



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Sabrina Mayara Cezario Gimenez

**Variantes Genéticas e Variabilidade da
Frequência Cardíaca em Pacientes com
Antecedente de Síndrome Coronariana
Aguda**

São José do Rio Preto
2019

**Variantes Genéticas e Variabilidade da
Frequência Cardíaca em Pacientes com
Antecedente de Síndrome Coronariana Aguda**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
São José do Rio Preto para obtenção do Título
de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.**

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Fernandes de
Godoy
Co-orientadora: Marcela Augusta de Souza
Pinhel**

**São José do Rio Preto
2019**

Sabrina Mayara Cezario Gimenez

**Variantes Genéticas e Variabilidade da
Frequência Cardíaca em Pacientes com
Antecedente de Síndrome Coronariana Aguda**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy

1º Examinador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

2º Examinador: Profa. Dra. Michele Lima Gregório

3º Examinador: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

4º Examinador: Profa. Dra. Marilita Falângola Accioly

Suplentes:

Profa. Dra. Camila Ive Oliveira Brancati

Prof. Dr. Márcio Antônio dos Santos

São José do Rio Preto, 16/12/2019.

Gimenez, Sabrina Mayara Cezario
Variantes Genéticas e Variabilidade da Frequência Cardíaca em Pacientes com
Antecedente de Síndrome Coronariana Aguda
Sabrina Mayara Cezario Gimenez
São José do Rio Preto, 2019
121 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy

1. Doença da Artéria Coronariana; 2. Lipoproteínas; 3. Infarto do Miocárdio; 4.
Genética; 5. Sistema Nervoso Autônomo. 6. Variabilidade da Frequência Cardíaca.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	ii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas e Quadros.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xi
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1 Doenças Cardiovasculares.....	1
1.2 Fisiopatologia	2
1.3 Colesterol.....	5
1.3.1 Absorção e Transporte.....	7
1.3.2 Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL).....	8
1.3.3 Metabolismo das Lipoproteínas.....	10
1.4 Fatores de Riscos para Doença Arterial Coronária.....	12
1.5 Fatores Genéticos Associados a Doença Arterial Coronária.....	18
1.6 Sistema Nervoso Autônomo.....	23
1.6.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	25
1.7 Objetivo Geral.....	30
2. Casuística e Métodos.....	31
2.1 Casuística.....	31
2.2 Métodos.....	32

2.2.1	Análise Genética.....	33
2.2.2	Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	42
2.2.3	Análise Bioquímica.....	47
2.2.4	Análise Estatística.....	48
3.	Resultados.....	49
3.1	Perfil Clínico-Demográfico e Hábitos de Vida.....	49
3.2	Análise de Polimorfismos Genéticos.....	49
3.3	Perfil Lipídico.....	58
3.4	Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	61
3.4.1	Relação da Variabilidade da Frequência Cardíaca e Polimorfismos Genéticos.....	62
3.4.2	Relação da Variabilidade da Frequência Cardíaca e Perfil Lipídico.....	62
4.	Discussão.....	71
5.	Conclusões.....	86
6.	Referências Bibliográficas.....	86
7.	Anexos.....	113
	Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	113
	Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	114
	Anexo III - Questionário Específico para Antecedentes Pessoais e Histórico Médico.....	118

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese
ao meu amado filho
Davi Gimenez.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, que me deu força para continuar e me colocou ao lado de pessoas tão especiais.

Ao meu marido Jefferson pelo amor, pelo incentivo a persistência e pela compreensão e paciência nas ausências. Viver ao seu lado torna as coisas mais leves, obrigada por tudo! Te amo.

Agradeço ao meu filho, Davi Gimenez, meu “presente divino”, meu “Tesouro do Universo”: você, meu filho, é o meu propósito.

Clarice e Antônio, meus pais de criação, todo meu amor e gratidão por vocês.

À minha querida amiga Maria Clara Calastri, presente que a vida me deu, sou muito grata por sua amizade.

À minha querida equipe da Cardio, Tayanne, Andressa, Milton, Vitor, Michele, Rodolfo. Por toda ajuda e dedicação nesses anos de pesquisa.

Agradeço a todos os pacientes, que serviram de base fundamental para a concretização desse trabalho: meu respeito e gratidão. Sem essas pessoas, nada disso seria possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy, pelo incentivo, apoio e credibilidade. Agradeço por acreditar no meu trabalho e contribuir para meu desenvolvimento científico. Muito obrigada pela oportunidade.

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, tão querida e amada, faltam palavras para expressar todo o meu carinho e admiração. Queria agradecer do fundo do meu coração por ter me acolhido na casa NPBIM há 8 anos atrás e me permitir através do

convívio diário aprender e evoluir como pessoa e profissional. Você sempre estará no meu coração guardada com muito carinho e amor.

À minha querida equipe de trabalho NPBIM. Com vocês a vida se torna mais leve, divertida. Tenho muita sorte!

À equipe LITEX, Heloisa Caldas, Camila Ravazi, Greiciani Florim e Carla Graça, por toda amizade e carinho que sempre recebi desde o início, vocês são muito importantes pra mim.

A todos os pesquisadores e funcionários do bloco U6 da FAMERP, que sempre foram solícitos em questão de ajuda. Obrigada por tudo!

Aos meus sogros Mimar e Diogo Gimenez, por todo carinho.

À Marcela Pinhel, minha eterna gratidão e carinho. Obrigada por tudo.

A Antonio Luiz Cadamuro, (*in memorian*), meu irmão, amo você.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e Hospital de Base - HB e seus dirigentes, pela cooperação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, pela oportunidade oferecida, atenção, eficiência e por todo o suporte necessário.

Aos funcionários da Pós-Graduação – FAMERP, José Antônio Silistino, Fabiana Cristina Godoy e Luiz Henrique pela colaboração e carinho.

Aos funcionários, enfermeiras e residentes do Departamento de Cardiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Muito obrigada.

Ao Santo Expedito, meu santo protetor, de quem sou devota, e que sempre me manteve firme na fé e na vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa, com auxílio à pesquisa regular - processo nº (2016/03983-3).

À CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante meu doutorado na FAMERP, àqueles que a mim dedicaram seu tempo, amizade e ajuda, pelos conselhos que me engrandeceram, pelo carinho e apoio que me ajudaram a crescer e a entender melhor o mundo da ciência. Muito Obrigada a todos que de alguma forma vivenciaram comigo minha vida acadêmica.

EPÍGRAFE

*“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não
aprendo nem ensino.”*

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação da formação da placa de ateroma no interior do vaso sanguíneo.....	4
Figura 2.	Desenvolvimento de aterosclerose. As Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) produzidas pelas células endoteliais, SMCs e macrófagos oxidam o LDL no espaço subendotelial, nos locais de dano endotelial, dando início a eventos que culminam na formação de uma placa fibrosa. A ruptura da placa fibrosa leva à formação de trombo e oclusão do vaso.....	5
Figura 3.	Estrutura do Colesterol.....	6
Figura 4.	Distribuição da densidade e tamanho das lipoproteínas.....	8
Figura 5.	Estrutura da lipoproteína de baixa densidade - LDL.....	9
Figura 6.	Representação do sistema nervoso autônomo, suas divisões e funções.....	24
Figura 7.	a) Representação das ondas obtidas em um eletrocardiograma (ECG). b) Representação do intervalo RR entre duas ondas R, que corresponde a um ciclo cardíaco completo.....	25
Figura 8.	Tacograma de um adulto jovem normal (A) e de um recém-nascido normal (B).	26
Figura 9.	Esquematização de um eletrocardiograma que corresponde ao domínio do tempo.....	27
Figura 10.	Análise espectral do domínio da frequência. Na abcissa há a frequência dos sinais em Hertz e na ordenada a potência dos sinais (em ms^2/Hz). Frequências entre 0,04 e 0,15Hz estão relacionados à baixa frequência (LF) de variação dos intervalos RR e corresponde as atividades simpática e parassimpáticas. Frequências acima de 0,15 até 0,4Hz indicam grandes variações do intervalo RR (HF) e estão relacionados com a atividade vagal.	28

- Figura 11. Ilustração do padrão de amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real, mostrando genótipo homozigoto mutante, representado pela amplificação do alelo marcado com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) em azul..... 36
- Figura 12. Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo heterozigoto com amplificação de ambos os alelos marcado com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e fluoróforo VIC..... 37
- Figura 13. Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo homozigoto selvagem, representado pela amplificação do alelo marcado com fluoróforo VIC em verde..... 37
- Figura 14. Etapas do procedimento experimental de Infinium Global Screening Array-24 Kit, da plataforma Illumina iSCAN (adaptado de *Infinium[®] DNA Analysis Beadchips*)..... 40
- Figura 15. Voluntária em avaliação da variabilidade da frequência cardíaca por frequencímetro polar RS800CX..... 43
- Figura 16. Gráfico de Poincaré de um adulto jovem normal (A) e de um recém-nascido normal (B). A dispersão tanto de curto (SD1) quanto de longo prazo (SD2) no painel B está menor do que no painel A..... 45
- Figura 17. Análise espectral de frequências de um adulto jovem normal (A) e de um recém-nascido normal (B). O componente de alta frequência (HF) está proporcionalmente bem mais reduzido no recém-nascido (setas) assim como a potência total..... 46

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Informações Técnicas do Infinium Global Screening Array-24 Kit BeadChip (Illumina®).....	40
Quadro 1 .	Ensaios e sondas <i>TaqMan®</i> SNP <i>Genotyping Assays</i>	41
Tabela 2.	Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	52
Tabela 3.	Frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos APOB (rs693 e rs1042031) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	53
Tabela 5.	Frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos RLDL (rs688, rs6511720) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	55
Tabela 6.	Combinações genótípicas para os polimorfismos APOB (rs693 e rs1042031); PCSK9 (rs505151, rs11591147, rs11206510) e RLDL (rs688, rs6511720) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	56

Tabela 7	Heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para os polimorfismos de APOB (rs693 e rs1042031); PCSK9 (rs11206510) e RLDL (rs688, rs6511720) com correspondente valor de P para o teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	57
Tabela 8	Análise de desequilíbrio de ligação para os polimorfismos de base única (SNPs) do gene APOB (rs693 e rs1042031); PCSK9 (rs505151, rs11591147, rs11206510) e RLDL (rs688, rs6511720) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	58
Tabela 9	Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	59
Tabela 10	Frequência de valores alterados do perfil lipídico em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	60
Tabela 11	Resultados de variáveis (desvio padrão±média) relativas em pacientes com doença arterial coronária (G1) e pacientes saudáveis (G2).....	61
Tabela 12	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene <i>APOB</i> rs693 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	63

Tabela 13	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene <i>APOB</i> rs1042031 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2)	66
Tabela 14.	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene <i>PCSK9</i> – rs11206510 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda e sua relação com pelo menos um alelo de risco comparado ao genótipo selvagem.....	67
Tabela 15-	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene <i>PCSK9</i> – rs11206510 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).	68
Tabela 16	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene <i>LDL</i> rs688 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).....	69
Tabela 17	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao CT alterado em pacientes com DAC e SCA.....	70
Tabela 18	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao HDLc alterado em pacientes com DAC e SCA.....	71
Tabela 19	Variabilidade da frequência cardíaca associada ao triglicerídeo alterado em pacientes com DAC e SCA.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
/	Por
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou Igual
≤	Menor ou Igual
±	Mais ou Menos
μL	Microlitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
rpm	Rotação por minuto
aa	Aminoácidos
AGL	Ácidos graxos livres
APOB	Apolipoproteína B
APOC	Apolipoproteína C
APOE	Apolipoproteína E
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CE	Colesterol esterificado
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Cm	Centímetro
CT	Colesterol Total
DAC	Doença arterial coronária
DCNTs	Doenças cardiovasculares
DEPC	Água ultrapura
DIN	DNA <i>Integrity Number</i>
DL	Desequilíbrio de ligação
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Àcido desoxirribonucleico

ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF-A	Fator de crescimento epidérmico A
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EHW	Equilíbrio de Hardy Weinberg
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FC	Frequência cardíaca
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
GOF	Gain-of-function
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HB/FAMERP	Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
HDLc	Fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade
HF	Alta frequência
HMG-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
HIV	Imunodeficiência humana
HW	Hardy Weinberg
Hz	Hertz
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IAMSSST	Infarto do miocárdio sem supradesnivelamento do segmento ST
IAMCSST	Infarto agudo do miocárdio com supra no segmento ST
IC	Insuficiência cardíaca
IDL	Lipoproteínas de densidade intermédia
IMC	Índice de massa corporal
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Dalton
Kg/m²	Quilograma por metro quadrado
Kubios HRV	<i>Software Heart Rate Variability</i>
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase

LDLc	Fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade
LF	Baixa frequência
LP	Lipoproteína
LOF	<i>Loss-of-function</i>
LPL	Lipoproteína lípase
Mg/dL	Miligrama por decilitro
MiliQ	Água deionizada
mL	Mililitro
mmHg	Mililitros de mercúreo
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
N	Números de indivíduos
NO	Óxido nítrico
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão arterial
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
pNN50	Porcentagem de intervalos normais com diferença superior a 50ms
qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
RLDL	Receptor de LDL
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
RMSSD	Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes
RR	Intervalo RR entre batimentos cardíacos
SCA	Síndrome coronária aguda
SD1/SD2	Relação entre os desvios-padrão 1 e 2 obtidos pelo gráfico de Poincaré-Bendixson
SDNN	Desvio-padrão entre batimentos normais
SNA	Sistema nervoso autônomo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único

SNS	Sistema nervoso simpático
ST	Segmento da onda T no ECG
TA	Temperatura ambiente
TG	Triglicérides
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U/μL	Unidade por microlitro
V	Volts
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
VLF	Muito baixa frequência
X²	Teste Qui-quadrado

RESUMO

Introdução – Genes do metabolismo de lipídios estão envolvidos com a doença arterial coronária (DAC) e síndrome coronariana aguda (SCA), assim como, a baixa variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Diante disso, a identificação de marcadores genéticos, VFC e fatores de riscos podem contribuir para o melhor conhecimento. **Objetivo** - Avaliar a associação de variantes genéticas envolvidas na via do metabolismo de lipídios e relacionar com perfil bioquímico e antropométrico, VFC, e hábitos de vida (tabagismo, etilismo e sedentarismo) em pacientes com DAC e dislipidemia, com ou sem SCA.

Casuística e Métodos – Foram estudados 80 pacientes com dislipidemia e DAC aterosclerótica, em tratamento com estatinas potentes, com idade >45 anos, distribuídos em: Grupo 1= 63 com histórico de SCA prévia e Grupo 2= 17 com DAC sem antecedente de SCA. Os pacientes foram submetidos à coleta de amostra de sangue periférico para análise do perfil genético (DNA microarray), sendo selecionados três genes relacionados com a via do metabolismo de lipídios com subsequente análise de sete polimorfismos (*APOB*-rs693, *APOB*-rs1042031, *PCSK9*-rs505151, *PCSK9*-rs11591147, *PCSK9*-rs11206510, *LDL*-rs688, *LDL*-rs6511720) por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (TaqMan *SNP Genotyping*). O perfil bioquímico foi obtido de prontuário médico eletrônico. A VFC foi analisada com auxílio de séries temporais registradas com Polar RS800 CX, por meio de método não lineares. Os dados foram analisados aplicando-se test t ou Mann-Whitney, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado. Admitiu-se erro α de 5%.

Resultados – Não observou diferença significativa entre os grupos para tabagismo, hipertensão, IMC e sedentarismo ($P>0,05$). Polimorfismos genéticos: *LDL*-rs6511720 observou-se presença do genótipo selvagem em G2 (67%) quando comparado a G1 (0%; $P<0,0001$); destacou-se em G1 o genótipo (65%;TT) e o alelo polimórfico (83%T;

$P < 0,0001$). A distribuição genotípica e alélica foi semelhante entre os grupos para os demais genes. Em relação ao perfil lipídico, observou-se semelhança entre os grupos nos valores de mediana para CT, HDLc e TG. Níveis aumentados de LDLc prevaleceram em G2 (83,0mg/dL) em relação a G1 (74,0mg/dL; $P < 0,025$). Quanto à VFC, das variáveis analisadas, houve diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2, respectivamente, para: RRi (817 ± 103 x $961,6 \pm 136,8$ ms; $P < 0,0001$); SDNN (141 ± 39 x $36,4 \pm 30,7$ ms; $P < 0,0001$); TotalPowerms2 (21.222 ± 11.663 x $1827,1 \pm 4869,1$; $P < 0,0001$); LnTotalPowerms2 ($9,83 \pm 0,51$ x $7,5 \pm 8,5$; $P = 0,0211$); VLFPowerms2 (1782 ± 965 x $911,0 \pm 2562,3$; $P = 0,0053$). Perfil lipídico e VFC observou-se semelhança entre as variáveis, **Conclusões:** Polimorfismos de *LDL* rs688 e rs6511720 associam-se com SCA prévia. Pacientes com doença arterial coronária têm redução da variabilidade da frequência cardíaca. Pacientes que têm pelo menos um genótipo polimórfico do gene PCSK9-rs11206510 sua variabilidade da frequência cardíaca é pior. A redução da VFC pode estar associada com um pior perfil lipídico.

Palavras-chave: Doença da Artéria Coronariana; Lipoproteínas; Infarto do Miocárdio; Genética; Sistema Nervoso Autônomo, Variabilidade da Frequência Cardíaca.

ABSTRACT

Introduction - Lipid metabolism genes are involved with coronary artery disease (CAD) and acute coronary syndrome (ACS) as well as low heart rate variability (HRV). Given thus, the identification of genetic markers, HRV and risk factors may contribute to better knowledge. **Objective** - To evaluate the association of genetic variants involved in the lipid metabolism pathway and their relation to biochemical and anthropometric profile, HRV, and lifestyle (smoking, drinking and physical inactivity) in patients with CAD and dyslipidemia, with or without ACS. **Patients and Methods** - We studied 80 patients with dyslipidemia and atherosclerotic CAD, under treatment with potent statins, aged > 45 years, divided into: Group 1 = 63 with a history of previous ACS and Group 2 = 17 with a CAD without a history of ACS. Patients underwent peripheral blood sampling for genetic profile analysis (DNA microarray), and three genes related to the lipid metabolism pathway were selected with subsequent analysis of seven polymorphisms (APOB-rs693, APOB-rs1042031, PCSK9-rs505151, PCSK9-rs11591147, PCSK9-rs11206510, LDLR-rs688, LDLR-rs6511720) by real time polymerase chain reaction (PCR) (TaqMan SNP Genotyping). The biochemical profile was obtained from electronic medical records. HRV was analyzed with the aid of time series recorded with Polar RS800 CX using linear and nonlinear methods. Data were analyzed using T-test or Mann-Whitney, Fisher's exact test or Chi-square. A 5% α error was assumed. **Results** - There was no significant difference between the groups for smoking, hypertension, BMI and physical inactivity ($P > 0.05$). Genetic polymorphisms – LDLR: Presence of wild genotype was observed in G2 (67%) when compared to G1 (0%; $P < 0.0001$); In G1, the genotype (65%; TT) and the polymorphic allele (83% T; $P < 0.0001$) stood out. The genotypic and allelic distribution was similar between groups

for the other genes. Regarding the lipid profile, there was similarity between the median values for TC, HDLc and TG. LDLc prevailed in G2 (83.0mg / dL) compared to G1 (74.0mg / dL; $P < 0.025$). Regarding HRV, of the analyzed variables, there was a statistically significant difference for: RRi (817 ± 103 x 961.6 ± 136.8 ms; $P < 0.0001$); SDNN (141 ± 39 x 36.4 ± 30.7 ms; $P < 0.0001$); TotalPowerms2 ($21,222 \pm 11,663$ x 1827.1 ± 4869.1 ; $P < 0.0001$); LnTotalPowerms2 (9.83 ± 0.51 x 7.5 ± 8.5 ; $P = 0.0211$); VLFPowerms2 (1782 ± 965 x 911.0 ± 2562.3 ; $P = 0.0053$). Lipid profile and HRV showed similarity between the variables. **Conclusion:** Polymorphisms of RLDL rs688 and rs6511720 are associated with previous SCA. Patients with coronary artery disease have reduced heart rate variability. Patients who have at least one polymorphic genotype of the *PCSK9*-rs11206510 gene, their heart rate variability is worse. The reduction in HRV may be associated with a worse lipid profile.

Keywords: Coronary Artery Disease; Lipoproteins; Myocardial infarction; Genetics; Autonomic Nervous System; Heart Rate Variability .

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) destacam-se por sua relevância mundial e por sua característica de alta morbimortalidade, não só nos países desenvolvidos mas também naqueles em desenvolvimento.⁽¹⁻⁴⁾ Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2018),⁽⁵⁾ 56 milhões de óbitos que ocorreram no mundo em 2016, aproximadamente 54%, foram relacionados a DCVs, representado por 17,5 milhões dos óbitos (46%).⁽⁶⁾ Estima-se que cerca de 7,4 milhões foram devidos à doença arterial coronariana (DAC), considerada a principal causa isolada de morte no mundo. No Brasil, as DCVs também se destacam como a principal causa de óbito. Sua prevalência na população adulta está estimada cerca de 8%.⁽³⁾ Estudo recente estima que 25 milhões de novos casos de doenças cardíacas serão diagnosticados até 2020.⁽⁴⁾

Acredita-se que as DCVs possam ser prevenidas pela adoção de estilos de vida saudável, isto é, medidas não farmacológicas, que passam por evitar o uso do tabaco, por ter uma alimentação saudável evitando a obesidade, combater o sedentarismo e o uso nocivo do álcool.⁽⁷⁾

A DAC se caracteriza pela presença de placas ateroscleróticas ou ateromas nos vasos da circulação arterial do coração. A aterosclerose coronária pode ser subclínica quando o grau de obstrução vascular é insuficiente para prejudicar o fluxo de sangue ao miocárdio. A placa aterosclerótica, entretanto, pode ter caráter obstrutivo, desencadeando a manifestação de sintomas. Nesse caso, enquanto a manifestação clínica de DAC estável é representada por angina de peito ao esforço

físico, a forma instável da doença aterosclerótica identificada como síndrome coronária aguda (SCA), envolve infarto do miocárdio sem ou com supradesnivelamento do segmento ST (IAMSSST e IAMCSST, respectivamente).^(8,9)

O infarto agudo do miocárdico (IAM) é ocasionado pela ruptura de uma placa aterosclerótica em qualquer um dos vasos sanguíneos que fornecem oxigênio ao coração. Os sintomas são dor forte e/ou opressão no peito, irradiando nos ombros e braço esquerdo, pescoço e maxilar, dor abdominal, sudorese, palidez, dispneia, sensação de morte iminente, náuseas e vômitos. Seu diagnóstico é realizado por alterações eletrocardiográficas e dosagens enzimáticas.^(10,11) A Angina instável é caracterizada pela dor em repouso ou ao mínimo esforço e a sua fisiopatologia e apresentação clínica é semelhante a do IAM.⁽¹⁰⁾

1.2 Fisiopatologia

Uma das causas de SCA é a instabilização da placa aterosclerótica, que pode ocorrer pela rotura da capa fibrosa que envolve a placa aterosclerótica ou por uma simples erosão da íntima, ambas predispondo à formação aguda de um trombo obstrutivo.⁽¹²⁾ O processo se inicia no endotélio, caracterizado por funções autócrinas e parácrinas.⁽¹²⁾ O endotélio normal participa na regulação do tônus vascular, na resposta inflamatória, na coagulação/fibrinolise e na resposta imune. Seu principal produto vasodilatador, o óxido nítrico (NO), protege contra lesão vascular, inflamação e trombose. O NO inibe a adesão leucocitária ao endotélio, evita proliferação das células musculares lisas e é antitrombótico limitando a agregação plaquetária.

