipe Neves de Albuquerque & Dr. Gustavo Salgado Duque
Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto - Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Eu esclareci todas as dúvidas que tinha a respeito deste projeto de pesquisa.

Eu li e entendi o que está escrito neste formulário. Eu aceito participar deste projeto.

_____

Nome do paciente por extenso

_____

Assinatura do paciente data

_____

Assinatura do investigador data

_____

Nome da testemunha* por extenso

_____

Assinatura da testemunha* data

* A assinatura da testemunha é necessária quando o paciente for analfabeto e /ou assinar com impressão datiloscópica.

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continua)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO POR ESCRITO

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

PROJETO DE PESQUISA:

Avaliação da importância do polimorfismo genético no prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca e cardiomiopatia isquêmica

Médico responsável: Gustavo Salgado Duque

Colaboradores: Felipe Neves de Albuquerque, Dayse Aparecida da Silva, Ricardo Mourilhe Rocha e Denilson Campos de Albuquerque

Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto, Faculdade de Ciências Médicas | UERJ – Disciplina/Serviço de Cardiologia e Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia

O QUE É INSUFICIÊNCIA CARDÍACA?

A insuficiência cardíaca é uma doença que se caracteriza pela falha no funcionamento normal do coração. A função de bomba exercida normalmente é prejudicada pelo aumento de tamanho do coração, causando cansaço, falta de ar, inchaço nas pernas e dificuldade para realizar as tarefas comuns. São várias as causas, mas a principal é a doença arterial coronariana (ex: infarto agudo do miocárdio).

QUAL É O PAPEL DA GENÉTICA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA?

O papel atual da genética no tratamento da insuficiência cardíaca é cada vez maior. O estudo do perfil genético de pacientes com insuficiência cardíaca já possibilitou a identificação de alguns marcadores diretamente ligado a esta doença. Assim, indivíduos com determinadas características genéticas tem maior chance de apresentar e evoluir com insuficiência cardíaca. O mesmo acontece com o tratamento: alguns indivíduos tem melhor resposta do que outros utilizando o mesmo tratamento.

Você está sendo convidado (a) para participar de um estudo. Antes de você decidir participar, é importante que você entenda porque a pesquisa está sendo feita, quais são as etapas do estudo e os possíveis benefícios e riscos que pode causar. Leia com calma as informações abaixo e converse com seu médico esclarecendo todas as dúvidas que tiver. O seu médico discutirá estas informações com você e, se for necessário, explicará todas as suas dúvidas.

Se, depois de ler e entender todas as informações, você decidir participar, favor assinar o termo de consentimento no local indicado. Você receberá uma cópia deste documento de consentimento.

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continuação)

1) FUNDAMENTO E OBJETIVO DESTE ESTUDO

Esse estudo pretende verificar se as pessoas acompanhadas na Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto por insuficiência cardíaca apresentam alterações genéticas responsáveis pela evolução e diferença de resposta ao tratamento, que favoreçam a piora da doença ou que possam alterar o tratamento da mesma.

2) VOLUNTARIEDADE

Você tem o direito de não participar deste estudo ou de se retirar do estudo a qualquer momento. Sua não participação não prejudicará o seu atendimento e o tratamento de sua doença neste hospital em qualquer momento.

3) RISCOS E DESCONFORTOS

Este estudo não oferece quaisquer riscos ao paciente ou dificuldades adicionais à rotina assistencial de um paciente internado com insuficiência cardíaca, além do desconforto relacionado a coleta de sangue.

4) BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Aquele que participar deste estudo contribuirá para melhorar o conhecimento da influência genética na insuficiência cardíaca. Adicionalmente, há a possibilidade, após a comprovação da relação entre genética e resposta terapêutica, de individualização do tratamento permitindo a adequação do seu tratamento para uso apenas de fármacos comprovadamente com benefícios.

5) CONFIDENCIALIDADE

Qualquer informação relacionada a esse projeto com respeito ao senhor(a), tais como, história médica, exame físico, resultados de exames complementares, serão mantidos em sigilo e apenas as pessoas envolvidas neste estudo e o seu médico assistente terão acesso.

6) CUSTOS

A participação neste estudo não tem objetivo de submeter você a um tratamento, e não terá custo para você. **Pelo fato deste projeto de acompanhamento ser voluntário, nem você ou os médicos que dele participam receberão qualquer compensação financeira.**

7) DIREITOS PELA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO

Você entende que a participação neste estudo é voluntária e que se decidir não participar, você não sofrerá nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Se resolver participar, você poderá mudar de idéia sobre continuar no estudo. Caso isso aconteça, você entende que terá de informar seu médico sobre esta decisão imediatamente. Está ciente de que tal decisão de sua parte não terá nenhuma influência sobre a disponibilidade de cuidados médicos futuros ou outros benefícios aos quais você tem direito, independente de sua participação neste grupo.