O endotélio é uma camada única de células especializadas que revestem a interface da parede/lúmen do vaso,⁽¹³⁾ e quando é lesado ocasiona proliferação de células musculares lisas do interior das artérias para cobrir a lesão. Essas células, ao entrarem em contato com o colesterol proveniente da lipoproteína de baixa densidade (LDLc), podem acarretar uma reação inflamatória e logo a formação de estrias gordurosas ou placas. Isto é, o LDL é oxidado pelas quatro principais células presentes na lesão aterosclerótica: macrófagos, linfócitos, células endoteliais e células musculares lisas. Após ser oxidado, o LDL é captado pelos macrófagos provocando morte celular com perpetuação dos mecanismos inflamatórios, imunológicos e, por conseguinte, progressão da lesão vascular.^(14,15)

O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, acontece na mesma proporção à concentração dessas lipoproteínas no plasma. Acredita-se que o acúmulo de lipídios na íntima torna a placa inerentemente instável. A LDL desempenha um papel mais complexo na instabilidade da placa.^(13,16) Assim que as células inflamatórias atravessam o endotélio disfuncional, o colesterol também entra na forma de LDL e fica retido no espaço subendotelial. A LDL é oxidada por radicais livres originando um composto pró-inflamatório, sendo absorvida pelos macrófagos da íntima. Os macrófagos com lípidos são chamados de células espumosas, considerado o principal componente das estrias gordurosas, caracterizando lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Quando ativados os macrófagos ocasionam a progressão da placa aterosclerótica através da secreção de citocinas, que aumentam a inflamação, e de enzimas proteolíticas, que podem degradar colágeno e outros componentes teciduais locais. Além dessas, outras células inflamatórias também estão envolvidas no processo aterosclerótico.^(13,16)

A progressão da lesão para placas fibróticas resultantes do processo inflamatório, os quimioatrativos de macrófagos ocasiona a infiltração e a proliferação de células musculares lisas. Estas, produzem a matriz extracelular, proporcionando uma barreira fibrosa estável entre os fatores pró trombóticos da placa. A inflamação não resolvida leva a formação de placas vulneráveis (Figura 1), com núcleos necróticos grandes e uma capa fibrosa afilada. Um desequilíbrio entre fatores inflamatórios e os mediadores especializados de pró-resolução (SPMs) facilitam a formação da placa vulnerável. A ruptura da capa fibrosa promove a formação de trombos, resultando em eventos cardiovasculares clínicos isquêmicos.⁽¹⁷⁾ Esse processo de “ruptura de placa” pode ser responsável pela ocorrência das SCA (angina instável, infarto do miocárdio) e eventos cerebrais isquêmicos (acidente vascular cerebral, dentre outros).⁽¹³⁾

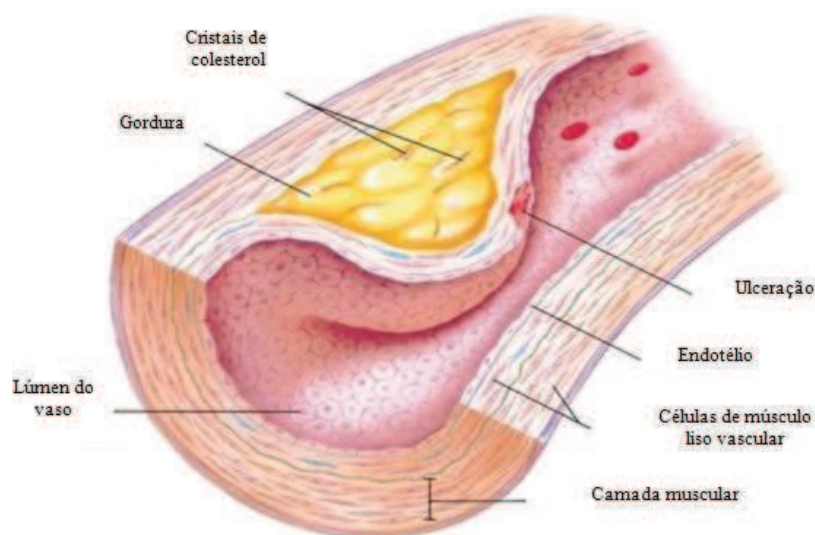


Figura 1. Representação da formação da placa de ateroma na camada subendotelial do vaso sanguíneo.⁽¹⁸⁾

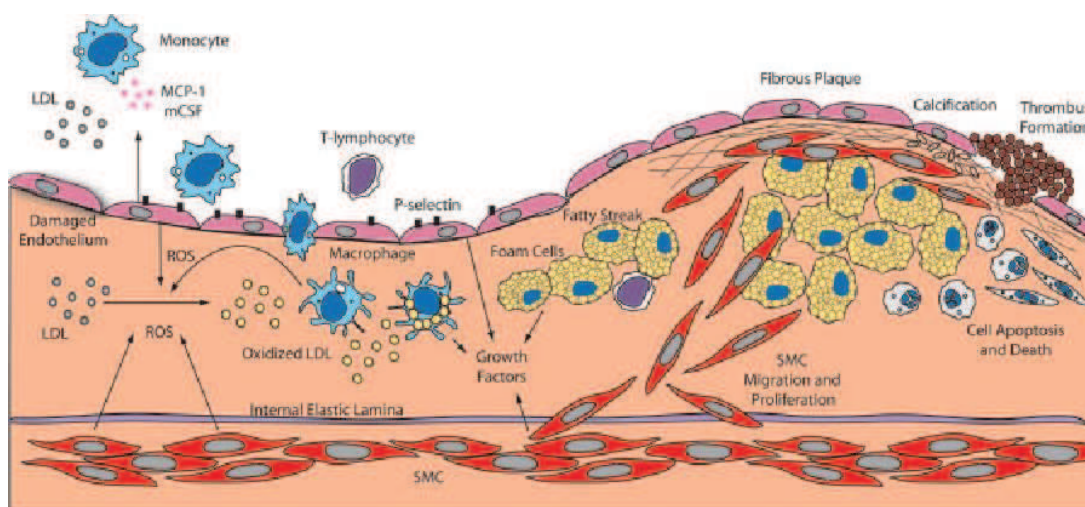


Figura 2 - Desenvolvimento de aterosclerose. As Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) produzidas pelas células endoteliais, SMCs e macrófagos oxidam o LDL no espaço subendotelial, nos locais de dano endotelial, dando início a eventos que culminam na formação de uma placa fibrosa. A ruptura da placa fibrosa leva à formação de trombo e oclusão do vaso.⁽¹⁹⁾

1.3 Colesterol

Níveis elevados de LDL-C no plasma são um fator de risco bem estabelecido para DCV.⁽²⁰⁻²²⁾ Segundo a WHO aproximadamente 2,6 milhões de mortes são causadas pela elevação do colesterol.^(23,24) Em indivíduos sem alterações genéticas, cerca de 70% do colesterol é adquirido pela síntese celular no fígado (colesterol endógeno). Enquanto 30% é decorrente da dieta (colesterol exógeno), absorvido pelo intestino e transportado para o fígado, sendo metabolizado para ser utilizado em tecidos adjacentes. O seu excesso é armazenado no tecido adiposo e pode ser prejudicial para a saúde, em particular no desenvolvimento da aterosclerose e suas consequências, por meio do acúmulo em locais indesejados de onde dificilmente é

removido. Diante disso, acredita-se que alterações no perfil lipídico predisõem ao desenvolvimento de DCVs.⁽²¹⁾

O colesterol é considerado o principal esteroide dos tecidos humanos, é um lipídio esteroide constituído por quatro anéis, unidos entre si e que no total constituem uma molécula de 27 carbonos.⁽²⁵⁾ Tem caráter anfipático, pois possui uma cabeça polar (grupo hidroxila em C3) e uma cadeia hidrocarbonada não polar (núcleo esteróide e cadeia lateral hidrocarbonada em C17; Figura 3).^(26,27)



Figura 3. Estrutura do colesterol.²⁷

O colesterol é o precursor de hormônios esteróides, ácidos biliares e vitamina D, além de ter importantes funções nas membranas celulares, atuando na sua fluidez e no estado de ativação de enzimas ligadas a membranas.^(29,30) Diante disso, ressalta-se a importância das células receberem um suprimento contínuo de colesterol.⁽³¹⁾ Sabe-se que em parte o colesterol é adquirido a partir de alimentos, porém a maior

proporção é sintetizada no fígado passando para a circulação geral, sendo transportada por lipoproteínas.^(32,33)

O colesterol está presente nos tecidos na forma de colesterol livre e esterificado e no plasma em combinação com um ácido graxo de cadeia longa, na forma de éster de colesterol, sua forma de armazenamento. No plasma, ambas as formas são transportadas em lipoproteínas. É sintetizado em diversos tecidos a partir de acetil-CoA. Pode ser encontrado nos alimentos de origem animal, como gema do ovo, carne, fígado e cérebro. A LDL do plasma é o veículo que oferece o colesterol e o éster de colesterol aos tecidos. O colesterol livre é removido dos tecidos pela lipoproteína de alta densidade (HDL) plasmática e transportado até o fígado, no qual é eliminado do organismo em sua forma inalterada ou após conversão em ácidos biliares pelo transporte reverso do colesterol. Por fim, seu principal papel em processos patológicos consiste em atuar como fator na gênese da aterosclerose de artérias vitais, causando doença vascular cerebral, coronariana e periférica.⁽³⁴⁾

1.3.1 Absorção e transporte

O colesterol circulante precisa ser transportado pelas lipoproteínas, uma vez que é insolúvel.^(26,35,36) Estes transportadores são complexos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas, designadas apolipoproteínas, associados a diferentes quantidades de colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos e triacilgliceróis. Existem várias classes de lipoproteínas – quilomicrons (QM), quilomicrons remanescentes, VLDL, LDL e HDL; Figura 4.⁽²⁶⁾

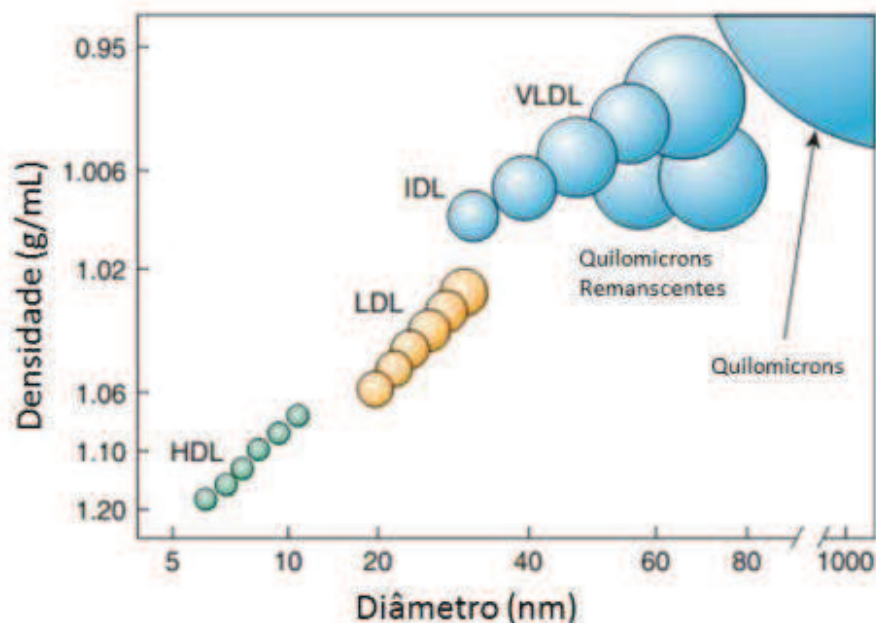


Figura 4. Distribuição da densidade e tamanho das lipoproteínas.²⁶

1.3.2 Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

Externamente a LDL é composta por uma monocamada de fosfolípidios que contém colesterol não-esterificado livre, e apolipoproteína-B-100. A parte interna é constituída por um núcleo apolar composto por ésteres de colesterol e em menor quantidade triglicerídeos e colesteróis não-esterificados (Figura5).⁽³⁷⁾

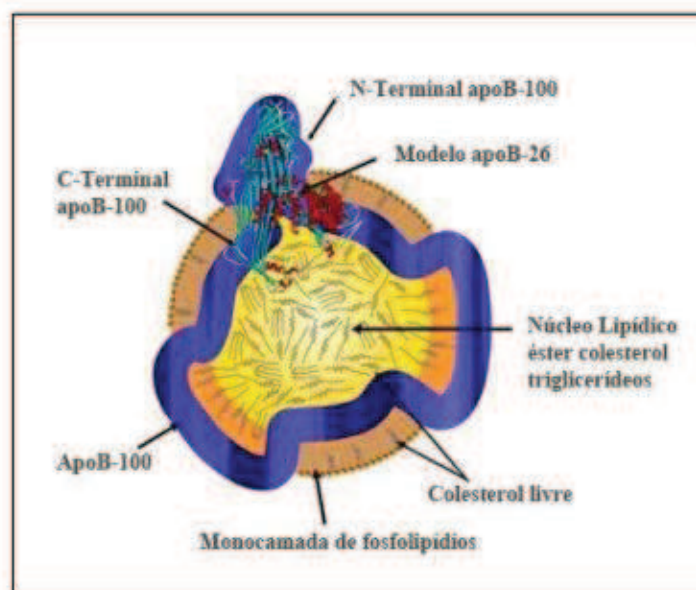


Figura 5. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade – LDL.³⁷

Aproximadamente 70% de colesterol plasmático é contido nas LDLs, e a endocitose de LDLs ricas em colesterol é mediada pelo receptor LDL (RLDL). Deste modo, os LDLs atuam como veículo para o transporte de colesterol entre o fígado e as células, com objetivo de manter um suprimento constante de colesterol no corpo humano. Em algumas condições anormais, a LDL pode ocasionar o acúmulo excessivo de colesterol para formar células espumosas, acarretando o processo aterosclerótico. Apo-B100 (apolipoproteína B100) localizada na superfície das partículas de LDL, promove sua ligação com receptores de membrana. A LDL oxidada pode promover a agregação de lipoproteínas e gerar inflamação, recrutando os monócitos circulantes para o local seguido, invadindo a parede do vaso e se diferenciando em macrófagos, produzindo conseqüentemente a placa aterosclerótica.³⁸

1.3.3 Metabolismo das lipoproteínas

Via exógena

Os lípidos, provenientes da dieta após serem emulsificados com ácidos biliares e sofrerem ação de enzimas pancreáticas no lúmen intestinal são incorporados em micelas e absorvidos. Nos enterócitos, os triacilgliceróis (TG), o colesterol esterificado (CE) e os fosfolípidios voltam a ser sintetizados e juntamente com apo B48 formam os QMs, muito ricas em TG, que entram na circulação através do sistema linfático. Após, os QMs nos capilares de alguns tecidos, em particular do tecido adiposo, adquirem, a partir das HDL, apo E e apo C, enquanto os TG são hidrolisados pela lipoproteína lípase (LPL) em ácidos graxos livres (AGL), os quais são transportados para dentro dos adipócitos e armazenados sob a forma de TG (podendo posteriormente ser hidrolisados e originar AGL para serem utilizados em energia quando necessário).

Desse processo, resultam os quilomícrons residuais, com menos TG e porém mais ricos em colesterol. Estes, rapidamente são depurados da circulação através de receptores da apo B100/apo E, presentes no fígado, acarretando a sua internalização por endocitose, sendo os seus componentes hidrolisados nos lisossomos. Desta forma, o colesterol liberado é transformado em ácidos biliares, incorporado em VLDL ou armazenado sob a forma de ésteres de colesterol.⁽³⁹⁻⁴¹⁾

Via endógena

No fígado, os hepatócitos sintetizam colesterol e TG, que são incorporados em lipoproteínas, com as VLDL, transportadas por exocitose para o meio extracelular. Estas entram na circulação e são catabolizadas, tal como referido para os QMs. As VLDL apresentam na sua constituição apo B100, apo E e apo C II importantes no seu

metabolismo. Em circulação, estas lipoproteínas sofrem a ação da LPL presente nas células endoteliais, em particular no tecido adiposo, sendo convertidas em partículas cada vez menores e mais ricas em colesterol – as VLDL remanescentes ou lipoproteínas de densidade intermédia (IDL). Estas últimas são também catabolizadas pelo fígado pelos receptores apo B100 / apo E e uma pequena parte transforma-se em LDL, cujo teor de TG é bastante reduzido contrariamente ao teor de CE que é superior a 50%. Por fim, as LDL podem ser captadas para o interior das células através do receptor LDL (RLDL), assim como pelos hepatócitos que apresentam número elevado de RLDL. ⁽⁴²⁾

O RLDL é uma glicoproteína de superfície que reconhece a apo B100 e a apo E. Ressalta-se sua afinidade particularmente pela apo E em relação a apo B, e por este mesmo motivo, as LDL permanecem mais tempo no plasma do que outras lipoproteínas. A ligação da LDL ao RLDL possibilita a sua internalização por endocitose formando-se, posteriormente, endossomas. Entretanto, parte dos RLDL são reciclados, regressando à superfície celular. Quanto às LDL são degradadas em peptídeos e aminoácidos e o CE é hidrolisado podendo ser utilizado para a produção de novas membranas, hormônios esteroides e ácidos biliares. Os hepatócitos conseguem regular os teores de colesterol intracelular controlando a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima chave da síntese de colesterol e inibindo a síntese de novos receptores de LDL através da supressão do seu gene. A regulação é feita por um mecanismo de feedback. ^(39,41,43)

Via do transporte reverso de colesterol

As HDL são um grupo importante de lipoproteínas. Elas podem ser produzidas pelo fígado ou sintetizadas pelo intestino. Em ambos os processos, formam-se HDL nascentes. A HDL pode ser caracterizada como um depósito de apo E e apo C para as lipoproteínas que delas carecem (QMs, VLDL). No entanto, quando há excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos, as partículas de HDL nascentes tiram este excesso sob a forma de colesterol livre, o qual é esterificado após ação, na HDL, da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Assim, formam-se as HDL maduras que transportam esse CE em excesso para o fígado onde são captadas por receptores hepáticos (*scavenger receptor* – SR-B1) sendo o conteúdo de colesterol dessas lipoproteínas remanejado para o hepatócito, onde é catabolizado e excretado pela bile. Assim como a troca de colesterol de HDL com TG das VLDL, IDL e LDL, troca essa mediada pela CETP. Com isso, a HDL fica mais rica em TG. O transporte reverso garante que o excesso de colesterol das células seja eliminado diminuindo a probabilidade de progressão de processos ateroscleróticos.^(39,41,44,45)

1.4 Fatores de risco para DAC

Destacam-se entre os fatores de risco para as doenças cardiovasculares: idade, obesidade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemias, diabetes mellitus (DM), histórico familiar, estresse e sedentarismo. A exposição do organismo à presença desses fatores de risco cardiovasculares predispõe o desenvolvimento do processo de disfunção endotelial.^(3,46)

Reconhecidamente a prevalência de doenças cardiovasculares aumenta com a idade. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas terão mais de 60 anos em 2050 em

todo o mundo. Segundo estudo realizado em 2018, a prevalência de DAC entre adultos com mais de 65 anos foi de 19,8%, enquanto entre 45 e 64 anos foi de 7,1%.^(47,48)

Dislipidemia (DLP) é um fator de risco estabelecido para a manifestação de doença arterial coronariana pelas alterações nos níveis lipídicos na circulação envolvendo o metabolismo lipídico.⁽⁴⁹⁻⁵³⁾ Reconhecidamente, a concentração plasmática alta da LDL-C tem associação com o desenvolvimento da doença, no entanto, a concentração plasmática da HDL-C baixa tem sido relatada como um dos mais fortes fatores de risco independentes para a doença aterosclerótica coronariana. Sabe-se que a DLP na DCV é decorrente à concentração elevada de lipídeos, que ocasionam alterações do sistema de hemostasia, levando a formação da placa aterosclerótica e, conseqüentemente, a formação de trombos. Nesse caso, destaca-se o transporte reverso de colesterol realizado pela HDL, que previne também a oxidação e agregação das partículas de LDL na parede arterial, diminuindo seu potencial aterogênico.^(54,55)

A prevalência crescente da obesidade tem sido um problema de saúde de grande importância mundial. Segundo a OMS, 39% da população mundial maior de 18 anos está acima do peso, sendo 13% obesos. Diversos estudos demonstraram uma relação entre obesidade e doenças cardiovasculares.⁽⁵⁶⁾ A fisiopatologia da obesidade e aterosclerose tem vários fatores em comum. Em ambos, lipídios, partículas oxidadas de LDL e ácidos graxos livres ativam o processo inflamatório e desencadeiam a doença. A inflamação é responsável por todos os passos em direção à aterosclerose, desde a disfunção endotelial precoce até as placas ateroscleróticas que causam complicações, e está relacionada à obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2. O tecido adiposo libera adipocitocinas, que induzem resistência à insulina, disfunção

endotelial, hipercoagulabilidade e inflamação sistêmica, facilitando o processo aterosclerótico. Na obesidade visceral, adipocitocinas inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-6, MCP-1, leptina e resistina) aumentam para níveis mais elevados. Além disso, o aumento do nível de proteína C-reativa está associado a um risco aumentado de infarto do miocárdio, doença vascular periférica e diabetes mellitus.⁽⁵⁶⁾

Segundo dados do Ministério da Saúde (2013),⁽⁵⁷⁾ DM é um conjunto de alterações metabólicas, que se caracterizam por hiperglicemia pelo excesso de glicose no sangue e produção deficiente de insulina, ou pela incapacidade do organismo de utilizar a insulina produzida de forma eficiente. Nesse caso, pode haver associação a outras complicações, disfunções e insuficiência de diversos órgãos, como rins, coração e cérebro, considerada significativa causa de óbitos, insuficiência renal e DCV.⁽⁵⁸⁾ É classificada em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM (defeitos genéticos na função das células beta, na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, induzidas por drogas ou substâncias químicas, ou após o transplante de órgãos) e DM gestacional.^(59,60)

No mundo, cerca de 382 milhões de indivíduos (8,3% da população adulta) têm DM. Aproximadamente 5,1 milhões de indivíduos morreram devido à doença em 2013, podendo alcançar 592 milhões (55%) em 2035.⁶¹ No Brasil, segundo Ministério da Saúde, DM foi responsável por 4,6% de mortes em 2007, destacando-se entre os 10 países com maior número de indivíduos portadores de DM tipo 2.^(57,62)

Sabe-se que uma das principais causas de mortalidade relacionadas a DM é a doença cardiovascular, em particular a doença arterial coronária. Ainda, a presença do diabetes melito é caracterizada como fator de risco cardiovascular independente do sexo, aumentando cerca de duas a quatro vezes a probabilidade de desenvolver

eventos maiores, quando comparado àqueles indivíduos sem a doença.⁽⁶²⁾ O diabetes melito modifica a função de vários tipos de células, dentre elas as endoteliais, as musculares lisas e as plaquetas. O conjunto de anormalidades associadas, como a hiperglicemia crônica, a dislipidemia e a resistência à insulina, diminui a vasodilatação, acarreta disfunção endotelial, facilitando a progressão aterosclerótica, em especial no território coronário.⁽⁶²⁾

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg. Caracteriza-se por alterações metabólicas e funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo,⁽⁶³⁾ é considerada um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. No Brasil, HAS acomete 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, aproximadamente 60% dos idosos, corroborando direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV.⁽⁶³⁾

HAS provoca alterações estruturais e funcionais nos vasos sanguíneos e no músculo cardíaco que podem reduzir a modulação adequada do fluxo coronário.⁽⁶⁴⁾ Em indivíduos hipertensos o risco para doenças cardíacas é três vezes maior entre os homens e quatro vezes entre as mulheres, quando comparadas com indivíduos normotensos.⁽⁶⁵⁾ Segundo Melo et al., 2007, existe forte relação entre HAS e aumento de marcadores inflamatórios, o que favorece a aterogênese. Estudo recente mostrou que a redução da PA pode prevenir eventos cardiovasculares em pacientes com DAC.⁽⁶⁷⁾

Inúmeros mecanismos fisiopatológicos explicam a relação entre a pressão arterial e DAC como hiperativação do sistema nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona, mudanças nas concentrações e ativação de vasodilatadores como o óxido

nítrico e a prostaciclina, alterações hemodinâmicas e estruturais, disfunção endotelial, expressão aumentada de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, entre outros.⁽⁶⁸⁾

Outro fator de risco importante é o tabagismo, ele contribui negativamente com vários processos fisiopatológicos da DAC. O hábito de fumar aumenta a chance de desenvolvimento de aterosclerose em até 70% quando comparado a não fumantes.⁽⁶⁹⁾ Anualmente em pacientes com DAC cerca de 30 a 40% das mortes foram atribuíveis ao tabagismo, ainda, acredita-se que a cessação do tabagismo diminui o risco em 50% de eventos recorrentes.^(70- 72) Entre os mais de 7.000 produtos químicos na fumaça do cigarro, muitos dos componentes são responsáveis por mediar a fisiopatologia das DCV, tais como aterogênese, desregulação endotelial, agregação plaquetária e aceleração da aterosclerose.^(73,74)

Resumidamente, a aterogênese começa quando células inflamatórias aderem ao endotélio danificado pelo fumo e se acumula sob a superfície do vaso causando inflamação crônica e, conseqüentemente, a disfunção endotelial. Células inflamatórias subendoteliais secretam substâncias que promovem o desenvolvimento e crescimento de placa pelo acúmulo de células ricas em colesterol. A inflamação contínua, desestabiliza e rompe algumas placas, causando vasoconstrição e trombose podendo conduzir a oclusão de vasos sanguíneos.⁽⁷⁴⁾

Diversos estudos mostram benefícios do consumo moderado de álcool para doenças coronarianas, porém, o consumo excessivo de álcool pode induzir ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão, infarto do miocárdio, cardiomiopatia e acidente vascular cerebral. O abuso do álcool resulta em alterações fisiopatológicas na estrutura e vasculatura do coração e em alterações funcionais

podendo contribuir com o aumento de estresse oxidativo, disfunção endotelial, ativação de vias redox-sensíveis e predisposição a desfechos cardiovasculares.⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾

O sedentarismo tem um papel extremamente importante como fator de risco para DAC. Estudos comprovam que a atividade física aeróbica moderada, quando realizada de forma regular, no mínimo 30 minutos ao dia pelo menos 3 vezes na semana pode reduzir o risco de até 40% de eventos cardiovasculares. No Brasil, um estudo com 11.033 pessoas com mais de 20 anos de idade relatou que somente 13% das pessoas realizavam no mínimo 30 minutos de atividade física em cinco ou mais dias de semana⁽⁷⁹⁾

Exercício físico regular está associado a benefícios para a saúde e menor risco significativo de DCV.^(80,81) A atividade física diária e regular possui efeito positivo tanto celular quanto molecular sobre o endotélio, podendo diminuir a vasodilatação, além de aumentar o surgimento de várias substâncias derivadas do endotélio, como óxido nítrico, prostaciclina e superóxido dismutase, contribuindo para a para a inibição da agregação plaquetária e prevenção para a formação de trombos. Ainda, modula a expressão de numerosas substâncias parácrinas, incluindo fatores de crescimento endotelial, moduladores de matriz, quimiocinas e reguladores da fluidez do sangue. Além de reduzir o aparecimento de comorbidades como DM e HAS.^(82,83)

Com isso, a prática regular de atividade física é analisada como instrumento de prevenção e terapia para as doenças coronarianas. Acredita-se que mudando o estilo de vida e incorporando a prática de exercício físico regularmente, pode-se obter uma redução dos níveis séricos de colesterol e triglicérides, de intolerância à glicose e a diminuição da pressão arterial e obesidade.⁽⁸⁴⁾

O estresse tem sido interpretado como um fator de risco da doença cardíaca. Acredita-se que o estresse acarreta múltiplas alterações no organismo, tais como a ativação do sistema psicofisiológico (aumento do ritmo cardíaco, pressão arterial, respiração, etc.), sistema cognitivo (preocupações, falta de concentração e falhas de memória) e sistema motor (hiperatividade, consumo de substâncias, etc.) Exposição contínua a estímulos geradores de estresse torna o indivíduo vulnerável a doenças dentre elas a DCV. Ainda, o estresse contribui para o aumento da tensão arterial e frequência cardíaca, maior necessidade de oxigênio do miocárdio e aumento da agregação de plaquetas, o que promove o bloqueio das artérias.^(84,85)

1.5 Fatores Genéticos Associados a DAC

Doença arterial coronária é caracterizada como uma doença crônica com grandes componentes genéticos.⁸⁶ Nesse contexto fatores ambientais e genéticos alteram as concentrações plasmáticas de LDL-C colaborando para o desenvolvimento de DAC. Reconhecidamente, os fatores genéticos contribuem com 40% a 60% de risco para DAC.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

Sabe-se que os polimorfismos são variações genéticas comuns, presentes em mais de 1% da população. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - *single nucleotide polymorphism*) é uma variação no DNA em um único nucleotídeo que acontece em uma posição específica do genoma, podendo ser um marcador de suscetibilidade a doença. Populações de indivíduos saudáveis e não-saudáveis podem ser analisados por genotipagem de SNPs (Single Nucleotide Polimorphism). Ainda, destacam-se os estudos de associação do genoma completo (GWAS - *genome wide association studies*) que mostraram uma associação consistente de SNPs), podendo ser

usados para criar escores de risco genético para melhorar o prognóstico de risco de diversas doenças, dentre elas DM1 e DM2, doenças inflamatórias, câncer, asma e DCVs.⁽⁹⁰⁻⁹³⁾ Acredita-se que essas variantes de risco podem trazer explicações da fisiopatologia da doença e tornarem-se alvos para novas terapias, podendo colaborar para prevenção e tratamento da doença.⁽⁹⁴⁾

Diversos estudos têm destacado genes envolvidos com a DAC, entre eles o gene do receptor de LDL (*LDLR*), da apolipoproteína-B (*APOB*) e o gene *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9).⁽⁹⁵⁻⁹⁹⁾

Gene *PCSK9*

PCSK9 é uma proteína fundamental no metabolismo das LDL, está envolvida na regulação do número de receptores LDL, visto que desempenha um papel essencial na degradação do *LDLR*. A principal ação da *PCSK9* é direcionar o *LDLR* para a degradação no lisossomo, reduzindo assim a expressão do *LDLR* na superfície celular e aumentando o níveis plasmático LDL-C. *PCSK9* promove a degradação de *LDL-R* por dois mecanismos: (1) extracelularmente, na qual se liga a *LDLR* ocasionando sua degradação lisossomal e internalização; e (2) intracelularmente, onde é diretamente encaminhado para os lisossomos, juntamente com o *LDLR*, causando sua degradação.^(100,22)

A estrutura da *PCSK9* é composta por uma sequência sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico e uma porção carboxiterminal incluindo resíduos de cisteína. Ela é sintetizada como um precursor inativo, que sofre clivagem por autocatálise entre o pró-domínio e o domínio catalítico, do qual o pró-domínio continua ligado à proteína em sua forma madura, e trafega na célula entre seus compartimentos acoplado à

proteína, possivelmente regulando sua atividade enzimática. Nesse contexto, a PCSK9 interfere no ciclo biológico do *LDL*, contribuindo com a sua degradação.⁽¹⁰³⁾

O gene *PCSK9* está localizado no braço curto do cromossomo 1p32.3 humano e contém 12 exons e 11 introns. Ele codifica uma pró-proteína Convertase Subtilisina Quexina tipo 9 (PCSK9) de 692 aminoácidos, expressa no fígado, intestino e rim e tem papel fundamental na regulação da homeostase do colesterol. A PCSK9 liga-se ao domínio do fator de crescimento epidérmico A (EGF-A), no LDL, levando a degradação desse receptor e o aumento da sua atividade ocasiona ao decréscimo do número de LDL disponíveis para a captação do colesterol plasmático e consequentemente o aumento nos níveis de LDL-C.⁽¹⁰³⁻¹⁰⁷⁾

O gene *PCSK9* tem duas formas de mutação: as mutações com ganho de função (GOF do inglês *gain-of-function*) que resultam na sua sobre-expressão, levando a maior inativação de *LDL* e, por conseguinte, com níveis aumentados de LDL-C, sendo assim, estão associadas com hipercolesterolemia e DAC, são consideradas mutações mais raras. Enquanto as mutações com perda de função (LOF do inglês *loss-of-function*) apresentam níveis menores de LDL-C no plasma, diminuindo os níveis de colesterol LDL e reduzindo, assim, a probabilidade de formação de placas ateroscleróticas e consequentemente de doença coronariana.^(22,107-109)

Deste modo, considerando que as mutações de ganho de função estão associadas com níveis aumentados de LDL-C e início precoce de aterosclerose, mutações de perda de função, no entanto, estão associadas a um LDL-C mais baixo e uma diminuição subsequente no risco cardiovascular.^(100,110)

Os polimorfismos *PCSK9*-rs505151 e rs11591147 são identificados como mutações de ganho e perda de função, respectivamente. *PCSK9*-rs505151 (-23968A>

G, E670G) é uma mutação comum de GOF, este SNP está localizado no exon 12 e resulta em substituição de aminoácido do glutamato para glicina na posição 670. Ele promove aumento de PCSK9 atividade (ganho de função), levando à redução do LDLR e, conseqüentemente, elevar o colesterol LDL plasmático, contribuindo para hipercolesterolemia.⁽¹¹¹⁾ A variante *PCSK9*-rs11591147 (137G> T, R46L) contém uma mutação de substituição (arginina para leucina na posição 46) localizada no exon 1. Esta variante relativamente rara é considerada uma mutação LOF-de PCSK9 (Qiu et al., 2017)¹⁰⁶. Diante disso, mutações no gene *PCSK9* resultam na destruição de receptores de LDL e na diminuição de seu número na superfície celular. Como resultado, menos receptores de LDL na superfície das células não eliminam o colesterol LDL do sangue. O nível de LDL-colesterol no sangue aumenta anormalmente.

Gene Apolipoproteína B (apo B)

A apolipoproteína B é um componente essencial do colesterol LDL que está envolvido no reconhecimento de partículas de colesterol LDL pelos receptores LDL nas células hepáticas capaz de afetar os níveis de lipídios no sangue pela regulação do LDL.⁽⁸⁶⁾ É sintetizada pelo fígado e intestino. Existem duas formas circulantes de Apo B, Apo B48 (produzida no intestino delgado) e Apo B100 (produzida no fígado).^(112,113) ApoB-48 é essencial para a produção de quilomícrons, e a apoB-100 é um componente estrutural essencial de VLDL e seus produtos metabólicos, lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e LDL. ApoB-100 também é um ligante para endocitose de LDL mediada por receptor. As lipoproteínas contendo ApoB exercem um papel crucial na aterogênese, incluindo a formação de placas nas

artérias. Estudos mostram que concentrações plasmáticas altas de lipoproteínas contendo apoB têm demonstrado ser fatores de risco para o desenvolvimento de DCV.^(112,114)

O gene *APOB* contém 29 exons e 28 introns com um comprimento total de 43 kb, e está localizado no braço curto do cromossomo 2 (p23-24) humano. A mutação na apo B impede a ligação da apo B defeituosa ao receptor de LDL, ou seja, em pacientes com mutações no gene *APOB*, os receptores LDL não reconhecem LDL-colesterol. O colesterol LDL não é removido da corrente sanguínea. O nível de LDL-colesterol no sangue aumenta anormalmente, podendo ocasionar xantomas e DAC prematuro (Niu et al.,2017; Devaraj & Jialal, 2019).^(112, 115)

Gene Receptor de LDL - RLDL

Os receptores de LDL (RLDL) desempenham um papel fundamental na remoção das partículas de LDL-C da corrente sanguínea, regulando a homeostase do colesterol, considerado um importante fator de risco na progressão da aterosclerose, pela internalização do complexo LDL/LDL-R nos hepatócitos ocasionando a degradação de partículas de LDL e, conseqüente, reciclagem do RLDL na superfície da célula. Logo após a ligação da lipoproteína ao LDLR na superfície da célula, o complexo é internalizado através de fossas revestidas de clatrina em vesículas revestidas com clatrina, que se fundem com os endossomas iniciais. A acidificação do pH endossomal promove a liberação de LDL, que logo após é degradada nos lisossomos. Geralmente, o RLDL é retornado à membrana e entra em um novo ciclo. Assim, mantém um nível constante de colesterol nos hepatócitos e outras células,

controlando a taxa de captação de colesterol do LDL e a taxa de síntese do colesterol.^(116,117)

O gene *RLDL* está mapeado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.1-p13.3) contém 18 exons e 17 introns e codifica uma glicoproteína de superfície celular, constituída por 860 aminoácidos (aa).⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾ As mutações no gene *RLDL* estão relacionadas com a disfunção do *RLDL* diminuindo o catabolismo de LDL-C. Sabe-se que pacientes com mutações em *RLDL* possuem níveis plasmáticos de colesterol elevados duas ou mais vezes que a concentração normal, ou seja, todos ou alguns dos *RLDL* estão ausentes ou são incapazes de capturar o colesterol LDL no sangue, ocasionando aumento anormal do colesterol LDL e, conseqüentemente, aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose e DAC. ^(104,120)

1.6 Sistema Nervoso Autônomo

O coração é um órgão que tem células com ritmos próprios, capazes de gerar potenciais de ação, responsáveis pelo estabelecimento da frequência cardíaca. O seu controle é feito, em parte pelo sistema nervoso autônomo (SNA), por meio de duas vias, o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), que age sobre o miocárdio ventricular e o sistema nervoso autônomo parassimpático (SNAP) cuja atuação se dá sobre o nó sinoatrial, miocárdio atrial e o nó atrioventricular, com o objetivo de preservar a estabilidade das funções vitais. Qualquer desequilíbrio pode promover respostas reguladoras automáticas e involuntárias.^(121,122) A atuação dessas vias caracteriza-se de forma antagônica, no qual a ação simpática ocasiona o aumento da frequência cardíaca ao passo que a parassimpática leva à sua diminuição.^(122, 123)

A regulação neural da função cardíaca é determinada sobretudo pela interação dos ramos simpático e parassimpático do SNA. Nas condições fisiológicas normais, a ativação tanto do simpático quanto do parassimpático é acompanhado pela diminuição da modulação do outro, sugerindo assim o conceito de balanço simpato-vagal. Desse modo, quando há predominância simpática, ocorre simultaneamente diminuição do tônus vagal, e vice versa, com o intuito de aumentar ou diminuir o desempenho cardíaco frente aos diferentes estímulos.⁽¹²⁴⁾

Segundo estudo de Vanderni et al.,(2011)¹²², modificações no SNA cardíaco de pacientes com DAC estão associadas ao grau de oclusão da artéria coronária. Essas alterações causam à diminuição da modulação vagal e aumento da modulação simpática. Acredita-se que redução na VFC esteja relacionada a maior risco de DAC.⁽¹²²⁾

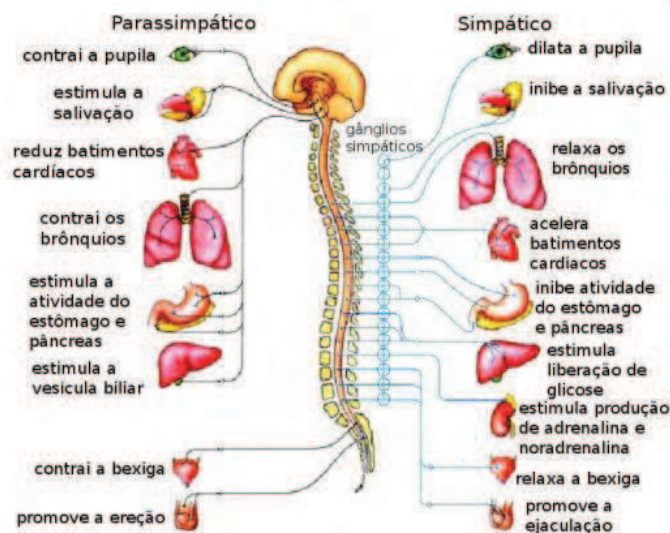


Figura 6. Representação do sistema nervoso autônomo, suas divisões e funções.⁽¹²⁵⁾

1.6.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é definida como a variação entre os intervalos RR dos batimentos cardíacos consecutivos (Figura 7). O Sistema nervoso autônomo (SNA) regula a frequência dos batimentos cardíacos. Diante disso, a análise de sua variabilidade torna-se importante ferramenta não invasiva para o estudo da interação simpato-vagal na saúde e na doença. A VFC também pode ser considerada um marcador de homeostase, ou seja, a variabilidade é alta em condições saudáveis e geralmente baixa em casos de doença.^(122,123,126-128)

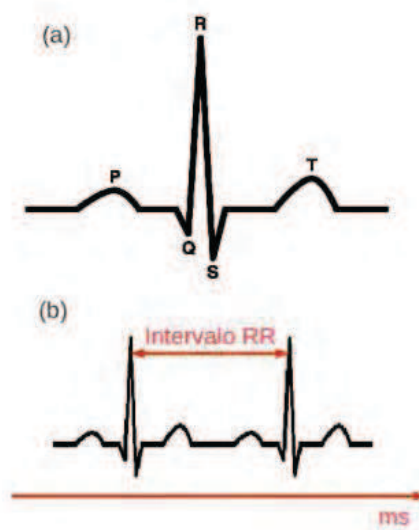


Figura 7 a) Representação das ondas obtidas em um eletrocardiograma (ECG). b) Representação do intervalo RR entre duas ondas R, que corresponde a um batimento cardíaco completo.⁽¹²²⁾

Alterações como o aumento ou a redução dos índices da VFC podem ser indícios de comprometimento da modulação do SNA sobre o sistema cardiovascular.^(122,129). Ressalta-se que VFC é avaliada em diversos estudos como

ferramenta auxiliar na avaliação de saúde e doença e passou a ser considerada um marcador biológico do funcionamento orgânico (Stys & Stys ,1998).⁽¹³⁰⁾

A Figura 8 ilustra séries temporais de batimentos cardíacos (tacogramas) a partir dos intervalos RR de um adulto jovem normal e de um recém-nascido normal. É possível observar que a VFC está bem menor no recém-nascido.

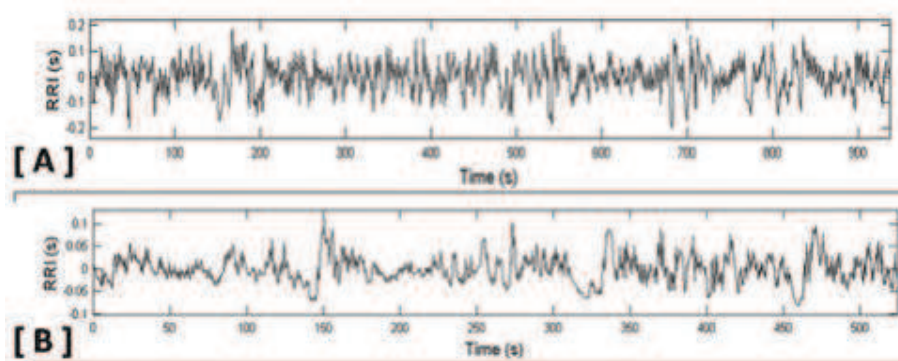


Figura 8. Tacograma de um adulto jovem normal (A) e de um recém-nascido normal (B).⁽¹²²⁾

Um dos instrumentos que se utiliza para análise desses intervalos RR são os cardiofrequencímetros. Eles captam toda atividade elétrica do miocárdio, por meio de eletrodos ligados a uma banda elástica usada em torno do tórax. Desse modo, sinais eletrônicos são constantemente transmitidos e armazenados em um receptor por um campo eletromagnético, para posterior análise e cálculo dos valores da VFC.⁽¹²²⁾

Por meio da captação dos intervalos RR é capaz de calcular diversos índices que representam a atuação do SNA, tanto lineares quanto não lineares. No âmbito linear há duas subdivisões: a) o domínio do tempo realizado por análises estatísticas e

geométricas e, b) o domínio da frequência. No âmbito não linear situam-se as variáveis explicáveis pelas teorias do caos e da complexidade.⁽¹³¹⁻¹³³⁾

As medidas no domínio do tempo são índices obtidos de um registro contínuo de ECG em curtos ou longos períodos.^(125,134,135) Mede-se cada intervalo RR normal (batimentos sinusais), por um certo intervalo de tempo (Figura 9). Assim, com base em métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos R-R), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos.^(122,137)

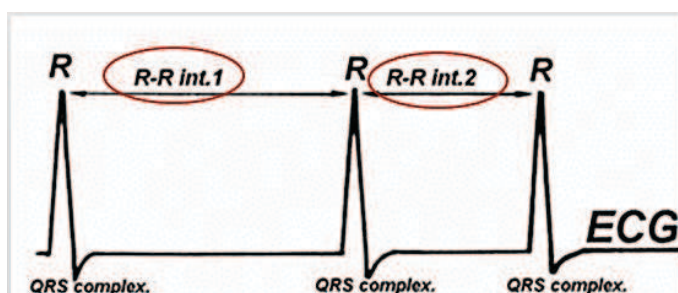


Figura 9. Esquematização de um eletrocardiograma que corresponde ao domínio do tempo.⁽¹²²⁾

As medidas da VFC no domínio da frequência (ou análise espectral) aplicam a análise espectral que permite decompor a variação da FC em um determinado tempo nos seus componentes oscilatórios fundamentais. Diante disso, a série temporal é decomposta em diferentes componentes de frequência. Essa análise separa os componentes simpático e parassimpático por meio de diversas frequências de ondas e suas respectivas origens fisiológicas; Figura 10).^(131,137)

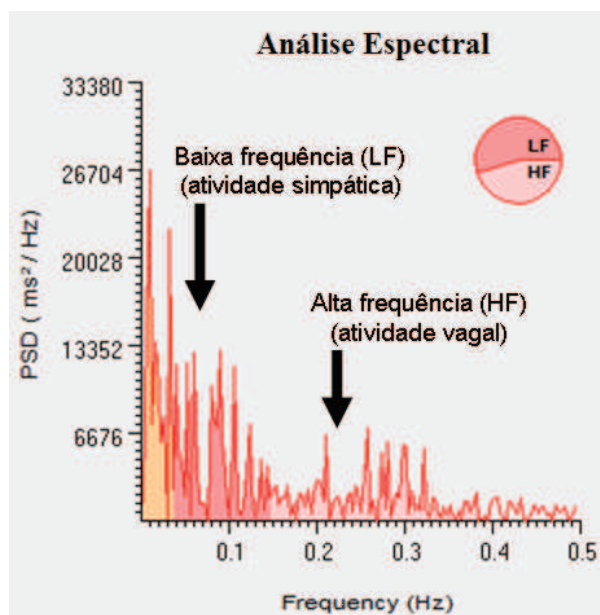


Figura 10. Análise espectral do domínio da frequência. Na abcissa há a frequência dos sinais em Hertz e na ordenada a potência dos sinais (em ms^2/Hz). Frequências entre 0,04 e 0,15Hz estão relacionados à baixa frequência (LF) de variação dos intervalos RR e corresponde as atividades simpática e parassimpáticas. Frequências acima de 0,15 até 0,4Hz indicam grandes variações do intervalo RR (HF) e estão relacionados com a atividade vagal. ⁽¹³⁷⁾

Os métodos não-lineares se relacionam a fenômenos altamente irregulares, mas não ao acaso, baseados na Teoria do Caos. Esse método é baseado em observações que indicam que os mecanismos envolvidos na regulação cardiovascular possivelmente interagem entre si de forma não-linear. ^(122,132) A análise no domínio do caos, é realizada por métodos da dinâmica não-linear. Isto posto, descrevem as flutuações complexas do ritmo e separam estruturas de comportamento não-linear nas séries temporais de batimentos cardíacos, mais propriamente que os clássicos métodos de domínio do tempo e da frequência. ^(122,132)

Justificativa

É sabido que os níveis altos circulantes de LDL-C no sangue estão relacionados com mortalidade cardiovascular. Diversos estudos clínicos randomizados revelam que, níveis reduzidos de LDL-C diminuem o risco de alterações cardiovascular. ⁽¹³⁸⁾ A terapia para a redução de níveis de LDL-C utilizando as estatinas parece ter impacto tanto na prevenção primária como na prevenção secundária de aterosclerose em pacientes com alto risco CV. ⁽¹³⁸⁾ Entretanto, alguns pacientes não alcançam níveis esperados de LDLc mesmo com máximas doses de estatinas, assim como nossos pacientes.

Nesse contexto, a incorporação de informações genéticas no diagnóstico e tratamento de distúrbios lipídicos e redução do risco cardiovascular é um avanço importante e bem reconhecido no atendimento ao paciente. Assim, existe um consenso internacional que recomenda a aplicação de testes genéticos em pacientes que atendem a critérios clínicos definidos ou prováveis para hipercolesterolemia familiar ⁽¹³⁹⁾ com a finalidade de melhorar o tratamento e diagnóstico precoce das dislipidemias. Os estudos de associação ampla do genoma completo (GWAS) aumentaram o entendimento sobre genes relacionados a distúrbios lipídicos e DAC. ⁽¹³⁹⁾

Baseado na literatura existente, assim como nos achados de GWAS desse estudo, foram selecionados alguns polimorfismos em genes especificamente envolvidos com metabolismo de lipídios, com objetivo de destacar sua influência nos pacientes com síndrome coronária aguda. Desse modo, prevê-se o avanço contínuo da genética para produzir uma avaliação aprimorada do risco para DAC, bem como estratégias para redução de risco adicional, permitindo assim, a detecção precoce de pacientes assintomáticos e tratamento personalizado, reduzindo morbidade e mortalidade associadas a essa doença. ⁽¹³⁸⁾

Diante disso, a hipótese deste estudo consistiu que SNPs envolvidos com metabolismo de lipídios podem estar associados com desenvolvimento da SCA, assim como nas alterações de parâmetros bioquímicos, fatores que podem refletir na variabilidade da frequência cardíaca.

1.7 Objetivo Geral

Analisar variantes genéticas relacionadas com a via do metabolismo de lipídios, além de perfil bioquímico, antecedentes pessoais, qualidade e hábitos de vida e VFC em pacientes com dislipidemia, hiporrespondedores ao tratamento otimizado com hipolipemiantes, com ou sem histórico de SCA, visando caracterizar subgrupos de risco e identificar marcadores biológicos para diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento da doença.

Objetivos específicos

1. Analisar os polimorfismos *APOB*-rs693, *APOB*-rs1042031, *PCSK9*-rs505151, *PCSK9*-rs11591147, *PCSK9*-rs11206510, *LDL*-rs688, *LDL*-rs6511720 e combinações de genótipos de risco em pacientes com DAC, com ou sem antecedente de SCA.
2. Avaliar a VFC nos referidos pacientes, considerando métodos lineares para domínio do tempo (Média RR, SDNN, RMSSD, pNN50, SD1 e SD2) e domínio da frequência (LF, VLF, HF e LF/HF).
3. Avaliar a relação entre SNPs e VFC, além de perfil bioquímico [colesterol total, fração de colesterol de lipoproteína de alta (HDLc) e baixa densidade (LDLc), triglicérides (TG), e antropométrico nos referidos pacientes.

2 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP/FAMERP - CAAE número: 53436316.7.0000.5415 – Apêndice 1). Todos os participantes foram orientados a respeito do protocolo da pesquisa, e confirmaram participação pelo Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice 2), além do preenchimento de questionário clínico (Apêndice 3). Os pacientes foram selecionados no Serviço de Cardiologia e Ambulatório de Coronariopatias e Dislipidemias, ambos do Hospital de Base-HB/FAMERP. Trata-se de uma parceria entre o NPBIM/FAMERP, NUTECC/FAMERP, HB/FAMERP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

2.1 Casuística

Foram selecionados 80 pacientes independente do sexo, com idade > 45 anos e de etnia miscigenada,⁽¹⁴⁰⁾ apresentando DAC aterosclerótica comprovada por cineangiocoronariografia, sem SCA ou com SCA prévia e hiporresponsividade (níveis séricos de LDLc \geq 50mg/dL) ao tratamento com estatinas potentes em máximas doses toleradas (dosagem diária de 40 a 80mg de Atorvastatina), por pelo menos 30 dias consecutivos antes da coleta do material biológico. Foram assim distribuídos: Grupo 1 (G1): 63 pacientes clinicamente já estáveis e com doença arterial coronariana aterosclerótica comprovada por cineangiocoronariografia, com histórico de SCA prévia, com persistência de LDLc \geq 50 mg/dL em vigência de terapêutica otimizada por pelo menos 30 dias consecutivos antes da coleta de material biológico (dosagem

diária de 20 a 40mg de Rosuvastatina ou 40 a 80mg de Atorvastatina). Grupo 2 (G2): 17 pacientes com persistência de LDLc ≥ 50 mg/dL e sem histórico de SCA, sob terapêutica hipolipemiante otimizada por pelo menos 30 dias consecutivos antes da coleta de material biológico e idade combinada à G1.

Foram excluídos indivíduos com idade ≤ 45 anos, portadores de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), usuários de drogas ilícitas e pacientes não aderentes à terapia farmacológica, assim como também aqueles com hipertensão não controlada (PA sistólica > 180 mmHg ou PA diastólica > 110 mmHg), insuficiência cardíaca congestiva persistindo em classe III ou IV da New York Heart Association a despeito de tratamento (ou, se medida, fração de ejeção ventricular esquerda $< 25\%$ na mensuração mais recente), história conhecida de acidente vascular cerebral hemorrágico, história de câncer, hepatopatia crônica, diagnóstico recente de hipotireoidismo (para o qual iniciou-se tratamento em até 30 dias antes da coleta), em uso de antioxidantes ou suplementos nutricionais e antibióticos ou anti-inflamatórios (em período de até 30 dias da coleta do material biológico), com níveis séricos de TG > 400 mg/dL, gestantes, disfunção renal crônica classe IV ou V e creatinofosfoquinase > 3 x limite superior de normalidade na determinação mais recente antes da coleta.

2.2 Métodos

Trata-se de um estudo com delineamento transversal, quantitativo e de campo. Os pacientes foram submetidos à coleta de amostra de sangue periférico para análise do perfil genético (SNPs). Também foi avaliada a variabilidade da frequência cardíaca, hábitos de vida, antecedentes pessoais e história familiar de doenças crônicas como

DM, HAS, DAC, obesidade, câncer, dentre outras. Os dados bioquímicos, tinham prazo de até três meses para inclusão no estudo e foram obtidos em prontuários médicos, uma vez que fazem parte do protocolo de atendimento dos referidos grupos de pacientes, incluindo níveis séricos de CT, HDLc, LDLc e TG.

2.2.1 Análise Genética

Extração de DNA

Os pacientes foram submetidos à coleta de amostra de sangue periférico em tubo de coleta a vácuo com EDTA (três tubos de 5mL) para extração de DNA genômico. As amostras foram armazenadas em gelo para transporte e posterior análise dos ácidos nucleicos. O DNA genômico foi extraído de leucócitos de amostra de sangue periférico, cuja técnica foi realizada pelo método salting-out, realizado em três etapas, compreendendo: 1) lise das células sanguíneas; 2) desproteinização; 3) precipitação do DNA e ressuspensão, de acordo com o protocolo apresentado a seguir.

O sangue periférico total foi coletado em tubo vacutainer com EDTA (1 mg/mL de sangue), transferido 1 mL de sangue para um tubo estéril de microcentrífuga de 2 mL, seguido de centrifugação a 5.000 rpm por cinco minutos, à temperatura ambiente (TA), sendo o plasma descartado. Foram adicionados ao sedimento 900 µL de Tampão 1x contendo Triton. O próximo passo consistiu na homogeneização com Vortex durante um minuto. A amostra foi centrifugada novamente a 5.000 rpm por cinco minutos. Posteriormente, realizou-se o descarte do sobrenadante por inversão vagarosa e constante, seguida da adição de 1 mL de tampão 1x. Esse procedimento foi repetido por cerca de três vezes, ou até que o pellet estivesse isento de hemoglobina

O próximo passo consistiu na ressuspensão do sedimento (núcleos de leucócitos) com 200 µL de Tampão 2X seguido do acréscimo de 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, que tem por função o rompimento da membrana nuclear. Incubou-se a amostra no banho-maria a 56 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M, e a amostra homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm durante cinco minutos à TA, o que favoreceu a precipitação das proteínas.

Na etapa seguinte o sobrenadante (DNA) foi transferido para outro tubo de microcentrífuga, e o precipitado (proteínas) descartado. O DNA foi misturado com 1 mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão lenta do tubo, de modo que o etanol promoveu a purificação do DNA e sua precipitação. A amostra foi mantida em freezer -20 °C overnight

A próxima fase, conhecida como precipitação de DNA, iniciou com a retirada das amostras do freezer e centrifugação a 12.000 rpm por cinco minutos à TA. O etanol absoluto foi removido e as amostras lavadas com etanol a 70% gelado e centrifugadas a 12.000 rpm por cinco minutos. Essa etapa foi repetida. Em seguida, foi removido todo o etanol. O tubo contendo a amostra foi colocado sobre papel absorvente para a evaporação do etanol (aproximadamente de cinco horas).

A terceira parte da extração inclui a ressuspensão do precipitado (DNA) em 100 µL de Tampão TE (pH 8,0), seguido de incubação em banho-maria a 56 °C por 15 minutos, reidratando o DNA (para não degradar). Desse modo, a amostra foi armazenada a -70 °C até o processamento para análise dos polimorfismos.

A qualidade das amostras foi avaliada, considerando valores de DIN (DNA Integrity Number) maiores que 7,0, como referência, utilizando-se o equipamento TapeStation System (Agilent®), o qual realiza detecção por fluorescência, monitorando entre 670 e

700nm. O programa gera um eletroferograma, onde as amostras devem apresentar um perfil, no qual as maiores concentrações de DNA sejam >200 pares de base. Depois, as amostras de DNA foram armazenadas à -80°C em alíquotas, visando estabilidade e preservação do DNA, impedindo, assim, a degradação do material a cada descongelamento.

Após extração, o DNA foi submetido a análise para genotipagem de larga escala com microarranjos de DNA em parceria com o Laboratório de Estudos em Nutrigenômica (LEN) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP (Anexo 1). Portanto, a partir dos achados fornecidos pela referida tecnologia foram selecionados genes relacionados com a via do metabolismo de lipídios (APOB, RLDL e PCSK9) e analisados neste estudo sete polimorfismos (APOB-rs693, APOB-rs1042031, PCSK9-rs505151, PCSK9-rs11591147, PCSK9-rs11206510, RLDL-rs688, RLDL-rs6511720) por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT quantitativo - RT-qPCR), cuja técnica é descrita a seguir.

PCR – RT quantitativo (RT-qPCR)

Utilizou-se volume total de 10 µL das misturas da reação na concentração final de 20 ng/µL de DNA. Assim, para a reação adicionou-se 5 µL de TaqMan Universal Master Mix, 3 µL de solução de água DEPC, 0,5 µL TaqMan SNP Genotyping e 1,5 µL da amostra de DNA e sondas específicos para cada alelo. Os ensaios TaqMan®SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) foram utilizados para as genotipagens dos polimorfismos propostos, com os primers e sondas descritos no Quadro 1. As reações foram realizadas de acordo com instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Com a reação de qPCR, visualizou-se a emissão de fluorescência emitida pelas sondas captadas pelo equipamento. Os ensaios foram realizados no equipamento StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados foram armazenados no programa StepOne v2.x (Applied Biosystems). As Figuras 11 a 13 mostram o padrão de amplificação dos respectivos polimorfismos.