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continuação)

8) AS INFORMAÇÕES COLETADAS NO ESTUDO SERÃO CONFIDENCIAIS?

Sim. Você está ciente de que todos os registros médicos e materiais de pesquisa que poderiam identificá-lo (a) serão mantidos em segredo e que, dentro do que é permitido pelas leis e/ou regulamentos aplicáveis, não estarão disponíveis publicamente. Você compreende que se os resultados deste estudo forem publicados na literatura médica, sua identidade não será revelada.

9) CONTATO

Se você tiver alguma dúvida durante o estudo, entre em contato com os médicos da Disciplina de Cardiologia **na Av. 28 de Setembro, 77 – 2º andar - cardiologia e no telefone (21) 2587-6684.**
Se você tiver dúvidas em relação aos seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com do **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto na Av. 28 de Setembro, 77 – Térreo e no telefone (21) 2587-6775.**

O QUE ACONTECERÁ COM VOCE SE DECIDIR PARTICIPAR?

O médico irá ler este Termo de Consentimento com você. Após a assinatura do mesmo, será feita uma coleta única de aproximadamente 10 (dez) mililitros de sangue por um profissional especializado. Esta coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o seu tratamento. Esta amostra será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Geral onde será guardado e utilizado no período de dois anos, período este da pesquisa.

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (conclusão)

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

PROJETO DE PESQUISA:

Importância do polimorfismo genético no prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com insuficiência cardíaca e cardiomiopatia isquêmica

Investigador Principal: Dr. Gustavo Salgado Duque

Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto - Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Eu esclareci todas as dúvidas que tinha a respeito deste projeto de pesquisa.

Eu li e entendi o que está escrito neste formulário. Eu aceito participar deste projeto.

_____

Nome do paciente por extenso

_____

Assinatura do paciente data

_____

Assinatura do investigador data

_____

Nome da testemunha* por extenso

_____

Assinatura da testemunha* data

* A assinatura da testemunha é necessária quando o paciente for analfabeto e /ou assinar com impressão datiloscópica.

ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continua)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Faculdade de Ciências Médicas
Hospital Universitário Pedro Ernesto
Serviço/Disciplina de Cardiologia
Setor de Hipertensão Arterial e Lípides
Laboratório de Diagnósticos por DNA

Consentimento Informado

1- Afirmação Introdutória

Você está sendo convidado a participar de um estudo de investigação clínica e genética. Para decidir se você deseja ou não participar, você precisa entender as vantagens e desvantagens do mesmo, para poder formar a sua opinião.

2- Objetivo do Estudo

Embora tenha havido muitos avanços no diagnóstico e tratamento das doenças cardiovasculares, elas ainda permanecem como causa de grande morbidade e mortalidade em vários países, inclusive o Brasil, sendo uma causa comum de afastamento do trabalho ou mesmo de aposentadoria precoce. Considerável soma de recursos estão destinadas em todo o mundo, para pesquisas e programas científicos com o objetivo máximo de identificar, controlar e prevenir estas doenças.

Uma das formas de fazer esta prevenção é identificar desde cedo certas condições, chamadas de fatores de risco cardiovascular, que aumentam a chance das pessoas de terem angina ou infarto, derrame, ou ouros problemas do coração e da circulação. São eles: pressão alta, diabetes ou açúcar alto no sangue, excesso de peso, problemas de colesterol alto e outros hábitos como má alimentação, fumar ou usar bebida alcoólica além de não praticar atividade física. Além disso, sabemos hoje que estes fatores de risco costumam estar presentes em vários membros da mesma família, o que quer dizer que se você ou algum parente seu tem alguma dessas anormalidades, as outras pessoas da sua família também poderão ter essas mesmas doenças.

Com o objetivo de esclarecer alguns destes fatores de risco, estamos convidando você, para comparecer ao Hospital Universitário Pedro Ernesto e realizar avaliações clínicas e exame de sangue. Depois de toda a avaliação, podemos saber se você tem algum problema no coração ou alguma dessas anormalidades que poderão causar esses problemas, no futuro. Na visita médica aqui no Hospital, serão feitos a medida da pressão arterial e verificação do seu peso, de sua altura, a medida da sua cintura, além da coleta de sangue para dosar as gorduras: colesterol, HDL, LDL e triglicerídeos, lém de lipoproteínas (apolipoproteína A e apolipoproteína B e lipoproteína A). O sangue também será utilizado para realizar exames em genes relacionados às gorduras (colesterol, HDL, LDL, triglicerídeos e lipoproteínas). Nesta avaliação, não serão administrados medicamentos. Depois do resultado dos exames, caso seja necessário e de seu interesse, você poderá realizar o tratamento no Serviço de Cardiologia deste hospital, ou levar os exames para o seu médico particular.