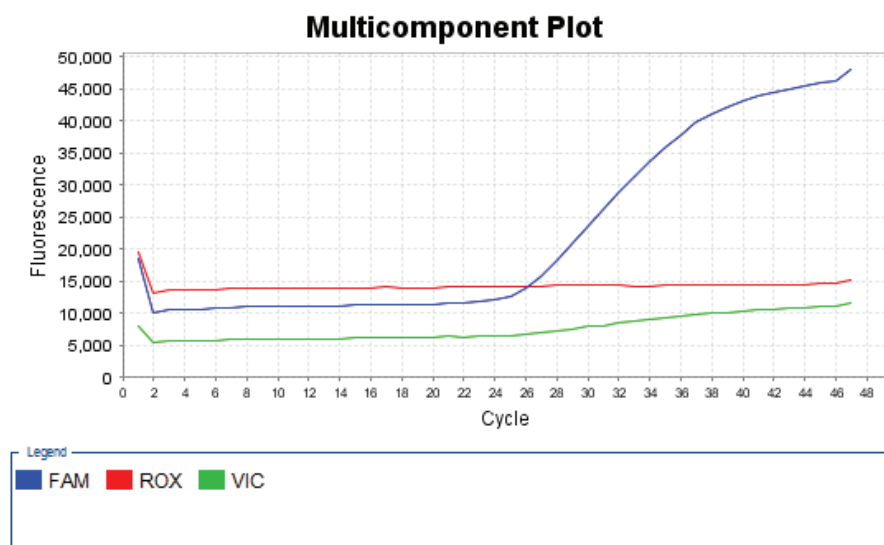


Figura 11. Ilustração do padrão de amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real, mostrando genótipo homocigoto mutante, representado pela amplificação do alelo marcado com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) em azul.

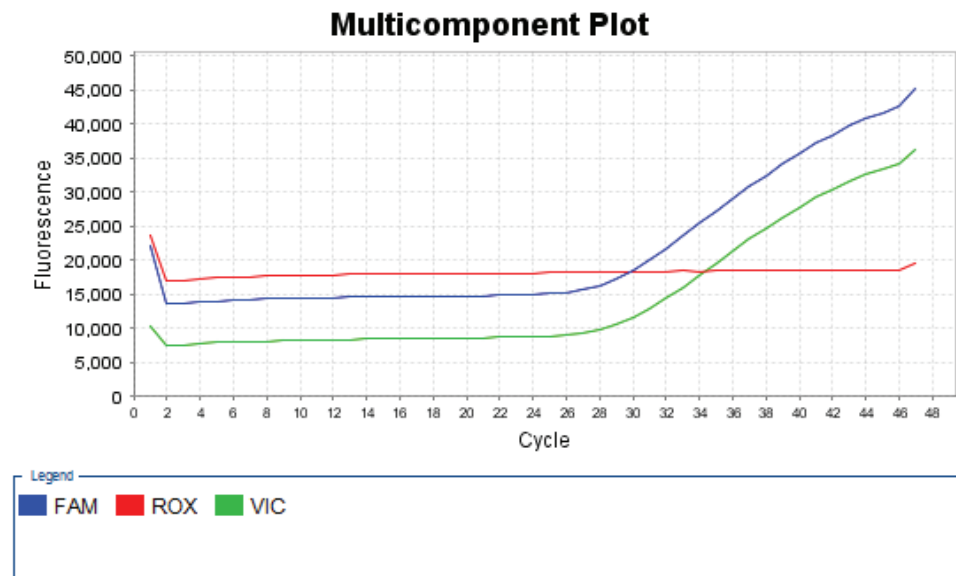


Figura 12. Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo heterozigoto com amplificação de ambos os alelos marcado com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e fluoróforo VIC.

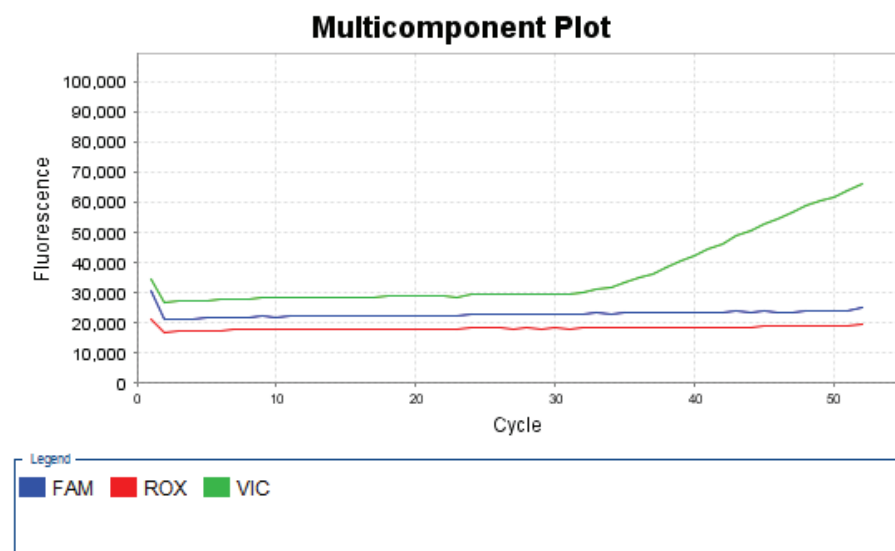


Figura 13. Padrão de amplificação por PCR em tempo real, mostrando genótipo homozigoto selvagem, representado pela amplificação do alelo marcado com fluoróforo VIC em verde.

Genotipagem de larga escala com microarranjos de DNA

O processo de genotipagem de DNA foi realizado utilizando-se a plataforma iSCAN (Illumina) para mais de quatro milhões de SNPs “*Infinium Global Screening*

Array-24 Kit”, o qual apresenta a mais atualizada versão dos SNPs correspondentes a diversas doenças humanas com aplicação para diagnóstico e tratamento das mesmas (Tabela 1). A seleção dos marcadores foi realizada pelo fabricante a partir das bases de dados RefSeq (NCBI) e ENSEMBL e do projecto HapMap. Incluem tagSNP, SNP sinônimos e não sinônimos localizados a menos de 10kb dos genes referenciados na RefSeq, assim como SNP em regiões de *Copy Number Variations* (CNV) e outros marcadores para preencher os espaços entre os anteriores, permitindo uma análise mais completa, uniforme e abrangente do genoma. A distância de separação entre marcadores situa-se entre 1,7Kb e 2,7 Kb para assegurar a cobertura de todo o genoma (Instruções do Fabricante Illumina®).

A plataforma iSCAN utiliza a tecnologia *BeadChip* e oferece flexibilidade para genotipar de centenas a milhares de marcadores do tipo SNP por amostra de DNA. A tecnologia *BeadChip* é baseada na presença de *beads* de $\sim 3\mu\text{M}$, alocados em micropoços existentes numa lâmina de sílica. Cada *bead* possui de centenas a milhares de oligonucleotídeos responsáveis por capturar as sequencias específicas de cada SNP presente no microarranjo. Esta plataforma apresenta alta sensibilidade e excelente limite de detecção, gerando dados de alta qualidade, caracterizados por resultados próximos de 99% de “Call Rate” e de 99% de reproduzibilidade (Instruções do Fabricante Illumina®).

O protocolo de análise do perfil de SNP (genético) foi realizado como preconizado pelo fabricante e está disponível em detalhes no endereço eletrônico www.illumina.com. Resumidamente, o protocolo em questão consiste de seis etapas principais:

- 1) Amplificação: o DNA das amostras será desnaturado, neutralizado e submetido a um processo de amplificação isotérmico. Essa etapa objetiva aumentar a

concentração de DNA centenas de vezes para que esse não seja um fator limitante no processo, reduzindo a qualidade dos resultados.

2) Fragmentação: o produto de amplificação será fragmentado por um processo enzimático do tipo *end-point*, ou seja, os sítios de fragmentação são determinados por atributos específicos da sequência de DNA, evitando a ocorrência de fragmentação excessiva.

3) Hibridização: o DNA amplificado e fragmentado se anela (hibridiza) à sequência de 50 pares de base, o qual está covalentemente ligado a nano partícula *bead*, sendo que cada *bead* corresponde a um locus específico de DNA.

4) Extensão de base única: ocorre a extensão de uma única base nucleotídica da sequência, a qual irá incorporar os corantes que permitirão determinar os genótipos.

5) Coloração: coloração da lâmina (microarranjo). Diversos corantes serão incorporados às *beads*, sendo responsáveis pela emissão de fluorescência.

6) Visualização das Imagens: um conjunto de laser será utilizado para excitar os fluoróforos que estão ligados as *beads* na lâmina, permitindo que o sinal de fluorescência seja captado e analisado pelo software do iSCAN.

A Figura 17 apresenta de forma sucinta o método acima descrito. Desse modo, o protocolo inicia-se com a amplificação e incubação do DNA genômico isotermicamente (passos 1 e 2). O produto de amplificação é fragmentado através de um processo enzimático (passo 3). Em seguida, o precipitado de DNA é ressuspenso e inicia-se a preparação e colocação da amostra no *BeadChip* (passos 4 e 5). O passo 6 é de hibridação: cada tipo de sonda corresponde a cada alelo de um determinado locus. A especificidade alélica é conferida através de uma reação enzimática e é marcado com fluorescência (passo

7). A intensidade da fluorescência emitida pelas sondas é detectada pelo *BeadArray Reader* (Illumina) e analisada no software *BeadStudio* (Illumina®) (passos 8 e 9).

Tabela 1: Informações Técnicas do *Infinium Global Screening Array-24 Kit BeadChip* (Illumina®)

Característica	Descrição
Número total de Marcadores	~640.000
Capacidade por Marcador Customizado	>50.000
Número de amostra por <i>BeadChip</i>	12
Quantidade de DNA necessário	200ng
Ensaio	Microarray
Equipamento Necessário	iSCAN
Tempo de análise por amostra	25 minutos

Incluindo: Variant Class, Copy Number Variants (CNVs), Germline Variants, Insertions-Deletions (indels), Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Structural Variants.

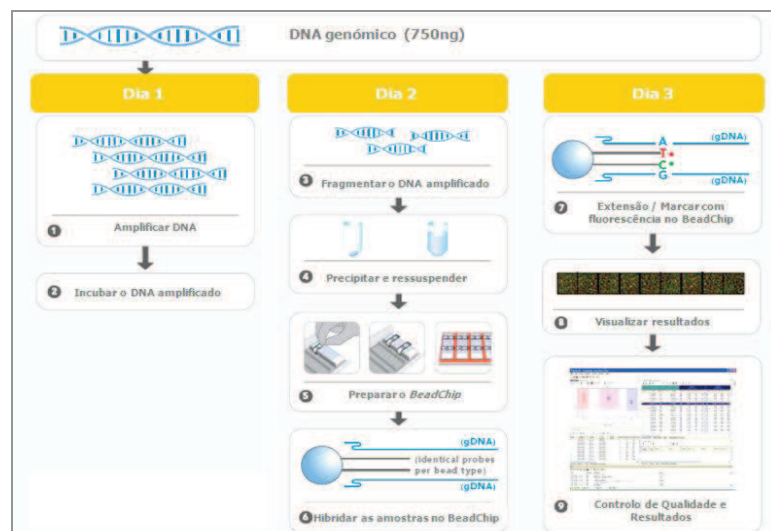


Figura 14. Etapas do procedimento experimental de Infinium Global Screening Array-24 Kit, da plataforma Illumina iSCAN (adaptado de *Infinium® DNA Analysis Beadchips*).

Controle de Qualidade e Validação do GWAS

Foram realizadas validações com múltiplas sondas para SNPs já associados com a DAC. A validação permite a confirmação dos alelos apresentados na análise de GWAS e ainda, admitiremos uma taxa de concordância > 95% entre o BeadChip e o ensaio Taqman (a ser realizado no PCR em tempo real). Além disso, para o controle de qualidade da análise foram removidas as amostras com discordância de sexo, eficiência de genotipagem (call rate) menor que 90%, desvios da heterozigosidade de mais ou menos cinco (± 5) desvios padrão, assim como averiguação da estratificação e subestrutura da população. Ainda, um controle de qualidade para análise dos SNPs foi realizado, excluindo-se aqueles com eficiência de genotipagem menor que 0,98; frequência do menor alelo (MAF) menor que 0,03; qui-quadrado (X^2) do equilíbrio de Hardy-Weinberg menor que 10^{-6} , além dos SNPs coincidentes.

Os genes selecionados para realizar a análise genética por BeadChip e validação foram: *APOB* (rs693, rs1042031), *PCSK9* (rs505151, rs11591147, rs11206510), *RLDL* (rs688, rs6511720), e assim foram utilizadas as sondas descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Ensaio e sondas *TaqMan*®SNP *Genotyping Assays*.

Gene	Identificação SNP	Polimorfismo	Localização NCBI	Ensaio
<i>APOB</i>	rs693	A/G	Chr.2: 21009323	C__7615420_20
	rs1042031	C/A	Chr.2: 21002881	C__7615381_20
	rs505151	G/A	Chr.1: 55063514	C__998744_10
<i>PCSK9</i>	rs11591147	G/T	Chr.1: 55039974	C__2018188_10
	rs11206510	T/G	Chr.1: 55030366	C__32221221_10
<i>RLDL</i>	rs688	C/T	Chr.19: 11116926	C__2804264_20
	rs6511720	G/T	Chr.19: 11091630	C__34514854_10

2.2.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca

O cardiófrequencímetro Polar RS800CX (Polar Eletro, Kempele, Finland) é utilizado para captar as séries temporais do ritmo cardíaco batimento a batimento.^(122,141,142) Os pacientes foram orientados previamente para não consumirem durante o período de 24 horas antecedentes à avaliação autonômica, bebidas alcoólicas e/ou estimulantes do sistema nervoso autônomo como café, chá e achocolatados. No dia da avaliação foram instruídos a manterem-se em silêncio, acordados, em repouso com respiração espontânea por 30 minutos em decúbito dorsal. Após a explicação dos procedimentos necessários para a coleta de dados, foi posicionada no terço distal do esterno uma cinta de captação e, no pulso, o receptor de frequência cardíaca Polar RS800CX (Polar Eletro, Kempele, Finland). Este equipamento consiste em dois eletrodos montados a um transmissor eletrônico selado que foi posicionado no tórax, utilizando-se uma cinta elástica. Essas unidades telemétricas obtêm os impulsos elétricos do coração e transmitem tais informações por meio de um campo eletromagnético para o monitor que está no pulso do usuário.

O registro teve duração de 15 a 30 minutos, visando-se a obtenção de pelo menos 1.000 intervalos RR consecutivos os quais passaram por métodos de filtragem, primeiramente digital, complementada por uma manual, para eliminação de batimentos ectópicos e artefatos, e somente séries com mais de 95% de batimentos sinusais foram incluídas no estudo.⁽¹⁴³⁾ A análise da VFC foi realizada por meio de métodos lineares e não lineares.



Figura 15: Voluntária em avaliação da variabilidade da frequência cardíaca por frequencímetro polar RS800CX.

Os métodos lineares foram os do domínio do tempo e da frequência, incluindo média de todos os intervalos R-R normais (Média RR), desvio-padrão de todos intervalos R-R normais (SDNN), raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes ao quadrado (RMSSD), percentual de intervalos R-R normais que diferem mais que 50 milissegundos de seu adjacente (pNN50) e relação entre os desvios-padrão 1 e 2 obtidos pelo gráfico de Poincaré-Bendixson (SD1/SD2). Para o domínio da frequência, foram utilizadas as variáveis de baixa frequência (LF = *low frequency*), muito baixa frequência (VLF= *very low frequency*) e alta frequência (HF = *high frequency*), além da relação entre LF e HF.

O índice SDNN é adquirido a partir de registros de longa duração e representam as atividades simpáticas e parassimpáticas. Entretanto não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal. ⁽¹⁴⁴⁾ Já os índices RMSSD e pNN50 refletem a atividade parassimpática, ^(122,145,146) pois são encontrados a partir da análise de intervalos RR adjacentes. ⁽¹⁴⁷⁾

Outra maneira de processar intervalos RR no domínio do tempo é a partir de métodos geométricos, sendo o índice triangular e a plotagem de Poincaré os mais conhecidos. Os métodos geométricos apresentam os intervalos RR em padrões geométricos e várias aproximações são usadas para derivar as medidas de VFC a partir delas. ^(148,149)

O plot de Poincaré é um método geométrico para a análise da dinâmica da VFC, que representa uma série temporal dentro de um plano cartesiano, no qual cada intervalo RR é correlacionado com o intervalo antecedente e definem um ponto no plot. ^(150,151). A Figura 16 exibe o plot de Poincaré de um adulto normal e de um recém-nascido normal. ⁽¹²²⁾

A análise do plot de Poincaré pode ser realizada de forma qualitativa (visual), pela avaliação da figura formada pelo seu atrator, a qual é útil para mostrar o grau de complexidade dos intervalos RR⁽¹⁵²⁾ ou quantitativa (quantifica os desvios padrão), pelo ajuste da elipse da figura formada pelo atrator, de onde se obtém três índices: SD1, SD2 e razão SD2/SD1. ⁽¹⁵⁰⁾

O SD1 representa a dispersão dos pontos perpendiculares à linha de identidade e parece ser um índice de registro instantâneo da variabilidade batimento a batimento e expressa o componente de curto prazo (sistema parassimpático); o SD2 representa a dispersão dos pontos ao longo da linha de identidade e representa a VFC em registros de longa duração (expressando o componente simpático); a relação de ambos (SD1/SD2) mostra a razão entre as variações curta e longa dos intervalos R-R (ou a relação parassimpático-simpático).^(149,153)

A análise qualitativa (visual) do plot de Poincaré é feita por meio da análise das figuras formadas pelo atrator do plot, as quais foram descritas por Tulppo et al., (1998)⁽¹⁵⁴⁾ que as classificaram como:

1) Figura com característica de um cometa, na qual um aumento na dispersão dos intervalos R-R batimento a batimento é observado com aumento nos intervalos, característica de um plot normal.

2) Figura com característica de um torpedo, com baixa dispersão global batimento a batimento (SD1) e progressiva redução da dispersão dos intervalos RR a longo prazo (SD2).

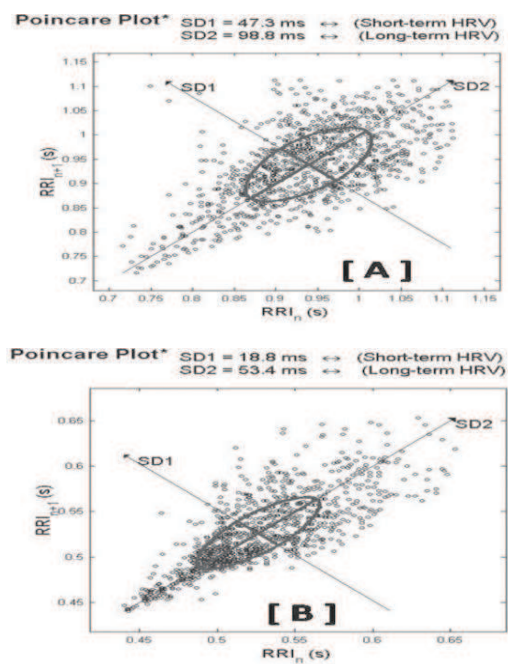


Figura 16 - Gráfico de Poincaré de um adulto jovem normal (A) e de um recém-nascido normal (B). A dispersão tanto de curto (SD1) quanto de longo prazo (SD2) no painel B está menor do que no painel A.⁽¹²²⁾

As medidas da VFC no domínio da frequência (ou análise espectral) representam a informação de como o potencial se distribui como uma função de frequência provendo uma informação útil sobre a modulação no tônus autonômico, ainda, avalia e quantifica as periodicidades descobertas na sequência dos intervalos RR, possibilitando a identificação e a separação de grupos de ondas semelhantes, além da construção de um gráfico em que essas ondas semelhantes sejam agrupadas.⁽¹³¹⁾ A análise da potência espectral separa os componentes simpático e parassimpático através de várias frequências de ondas e suas respectivas origens fisiológicas.⁽¹³¹⁾ Exemplos da análise no domínio da frequência esta demonstrada na Figura 17.⁽¹²²⁾

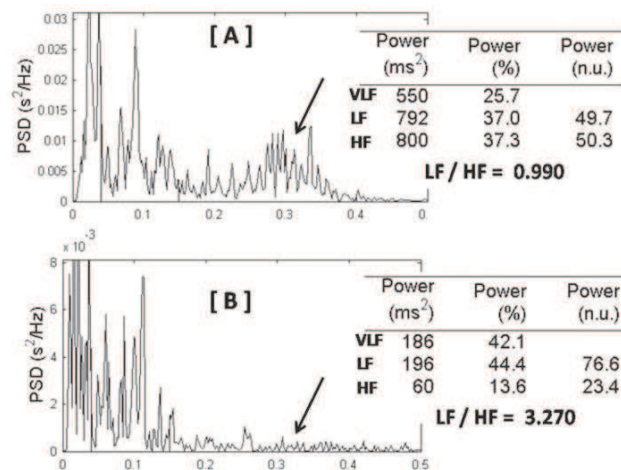


Figura 17 - Análise espectral de frequências de um adulto jovem normal (A) e de um recém-nascido normal (B). O componente de alta frequência (HF) está proporcionalmente bem mais reduzido no recém-nascido (setas) assim como a potência total.

Seus principais componentes são: ^(122,143,149)

- a) Componente de alta frequência (High Frequency – HF), com variação de 0,15 a 0,4Hz, modulada pelo sistema nervoso parassimpático com influência da respiração;
- b) Componente de baixa frequência (Low Frequency – LF), com variação entre 0,04 e 0,15Hz, modulada pelo sistema simpático e parassimpático
- c) Componente de muito baixa frequência (Very Low Frequency – VLF), com variação de 0,01 a 0,04Hz, e ultrabaixa frequência (Ultra Low Frequency – ULF), que varia de 10⁻⁵ a 10⁻² Hz – Índices menos utilizados cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida, parecendo estar relacionada ao sistema renina-angiotensinaaldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor periférico.

Para análise dos índices de VFC por meio de métodos lineares vários softwares podem ser utilizados, dentre eles o software HRV Analysis da Universidade de Kuopio - KUBIOS (Finlândia),¹⁴⁴ podendo ser obtido gratuitamente pela internet.

2.2.3 Análise Bioquímica

Os dados bioquímicos, deveriam ter prazo máximo de até três meses para inclusão no estudo, obtidos em prontuários médicos, tendo em vista que fazem parte do protocolo de atendimento dos referidos grupos de pacientes, incluindo níveis séricos de glicemia, colesterol total (CT) fração de colesterol de lipoproteína de alta (HDL-C) e baixa densidade (LDL-C) e triglicérides (TG).

Todos os participantes preencheram um questionário com informações sobre estilo de vida e história médica. Com relação ao hábito de fumar,

considerou-se histórico de tabagismo. Para etilismo, considerou-se frequência diária de bebidas alcoólicas, independente da dose. Para critério de dislipidemia foram considerados uso de medicamentos hipolipemiantes, assim como valores alterados para o perfil lipídico.

Valor de IMC foi classificado como peso (kg) dividido pela altura ao quadrado em metros, e foi categorizado de acordo com a faixa etária. Para indivíduos com idade entre 20 e 60 anos incompletos: $<18,5\text{kg/m}^2$ = Baixo peso; $>18,5$ e $<25\text{kg/m}^2$ = Eutróficos; >25 e $<30\text{kg/m}^2$ = Sobrepeso; $>30\text{kg/m}^2$ = Obesidade. Os indivíduos com idade igual ou maior do que 60 anos: $<22\text{kg/m}^2$ = Baixo peso; >22 e $<27\text{kg/m}^2$ = Eutróficos; $>27\text{kg/m}^2$ = Sobrepeso.⁽¹⁵⁶⁾

Hipertensão foi definida como pressão arterial sistólica de $\geq 140\text{mmHg}$ e pressão arterial diastólica $\geq 90\text{mmHg}$, ou já haviam sido diagnosticados com hipertensão e/ou estavam em tratamento com medicação anti-hipertensiva.⁽¹⁵⁵⁾

2.2.4 Análise Estatística

Foram utilizados os programas MiniTab, Stats Direct e GraphPad. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de Fisher ou teste Qui-quadrado (χ^2). A análise de distribuição de genótipos para o cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizada pelo teste χ^2 . Para as variáveis quantitativas com distribuição gaussiana aplicou-se teste unpaired t para comparação entre dois grupos. Para as variáveis quantitativas sem distribuição gaussiana foi empregado teste Mann Whitney para dois grupos. Foi admitido erro alfa de 5%, considerando-se significantes valores de $P < 0,05$.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para cada SNP, com aplicação do programa Arlequin v.3.11, utilizando-se dados genotípicos. Com o mesmo programa, realizou-se a análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os sete SNPs de *PCSK9*, *RLDL* e *APOB*. Diferenças na distribuição haplotípica dos pacientes com DAC, com histórico de SCA ou não foram acessadas pelo teste exato de diferenciação populacional do programa Haploview.

3 RESULTADOS

3.1 Perfil Clínico-Demográfico e Hábitos de Vida

Não obteve-se diferença estatística para sexo ($P=0,117$) e para idade ($P=0,544$) entre os grupos. Tabagismo destacou-se nos pacientes com histórico de síndrome coronária aguda (SCA; $G1=79\%$), o que não ocorreu com o hábito etilismo ($G1=49\%$; $G2=47\%$; $P=0,875$). Notou-se destaque do IMC elevado (>25) em ambos os grupos ($G1=81\%$; $G2=88\%$), porém sem diferença estatisticamente significativa. Não foi observado diferença estatística entre os grupos para hipertensão arterial sistêmica (HAS) ($G1=94$; $G2=88$; $P>0,05$), Sedentarismo ($G1=76\%$, $G2=82\%$; $P=0,749$), e Diabetes Mellitus ($G1=33\%$, $G2=53\%$; $P=0,230$; Tabela 2).

3.2 Análise de Polimorfismos Genéticos

APOB-rs693 – Houve prevalência do genótipo heterozigoto (*G/A*) em $G1=47\%$ e $G2=50\%$; $P=0,098$), assim como alelo polimórfico *A* em $G2=0,69$ quando comparado ao alelo selvagem *G* ($0,31$; $P=0,355$; Tabela 3).

APOB-rs1042031 – Notou-se semelhança entre frequências genótípicas e alélicas de G1 e G2 ($P>0,05$), com destaque do genótipo selvagem (*C/C*) em G1=67%, o mesmo ocorreu com o alelo selvagem (*C*; 82%; Tabela 3).

PCSK9 – *rs505151* e *PCSK9* – *rs11591147* – Observou-se presença somente do genótipo selvagem (*A/A*) assim como o alelo selvagem (*A*). Para *PCSK9*-*rs11206510*, o genótipo homozigoto selvagem (*TT*) mostrou maior frequência em ambos grupos (G1=71%; G2=71%; $P=1,000$), assim como o alelo selvagem (*T*) (G1=84%; G2=82%; $P=0,777$; Tabela 4).

RLDL-*rs688* – Observou-se predomínio do genótipo homozigoto mutante (*T/T*) em G1 (56%) e G2 (50%), tal como para o alelo mutante (*T*; G1=67%; G2=63%), sem diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$; Tabela 5).

Para *RLDL*-*rs6511720*, destacou-se a presença do alelo selvagem (*G/G*) no grupo G2 (67%; $P<0,0001$), ainda, observou-se a presença de 65% do alelo homozigoto polimórfico *T/T* em pacientes com histórico de SCA o que não foi evidenciado em G2=0%; $P<0,0001$. O mesmo ocorreu com o alelo mutante *T* (G1=83%; G2=38%; $P<0,0001$; Tabela 5).

Combinações genótípicas de pelo menos um alelo polimórfico comparado à combinações genótípicas selvagem para os polimorfismos *APOB* (rs693 e rs1042031); *PCSK9* (rs505151, rs11591147, rs11206510) e *RLDL* (rs688, rs6511720) em G1 versus G2 não evidenciaram diferenças significantes ($P=0,161$; Tabela 6)

Para análise de haplótipos, houve semelhança entre as frequências haplotípicas de pacientes e controles, considerando os conjuntos de SNPs

rs10490920-rs532678 (P=0,87752), rs532678-rs701848 (P=0,95670) e rs10490920-rs532678-rs701848(P=0,75203;Tabela18).

Tabela 2. Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

Variáveis	G1 (N=63)		G2 (N=17)		*Valor-P
Idade (anos)					
Mediana	61		64		0,544
Mínimo	46		49		
Máximo	77		72		
Gênero	N	%	N	%	0,117
Masculino	38	60	6	35	
Feminino	25	40	11	65	
Hábito de vida	N	%	N	%	0,059
Tabagismo	50	79	9	53	
Etilismo	31	49	8	47	
Comorbidades	N	%	N	%	0,602
HAS	59	94	15	88	
IMC	51	81	15	88	
Sedentarismo	48	76	14	82	
DM	21	33	9	53	0,230

Teste Qui-quadrado e Fisher, P= nível de significância $P < 0,05$; HAS= hipertensão arterial sistêmica; N= número de pacientes, %=porcentagem, G1=grupo 1, G2=grupo 2.

Tabela 3. Frequências alélicas e genóticas para os polimorfismos de *APOB* (*rs693* e *rs1042031*) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

Perfil Genético	G1		G2		*Valor-P
<i>APOB - XbaI</i>					G1xG2
(<i>rs693</i>)					
Genótipo	N	%	N	%	
<i>G/G</i> (selvagem)	18	31	1	6	0,098
<i>G/A</i> (heterozigoto)	28	47	8	50	0,856
<i>A/A</i> (polimórfico)	13	22	7	44	0,154
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	
<i>G</i>	64	0,54	10	0,31	0,355
<i>A</i>	54	0,46	22	0,69	
<i>APOB-EcoRI</i>					G1xG2
(<i>rs1042031</i>)					
Genótipo	N	%	N	%	
<i>C/C</i> (selvagem)	38	67	7	44	0,169
<i>C/T</i> (heterozigoto)	17	30	9	56	0,097
<i>T/T</i> (polimórfico)	2	3	0	0	0,447
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	
<i>C</i>	93	82	23	72	0,340
<i>T</i>	21	18	9	28	

APOB= Apolipoproteína B; P= Nível de significância<0,05; *Teste Qui-Quadrado ou Fisher; N=Número de indivíduos; Freq. abs.=Frequência absoluta

Tabela 4. Frequências alélicas e genóticas para os polimorfismos de *PCSK9* (rs505151, rs11591147, rs11206510) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

Perfil Genético	G1		G2		*Valor-P
<i>PCSK9 (rs505151)</i>					
Genótipo	N	%	N	%	
<i>A/A</i> (selvagem)	59	100	17	100	
<i>A/G</i> (heterozigoto)	0	0	0	0	-
<i>G/G</i> (polimórfico)	0	0	0	0	
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	-
<i>A</i>	177	100	51	100	
<i>G</i>	0	0	0	0	
<i>PCSK9 (rs11591147)</i>					
					G1xG2
Genótipo	N	%	N	%	
<i>G/G</i> (selvagem)	59	100	17	100	-
<i>G/T</i> (heterozigoto)	0	0	0	0	
<i>T/T</i> (polimórfico)	0	0	0	0	
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	
<i>G</i>	177	100	51	100	-
<i>T</i>	0	0	0	0	
<i>PCSK9 (rs11206510)</i>					
					G1xG2
Genótipo	N	%	N	%	
<i>T/T</i> (selvagem)	42	71	12	71	1,000
<i>T/G</i> (heterozigoto)	16	27	4	23	1,000
<i>G/G</i> (polimórfico)	1	2	1	6	0,399
Alelo					
<i>T</i>	100	84	28	82	
<i>G</i>	19	16	6	18	0,777

PCSK9 = proprotein convertase subtilisin/kexin type 9); P= Nível de significância<0,05; *Teste Qui-Quadrado ou Fisher; N=Número de indivíduos; Freq. abs.=Frequência absolut

Tabela 5. Frequências alélicas e genóticas para os polimorfismos de *RLDL* (rs688, rs6511720) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2)

Perfil Genético	G1		G2		*Valor-P
	N	%	N	%	
<i>RLDL (rs688)</i>					
Genótipo	N	%	N	%	
<i>C/C</i> (selvagem)	10	22	4	25	0,743
<i>C/T</i> (heterozigoto)	10	22	4	25	0,743
<i>T/T</i> (polimórfico)	26	56	8	50	0,811
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	
C	30	33	12	37	0,774
T	62	67	20	63	
<i>RLDL(rs6511720)</i>					
Genótipo	N	%	N	%	
<i>G/G</i> (selvagem)	0	0	10	67	<0,0001
<i>G/T</i> (heterozigoto)	19	35	5	33	0,930
<i>T/T</i> (polimórfico)	36	65	0	0	<0,0001
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	
G	19	17	25	62	<0,0001
T	91	83	15	38	

RLDL = receptor de LDL; P= Nível de significância<0,05; *Teste Qui-Quadrado ou Fisher; N=Número de indivíduos; Freq. abs.=Frequência absoluta.

Tabela 6: Combinações genóticas para os polimorfismos *APOB* (*rs693* e *de*); *PCSK9* (*rs505151*, *rs11591147*, *rs11206510*) e *RLDL* (*rs688*, *rs6511720*) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2)

Perfil Genético	G1		G2		*Valor-P G1xG2
	N	%	N	%	
<i>_A/_T/_G/_T/_G/_T/_T</i> (Alelo polimórfico)	165	42	58	50	0,161
<i>_G/_C/_A/_G/_T/_C/_G</i> (Alelo selvagem)	227	58	58	50	

Tabela 7. Heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para os polimorfismos de APOB (rs693 e rs1042031); PCSK9 (rs11206510) e RLDL (rs688, rs6511720) com correspondente valor de P para o teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2)

Polimorfismo	G1			G2		
	Ho	He	P-EHW	Ho	He	P-EHW
APOB- <i>rs693</i>	0,49	0,50	1,00000	0,46	0,43	1,00000
APOB- <i>rs1042031</i>	0,29	0,30	1,00000	0,53	0,40	0,50788
PCSK9 <i>rs11206510</i>	0,27	0,26	1,00000	0,23	0,29	0,41150
RLDL <i>rs688</i>	0,21	0,45	1,00000	0,25	0,48	0,10132
RLDL <i>rs6511720</i>	0,37	0,30	0,17860	0,43	0,35	0,54316

Haplótipos

A análise do desequilíbrio de ligação (DL) não mostrou associação alélica entre os polimorfismos estudados. $P > 0,05$; Tabela 8).

Tabela 8. Análise de desequilíbrio de ligação para os polimorfismos de base única (SNPs) do gene *APOB* (rs693 e rs1042031); *PCSK9* (rs505151, rs11591147, rs11206510) e *LDL* (rs688, rs6511720) em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2)

Par de SNP	G1 (N=37)		G2 (N=13)	
	χ^2	Valor-P	χ^2	Valor-P
rs rs693 – rs1042031	8,9973	1,00000	1,33954	1,00000
rs rs505151 – rs11591147	0,00000	1,00000	0,00000	1,00000
rs rs505151- rs11206510	0,00000	1,00000	0,00000	1,00000
rs11591147- rs11206510	0,00000	1,00000	0,00000	1,00000
rs688- rs6511720	0,39374	0,53034	2,20354	0,13769

N= número de indivíduos; χ^2 = qui quadrado; P=nível de significância.

3. 3 Perfil Lipídico

A tabela 9 mostra valores semelhantes de mediana para níveis séricos de CT (G1=150,0mg/dL; G2= 153,0mg/dL); HDL (G1=46,5mg/dL; G2=48,0mg/dL) e TG (G1=137,0mg/dL; G2=112,0mg/dL; P>0,05). Por outro lado, níveis séricos de fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDLc), valores aumentados prevaleceram em G2 comparado a G1, P=0,025, Tabela 9). Para frequência de valores alterados do perfil lipídico (Tabela 10), não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos (P>0,05).

Tabela 9. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

Perfil Lipídico (mg/dL)	G1 (N = 63)	G2 (N = 17)	*Valor-P
CT			
Mediana	150,0	153,0	
Mínimo	100,00	131,0	0,212
Máximo	406,0	277,0	
HDLc			
Mediana	46,5	48,0	
Mínimo	25,0	31,0	0,758
Máximo	47,0	59,0	
LDLc			
Mediana	74,0	83,0	
Mínimo	50,0	70,0	0,025
Máximo	180,0	191,0	
TG			
Mediana	137,0	112,0	
Mínimo	57,0	96,0	0,535
Máximo	293,0	378,0	

P=nível de significância $P < 0,05$; *, CT= colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDLc=fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG=triglicérides; N=número de pacientes;

Tabela 10. Frequência de valores alterados do perfil lipídico em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

Perfil Lipídico (mg/dL)	G1		G2		*Valor-P
	N	%	N	%	G1xG2
CT>200	5	12,5	5	42	0,532
HDLc Feminino (<50)	12	57	5	56	1,000
Masculino (<40)	8	45	2	50	1,000
TG ≥150	15	37,5	3	23	0,503

P=nível de significância $P < 0,05$; *; CT= colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDLc=fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG=triglicérides; N=número de pacientes;

3. 4 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)

Das variáveis analisadas, houve diferença estatisticamente significativa para: RRi (817 ± 103 x $961,6 \pm 136,8$ ms; $P < 0,0001$); SDNN (141 ± 39 x $36,4 \pm 30,7$ ms; $P < 0,0001$); TotalPowerms2 (21222 ± 11663 x $1827,1 \pm 4869,1$; $P < 0,0001$); LnTotalPowerms2 ($9,83 \pm 0,51$ x $7,5 \pm 8,5$; $P = 0,0211$); VLFPowerms2 (1782 ± 965 x $911,0 \pm 2562,3$; $P = 0,0053$, Tabela 11).

Tabela 11. Resultados de variáveis (desvio padrão \pm média) relativas em pacientes com doença arterial coronária (G1) e pacientes saudáveis (G2).

Variáveis	Sadios [274]	G1 [74]	P
Normal RR intervals, ms	817\pm103	961,6\pm136,6	<0,0001
SDNN, ms	141\pm39	36,4\pm30,7	<0,0001
r-MSSD, ms ³	27\pm12	30,1\pm27,1	0,3405
Ln(r-MSSD)	3,24\pm0,37	3,40\pm3,29	0,6774
pNN50 ³	9\pm7	9,1\pm13,9	0,9524
Ln(pNN50)	1,83\pm0,98	2,2\pm2,6	0,2333
Total (<0.40 Hz) power, ms ²³	21 222\pm11 663	1827,1\pm4869,1	<0,0001
Ln(total power)	9,83\pm0,51	7,5\pm8,5	0,0211
Very-low-frequency (0.0033-0.04 Hz) power, ms ²³	1782\pm965	911\pm2562,3	0,0053
Ln(very-low-frequency power)	7,35\pm0,53	6,8\pm7,8	0,5463
Low-frequency (0.04-0.15 Hz) power, ms ²³	791\pm563	681,5\pm1853,4	0,6171
Ln(low-frequency power)	6,45\pm0,68	6,52\pm7,5	0,9363
High-frequency (0.15-0.40 Hz) power, ms ²³	229\pm282	233,6\pm565,5	0,9462
Ln(high-frequency power)	5,05\pm0,83	5,5\pm6,3	0,5418
Low-frequency power/high-frequency power ³	4,61 \pm2,33	5,5\pm7,0	0,2845
Ln(low-frequency power/high-frequency power)	1,41\pm0,51	1,7\pm1,9	0,1974

Valores expressos como desvio padrão \pm média, P=nível de significância $P < 0,05$; N= número de pacientes.

3.4.1 Relação de Variabilidade da Frequência Cardíaca e Polimorfismos Genéticos

Para essa análise foi considerado o grupo com DAC com ou sem SCA (G1+G2), comparando-se o valor das variáveis da VFC, considerando pelo menos um genótipo de risco versus genótipos selvagens (Tabelas 12 a 16). Destacaram-se apenas o polimorfismo de *PCSK9 rs11206510*, cuja presença de pelo menos um alelo polimórfico ($_ / G$) associou-se a valores de mediana reduzida para PNN50 (1,23), RMSSD (19,73) e SD1 (13,95) comparado respectivamente aos genótipos selvagens (*T/T*); PNN50 (4,83; $P=0,024$); RMSSD (25,97;0,034) e SD1 (18,38; $P=0,034$). As demais variáveis da VFC mostraram semelhança na análise comparativa entre os genótipos de *APOB-rs693*, *APOB-rs1042031* e *RLDL-rs688* ($P>0,05$; Tabelas 12 a 14).

3.4.2 Relação de Variabilidade da Frequência Cardíaca e Perfil Lipídico

A análise do perfil lipídico alterado relacionado com a variabilidade da frequência cardíaca não apresentou diferenças significantes ($P>0,05$; Tabelas 17 a 19)

Tabela 12 – Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene *APOB*-rs693 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

VFC	Gene <i>APOB</i> rs693 G>A		*Valor-P
	<u>/A</u> (polimórfico)	<u>G/G</u> (selvagem)	
Mean RR			
Mediana	983.82	949.78	
Mínimo	718.17	531.37	0,437
Máximo	1345,7	1227,0	
SDNN			
Mediana	32,28	38,09	
Mínimo	15,92	10,53	0,321
Máximo	91,58	205,96	
PNN50			
Mediana	2,82	5,82	
Mínimo	0	0	0,359
Máximo	42,04	73,18	
RMSSD			
Mediana	22,38	26,47	
Mínimo	10,84	6,14	0,570
Máximo	59,19	184,01	
HF nu			
Mediana	25,07	38,09	
Mínimo	2,21	5,53	0,127
Máximo	85,57	51,14	
SD1			
Mediana	15,83	18,73	
Mínimo	7,67	4,34	0,570
Máximo	41,87	130,18	
SD2			
Mediana	38,45	44,57	
Mínimo	8,65	15,64	0,283
Máximo	126,20	259,19	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância P<0,05; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 13 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene *APOB*- rs1042031 em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

VFC	<i>Gene APOB rs1042031 C>T</i>		*Valor-P
	<i>_T</i> (polimórfico)	<i>C/C</i> (selvagem)	
Mean RR			
Mediana	990,89	949,78	
Mínimo	713,33	531,37	0,712
Máximo	1140,4	1345,7	
SDNN			
Mediana	35,37	32,03	
Mínimo	15,92	10,53	0,736
Máximo	205,96	205,96	
PNN50			
Mediana	2,82	4,77	
Mínimo	0	0	0,788
Máximo	59,52	73,18	
RMSSD			
Mediana	21,58	24,63	
Mínimo	10,84	6,14	0,723
Máximo	184,01	184,00	
HF nu			
Mediana	27,07	18,75	
Mínimo	4,76	2,21	0,368
Máximo	85,57	84,31	
SD1			
Mediana	15,26	17,43	
Mínimo	7,67	4,34	0,723
Máximo	130,18	130,88	
SD2			
Mediana	35,56	40,65	
Mínimo	8,65	15,64	0,853
Máximo	259,19	259,89	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância $P<0,05$; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 14 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene *PCSK9* – *rs11206510* em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda e sua relação com pelo menos um alelo de risco comparado ao genótipo selvagem.

VFC	Gene <i>PCSK9</i> <i>rs11206510</i> T>G		*Valor-P
	_/G (polimórfico)	T/T (selvagem)	
Mean RR			
Mediana	985,49	994,13	
Mínimo	788,65	713,33	0,723
Máximo	1046,4	1140,4	
SDNN			
Mediana	26,84	34,02	
Mínimo	10,53	15,92	0,058
Máximo	52,64	205,96	
PNN50			
Mediana	1,23	4,83	
Mínimo	0	0	0,024*
Máximo	14,07	73,18	
RMSSD			
Mediana	19,73	25,97	
Mínimo	6,14	10,84	0,034*
Máximo	36,32	184,01	
HF nu			
Mediana	18,44	23,32	
Mínimo	4,51	2,21	0,461
Máximo	72,61	85,57	
SD1			
Mediana	13,95	18,38	
Mínimo	4,34	7,67	0,034*
Máximo	25,70	130,18	
SD2			
Mediana	29,56	40,51	
Mínimo	10,95	8,65	0,273
Máximo	92,98	259,19	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância P<0,05; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 15 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene *PCSK9* – *rs11206510* em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

VFC	<i>Gene PCSK9 rs11206510 T>G</i>		*Valor-P
	<i>_/G</i> (polimórfico)	<i>T/T</i> (selvagem)	
Mean RR			
Mediana	985,49	994,13	
Mínimo	788,65	713,33	0,723
Máximo	1046,4	1140,4	
SDNN			
Mediana	26,84	34,02	
Mínimo	10,53	15,92	0,058
Máximo	52,64	205,96	
PNN50			
Mediana	1,23	4,83	
Mínimo	0	0	0,024*
Máximo	14,07	73,18	
RMSSD			
Mediana	19,73	25,97	
Mínimo	6,14	10,84	0,034*
Máximo	36,32	184,01	
HF nu			
Mediana	18,44	23,32	
Mínimo	4,51	2,21	0,461
Máximo	72,61	85,57	
SD1			
Mediana	13,95	18,38	
Mínimo	4,34	7,67	0,034*
Máximo	25,70	130,18	
SD2			
Mediana	29,56	40,51	
Mínimo	10,95	8,65	0,273
Máximo	92,98	259,19	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância $P<0,05$; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 16 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao gene *RLDL rs688* em pacientes com antecedente de síndrome coronária aguda (G1) e pacientes dislipidêmicos sem histórico de SCA (G2).

VFC	Gene <i>RLDL rs688 C>T</i>		*Valor-P
	<i>_</i> / <i>T</i> (polimórfico)	<i>C/C</i> (selvagem)	
Mean RR			
Mediana	942,11	1020,0	
Mínimo	531,37	779,88	0,126
Máximo	1345,7	1210,0	
SDNN			
Mediana	32,16	33,55	
Mínimo	15,92	11,68	0,692
Máximo	205,96	63,23	
PNN50			
Mediana	2,33	9,86	
Mínimo	0	0	0,274
Máximo	73,18	34,41	
RMSSD			
Mediana	21,88	32,42	
Mínimo	10,84	8,15	0,248
Máximo	184,01	50,73	
HF nu			
Mediana	20,92	18,75	
Mínimo	4,51	2,21	0,719
Máximo	74,43	85,57	
SD1			
Mediana	15,48	22,93	
Mínimo	7,67	5,76	0,248
Máximo	130,18	35,89	
SD2			
Mediana	38,45	50,84	
Mínimo	10,95	8,65	0,345
Máximo	259,19	96,20	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da média da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância $P<0,05$; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 17 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao CT alterado em pacientes com DAC e SCA.

VFC			
Mean RR	Perfil lipídico alterado	Perfil lipídico normal	*Valor-P
Mediana	973,26	952,47	0,926
Mínimo	793,03	531,37	
Máximo	1058,0	1210,0	
SDNN			
Mediana	26,96	32,28	0,529
Mínimo	16,68	11,68	
Máximo	43,51	149,11	
PNN50			
Mediana	4,16	2,90	0,879
Mínimo	0	0	
Máximo	25,41	73,18	
RMSSD			
Mediana	26,81	21,88	0,985
Mínimo	9,92	7,38	
Máximo	41,74	151,79	
HF nu			
Mediana	46,06	28,83	0,129
Mínimo	5,68	2,14	
Máximo	74,56	85,57	
SD1			
Mediana	18,98	15,48	0,265
Mínimo	7,02	5,22	
Máximo	29,53	107,38	
SD2			
Mediana	21,34	32,85	0,067
Mínimo	10,17	8,65	
Máximo	49,77	190,40	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância $P < 0,05$; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 18 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao HDLc alterado em pacientes com DAC e SCA.

VFC			
Mean RR	Perfil lipídico alterado	Perfil lipídico normal	*Valor-P
Mediana	925,15	991,96	0,883
Mínimo	788,28	531,37	
Máximo	1210,0	1140,7	
SDNN			
Mediana	33,54	30,31	0,636
Mínimo	11,68	15,92	
Máximo	63,23	149,11	
PNN50			
Mediana	3,50	3,02	0,917
Mínimo	0	0	
Máximo	42,04	73,18	
RMSSD			
Mediana	21,27	24,63	0,674
Mínimo	7,38	10,84	
Máximo	59,19	151,79	
HF nu			
Mediana	48,91	27,84	0,192
Mínimo	2,21	4,51	
Máximo	85,57	74,56	
SD1			
Mediana	15,05	17,43	0,679
Mínimo	5,22	7,67	
Máximo	41,87	107,38	
SD2			
Mediana	27,74	36,40	0,094
Mínimo	8,65	10,95	
Máximo	96,20	190,4	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância $P<0,05$; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

Tabela 19 - Variabilidade da frequência cardíaca associada ao triglicerídeo alterado em pacientes com DAC e SCA.

VFC			
Mean RR	Perfil lipídico alterado	Perfil lipídico normal	*Valor-P
Mediana	927,16	991,97	0,436
Mínimo	531,37	788,28	
Máximo	1210,0	1167,5	
SDNN			
Mediana	29,55	32,33	0,590
Mínimo	11,68	15,92	
Máximo	149,11	63,23	
PNN50			
Mediana	3,02	3,17	0,630
Mínimo	0	0	
Máximo	73,18	42,04	
RMSSD			
Mediana	24,03	22,26	0,697
Mínimo	8,15	7,38	
Máximo	151,79	57,19	
HF nu			
Mediana	35,86	30,79	0,334
Mínimo	6,33	2,21	
Máximo	85,57	84,31	
SD1			
Mediana	17,00	15,74	0,697
Mínimo	5,76	5,22	
Máximo	107,38	41,87	
SD2			
Mediana	26,53	29,56	0,461
Mínimo	8,65	10,17	
Máximo	190,4	96,204	

VFC= variabilidade da frequência cardíaca; RR=intervalo entre duas ondas R no eletrocardiograma; SDNN=desvio padrão de intervalos RR normais; RMSDD= raiz quadrada da media da soma dos quadrados de diferenças sucessivas entre batidas normais adjacentes; pNN50= número de pares de intervalos de batidas sucessivas normais que diferem de 50ms; SD= desvio padrão; P=nível de significância $P<0,05$; *Teste Kruskal Wallis. Teste Mann Whitney: N= número de pacientes

4. DISCUSSÃO

Perfil clínico-demográfico e hábitos de vida

Em relação ao gênero não houve diferença entre os grupos. Em nosso estudo observou-se prevalência do sexo masculino nos pacientes com SCA (60%) em relação ao sexo feminino (40%). Esses dados vão ao encontro com o estudo de Oliveira et al, 2015 na qual dos 509 pacientes 291(57,2%) eram do sexo masculino. O mesmo com Sifri et al,⁽¹⁵⁷⁾ dos 597 pacientes com SCA, 79,2% (473) eram homens. Assim como estudos de Lima et al.,⁽¹⁵⁸⁾ Soeiro et al.,⁽¹⁵⁹⁾ Discordando de Gus et al.,⁽¹⁶⁰⁾ em seu trabalho envolvendo 1.056 indivíduos com DAC, representado por 57% de mulheres. No Brasil, em todas as regiões do país, a DAC ocasiona a maior causa de morte em ambos os sexos (Oliveira et al, 2015)⁽¹⁶¹⁾. É ainda questionável sua prevalência em relação a gênero. Segundo estudo de Oliveira, et al., 2015⁽¹⁶¹⁾ notou-se maior risco elevado no sexo masculino (92,3%) e frequência baixa do risco no sexo feminino (43,8%) indicando maior risco para o gênero masculino. Claassen e colaboradores (2012)⁽¹⁶²⁾ descreveram que em mulheres com a doença coronariana, devido o possível efeito protetor dos estrogênios, se desenvolvem de 7 a 10 anos mais tarde do que nos homens. Ainda, podemos reforçar dois estudos que mostraram que a doença desenvolve-se em idade mais precoce no gênero masculino do que no feminino.⁽¹⁶³⁾ Ressalta-se que, mulheres mais jovens se favorecem dos efeitos protetores dos estrógenos endógenos, dentre eles o estradiol, que pode inibir o remodelamento vascular relacionado à idade, reduzir os níveis de colesterol e melhorar o tônus vascular. Acredita-se que essa diferença entre gêneros começa a diminuir após a menopausa, considerado fator de risco para a SCA.

O tabagismo foi constatado em 79% dos pacientes. Estudo de Ge et al.,(2018), encontrou 70,6% de tabagistas em pacientes com SCA comparado aqueles sem coronariopatia. Segundo Yusuf et al.,⁽¹⁶⁴⁾ o uso de um a cinco cigarros/dia aumenta 40% o risco de IAM. Outros estudos também relataram risco aumentado para SCA.⁽¹⁶⁵⁻¹⁶⁷⁾ Reconhecidamente, o uso do cigarro está envolvido em vários processos fisiopatológicos da doença, como desregulação endotelial, aterogênese, agregação plaquetária e aceleração da aterosclerose.^(160,167) Diversos estudos concluem que há disfunção endotelial nos fumantes,⁽¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾ porém sem comprovação efetiva.

O uso de álcool é considerado o quinto fator de risco mais importante para mortalidade e morbidade global.⁽¹⁷¹⁾ No presente estudo, o consumo de bebidas alcoólicas, embora relatado quase pela metade dos pacientes (49%) não se associou à SCA. Em um estudo realizado em 100 pacientes com infarto,⁽¹⁷¹⁾ 24% já haviam consumido frequentemente bebidas alcoólicas, enquanto 22% ainda eram consumidores. O mesmo ocorreu com estudo com pacientes pós síndrome coronária aguda, que as frequências de consumo de álcool de 24,7% e 21,1% nos 12 meses anteriores à SCA e seis meses após, respectivamente.⁽¹⁷²⁾ Reconhecidamente, o álcool é uma neurotoxina que pode ocasionar o aumento de estresse oxidativo, disfunção endotelial e ativação de vias redox-sensíveis além de predispor desfechos cardiovasculares.⁽⁷⁸⁾

Representada pela maioria dos pacientes (81%), a obesidade, é um fator agravante e está relacionada com diversos fatores de risco para DCVs.⁽¹⁷³⁾ No entanto, neste estudo não se associou à SCA, assim como em outra casuística brasileira.⁽¹⁷⁴⁾ Porém, estudo realizado em 26.592 pacientes com IAM houve

aumento do risco para SCA quando associado a obesidade.⁽¹⁷⁵⁾ No Brasil, assim como em outros países, a prevalência de sobrepeso e obesidade só aumenta. No estudo de Silva e Leite (2010) observou-se prevalência de obesidade em 38,3% dos pacientes. Em Niterói, 56,9% dos pacientes com SCA apresentavam IMC aumentado.⁽¹⁷⁶⁾ Ainda, o estudo FRICAS mostra a importância da obesidade como fator de risco para IAM.⁽¹⁷⁷⁾ Sabe-se que o tecido adiposo visceral secreta adipocinas ou hormônios derivados de lipídios, colaborando para HAS, dislipidemia e síndrome metabólica, que são fatores de risco para DAC.^(160,178,179)

O sedentarismo e a inatividade física são considerados importantes fatores de risco para DCNTs, além de interferirem na expectativa de vida são considerados entre as principais causas indiretas de óbito no mundo.⁽¹⁸⁰⁾ Em nosso estudo, o sedentarismo destacou-se como o quarto fator de risco, com frequência de 76%, porém sem diferenças estatísticas. Em estudo realizado em 2005 com pacientes com SCA com ou sem supra de segmento ST, aproximadamente 70% eram sedentários.⁽¹⁸¹⁾ No estudo de Silva e Leite, 74,5% dos pacientes eram sedentários. Ainda, estudo recente com pacientes com diagnóstico de IAM, 74,4% eram sedentários.⁽¹⁵⁸⁾ O mesmo ocorreu em outros estudos.^(176,182-184) Acredita-se que a razão de taxas mais elevadas de sedentarismo encontradas no presente estudo pode estar relacionada à progressão da DAC, pois um percentual dos indivíduos deste estudo já apresentava IAM prévio, angina de peito ou cirurgia de revascularização do miocárdio – condições essas que limitam a realização de atividade física, na visão dos pacientes.