Além disso, você saberá como está a sua saúde cardiovascular geral e a prática de hábitos saudáveis de vida poderá ser adotada.

ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continuação)

3- Procedimentos Médicos a Serem Seguidos

Após ler, entender e concordar, você assinará o Consentimento Informado, e somente depois, os médicos irão examinar você e colher o seu sangue para os exames laboratoriais. Se você estiver tomando algum remédio prescrito pelo seu médico, eles deverão ser mantidos, ou, a critério do seu médico, poderão ser modificados no futuro, de acordo com o resultado de seus exames. A avaliação constará de uma visita médica, onde serão realizados o exame clínico, antropométrico e a coleta de sangue, Após esta visita, você terá acesso a todos os resultados e poderá ser acompanhado aqui no Hospital Pedro Ernesto ou levar estes resultados para seu médico particular.

4- Desconfortos e Riscos

Nenhum novo medicamento ou forma de tratamento será testado em você e o único desconforto será o da coleta de sangue, através da punção do sangue de sua veia, como é feito habitualmente.

5- Exclusões

Se você não entender alguma palavra do texto, peça explicações ao médico que o está atendendo. Se não for da sua vontade, você não tem obrigação de participar do estudo.

6- Benefícios aos participantes

As doenças do coração são a principal causa de morte no nosso país e no mundo. Várias são as situações que, quando presentes, aumentam o risco do indivíduo ter um problema do coração: pressão alta, diabetes, colesterol elevado, fumo, obesidade, falta de exercício físico são algumas das mais conhecidas. Estas condições são reconhecidas hoje como os fatores de risco cardiovascular. Hoje se sabe que, quanto mais cedo estes fatores são identificados, mesmo que a pessoa não sinta nada, maior o benefício que esta pessoa terá com o tratamento imediato.

Ao participar de estudos como este, você estará colaborando para que um maior conhecimento médico e científico em nosso país seja alcançado. Além disso, você estará realizando uma revisão ampla da sua saúde cardiovascular e em sendo encontrada alguma anormalidade, você será devidamente informado, e as orientações médicas serão fornecidas.

É possível também que nos indivíduos, onde os fatores de risco cardiovascular estão mais presentes, sejam identificados e possam ser alertados para mudanças nos seus hábitos, com vistas à prevenção das doenças do coração.

7- Dados confidenciais

A menos que sejam requeridos por lei, apenas o investigador, o comitê de revisão e a comissão de ética terão acesso aos dados confidenciais que identificam você pelo nome. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou em publicações; no entanto, você não será identificado nestas apresentações. Todo o material biológico coletado neste estudo será exclusivamente utilizado para as pesquisas dos fatores de risco cardiovascular e avaliação genética. Qualquer outro exame a ser realizado com este material será solicitado novo consentimento, informando detalhadamente o fim a que se destina.

ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (conclusão)

8- Novas descobertas

Se no decorrer deste estudo ou ao seu final, surgir alguma conclusão relevante para seu benefício, você será informado a respeito.

9- Pessoas para contato

O pesquisador ou seu substituto responderá a todas as perguntas. Se você tiver questões adicionais no decorrer deste estudo sobre a pesquisa ou seus direitos como um participante da pesquisa, poderá dirigi-las à Rossana Ghessa Andrade de Freitas, ou Dra. Maria Eliane Magalhães no setor de Hipertensão Arterial e Lípides da Cardiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tel: (21) 2587-6482 ou Dra. Dayse Aparecida da Silva no Laboratório de Diagnósticos por DNA da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tel: (21) 2334-0594.

10- Participação voluntária

Você está participando voluntariamente deste estudo. Você pode se recusar a participar do mesmo a qualquer momento, sem penalidades nem perda dos benefícios a que você já tem direito.

Li o texto acima e estou ciente do conteúdo deste formulário de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Consinto voluntariamente em participar. Recebi uma cópia deste formulário de consentimento.

Este termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE) e qualquer dúvida pode-se entrar em contato através do endereço: CEP/HUPE:CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA. AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030. Ou pelo telefone: (21) 2868-8253, ou através do e-mail: cep-hupe@uerj.br.

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do investigador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura: _____ Data: _____