Sabe-se que o sedentarismo desempenha papel essencial na manutenção da obesidade e que a prática regular de exercícios físicos é fundamental para o cuidado

à saúde, principalmente cardiovascular.^(51,158,185) Realizada com frequência, a atividade física contribui para a vasodilatação, e ainda aumenta a produção de diversas substâncias produzidas no endotélio, dentre elas, óxido nítrico, prostaciclina e superóxido dismutase, contribuindo para a inibição da agregação plaquetária e prevenção da formação de trombos.^(82,83)

No Brasil, as doenças cardiovasculares e o DM são responsáveis por óbitos e morbidade por doenças crônicas em adultos. A DM piora o prognóstico de pacientes com doença coronariana.⁽¹⁸²⁾ Em nossa causuística não encontramos associação de DM e SCA (P=0,230), corroborando outros estudos.^(54,176, 186)

Sabe-se que DM altera a função de células endoteliais ocasionando hiperglicemia crônica, dislipidemia e a resistência à insulina. Além disso, diminui a vasodilatação, acarretando a disfunção endotelial e conseqüentemente a progressão aterosclerótica (CentemeroI et al., 2009).⁽⁶⁹⁾

HAS destacou-se com maior prevalência entre os fatores de riscos estudados (94%), mas sem significância, corroborando outros estudos.^(174,187) Porém, há referência de HAS como preditor para o desenvolvimento e progressão de DAC,^(188,189) sendo considerada fator de risco de maior prevalência para DAC, assim como para todas as doenças isquêmicas. Ressalta-se, nesse caso, sua contribuição na remodelação ventricular, disfunção endotelial, hipertrofia de células musculares lisas vasculares, insuficiência cardíaca congestiva e progressão da aterosclerose.^(63,190) Sabe-se também que, pacientes com HAS apresentam acelerada degeneração das artérias devido a mudanças da onda de pulso arterial, ocasionando estreitamento da parede vascular, fratura de fibras elásticas e fibrosas, dilatação e, por fim, formação de ateromas com sua posterior ruptura.^(191,192)

Perfil Genético

Neste estudo utilizou-se a metodologia de microarranjos de DNA para identificação de SNPs relacionados com a SCA. Nesse caso, os microarrays de genotipagem, também conhecidos como arranjos de SNPs, têm sido a força motriz de estudos de associação de genoma completo (GWAS) nos últimos 15 anos.¹⁹³ A análise e o controle de qualidade da matriz de genotipagem da Illumina, as quais foram aplicadas neste estudo, foram extensivamente estudadas em diferentes populações,^(194,195) garantindo a confiabilidade dos dados gerados.

Nesse contexto, o estudo de associação global do genoma (GWAS) é um procedimento validado para identificar loci responsáveis pela variação de características poligênicas. Esta metodologia consiste em correlacionar o genótipo de milhares de SNP com fenótipos de interesse. Os primeiros estudos envolvendo a associação global do genoma, realizados em humanos, possibilitaram a identificação de loci que afetam várias doenças complexas, como câncer de próstata, transtorno bipolar, doença arterial coronariana, hipertensão, artrite reumatóide, diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2.^(196,197)

Assim, neste estudo, com a análise por GWAS, foi possível identificar SNPs que apresentaram possível associação com SCA e como esperado estavam envolvidos com vias do metabolismo lipídico. Nesse caso, para o gene *APOB-rs693* destacou-se o genótipo heterozigoto *G/A* e o alelo polimórfico *A* no grupo controle. Em estudo de meta-análise, com 3.393 pacientes com IM e 3.776 controles, a qual conclui-se que o alelo e genótipo polimórfico podem predispor ao infarto do miocárdio (Li,2014)¹⁹⁸. Em nosso estudo, acredita-se que esse achado, pode ser decorrente ao grupo controle ser dislipidêmico, uma vez que, com base em estudos tipo caso-controle, observacionais, de

base genética ou de tratamento, existem evidências que o colesterol elevado seja considerado o principal fator de risco modificável para DAC.⁽²¹⁾ Em alguns estudos não se confirma a associação do polimorfismo *APOB-rs693* com SCA, assim como estudo envolvendo diversas etnias (Zhang et al.)¹⁹⁹ e estudo de Chiodini et al.²⁰⁰. Por outro lado, Baroni et al.²⁰¹ ao estudar italianos observaram que o polimorfismo *XbaI* do gene *APOB* foi independentemente associado com DAC. Li et al.⁽¹⁹⁸⁾ também observaram esse comportamento nas populações não caucasianas, assim como o estudo de Xu et al.⁽²⁰²⁾ Zang et al.⁽²⁰³⁾, Chen e colaboradores⁽⁸⁶⁾ na população chinesa; Hegele et al.⁽²⁰⁴⁾ na população dos Estados Unidos e Tybjaerg-Hansen et al.⁽²⁰⁵⁾ em brancos de ascendência dinamarquesa.

Em relação a *APOB-rs1042031*, neste estudo, os pacientes com DAC com SCA mostraram prevalência do genótipo selvagem (*CC*) e do alelo selvagem (*C*), o mesmo ocorreu no estudo com 150 indivíduos com DAC angiograficamente documentada e 100 controles angiograficamente saudáveis.²⁰⁶ Por outro lado, há referência de associação entre esse polimorfismo e o risco de DAC.^(199,207) Sabe-se que o gene *APOB* desempenha papel fundamental no acúmulo de lipídios e regula o equilíbrio do colesterol.⁽²⁰⁸⁾ Mutações nesse gene interferem na ligação entre os *RLDL* e *LDL* afetando a taxa catabólica de *LDL*, ocasionando acúmulo de *LDL* no plasma. Assim, tal dislipidemia aceleraria o desenvolvimento da aterosclerose. Portanto, os resultados deste estudo poderiam ser interpretados a partir desses mecanismos biológicos.^(86,209)

Mutações funcionais de *PCSK9* afetam a atividade da proteína *PCSK9*, resultando em modificações no metabolismo lipídico e no risco cardiovascular. A *PCSK9* aumenta a degradação nos lisossomos *RLDL*, acarretando a redução da depuração de *LDL-C*, resultando em níveis séricos de *LDL-C* elevados.⁽¹⁰⁶⁾

Em nosso estudo, não foi evidenciada associação de *PCSK9* com SCA ($P > 0,05$). Observou-se destaque para os polimorfismos *PCSK9*-rs505151 e *PCSK9*-rs11591147, no qual, 100% dos alelos e genótipos foram selvagens, corroborando estudo de Chiang et al⁽²¹⁰⁾ e Alves⁽²¹¹⁾ Entretanto, alguns estudos mostraram que sua associação com risco cardiovascular elevado.⁽²¹²⁻²¹⁴⁾ É importante ressaltar que o risco de eventos cardiovasculares pode ser significativamente menor pela redução substancial nos níveis de LDL.⁽¹³⁸⁾ Estudos envolvendo informações genéticas de *PCSK9* e o processamento fisiopatológico da doença ao manejo de lipídios e à predição do risco cardiovascular, podem ser potencialmente útil na prática clínica.⁽¹⁰⁶⁾

Em nosso estudo observou-se associação do polimorfismo rs6511720 do gene *LDL* com SCA, sendo que o genótipo selvagem foi observado apenas no grupo controle. De forma semelhante, diversos estudos encontraram associação com o polimorfismo rs6511720.⁽²¹⁵⁻²¹⁸⁾ O mesmo com o polimorfismo rs688.⁽²¹⁹⁻²²¹⁾ Sabe-se que os LDL estão envolvidos no metabolismo das lipoproteínas e na regulação dos níveis plasmáticos de lipídios e colesterol pela captação mediada por receptores de lipoproteínas.⁽²²²⁾ Ainda, as mutações no gene *LDLR* estão relacionadas com a disfunção do *LDLR*, diminuindo o catabolismo de LDL-C. Além disso, pacientes com mutações no gene *LDLR* possuem níveis plasmáticos de colesterol elevados duas ou mais vezes que a concentração normal, predispondo o risco de desenvolvimento de aterosclerose e DAC.^(104,120)

O Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) não se confirmou entre os genes estudados em pacientes com DAC com ou sem histórico de SCA. Ressalta-se que a ausência de equilíbrio indica, entre outros fenômenos, o impacto de fatores evolutivos que podem alterar frequências genóticas. Adicionalmente, devem ser considerados

também os critérios utilizados na seleção dos grupos.⁽²²³⁾ Deve ser destacado, ainda, o caráter miscigenado da população brasileira,^(140,224,225) o que pode contribuir para divergências em relação EHW, utilizado há mais de 100 anos para identificar características genéticas das populações.⁽²²⁶⁻²²⁸⁾

As interações genéticas são complexas e apenas um polimorfismo isolado pode não influenciar diretamente os produtos gênicos. Desse modo, a análise de uma única variante genética seria insuficiente para prever proteção ou risco para a doença. Nesse contexto, o conjunto de vários polimorfismos ou haplótipos poderiam desempenhar papel importante no desenvolvimento de DAC.⁽²²⁹⁾

Foi analisado também neste estudo o desequilíbrio de ligação (DL) para os respectivos genes. Trata-se de associação não-aleatória de alelos em dois ou mais loci. É utilizado para entender eventos evolutivos e demográficos passados, mapear genes que estão associados com caracteres quantitativos e doenças hereditárias, e entender a evolução de conjuntos de genes interligados.⁽²²⁸⁾ Nesse contexto, observou-se no presente estudo desequilíbrio de ligação entre os pares em ambos os grupos. Deste modo, a extensão do DL no presente estudo sugere aumento de risco de doenças hereditárias complexas, seleção, mutação, deriva aleatória ou não aleatória, miscigenação ou subdivisão populacional.⁽²²⁸⁾

Este estudo apresentou algumas limitações. Primeiro, o tamanho amostral foi reduzido devido à dificuldade de seleção da casuística com os critérios propostos. Sabe-se que para análise de polimorfismo, uma casuística numerosa é relevante para realizar análise do tipo caso-controle. Contudo, ainda com um número reduzido foi possível observar diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Segundo, o grupo

controle foi composto por pacientes com doença arterial coronariana que não apresentavam síndrome coronária aguda, esse fato pode ser um fator confundidor.

Perfil Lipídico

A concentração plasmática elevada da fração LDL-C está relacionada com o desenvolvimento de DAC.^(54,230) Em nosso estudo foram analisados pacientes com DAC com ou sem SCA e níveis de LDLc >50mg/dL, mesmo em tratamento com doses potentes de estatina.^(228,231,232) Sabe-se que os níveis de LDL-C que indicam abordagem terapêutica dependem do perfil de risco dos indivíduos. Segundo a Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2017),⁽²²⁸⁾ criaram a categoria de “muito alto risco cardiovascular” para os indivíduos que apresentam doença aterosclerótica significativa em território coronariano, cerebrovascular ou vascular periférico. Para estes indivíduos, as metas do LDL-C foram reduzidas para <50 mg/dL.^(232,233,228)

A propósito, o uso das estatinas fundamenta-se na redução das taxas sanguíneas de LDL-C, caracterizada como importante fator de risco independente para DAC.⁽²³⁴⁾ Ainda, a redução do LDL-C, causa a redução da disfunção celular, melhorando a função endotelial e promovendo a estabilidade da placa, levando a rápida melhora da disfunção vasomotora e endotelial em algumas horas. Também pode diminuir a densidade e a atividade das células inflamatórias na placa, pela redução do recrutamento destas células na parede do vaso e pelo aumento da apoptose, redução do estresse oxidativo e inflamação, e diminuição da resposta trombogênica.^(235, 236)

É importante ressaltar, que o tipo do hipolipemiante e sua dosagem diária, intervêm diretamente na redução expressiva de LDL-C.⁽²³⁶⁾ Além do mais, estudos

evidenciaram que atorvastatina foi mais eficaz comparada a outras estatinas, no decréscimo de LDL-C como prevenção secundária à novos desfechos cardiovasculares.⁽¹³⁷⁻¹⁴⁰⁾ Diante disso, em nosso estudo, foram selecionados pacientes hiporrespondedores a dosagem diária de atorvastatina de 80mg corroborando estudo de Weng et al.²³⁵ e Wirtwein et al.⁽¹⁸⁹⁾

O estudo PRISM (*Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management*) (2002)⁽²⁴¹⁾ avaliou em 1.616 pacientes, o benefício das estatinas na taxa de eventos cardíacos. Observaram que a administração de estatinas estava ligada à redução da taxa de eventos (Razão de Chances [OR] de 0,49), que foi estatisticamente significativa. Apesar disso, se a terapia com estatinas fosse interrompida durante a internação, observou-se aumento significativo no risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares (OR 2,93). O mesmo foi evidenciado com o estudo *National Registry of Myocardial Infarction*.^(242,243)

Dois estudos: PAIS (*Pravastatin in Acute Ischaemic Syndromes*)⁽²⁴⁴⁾ e LAMIL (*Lipids and Apolipoproteins after acute Myocardial Infarction*)⁽²⁴⁵⁾ confirmaram que a utilização de uma estatina, no caso, a pravastatina, após internação por SCA, foi bem tolerada e produziu redução significativa do colesterol total e do LDL-C, além de aumento do HDL-C.

E ainda, um estudo internacional - O A to Z Trial,⁽²⁴⁶⁾ que comparou a terapia intensiva por estatinas iniciada precocemente com a terapia menos intensiva e iniciada tardiamente em pacientes com SCA. Os pacientes (n = 2.265) receberam 40 mg/dia de sinvastatina por um mês e em seguida 80 mg/dia, em comparação com o grupo controle, que recebia placebo por 4 meses e, depois, sinvastatina 20 mg/dia (n = 2.232). O estudo teve 4.497 pacientes no período de seguimento entre 6 e 24 meses. No grupo que

utilizou estatina desde o início, as taxas de LDL-C após um mês e oito meses de tratamento foram, respectivamente, 68 mg/dL e 63 mg/dL, enquanto no grupo placebo 122 mg/dL e 77 mg/dL, respectivamente.

No presente estudo, foi possível observar, que mesmo sob terapêutica otimizada, os pacientes apresentaram níveis elevados de LDL-C no grupo com antecedente de SCA (G1) (valores entre 50 e 191mg/dL; mediana de 74mg/dL), assim como naqueles com DAC sem SCA (G2) (50 a 180mg/dL; mediana de 83mg/dL; P=0,025). Alguns ensaios clínicos e metanálises têm demonstrado que o tratamento mais eficaz no alcance de reduções mais agressivas do colesterol LDL, se associa a inequívocos benefícios na redução de eventos por doença aterosclerótica cardiovascular (DACV).⁽²³²⁾

Ainda, embora em nosso estudo os níveis séricos médios do colesterol total (150,0 mg/dL), do HDL-C (46,8 mg/dL) e dos triglicerídeos (137,0 mg/dL) não sejam considerados elevados, chama-se a atenção para o fato que a maioria dos pacientes apresentavam alguma alteração dos níveis lipídicos (12,5% com aumento do colesterol total, 37,5% hipertrigliceridemia e 57% HDL-C baixo. Esses dados vão ao encontro com resultado semelhante ao da literatura.⁽²⁴⁷⁾ Além disso, trata-se de uma população de alto risco cardiovascular pela presença de vários fatores de risco: 94% com HAS, 79% fumantes, 33% com glicemia alterada e 81% com IMC acima de 25 kg/m². Estes dados fortalecem o que tem sido retratado, na literatura, da importância da associação dos fatores de risco na determinação do risco de um indivíduo ter um evento coronariano e não apenas do julgamento de um fator, isoladamente.

Variabilidade da Frequência Cardíaca

O coração humano saudável possui uma variação de sua frequência de funcionamento, batimento a batimento, decorrente dos ajustes promovidos pelo sistema nervoso autônomo para regulação da homeostasia. A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) permite uma avaliação não invasiva e seletiva da função autonômica, e ainda, é considerada um indicador prognóstico de determinadas doenças cardíacas. Alguns estudos demonstram que a menor atividade parassimpática, ou seja, que a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca está associada a maior índice de mortalidade cardiovascular, enquanto alta variabilidade da frequência cardíaca reflete melhor estado de saúde. ^(248,149)

Segundo estudo de Kleiger et al.⁽²⁵⁰⁾ a mortalidade global é 5,3 vezes maior no grupo com menor VFC. Já Wolf, Varigos e Hunt (1978)⁽²⁵¹⁾ observaram em pacientes com IAM recente a mortalidade hospitalar foi 4 vezes maior no grupo com menor VFC. Estudo de Hayano et al⁽²⁵²⁾ relacionou VFC com alterações angiográficas, evidenciando que na doença arterial coronariana, quanto mais grave a lesão maior a redução da atividade vagal, assim como no estudo de Kunz (2007).⁽²⁵³⁾ Foi observado também redução da VFC em pacientes com angina estável em diversos trabalhos.⁽²⁵⁴⁻²⁵⁷⁾

Uma das variáveis de grande importância no domínio do tempo é a média dos intervalos RR, uma vez que é a partir da sua comparação com as flutuações nos batimentos cardíacos que os outros cálculos estatísticos são realizados. Dentre as variáveis estudadas nesse domínio, RR médio e SDNN demonstraram diferença estatisticamente significantes entre os grupos. Para essa análise da VFC utilizamos como controle os pacientes do estudo Task Force, 1996⁽¹²⁶⁾ (indivíduos sadios de 40 à 69 anos), foi possível observar que nos pacientes com DAC há redução da variabilidade

da frequência cardíaca tanto de seu componente simpático quanto parassimpático (pela redução expressiva de SDNN e TotalPower). Essa redução pode justificar a possibilidade de ocorrência de eventos futuros tais como arritmias, infarto, acidente vascular cerebral e óbito.^(258,259)

Quando comparamos os pacientes com DAC e SCA que possuem o genótipo polimórfico para PCSK9-rs11206510 versus genótipo selvagem, observou-se redução das variáveis PNN50, RMSSD e SD1 no grupo com genótipos de risco, indicando que pacientes que tem pelo menos um genótipo polimórfico sua VFC é pior. A queda na atividade parassimpática está representando nos valores baixos do PNN50 em pacientes com DAC e SCA com a presença de pelo menos um genótipo de risco, uma vez que o valor deste índice do domínio do tempo reflete no tônus vagal.⁽²⁶⁰⁾ A variável SDNN quando aumentada, tem sido associada à influência positiva do nervo vago e melhor atividade do parassimpático, conferindo em homeostase^(126,261,262) No entanto, em nosso estudo, houve diminuição de SDNN sugerindo piora na VFC, redução da atividade do sistema parassimpático e consequentemente menos entropia quando na presença do genótipo polimórfico *PCSK9 rs11206510*, nossos achados sugerem que há associação do gene com baixa VFC.

Godoy et al,⁽²⁶³⁾ reportando as alterações na modulação autonômica, observaram em pacientes com cardiopatia congênita redução nos índices SDNN e rMSSD (domínio do tempo), e redução nos índices HF e LF (domínio da frequência), ocasionando redução da VFC e maior probabilidade da ocorrência de eventos adversos. Outro estudo com pacientes IAM e dislipidemias também notou redução dos índices SDANN e SDNN, nos casos de IAM e apenas do SDANN nas dislipidemias (Rocha et al., 2005).⁽²⁶⁴⁾ Já em estudo realizado por Vanderlei et al⁽¹²²⁾ com pacientes com HAS

índices SDNN, rMSSD, pNN50, HF, LF, LF/ HF encontram-se reduzidos comparado a pacientes normotensos.

Em pacientes após infarto agudo do miocárdio a VFC baixa é considerada como um fator de risco, além de estar relacionada com maior gravidade e pior prognóstico.^(249,265,266) Os mecanismos pelos quais a VFC está momentaneamente diminuída após IAM ainda não estão claros, mas acredita-se que estejam relacionados ao aumento da atividade simpática e redução da atividade vagal para adaptações frente aos distúrbios da atividade neural de origem cardíaca.^(267,268)

Ressalta-se que a redução da VFC é um indicador de risco relacionado a eventos adversos em indivíduos normais e em pacientes com grande número de doenças, refletindo o papel que o SNA desempenha na manutenção da saúde.⁽¹²²⁾

Em relação ao perfil lipídico alterado e VFC, embora menor em valores absolutos o grupo com perfil dislipidêmico alterado, não foi possível identificar alterações significativas, fato este, sugere que a redução da VFC podem estar associadas com um pior perfil lipídico. Alguns estudos evidenciaram que um desequilíbrio no SNA está associado com alterações hormonais e metabólicas, uma vez que esse sistema exerce um papel fundamental no controle metabólico.^(269,270)

5. CONCLUSÕES

1. Após análise dos polimorfismos *APOB*-rs693, *APOB*-rs1042031, *PCSK9*-rs505151, *PCSK9*-rs11591147, *PCSK9*-rs11206510, *LDL*-rs688, *LDL*-rs6511720 concluiu-se que existe associação do polimorfismo (*LDL* rs688 e rs6511720).
2. Em pacientes com DAC há redução da variabilidade da frequência cardíaca tanto de seu componente simpático quanto parassimpático (pela redução expressiva de *SDNN*; *TotalPowerms2*; *LnTotalPowerms2*; *VLFPowerms2*).
3. O polimorfismo *PCSK9*-rs11206510 associa-se a redução da VFC, demonstrado pelo decréscimo nos valores de *PNN50*, *RMSSD* e *SD1*.
4. A análise da VFC e perfil lipídico sugere que a redução da VFC pode estar associada com um pior perfil lipídico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Williams J, Rayner M, Townsend N. The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. *Heart*. 2015 Aug 1;101(15):1182-9.
2. Rippe JM. Lifestyle Strategies for Risk Factor Reduction, Prevention, and Treatment of Cardiovascular Disease. *Am J Lifestyle Med*. 2018 Dec 2;13(2):204-212.
3. Silveira EL, Cunha LM, Pantoja MS, Lima AVM, Cunha ANA. Prevalence and distribution of cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease in northern Brazil. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2018;20(3):167-73.
4. Hojat M, Jahromi MK, Koshkaki SR, Rahmanian M. Comparison of risk factors of cardiovascular diseases in male and female nurses. *J Educ Health Promot*. 2019 Jan 29;8:19.
5. Organização Mundial da Saúde. OMS [homepage na Internet]. Brasília (DF); 2017 [acesso em 2018 Nov 12]. Disponível em <http://www.paho.org/bra>.
6. Ministério da Saúde. Datasus. Mortalidade geral. 2015; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.de>.
7. WHO, Cardiovascular diseases (CVDs) - [Em linha]. [S.l.]: World Health Organization, 2016, atual. 2016. [Consult. 26 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.
8. Bochi SC, Ribeiro ACG, Paes MR. Perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes com ansiedade em uma unidade de dor torácica. *Rev Enferm UFPE online*. 2014 Ago;8(8):2833-9.
9. Domiciano CB, Brasileiro FC, Lopes LC, Araújo LMF, Bringel RA. Dor torácica na sala de emergência – A importância de uma sistematização. *Rev saúde ciên UFCG*. 2010 Jan/July;1(1):15-20.
10. Carlucci EMS, Gouvêa JAG, Oliveira AP, Silva JD, Cassiano ACM, Bennemann RM. Obesidade e sedentarismo: fatores de risco para doença cardiovascular. *Com Ciências Saúde*. 2013 [cited 2015 Sept 18];24(4):375-384.

11. Loftus AKI. Mechanisms of Plaque Rupture. In: Fitridge R, Thompson M, editors. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011.
12. Luz PL, Matos JS, Chagas ACP. Endotélio e aterosclerose Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2013;23(4):10-17.
13. Loftus I. Mechanisms of Plaque Rupture. In: Fitridge R, Thompson M, editors. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 4.
14. Pollock ML; WILMORE JH; Exercícios na saúde e na doença: avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. 2. ed. Rio de Janeiro:Medsi, 1993.
15. RAMIRES JA; LAGE S; MACHADO LA.; PILEGGI F. Doença coronária e aterosclerose. São Paulo:Atheneu, 1996.
16. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq. Bras. Cardiol. vol.101 no.4 supl.1 São Paulo Oct. 2013
17. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al.. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. 2019 Jan 3. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.
18. CRID, 2014. Disponível em: <<http://crid.fmrp.usp.br/site/2014/11/04/a-aterosclerose/>> Acesso em 1 de julho de 2018.
19. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jan;25(1):29-38.
20. LIBBY P; RIDKER PM.; HANSSON GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature, 19; 473: 317-325, 2011.
21. Faludi AA, Izar MC, Saraiva JF, Chacra APM, Bianco HT, Neto AA, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. Arq Bras Cardiol. 2017;109(2 supl 1):1-76.

22. Dijk W, Le MC, Cariou B. Beyond LDL: What Role for PCSK9 in Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism? *Trends Endocrinol Metab.* 2018 Jun;29(6):420-434.
23. WHO – World Health Organization (2015). Cardiovascular diseases. [Em linha]. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> >
24. RUDENKO L; DEISENHOFER J. O receptor de lipoproteínas de baixa densidade: ligandos, debates de folclore. *Curr Opin Struct Biol*, v. 6, p. 683–9, 2003.
25. Smith LL. Another cholesterol hypothesis: cholesterol as antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1991;11:47-61.
26. Nelson, DL; Cox, MM. *Principles of Biochemistry*, 4.º ed. 2005; New York, W.H., Freeman and Company.
27. NELSON DL, COX M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*, Ed. Sarvier 3º Edição, pp 53-60, 1995.
28. Herman, GE. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation Syndromes. *Human Molecular Genetics*; 2003,12: 75 – 88.
29. Martinez, TLR. *Conduas clínicas nas dislipidemias*. Belo Horizonte: Health, 1997, 291p.
30. SBC SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* v. 77
31. GOEDEKE L; FERNANDEZ-HERNANDO C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, v. 69, n. 6, p. 915-30.
32. Waterham, H.R. Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*; 2006. 580: 5442 - 5449.
33. Zárata, ALM. Colesterol e aterosclerose. Considerações e tratamento histórico. *Arch. Cardiol. Mex.*, v. 86, n. 2, 2016.
34. Botham, KM. Síntese, transporte e excreção do colesterol. *Bioquímica Ilustrada de Harper*, Ed. Artmed, 30 edição, cap. 26, pag 266-276, 2017.

35. OLSO. Descoberta das lipoproteínas, seu papel no transporte de gordura e sua importância como fatores de risco. *J Nutr.*, v. 31, n. 2, p. 203–215, 1998
36. Moebius, FF, Fitzky, BU, Glossmann, H. (2000). Genetic Defects in Postsqualene Cholesterol Biosynthesis. *TEM*; 11: 106 - 114.
37. Prassl R, Laggner P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. *Eur Biophys J*, v. 38, n. 2, p. 145-58.
38. Yang Z, Hao D, Che Y, Zhang L, Zhang S.. Base estrutural e mecanismo funcional da lipoproteína no transporte de colesterol, colesterol bom, ruim e coração, Madan L. Nagpal, IntechOpen,2018.
39. Katzung B, Masters S, Trevor A. *BASIC and Clinical Pharmacology*. 12 edition ed. United States : [s.n.]. ISBN 978-0-07-176402-5.
40. Marais A, KIM J, WASSERMAN S, LAMBERT G. PCSK9 inhibition in LDL cholesterol reduction: genetics and therapeutic implications of very low plasma lipoprotein levels. *Pharmacology & therapeutics*. 145 (2015) 58–66.
41. Marques da Silva, P. Metabolismo lipídico e diagnóstico das dislipidemias primárias. *Fatores de Risco*. 2015) 10–25.
42. Cavaleiro LFF. PCSK9: novo alvo terapêutico no combate à aterosclerose?. 2016.
43. Burnett J. Coronary Artery Disease: Lipid Metabolism. In *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. Kaplan, L.A. and Pesce, A.J., Eds (2010), Mosby, Inc., Elsevier, pp. 691–728.
44. Bell D, Hooper A, Watts G, Burnett J. Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Vascular Health and Risk Management*. 8:1 (2012) 651–659.
45. Feingold KR, Grunfeld C. Introdução aos lipídios e lipoproteínas. [Atualizado em 2 de fevereiro de 2018]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., Editores. *Endotexto* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc .; 2000.
46. Melo JB, Campos RCA, Carvalho PC, Meireles MF, Andrade MVG, Rocha TPO, et al. Cardiovascular Risk Factors in Climacteric Women with Coronary Artery Disease. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2018;31(1)4-11.

47. Malta DC, Bernal RT, Andrade SSCA, Silva MMA, Velasquez-Melendez G. Prevalence of and factors associated with self-reported high blood pressure in Brazilian adults. *Rev Saude Publica*. 2017;51 Suppl 1:11s.
48. Pipicz M, Demján V, Sárközy M, Csont T. Effects of Cardiovascular Risk Factors on Cardiac STAT3. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 12;19(11).
49. Rocha ASC, Matiello ME, Cunha AB, Paris DS, Pittella FJM, Melhado JC, et al. Perfil clínico e angiográfico da doença arterial coronária em pacientes com idade inferior a 50 anos. *Editorial Laranjeiras*. 2002;1(1):1.
50. Smith SC, Jackson R, Pearson TA, Fuster V, Yusuf S, Faergeman O, et al. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the world heart and stroke forum. *Circulation*. 2004; 109: 3112-21.
51. Carvalho VCV; Silva LCA; Werkhauser RP; Montenegro ST; Silva CGR; Gomes AV; et al. Evaluation of *IL-6* (-174 H/C) polymorphism in acute coronary syndrome in the northeast of Brazil. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2016;29(4):288-294
52. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017 Sep 21;377(12):1119-1131.
53. Peter Libby. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: The Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Oct 31; 70(18): 2278–2289.
54. Penalva RA, Huoya MO, Correia LCL, Feitosa GS, Ladeia AMT. Perfil lipídico e intensidade de doença aterosclerótica na síndrome coronariana aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 90(1):24-30.
55. Cardoso APZ; Nogueira MS; Hayashida M; Souza L; Cesarino EJ. Aspectos clínicos e socioeconômicos das dislipidemias em portadores de doenças cardiovasculares. *Physis*,v.21, n.2, p. 417-436,2011.
56. Csige I, Ujvárosy D, Szabó Z, Lőrincz I, Paragh G, Harangi M,etal. The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *J Diabetes Res*. 2018 Nov 4;2018:3407306.

57. Ministério da Saúde. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. (Cadernos de Atenção Básica, n. 36).
58. Santos MG, Pegoraro M, Sandrini F, Macuco EC, Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. *Arq. Bras. Cardiol*, v.90, n.4, p. 301-308, 2008.
59. American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(suppl 1):S81–S90.
60. Organização Mundial da Saúde. OMS [homepage na Internet]. Brasília (DF); 2018 [acesso em 2018 Nov 12]. Disponível em <http://www.paho.org/bra>.
61. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 6. Brussels: International Diabetes Federation; 2013.
62. Centemero MP, Cherobin JC, Conti KVF, Ohe LN, Mallmann N, Abizaid A, et al. Coronary artery disease and diabetes: from drug therapy to revascularization procedures. *Rev. Bras. Cardiol. Invasiva* vol.17 no.3 São Paulo July/Sept. 2009.
63. Malachias MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al., 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107(3Supl.3):1-83.
64. Cesena FHY, Chagas ACP. A circulação coronária na hipertensão arterial sistêmica e na insuficiência cardíaca consequente. *Rev Bras Hipertens* 8: 431-39, 2001.
65. Alves A, Marques IR. Associated risk factors for Coronary Heart Disease among nursing students. *Rev Bras Enferm*, Brasília 2009 nov-dez; 62(6): 883-8.
66. Melo SESFC, Yugar-Toledo JC, Coca AP, Junior HM. Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. **Ver. Bras. Hipertens.** 14(4): p.234-238, 2007.
67. Li YH, Chen JW, Lin TH, Wang YC, Wu CC, Yeh HI, et al. A performance guide for major risk factors control in patients with atherosclerotic cardiovascular disease in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2019 May 18. pii: S0929-6646(19)30003-8.
68. Pires NF, Faria AP, Modolo R. Hypertension in patients with coronary artery disease – blood pressure goals. *Rev Bras Hipertens* vol. 23(1):8-15, 2016.

69. McEvoy JW, Blaha MJ, DeFilippis AP, Lima JA, Bluemke DA, Hundley WG, et al. Cigarette smoking and cardiovascular events: role of inflammation and subclinical atherosclerosis from the MultiEthnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Mar;35(3):700-9.
70. Jansen SCP, Hoorweg BBN, Hoeks SE, van den Houten MML, Scheltinga MRM, Teijink JAW, et al.. A systematic review and meta-analysis of the effects of supervised exercise therapy on modifiable cardiovascular risk factors in intermittent claudication. *J Vasc Surg.* 2019 Apr;69(4):1293-1308.
71. Giachini RM, Lima G, Thaís T, Consalter JK. Risk factors for coronary artery disease in general services auxiliary of the vale do itajaí university/sc. *Revista Contexto & Saúde, Ijuí • v. 10 • n. 20 • Jan./Jun. 2011.*
72. Malakar AK, Choudhury D, Halder B, Paul P, Uddin A, Chakraborty S. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J Cell Physiol.* 2019 Feb 20.
73. McEvoy JW, Blaha MJ, DeFilippis AP, Lima JA, Bluemke DA, Hundley WG, et al. Cigarette smoking and cardiovascular events: role of inflammation and subclinical atherosclerosis from the MultiEthnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Mar;35(3):700-9.
74. Roy A, Rawal I, Jabbour S, et al. Tobacco and Cardiovascular Disease: A Summary of Evidence. In: Prabhakaran D, Anand S, Gaziano TA, et al., editors. *Cardiovascular, Respiratory, and Related Disorders.* 3rd edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017 Nov 17. Chapter 4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525170/> doi: 10.1596/978-1-4648-0518-9/ch4.
75. Dguzeh U, Haddad NC, Smith KTS, Johnson JO, Doye AA, Gwathmey JK, et al. Alcoholism: A Multi-Systemic Cellular Insult to Organs. *Int J Environ Res Public Health.* 2018 May 28;15(6).
76. Pipicz M, Demján V, Sárközy M, Csont T. Effects of Cardiovascular Risk Factors on Cardiac STAT3. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 12;19(11).

77. Stipp MAC, Leite JL, Cunha NM, Assis LS, Andrade MP, Simões RD. The consumption of alcohol and the cardiovascular: diseases an analysis under the nursing view. *Esc Anna Nery Rev Enferm* 2007 dez; 11 (4):581-5.
78. Simplicio JA, Hipólito UV, Vale GT, Callera GE, Pereira CA, Touyz RM, et al. Acute Ethanol Intake Induces NAD(P)H Oxidase Activation and Rhoa Translocation in Resistance Arteries. *Arq Bras Cardiol.* 2016 Oct 27:0.
79. Alves A, Marques IR. Associated risk factors for Coronary Heart Disease among nursing students. *Rev Bras Enferm, Brasília* 2009 nov-dez; 62(6): 883-8
80. Saad EA. Prevenção Primária e Secundária da Aterosclerose: perspectivas atuais e futuras. *Revista da SOCERJ - Abr/Mai/Jun* 2004
81. Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Front Cardiovasc Med.* 2018 Sep 28;5:135.
82. Ashley EA, Niebauer J. *Cardiology Explained.* London: Remedica; 2004. Chapter 5, Coronary artery disease. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2216/>
83. Melo JB, Campos RCA, Carvalho PC, Meireles MF, Andrade MVG, Rocha TPO, et al. Cardiovascular Risk Factors in Climacteric Women with Coronary Artery Disease. *International Journal of Cardiovascular Sciences.* 2018;31(1)4-11.
84. Santos CS, Isidoro LCR, Cruz GECP. Risk factors for coronary artery disease in young people: integrative review of brazilian literature. *R. Enferm. Cent. O. Min.* 2012 mai/ago; 2(2):264-278.
85. Rodrigues A; Guerra M; Maciel MJ. Impact of stress and hostility in coronary heart disease. *Rev. SBPH vol.13 no.1 Rio de Janeiro jun.* 2010
86. Chen Y, Lin M, Liang Y, Zhang N, Rao S. Associação entre Polimorfismo da Apolipoproteína B XbaI e Doença Cardíaca Coronariana em Han População Chinesa: Uma Meta-Análise. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016 jun; 20 (6): 304-11.
87. Roberts R. Acute Coronary Syndromes Compendium. *Circulation Research.* 2014; 114: 1890-1903.

88. Veljkovic N, Zaric B, Djuric I, Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Radak D, et al. Genetic Markers for Coronary Artery Disease. *Medicina (Kaunas)*. 2018 May 28;54(3).
89. Wang Y, Wang JG. Genome-Wide Association Studies of Hypertension and Several Other Cardiovascular Diseases. *Pulse (Basel)*. 2019 Apr;6(3-4):169-186.
90. McCarthy M, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 9: 356-369
91. Esparragón FR, Companioni O, Bello MG, Ríos NB, Pérez JCR. Replication of relevant SNPs associated with cardiovascular disease susceptibility obtained from GWAs in a case-control study in a Canarian population. *Dis Markers*. 2012 Jan;32(4):231–9.
92. Diogo D, Kurreeman F, Stahl EA, Katherine P. Gupta LN, Jeffrey D, et al. Rare, Low-Frequency, and Common Variants in the Protein-Coding Sequence of Biological Candidate Genes from GWASs Contribute to Risk of Rheumatoid Arthritis. *The American Journal of Human Genetics* 92, 15–27, January 10, 2013.
93. Martinez PF, Okoshi MP. Genetic Risk in Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol*. 2018; 111(1):62-63 Pablo Corral. Back to Basics: PCSK9 as a New Target for the LDL Receptor. *Arq Bras Cardiol*. 2014; 102(1):e5-e8
94. Roberts R, Stewart AF. Genes and coronary artery disease: where are we? *J Am Coll Cardiol*. 2012 Oct 30;60(18):1715-21.
95. Brautbar A, Ballantyne CM, Lawson K, Nambi V, Chambless L, Folsom AR, et al. Impact of adding a single allele in the 9p21 locus to traditional risk factors on reclassification of coronary heart disease risk and implications for lipid-modifying therapy in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, v. 2, n. 3, p. 279– 285, 2009.
96. Buyschaert I, Carruthers KF, Dunbar DR, Peuteman G, Rietzschel E, Belmans A. A variant at chromosome 9p21 is associated with recurrent myocardial infarction and cardiac death after acute coronary syndrome: The GRACE Genetics Study. *European Heart Journal*, v. 31, p. 1132–1141, 2010.

97. Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *European Heart Journal*, v. 31, n. 8, p. 918-925, 2010.
98. ROBERTS R. Genetics of Coronary Artery Disease: An Update. *MDCVJ*, v. X, n. 1, 2014.
99. Atanasovska B, Kumar V, Fu J, Wijmenga, C, Hofker MH. GWAS as a Driver of Gene Discovery in Cardiometabolic Diseases. *Trends Endocrinol Metab*, 2015.
100. Hachem A, Hariri E, Saoud P, Lteif C, Lteif L, Welty F. The Role of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) in Cardiovascular Homeostasis: A Non-Systematic Literature Review. *Curr Cardiol Rev*. 2017;13(4):274-282.
101. Horton, JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular Biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Science*, 32(2):71-7, 2006.
102. Leitão RG. Estudo Bioquímico e Molecular de Famílias com Hipercolesterolemia Familiar. 212, 129f, Dissertação (mestrado em biologia humana e ambiente) Universidade de Lisboa, 2012.
103. Scartezini M, Hubbart C, Whittall RA, Cooper JA, Neil AH, Humphries SE. The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men. *Clinical Science, London*, v. 113, n. 11, p. 435-441, 2007.
104. Flauzino T, Alfieri DF, Kallaur AP, Regina E, Almeida D, Reiche EMV. Genetic polymorphisms associated with lipid metabolism involved in the pathophysiology of ischemic stroke. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 35, n. 2, p. 163-180, 2014
105. Tavori H, Rashid S, Fazio S. On the function and homeostasis of PCSK9: Reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. *Atherosclerosis*, v. 238, n. 2, p. 264–270, 1 fev. 2015.
106. Qiu C, Zeng P, Li X, Zhang Z, Pan B Peng ZY, et al. What is the impact of PCSK9 rs505151 and rs11591147 polymorphisms on serum lipids level and cardiovascular risk: a meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2017 Jun 12;16(1):111.

107. Akram O, Bernier A, Petrides F, Wong G, Lambert G. Beyond LDL cholesterol, a new role for pcsk9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 30:7 (2010) 1279–1281.
108. Bell D, Hooper A, Watts G, Burnett J. Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Vascular Health and Risk Management*. 8:1 (2012) 651–659.
109. Giugliano R, Sabatine M. Are PCSK9 Inhibitors the Next Breakthrough in the Cardiovascular Field? *Journal of the American College of Cardiology*. 65:24 (2015) 2638–2651.
110. Thierry J, Burkhardt R. PCSK9 - "missing link" in familial hypercholesterolemia: New therapeutic options in hypercholesterolemia and coronary artery disease. *Herz*. 2016 Jun;41(4):281-9.
111. Nicoletti CF, Azevedo RG, Pinhel MAS, Delfino HBP, Nonino CB. INSIG2 gene polymorphism is associated with higher blood pressure and triglyceride levels in Brazilian obese subjects. *Nutr Hosp*. 2019 Jul 1;36(3):604-610.
112. Devaraj S, Jialal I. Biochemistry, Apolipoprotein B. [Updated 2019 Feb 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019
113. Farrokhi E, Shayesteh F, Asadi Mobarakeh S, Roghani Dehkordi F, Ghatreh Samani K, Hashemzadeh Chaleshtori M. Molecular characterization of Iranian patients with possible familial hypercholesterolemia. *Indian J Clin Biochem*. 2011 Jul;26(3):244-8.
114. Whitfield AJ, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem*. 2004 Oct;50(10):1725-32.
115. Niu C, Luo Z, Yu L, Yang Y, Chen Y, Luo X, et al .Associations of the APOB rs693 and rs17240441 polymorphisms with plasma APOB and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2017 Sep 6;16(1):166.
116. Hachem A, Hariri E, Saoud P, Lteif C, Lteif L, Welty F. The Role of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) in

- Cardiovascular Homeostasis: A Non-Systematic Literature Review. *Curr Cardiol Rev.* 2017;13(4):274-282.
117. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C. Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 5;19.
118. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolaemia. *Cardiovasc Med* 2007;4(4):214-225.
119. Paththinige CS, Rajapakse JRDK, Constantine GR, Sem KP, Singaraja RR, Jayasekara RW, et al. Spectrum of low-density lipoprotein receptor (LDLR) mutations in a cohort of Sri Lankan patients with familial hypercholesterolemia - a preliminary report. *Lipids Health Dis.* 2018 May 2;17(1):100.
120. Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS. Familial hypercholesterolaemia. In: *The metabolic basis of inherited diseases.* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) McGraw-Hill: New York; 1995; 7th ed, Vol II, p.1981-2021.
121. Paschoal, MA, Volanti VM, Pires CS, Fernandes FC. Variabilidade da frequência cardíaca em diferentes faixas etárias. *Rev Bras Fisioter* 2006; 10:413-19.
122. Vanderlei, LCM; Pastre, CM; Hoshi, RA; Carvalho, TD; Godoy, MF. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009; 24(2):205-17.
123. Acharya UR, Kannathal N, Krishnan SM. Comprehensive analysis of cardiac health using heart rate signals. *Physiol. Meas.* 25 (2004) 1139-51.
124. Malliani A. *Principles of Cardiovascular Neural Regulation in Health and Disease.* Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers, 2000.
125. Lopes, Sônia. *Bio 2.* São Paulo, Ed. Saraiva, 2002.
126. Task Force of ESC and NASPE. Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use. *Circulation* 1996;93:1043-65.

127. de Castilho FM, Ribeiro ALP, Nobre V, Barros G, de Sousa MR. Heart rate variability as predictor of mortality in sepsis: A systematic review. *PLoS One*. 2018 Sep 11;13(9):e0203487.
128. Silva MGF, Gregório ML, de Godoy MF. Does heart rate variability improve prediction of failed extubation in preterm infants? . *J Perinat Med*. 2019 Feb 25;47(2):252-257.
129. Xhyheri B, Manfrini O, Mazzolini M, Pizzi C, Bugiaardini R. Heart rate variability today. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012;55:321-331.
130. Stys A, Stys T. Current Clinical Applications of Heart Rate Variability. *Clin Cardiol* 1998;21:719–24.
131. Grupi CJ, Moffa PJ, Sanches PCR, Barbosa AS, Belloti GMV, Pilleggi FJC. Variabilidade da frequência cardíaca: significado e aplicação clínica. *Rev Ass Med Bras* 1994;40(2):129-36.
132. Godoy MF. Teoria do caos aplicada à medicina [tese Livre Docência]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2003.
133. Corrêa, PR. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do caos como preditora de infecções pulmonares em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para a obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas. São Paulo – São José do Rio Preto, 2006.
134. Radespiel-Tröger M, Rauh R, Mahlke C, Gottschalk T, Muck-Weymann M. Agreement of two different methods for measurement of heart rate variability. *Clin Auton Res*.2003;13(2):99-102.
135. Mchugh GJ, Sleight WJ, Bo H, Henderson JD. Heart rate variability following cardiac surgery fail to predict short-term cardiovascular. *Anaesth Inters Care* 1997;25:621-26.
136. Majercak I. The use of heart rate variability in cardiology. *Bratisl Lek Listy* 2002;103(10): 368-77.
137. Shirane DC, Maiolini FP, Moreira D. Variabilidade da Frequência Cardíaca em Universitários Saudáveis Após Ingesta de Bebida Energética

- / Heart Rate Variability in Healthy College Students After Energy Drink Intake. *Revista Ciências em Saúde* 2016.
138. Ferrari F, Stein R, Motta MT, Moriguchi EH. PCSK9 Inhibitors: Clinical Relevance, Molecular Mechanisms, and Safety in Clinical Practice. *Arq Bras Cardiol.* 2019; 112(4):453-460
139. Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, Ahmad ZS, Ahmed CD, Ballantyne CM, et al. Clinical genetic testing for familial hypercholesterolemia: JACC scientific expert panel. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(6):662–80
140. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 2009;42(10): 870-76.
141. Porto LGG, Junqueira LF. Comparison of Time-Domain Short-Term Heart Interval Variability Analysis Using a Wrist-Worn Heart Rate Monitor and the Conventional Electrocardiogram. *J Compilation.* 2009; 32: 43-51.
142. Marães VRFS. Frequência cardíaca e sua variabilidade: análises e aplicações. *Rev Andal Med Deporte.* 2010; 3(1): 33-42.
143. Godoy MF, Takakura IT, Correa PR. Relevância da análise do comportamento dinâmico não linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. *Arq Ciênc Saud.* 2005; 12(4): 167-171.
144. Niskanen JP, Tarvainen MP, Ranta-Aho PO, Karjalainen PA. Software for advanced HRV analysis. *Comput Methods Programs Biomed* 2004;76(1):73-81.
145. Pumprla J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *Int J Cardiol* 2002;84(1):1-14.
146. Bittencourt MI, Barbosa PRB, Drumond Neto C, Bedirian R, Barbosa EC, Brasil F, et al. Avaliação da função autonômica na cardiomiopatia hipertrófica. *Arq Bras Cardiol* 2005;85(6):388-96.
147. Rassi Jr. A. Compreendendo melhor as medidas de análise da variabilidade da frequência cardíaca. 2000.

148. Aubert AE, Seps B, Beckers F. Heart rate variability in athletes. *Sports Med* 2003;33(12):889-919.
149. Rajendra Achatya U, Paul JK, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. *Med Bio Eng Comput* 2006;44(12):1031-51.
150. Brunetto AF, Roseguini BT, Silva BM, Hirai DM, Guedes DP. Limiar ventilatório e variabilidade de frequência cardíaca em adolescentes. *Rev Bras Med Esporte* 2005;11(1):22-7.
151. Smith AL, Reynolds KJ, Owen H. Correlated Poicaré indices for measuring heart rate variability. *Australas Phys Eng Sci Med* 2007;30(4):336-41.
152. De Vito G, Galloway SD, Nimmo MA, Maas P, McMurray JJ. Effects of central sympathetic inhibition on heart rate variability during steady-state exercise in healthy humans. *Clin Physiol Funct Imaging* 2002;22(1):32-8.
153. Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L. Validity of the polar S810 heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38(5):887-93.
154. Tulppo MP, Mäkikallio TH, Seppänen T, Laukkanen RT, Huikuri HV. Vagal modulation of heart rate during exercise: effects of age and physical fitness. *Am J Physiol* 1998;274(2 Pt 2):424-9.
155. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.95 no.1 supl.1 São Paulo 2010
156. Adriane Cervi, Sylvia do Carmo Castro Franceschini, Sílvia Eloiza Priore. Critical analysis of the use of the body mass index for the elderly. *Rev. Nutr.* vol.18 no.6 Campinas Nov./Dec. 2005
157. Sifri S, Shammeri O, Jaser S, Alkhenizan A, Bin Shafi Shafiurrehman A, Morcos B, et al. Prevalence of lipid abnormalities and cholesterol target value attainment in patients with stable coronary heart disease or an acute coronary syndrome in Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2018 Jul;39(7):697-704.
158. Silveira EL, Cunha LM, Pantoja MS, Lima AVM, Cunha ANA. Prevalence and distribution of cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease in northern Brazil. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba.* 2018;20(3):167-73.

159. Soeiro AM, Barros PGM, Silva EACR, Bossa AS, Biselli B, Leal TCAT, et al. Prognostic Differences between Men and Women with Acute Coronary Syndrome. Data from a Brazilian Registry. *Arq Bras Cardiol.* 2018; 111(5):648-653.
160. Gus I, Ribeiro RA, Kato S, Bastos J, Medina C, Zazlavsky C, et al. Variations in the Prevalence of Risk Factors for Coronary Artery Disease in Rio Grande do Sul-Brazil: A Comparative Analysis between 2002 and 2014. *Arq Bras Cardiol.* 2015; 105(6):573-579.
161. Junior MTO, Canesin MF, Marcolino MS, Ribeiro AL, Carvalho AC, Reddy S, et al. Diretriz de Telecardiologia no Cuidado de Pacientes com Síndrome Coronariana Aguda e Outras Doenças Cardíacas. *Arq Bras Cardiol.* 2015 Jun;104(5 Suppl 1):1-26.
162. Claassen M, Sybrandy KC, Appelman YE, Asselbergs FW. Gender gap in acute coronary heart disease: Myth or reality? *World J Cardiol.* 2012 Feb 26;4(2):36-47.
163. Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger A, Kannel WB. Sex and time trends in cardiovascular disease incidence and mortality: the Framingham Heart Study, 1950-1989. *Am J Epidemiol.* 1996 Feb 15;143(4):338-50.
164. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52.
165. Jensen-Urstad M, Viigimaa H, Sammuli S, Lenhoff H, Johansson J. Impact of smoking: all-cause and cardiovascular mortality in a cohort of 55-year-old Swedes and Estonians. *Scand J Public Health.* 2014 Dec;42(8):780-5.
166. Kamceva G, Vavlukis M, Kitanoski D, Kedev S. Newly Diagnosed Diabetes and Stress Glycaemia and Its' Association with Acute Coronary Syndrome. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015 Dec 15; 3(4): 607–612.
167. Robertson JO, Ebrahimi R, Lansky AJ, Mehran R, Stone GW, Lincoff AM. Impact of cigarette smoking on extent of coronary artery disease and prognosis of patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes:

- an analysis from the ACUITY Trial (Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy). *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Apr;7(4):372-9.
168. Goligorsky MS, Noiri E, Tsukahara H, Budzikowski AS, Li H. A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction. *Acta Physiol Scand.* 2000 Jan;168(1):33-40.
169. Neunteufl T, Heher S, Stefenelli T, Pabinger I, Gisslinger H. Endothelial dysfunction in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 2001 Nov;115(2):354-9.
170. Sabha M, Tanus-Santos JE, Toledo JC, Cittadino M, Rocha JC, Moreno H Jr. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Aug;68(2):167-74.
171. Harisharan, Singh AK, Dangal NR, Surapaneni KM, Joshi A. Multiple Risk Factors of Alcoholic and Non-Alcoholic Myocardial Infarction Patients. *Glob J Health Sci.* 2016 May 17;8(1):62-71.
172. Morilha A, Karagulian S, Lotufo PA, Santos IS, Benseñor IM, Goulart AC. Post-Acute Coronary Syndrome Alcohol Abuse: Prospective Evaluation in the ERICO Study. *Arq Bras Cardiol.* 2015 Jun;104(6):457-67.
173. Montazerifar F, Bolouri A, Paghalea RS, Mahani MK, Karajibani M. Obesity, Serum Resistin and Leptin Levels Linked to Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol.* 2016 Oct;107(4):348-353.
174. Piegas LS, Avezum A, Guimarães HP, Muniz AJ, Reis HJ, Santos ES, Knobel M, Souza Rd. Acute coronary syndrome behavior: results of a Brazilian registry. *Arq Bras Cardiol.* 2013 Jun;100(6):502-10
175. Gao XJ, Yang JG, Yang YJ, Li W, Xu HY, Wu Y, et al. Age-related coronary risk factors in Chinese patients with acute myocardial infarction. *Chinese Medical Journal,* 2016 Nov 1;96(40):3251-3256.
176. Reis AF, Salis LHA, Macrini JLR, Dias AMC, Chilinque MGL, Saud CGM, et al. Síndrome Coronariana aguda: morbimortalidade e prática clínica em pacientes do município de Niterói (RJ). *Rev. Socerj.* 2007; 20(5):360-71.
177. Silva MAD, Sousa AGMR, Schargodsky H. Fatores de Risco para Infarto do Miocárdio no Brasil Estudo FRICAS. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.71 n.5 São Paulo Nov. 1998

178. Malta DC, Silva Jr JB. Brazilian strategic action plan to combat chronic non-communicable diseases and the global targets set to confront these diseases by 2025: a review. *Rev Epidemiol Serv Saúde*. 2013;22(1):151-64.
179. Wolf RM, Steele KE, Peterson LA, Magnuson TH, Schweitzer MA, Wong GW. Lower Circulating C1q/TNF-Related Protein-3 (CTRP3) Levels Are Associated with Obesity: A Cross-Sectional Study. *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7)
180. Reis AFN, Cesarino CB. Fatores de risco e complicações em usuários cadastrados no hiperdia de são josé do rio preto. *Cienc Cuid Saude* 2014 Jan/Mar; 15(1):118-124.
181. Pinheiro MG, Rabelo Jr A, Jesus RS, Nascimento LC, Costa UMM. Síndromes coronarianas agudas na ausência de doença arterial coronariana significativa. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84(1):24-8.
182. Cosentino MB, Coutinho MSSA, Nedel FB, Luciano KS. Fatores de risco para síndrome coronariana aguda em Tubarão, SC – estudo caso controle. *Arq Catarin Med*. 2007; 36(2):41-9
183. Feijó MKEF; Lutkmeier R, Ávila CW, Rabelo ER. Fatores de risco para doença arterial coronariana em pacientes admitidos em unidade de hemodinâmica. *Rev Gaúcha Enferm.*, Porto Alegre (RS) 2009 dez;30(4):641-7.
184. Gus I, Fischmann A, Medina C. Prevalência dos fatores de risco da doença arterial coronariana no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 78(5):478-83.
185. Saad EA. Prevenção Primária e Secundária da Aterosclerose: perspectivas atuais e futuras. *Revista da SOCERJ - Abr/Mai/Jun 2004*
186. Santos ES, Minuzzo L, Pereira MP, Castillo MTC, Palácio MAG, Ramos RF, et al. Registro de síndrome coronariana aguda em um centro de emergências em cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 87(5):597-602
187. Jorge JG, Santos MA, Barreto Filho JA, Oliveira JL, de Melo EV, de Oliveira NA, Faro GB, Sousa AC. Level of Physical Activity and In-Hospital Course of Patients with Acute Coronary Syndrome. *Arq Bras Cardiol*. 2016 Jan; 106(1):33-40.

188. Gus I, Ribeiro RA, Kato S, Bastos J, Medina C, Zazlavsky C, et al. Variations in the Prevalence of Risk Factors for Coronary Artery Disease in Rio Grande do Sul-Brazil: A Comparative Analysis between 2002 and 2014. *Arq Bras Cardiol.* 2015 Dec;105(6):573-9.
189. Wirtwein M, Melander O, Sjögren M, Hoffmann M, Narkiewicz K, Gruchala M, et al. Relationship between selected DNA polymorphisms and coronary artery disease complications. *Int J Cardiol.* 2016 Nov 9;228:814-820.
190. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, et al. GBD 2013 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;386(10010):2287-323.
191. Fujimaki T, Oguri M, Horibe H, Kato K, Matsuoka R, Abe S, et al. Association of a transcription factor 21 gene polymorphism with hypertension. *Biomed Rep.* 2015 Jan;3(1):118-122.
192. Meng X, Yang J, Dong M, Zhang K, Tu E, Gao Q, et al. Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Mar;13(3):167-79.
193. Wang J, Samuels DC, Shyr Y, Guo Y. StrandScript: evaluation of Illumina genotyping array design and strand correction. *Bioinformatics.* 2017 Aug 1;33(15):2399-2401.
194. Guo Y, He J, Zhao S, Wu H, Zhong X, Sheng Q, et al. Illumina human exome genotyping array clustering and quality control. *Nat Protoc.* 2014 Nov;9(11):2643-62. doi: 10.1038/nprot.2014.174. Epub 2014 Oct 16.
195. Zhao S, Jing W, Samuels DC, Sheng Q, Shyr Y, Guo Y. Strategies for processing and quality control of Illumina genotyping arrays. *Brief Bioinform.* 2018 Sep 28;19(5):765-775.
196. Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S, et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat. Genet., v.39, p.645-649.* 2007.

197. WTCCC - The Wellcome Trust Case Control Consortium: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, v. 447, p.661-678, 2007.
198. Yan-Yan Li. ApoB gene SpIns/Del, XbaI polymorphisms and myocardial infarction: a meta-analysis of 7169 participants. *Medicine* Published in *Journal of cardiovascular*, 2014.
199. Zhang JZ, Zheng YY, Yang YN, Li XM, Fu ZY, Dai CF, et al. Association between apolipoprotein B gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease (CHD): an update meta-analysis. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2015;16:827–837.
200. Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Inrona M, Tognoni G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2003; 167: 355 – 66.
201. Baroni MG, Berni A, Romeo S, Arca M, Tesorio T, Sorropago G, et al. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Med Genet.* 2003 Sep 10;4:8.
202. Xu YF, Shi JD, Chen JD, Liu L. The apolipoprotein B gene polymorphisms in myocardial infarction patients. *Chin J Arterioscler* 1999; 7:37–39.
203. Zang B, Li HN, Guo JJ, Wu KG. The relation between polymorphisms of apolipoprotein B gene and myocardial infarction. *Chin J Pract Intern Med* 2001; 21:723–724
204. Hegele RA, Huang LS, Herbert PN, Blum CB, Buring JE, Hennekens CH, et al. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *New Engl J Med* 1986; 315: 1509 – 15
205. Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Gerdes LU, Humphries SE. Variation of apolipoprotein B gene is associated with myocardial infarction and lipoprotein levels in Danes. *Atherosclerosis* 1991; 89:69–81.

206. Duman BS, Turkoglu C, Akpinar B, Guden M, Vertii A, Cagatay P, et al. Genetic variations of the apolipoprotein B gene in Turkish patients with coronary artery disease. *Ann Hum Biol.* 2005;32(5):620–629.
207. Nikolajevic Starcevic J, Santl Letonja M, Praznikar ZJ, Makuc J, Vujkovic AC, Petrovic D. Polymorphisms XbaI (rs693) and EcoRI (rs1042031) of the ApoB gene are associated with carotid plaques but not with carotid intima-media thickness in patients with diabetes mellitus type 2. *Vasa.* 2014 May;43(3):171-80.
208. Pencina MJ, D'Agostino RB, Zdrojewski T, Williams K, Thanassoulis G, Furberg CD, et al. Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C. *Eur J Prev Cardiol.* 2015 Oct;22(10):1321-7.
209. Forti N, Salazar LA, Diament J, Giannini SD, Hirata MH, Hirata RDC. Alterações genéticas e colesterolemia: Recentes estudos brasileiros. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.80 no.5 São Paulo May 2003
210. Chiang SM, Yang YS, Yang SF, Tsai CF, Ueng KC. Variations of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene in coronary artery disease. *J Int Med Res.* 2019 Apr 5:300060519839519.
211. Alves ACS. Base Genética da Hipercolesterolemia Familiar. 2014. 241f. Tese (doutorado em bioquímica), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.
212. Adi D, Xie X, Liu F, Ma Y, Abudoukelimu M, Wu Y, et al. Relationships between genetic polymorphisms of E670G in PCSK9 gene and coronary artery disease: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(8): 13251–13258
213. Cai G, Zhang B, Shi G, Weng W, Ma C, Song Y, et al. The associations between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 E670G polymorphism and the risk of coronary artery disease and serum lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2015 Nov 17;14:149.
214. Zhang Y, Eigenbrot C, Zhou L, Shia S, Li W, Quan C, et al. Identification of a small peptide that inhibits PCSK9 protein binding to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 2014 Jan 10;289(2):942-55.

215. Chasman DI, Paré G, Zee RY, Parker AN, Cook NR, Buring JE, et al. Genetic loci associated with plasma concentration of low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, Apolipoprotein A1, and Apolipoprotein B among 6382 white women in genome-wide analysis with replication, clinical perspective. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008;1(1):21–30.
216. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet*. 2009;41(1):56–65.
217. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466(7307):707–713.
218. Lettre G, Palmer CD, Young T, Ejebe KG, Allayee H, Benjamin EJ, et al. Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE project. *PLoS Genet*. 2011;7(2):e1001300.
219. Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, et al. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet*. 2008;82(1):139–149.
220. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1240–1249.
221. Park MH, Kim N, Lee JY, Park HY. Genetic loci associated with lipid concentrations and cardiovascular risk factors in the Korean population. *J Med Genet*. 2011;48(1):10–15.
222. Paththinige CS, Sirisena ND, Dissanayake V. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia - a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis*. 2017 Jun 2;16(1):103.
223. Aguilar PO, Frías JR. Aplicación de la genética de poblaciones en el ámbito de la medicina. *Biomédica* 2014;34:171-9.

224. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998;44:1748-50.
225. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;76:967-86.
226. Klettner A, Kaya L, Flach J, Lassen J, Treumer F, Roeder J. Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growthfactor in the RPE/choroid and primary RPE. *Mol Vis* 2015;21:736-48.
227. Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):477-85.
228. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune A Neto, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017. *Arq Bras Cardiol.* Julho de 2017 ; 109 (2 Supl 1): 1-76.
229. Azevedo PM, Merriman TR, Topless RK, Wilson NJ, Crengle S, Lennon DR. Estudo de associação envolvendo polimorfismos nos genes IL-6, IL-1RA e CTLA4 e doença cardíaca reumática na população neozelandesa de ancestrais maori e pacíficos. *Citocina.* 2016 setembro; 85: 201-6.
230. Sachdeva A, Cannon CP, Deedwania PC, Labresh KA, Smith SC Jr, Dai D, Hernandez A, Fonarow GC. Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: an analysis of 136,905 hospitalizations in Get With The Guidelines. *Am Heart J.* 2009 Jan;157(1):111-117.e2.
231. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhala N, et al; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170?000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010;376(9753):1670-81.
232. Magalhães MEC. New Cholesterol Targets of SBC Guidelines on Dyslipidemia. *International Journal of Cardiovascular Sciences.* 2017;30(6)466-468
233. Wannmacher L, Costa AF. Estatinas: uso racional na cardiopatia isquêmica. ISSN 1810-0791 Vol. 1, Nº10 Brasília, Setembro de 2004

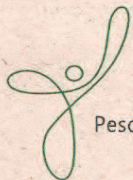
234. Sposito AR, Filho GBA, Aarão AR, de Sousa FTT; Bertolami MC. Estatinas nas síndromes coronarianas agudas. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.97 no.4 São Paulo Oct. 2011.
235. Weng TC, Yang YH, Lin SJ, Tai SH. A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *J Clin Pharm Ther.* 2010 Apr;35(2):139-51.
236. Beck DGS, Barasuol TX. Effects of Statins on Endothelial Dysfunction in the Prevention of Cardiovascular Diseases. *Rev. Sau. Int.* 2015;8:15-16.
237. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol.* 1998 Mar 1;81(5):582-7.
238. März W, Wollschläger H, Klein G, Neiss A, Wehling M. Safety of low-density lipoprotein cholesterol reduction with atorvastatin versus simvastatin in a coronary heart disease population (the TARGET TANGIBLE trial). *Am J Cardiol.* 1999 Jul 1;84(1):7-13.
239. Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJ, Olsson AG, Tikkanen MJ, Holme I, et al. High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005 Nov 16;294(19):2437-45.
240. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J* 2011; 32: 1769-818.
241. Platelet-Receptor Inhibition for Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms - PRISM-PLUS,2002
242. Spencer FA, Fonarow GC, Frederick PD, Wright RS, Every N, Goldberg RJ, et al. Early withdrawal of statin therapy in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction: national registry of myocardial infarction. *Arch Intern Med.* 2004;164(19):2162-8.
243. Fonarow GC, Wright RS, Spencer FA, Fredrick PD, Dong W, Every N, et al. Effect of statin use within the first 24 hours of admission for acute

- myocardial infarction on early morbidity and mortality. *Am J Cardiol.* 2005;96(5):611-6.
244. Den Hartog FR, Van Kalmthout PM, Van Loenhout TT, Schaafsma HJ, Rila H, Verheugt FW. Pravastatin in acute ischaemic syndromes: results of a randomised placebo-controlled trial. *Int J Clin Pract.* 2001;55(5):300-4.
245. Kesteloot H, Claeys G, Blanckaert N, Lesaffre E. Time course of serum lipids and apolipoproteins after acute myocardial infarction: modification by pravastatin. *Acta Cardiol.* 1997;52(2):107-16.
246. de Lemos JA, Blazing MA, Wiviott SD, Lewis EF, Fox KA, White HD, et al. Early intensive vs a delayed conservative simvastatin strategy in patients with acute coronary syndromes: phase Z of the A to Z trial. *JAMA.* 2004;292(11):1307-16.
247. Oliveira, TV. Effects of the rich diet in cholesterol and saturated fat in metabolism of the high-density lipoprotein (HDL) in hamsters. São Paulo [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 84p.
248. Paschoal MA, Petrelluzzi KFS, GONÇALVES NVL. Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. - *Rev. ciências médicas*, v. 11, p. 27-37, 2002.
249. Kunz VC, Souza RB, Takahashi ACM, Catai AM, Silva E. The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease. *Rev Bras Fisioter*, São Carlos, v. 15, n. 6, p. 503-10, Nov./Dec. 2011
250. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JTJr, Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1987; 59: 256-262.
251. Wolf M, Varigos G, Hunt D. Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction. *Med J Aust.* 1978; 2: 52.
252. Hayano J, Sakakibara Y, Yamada M, Ohte N, Fujinami T, Yokoyama K et al. Decreased magnitude of heart rate spectral components in coronary artery disease. *Circulation.* 1990;81:1217-224.

253. Kunz VC. Estudo da Variabilidade da Frequência Cardíaca em voluntários com Infarto Agudo do Miocárdio e Saudáveis Sedentários em repouso. Dissertação (Programa de pós-graduação) - Universidade Metodista de Piracicaba, 2007
254. van Ravenswaaij-Arts CM, Kollée LA, Hopman JC, Stoeltinga GB, van Geijn HP. Heart rate variability. *Ann Intern Med.* 1993 Mar 15;118(6):436-47.
255. Martin GJ, Magid NM, Myers G, Barnett PS, Schaad JW, Weiss JS, et al. Heart rate variability and sudden death secondary to coronary artery disease during ambulatory electrocardiographic monitoring. *Am J Cardiol.* 1987 Jul 1;60(1):86-9.
256. H V Huikuri, M J Niemelä, S Ojala, A Rantala, M J Ikäheimo, K E Airaksinen. Circadian rhythms of frequency domain measures of heart rate variability in healthy subjects and patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1994;90:121-26
257. Huikuri VH. Heart rate variability in coronary artery disease. *J Int Med.* 1995;237:349-57.
258. Fiogbé E; Ferreira R, Sindor MAG, Lopes CR. Moreno MA. Cardiac autonomic function and level of physical activity in patients with coronary artery disease. *Rev Bras Ativ Fis e Saúde • Pelotas/RS • 19(5):579-580.*
259. Reis MS, Moreno MA, Sakabe DI, Catai AM; Silva E. Análise da modulação autonômica da frequência cardíaca em homens sedentários jovens e de meia idade. *Rev. Fisioterapia em Movimento*, v. 18, n. 2, p. 11-18, 2005.
260. Romão Júnior, J.E. Doença renal crônica: Definição, epidemiologia e classificação. *J bras nefrol.*, v. 26, n. 3, suppl. 1, 2004. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/JBN/26-31/v26e3s1p001.pdf>.
261. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 2006 Feb 14;113(6):898-918

262. Bobbioni-Harsch E, Sztajzel J, Barthassat V, Makoundou V, Gastaldi G, Sievert K, et al. (2009) Independent evolution of heart autonomic function and insulin sensitivity during weight loss. *Obesity* 17 (2):247-253.
263. Godoy MF, Marques GN, Maeda J, Madalozzo BB, Carral LHM, Lorente GD, Sanches KB, Pastre CM, Vanderlei LCM. Gravidade da cardiopatia congênita e nível de redução da variabilidade da frequência cardíaca. *Arq Bras Ciênc Saúde* 2012;37(1):19-22.
264. Rocha RM, Albuquerque DC, Albanesi Filho FM. Variabilidade da frequência cardíaca e ritmo circadiano em pacientes com angina estável. *Rev Socerj* 2005;18(4):429-42.
265. Farrell TG, Bashir Y, Cripps T, Malik M, Poloniecki J, Bennett ED, et al. Risk stratification for arrhythmic events in postinfarction patients based on heart rate variability, ambulatory electrocardiographic variables and the signal-averaged electrocardiogram. *Am. Journal of Cardiology*, v.18, p. 687-97, 1991
266. Nolte IM, Munoz ML, Tragante V, Amare AT, Jansen R, Vaez A, et al. Genetic loci associated with heart rate variability and their effects on cardiac disease risk. *Nat Commun.* 2017 Jun 14;8:15805.
267. Grupi CJ, Moraes R. Variabilidade da Frequência Cardíaca: Conceito e Utilidade Eletrocardiograma Normal e Patológico. 7ª edição. São Paulo:Clínica. In: Rocca, 2001.
268. Nolan J, Batin PD, Andrews R, Lindsay SJ, Brooksby P, Mullen M, et al. Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure: results of the United Kingdom Heart Failure Evaluation and Assessment of Risk Trial (UK-Heart). *Circulation.* 1998; 98: 1510-6.
269. Rinaldi W, Ribeiro TAS, Marques AS, Fabricio GS, Tofolo LP, Gomes RM, et al. Effect of small litter size on the autonomic and metabolic responses of Wistar rats. *Rev. Nutr.* 2012;25(3):321-30.
270. Gonzaga, L. A., Paulo, T., Viesel, J., Vanzella, L. M., Freitas, I. F., Jr, & Vanderlei, L. (2019). Changes in Cardiac Autonomic Modulation in Women with Breast Cancer Using Aromatase Inhibitors and the Relation with Biochemical Variables. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 112(5), 555–563.

7. Anexos



Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos
CEP/FAMERP

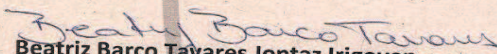
Parecer nº 1.504.516

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa **CAAE 53436316.7.0000.5415** sob a responsabilidade de **Dorotéia Rossi Silva Souza** com o título "Variantes Genéticas e Variabilidade da Frequência Cardíaca em Pacientes com Antecedente de Síndrome Coronariana Aguda" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi **aprovado por esse CEP.**

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos e também da notificação da data de inclusão do primeiro participante de pesquisa, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 20 de abril de 2016.


Beatriz Barco Tavares Jontaz Irigoyen
Secretária Geral do CEP/FAMERP

17 3201 5813
cepfamerp@famerp.br
Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 | Vila São Pedro
15090-000 | São José do Rio Preto SP
www.famerp.br/cep

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Variantes Genéticas e Variabilidade da Frequência Cardíaca em Pacientes com Antecedente de Síndrome Coronariana Aguda

Instituição: Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto

Setor: Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular (NPBIM) – FAMERP e Centro Integrado de Pesquisa – CIP (FUNFARME/FAMERP)

Investigador Responsável: Moacir Fernandes de Godoy

Você está sendo convidado para participar de um estudo. Antes de decidir se deseja participar, é importante que você entenda porque o estudo está sendo feito, como as suas informações serão utilizadas e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. **Por favor, leia as informações a seguir com cuidado e sem pressa e discuta-as com o médico responsável ou com a equipe do estudo se você tiver qualquer dúvida.**

Qual é a finalidade deste Estudo?

Você foi convidado para participar deste estudo porque já sofreu um infarto ou angina instável quando possuía menos de 55 (homens) ou menos de 65 anos (mulheres) caso seja convidado para compor o grupo de estudo ou porque você tem dislipidemia (níveis alterados de colesterol) caso ainda não tenha sofrido ataque cardíaco. Esta pesquisa pretende caracterizar o perfil genético (análise de até 5 milhões de SNPs), bioquímico e antropométrico, além de VFC, antecedentes pessoais, qualidade e hábitos de vida de pacientes com estes antecedentes. Assim, espera-se compreender as vias moleculares envolvidas com doenças metabólicas auxiliará na busca de respostas para melhor tratamento, prevenção e diagnóstico precoce dessas doenças e ainda, identificar possíveis marcadores genéticos associados.

Eu tenho que participar?

Cabe a você decidir se deseja ou não participar desta pesquisa. Caso decida não participar, não será prejudicado de maneira alguma, incluindo tratamento médico ou cuidados a que tem direito de receber. Se você decidir participar, ainda assim, é livre para desistir a qualquer momento, devendo apenas comunicar o responsável pelo estudo ou alguém de sua equipe para que, a partir daí, não seja mais realizado nenhum contato com você a respeito desta pesquisa.

O que vai acontecer comigo se eu participar?

O estudo prevê uma coleta de sangue periférico (aproximadamente 15 mL) para permitir a análise laboratorial proposta, com o objetivo de caracterizar o perfil genético que possam estar associados com as doenças mencionadas. Isto poderá esclarecer mecanismos bioquímicos que possam, no futuro, contribuir para a prevenção, o diagnóstico precoce e a escolha adequada do tratamento capaz de diminuir os sintomas e as sequelas relacionadas à Doença Arterial Coronária (doença dos vasos do coração). Caso aceite contribuir com as informações úteis para esta pesquisa, você será convidado a responder a um questionário durante uma breve entrevista que será realizada após a sua assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Como as minhas informações serão utilizadas?

Assinando este documento, você autoriza o médico responsável pelo estudo a consultar os seus registros de prontuário arquivados nesta Instituição, a fim de permitir a caracterização de suas condições de saúde nos períodos avaliados pela pesquisa para que possam ser correlacionadas com as informações relatadas durante a sua entrevista. Entretanto, é importante que você entenda que todos os seus dados serão codificados, garantindo a sua confidencialidade tanto durante a análise quanto na divulgação dos resultados desta pesquisa, em respeito à legislação brasileira em vigor.

Quais são os possíveis benefícios em participar deste estudo?

Poderá não haver benefícios diretamente a você com a sua participação. Entretanto, há expectativa de que o conhecimento gerado a partir dos resultados deste estudo seja de grande importância, na medida em que estes dados podem enriquecer a literatura acerca da real percepção do paciente sobre o seu acompanhamento cardiológico e contribuir para o diagnóstico, escolha adequada do tratamento e prevenção de sintomas e sequelas associados à Doença Arterial Coronária.

Quais são os possíveis riscos ou desconfortos relacionados com esta minha participação?

Habitualmente, não há desconfortos ou riscos físicos significativos. Entretanto, caso você se sinta incomodado durante a entrevista em falar, compartilhar alguma informação que julgue ser pessoal ou confidencial, fique à vontade para não responder a qual pergunta. É importante lhe informar que este estudo prevê a coleta de uma amostra de sangue que será colhida de sua veia periférica do antebraço (processo que poderá lhe causar leve desconforto doloroso local e consequente “mancha roxa na pele” conhecida por equimose) para a avaliação laboratorial proposta. Você poderá, no decorrer da pesquisa, solicitar esclarecimentos sobre a forma de aplicação do questionário, riscos, benefícios ou quaisquer outros assuntos relacionados com esta pesquisa. Ainda, lhe informo que os dados coletados nesta pesquisa serão utilizados para apresentação de trabalhos em eventos e publicações científicas. Você tem toda a liberdade

para recusar participar ou retirar este seu consentimento a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo. A sua identidade será sempre preservada.

Há custos com esta participação?

Você não terá qualquer custo com a sua participação neste estudo.

Quem eu posso contatar se quiser maiores esclarecimentos ou obter outras informações a respeito deste estudo?

Dr. Moacir Fernandes de Godoy – médico responsável pelo estudo – Telefone: (17) 3201-5927
Sabrina Mayara Cezario – membro da equipe do estudo – Telefone: (17) 3201-5864
Tayanne Silva do Carmo – membro da equipe do estudo – Telefone: (17) 3201-5864
Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza – membro da equipe do estudo – Telefone: (17) 3201-5864
Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Telefone: (17) 3201-5813

Declaro que li o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para este estudo e aceito participar voluntariamente desta pesquisa. Eu tive oportunidade de discutir sobre a proposta deste estudo e fazer perguntas que facilitaram o meu esclarecimento. Eu entendo que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por mim, pela pessoa que realizou a discussão sobre o Termo de Consentimento e, quando aplicável, pela testemunha e/ou representante legal.

Deve ser assinado e datado pelo Participante da pesquisa:

_____	_____	_____
Nome (por extenso) do Participante da pesquisa	Assinatura	Data da assinatura

Deve ser assinado e datado pelo Responsável da pesquisa:

_____	_____	_____
Nome (por extenso) do Responsável da pesquisa	Assinatura	Data da assinatura

Deve ser assinado e datado pela pessoa que conduziu a discussão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

Nome (por extenso) da pessoa que conduziu a discussão do TCLE	Assinatura	Data da assinatura
---	------------	--------------------

A assinatura do representante legalmente aceito deve ser adicionada se o participante da pesquisa for incapaz de assinar por si próprio. A relação (parentesco) entre o participante da pesquisa e o seu representante legal deve ser indicada. A assinatura da testemunha imparcial deve ser adicionada se o participante da pesquisa não for capaz de ler ou escrever.

Nome (por extenso) do representante legalmente Aceito (se aplicável)	relação	Assinatura	Data da assinatura
--	---------	------------	--------------------

Nome (por extenso) da testemunha Imparcial (se aplicável)	Assinatura	Data da assinatura
---	------------	--------------------

Anexo III

Questionário Clínico

Projeto de Pesquisa: “Variantes Genéticas e Variabilidade da Frequência Cardíaca em Pacientes com Antecedente de Síndrome Coronariana Aguda”

Nome do paciente: _____ Identificação no projeto: _____

Questionário Clínico				
Nome:		Identificação no projeto:		
Data da Entrevista: / /	RG doc. :	Prontuário:		
Data de Nascimento: / /	Idade:	Naturalidade:		
Gênero: Masculino () Feminino ()		Menopausa: Pré() Pós() Atual()		
Grupo Étnico: Branca () Parda () Negra () Asiática () Outro () _____				
Endereço (Residencial):				Nº:
Complemento:	Cidade:	Estado:	País:	
Telefone Residencial:		Comercial:		
Celular: ()				
E-mail:				
Profissão:				
Escolaridade:	Ensino Fundamental:	completo ()	incompleto ()	
	Ensino Médio:	completo ()	incompleto ()	
	Ensino Superior:	completo ()	incompleto ()	
Avaliação Clínica				
Peso do (a) paciente	Kg	IMC	Kg/cm ²	
Altura do (a) paciente	m	Circunferência Abdominal:	cm	
PAS	mmHg	FC:	bpm	
PAD	mmHg			
Dados Biodemográficos				
Histórico do paciente	Sim	Não	Não sabe	Frequencia/ Há quanto tempo?
Tabagista				
Ex-tabagista				
Etilista				

Ex-etilista				
Usa drogas ilícitas				
Ex- usuário				
HAS				
DM				Tipo: 1 () 2 ()
IAM				
AI				
AVC				Tipo: Isquêmico () Cardioembólico () Aterotrombótico ()
Obesidade				
Sedentarismo				
Síndrome metabólica				
Doença Aterosclerótica Coronariana				
Angina estável (ou de peito)				
Doença arterial periférica				
Ataque transitório isquêmico				
Aneurisma de Ao				
Estenose de Carótida				
Revascularização do Miocárdio				Tipo: Cirúrgica () Percutânea () Qual o número de coronárias abordadas por cirurgia ou por angioplastia?
Outras doenças:				

Medicamentos utilizados

Paciente utiliza medicamentos? () sim () não

1. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
2. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
3. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
4. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____

5. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
6. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
7. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
8. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
9. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____
10. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário _____

<u>Antecedentes Familiares</u>			
Patologia	Sim	Não	Parentesco/ Idade
Hipercolesterolemia Familiar			
Dislipidemia			
Doença aterosclerótica coronária			
HAS			
IAM			
AI			
AVC			
DM			Tipo: 1 () 2 ()
Obesidade			
Morte Súbita			