

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

FÁBIA CARLA DA SILVA SOARES

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO NPY, DO NPYR2 E DA METILAÇÃO DE DNA
GLOBAL EM PACIENTES COM A SÍNDROME CORONARIANA AGUDA

Recife
2018

FÁBIA CARLA DA SILVA SOARES

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO NPY, DO NPYR2 E DA METILAÇÃO DE DNA
GLOBAL EM PACIENTES COM A SÍNDROME CORONARIANA AGUDA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunopatogênese de doenças crônicas, infecciosas e parasitárias/Imunogenética e terapia celular em doenças crônicas.

Orientadores: Dra. Sílvia M. L. Montenegro

Dra. Clarice N. Lins de Moraes

Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S676a Soares, Fábica Carla da Silva.
Avaliação da influência do NPY, do NPYR2 e da metilação de DNA global em pacientes com a síndrome coronariana aguda / Fábica Carla da Silva Soares. - Recife: [s.n.], 2018.
96 p. : il., tab., graf. ; 30 cm

Tese (doutorado em saúde pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientadoras: Orientadoras: Sílvia Maria Lucena Montenegro, Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, Danyelly Brunaska Gondim Martins.

1. Síndrome Coronariana Aguda. 2. Neuropeptídeo Y. 3. Receptores de Neuropeptídeo Y. 4. Polimorfismo de Nucleotídeo Único (variantes). 5. Metilação de DNA. I. Montenegro, Sílvia Maria Lucena. II. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. III. Martins, Danyelly Brunaska Gondim. IV. Título.

FÁBIA CARLA DA SILVA SOARES

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO NPY, DO NPYR2 E DA METILAÇÃO DE DNA
GLOBAL EM PACIENTES COM A SÍNDROME CORONARIANA AGUDA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como
requisito para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Aprovado em: 27/06/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sílvia Maria Lucena Montenegro
Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE

Prof Dr Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE

Prof^a. Dr^a Valéria Pereira Hernandes
Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal de Pernambuco, UFRPE

Prof^a. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Dedico este trabalho aos aspectos
do Divino Mãe, Pai e Filho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir com amor a finalização desse ciclo em minha vida e por todo o crescimento durante esse período cheio de aprendizados.

À minha família, minha mãe, Eronilda, meu pai, Luis, meu irmão, Bruno, e cunhada, Evelin por terem se colocado sempre presentes e me apoiando com carinho e amor nesse trecho da caminhada da vida.

A todos os irmãos e irmãs da Sahaja Yoga que foram muito compreensivos e amorosos comigo e sempre disponíveis a colaborar em momentos cruciais.

À minha orientadora Dra Sílvia Montenegro, que desde começo me recebeu com confiança, e que desenvolveu um importante papel para mim, me orientando e ao mesmo tempo, permitindo que eu desenvolvesse minha autonomia como pesquisadora. Além disso, levo com carinho e gratidão a nossa amizade construída durante essa “estação de trem”.

À minha coorientadora Clarice Lins, por sua colaboração e enxergar em mim no primeiro momento algum potencial e me estimular a construir um projeto de doutorado, assim permitindo que eu seguisse essa caminhada acadêmica.

À minha coorientadora Danyelly Brunaska, por sua confiança em me aceitar como aluna depois do trabalho em andamento, por sua colaboração, por sua leveza e alegria de sempre. Obrigada por sua amizade e por permitir que os momentos que poderiam ser tensos fossem transformados em risos.

Ao amigo e colaborador Roberto Werkhäuser, por sua colaboração e por se colocar sempre à disposição para ajudar.

Ao amigo e colaborador Romário Martins, por sua disponibilidade durante todo o trabalho para colaborar e por sua confiança na nossa amizade construída durante esse período.

A estudante PIBIC, Ester Alves, pela dinâmica diária que vivemos no laboratório, as trocas de conhecimento e por sua colaboração e agilidade em ajudar no trabalho.

Às amigas, Manu, Renata, Laíse, Morgana, Sheilla e Joelma que conheci nessa trilha e que me ajudaram com a nossa bela e sincera amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Manoel, Viviane, Lílian, Alex e Lucas, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos colegas, Simone, Mineo, Roni, Carmem, Graça, Neidinha, Edileuza, Fabiana e todos do departamento de Imunologia pelo convívio harmonioso e carinhoso durante esse ciclo.

Aos estatísticos Tetsuo e George, por suas importantes colaborações neste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, Márcia, Mégine e Adagilson, por se colocarem sempre disponíveis para nos ajudar.

Ao colaborador Dr. Sérgio Montenegro e membros do Hospital Português, pela parceria e importante ajuda para a realização desse estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do IAM/Fiocruz-PE pela contribuição na minha formação acadêmica.

À IAM/Fiocruz-PE pela infraestrutura para a realização desse estudo.

À CAPES pela bolsa concedida durante o Doutorado.

À PROEP pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, sugestões e críticas a este trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT) do IAM/Fiocruz-PE pela assistência técnica indispensável neste trabalho.

Aos pacientes com e sem síndrome coronariana aguda, aos doadores de sangue do Hemope, pela participação nesta pesquisa, tornando possível a realização deste estudo.

A todos aqueles que não foram mencionados e contribuíram para a realização deste estudo.

Muito Obrigada!

Fábria Soares

Gratidão

Agradeço ao mestre da dor, que me permite ficar mais perto de Deus.

Agradeço ao mestre da alegria, que me permite sentir a vida com leveza.

Agradeço ao mestre da paciência, que me torna mais tolerante.

Agradeço ao mestre da compaixão, que me permite sentir o outro em mim.

Agradeço ao mestre da sabedoria, que me permite crescer a cada instante.

Agradeço ao mestre da humildade, que me permite ter consciência que não sou melhor do que ninguém.

E agradeço ao mestre do amor, que me faz saber acolher estes e tantos outros mestres com aceitação e AMOR.

Fábia Soares

Como uma partícula de poeira

Eu quero ser pequenina,

Como uma partícula de poeira

Que se move com o vento.

Ela vai a qualquer lugar.

Pode sentar-se na cabeça de um rei

Ou pode cair aos pés de alguém.

E pode repousar em qualquer lugar.

Mas Eu quero ser uma partícula de poeira

Que tenha fragrância,

Que seja nutridora,

Que illumine.

Shri Mataji Nirmala Devi, aos sete anos de idade

SOARES, Fábila Carla da Silva. **Avaliação da influência de variantes no NPY e no NPYR2 e da metilação de DNA global na gravidade da síndrome coronariana aguda.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

O neuropeptídeo Y (NPY) é um dos neurotransmissores mais abundantes do sistema nervoso, que pode estimular angiogênese, inflamação e adipogênese na região abdominal através do Receptor 2 do NPY (NPYR2). Alterações na sua sinalização foram associadas, com a Síndrome Coronariana Aguda (SCA). O estudo avaliou a relação entre as variantes. c.20T>C, c.84G>A, c.150G>A, c.-485T>C do NPY e as c.-1088C>T e c.-1116A>G do NPYR2, como da metilação de DNA global, com a gravidade da SCA, através do *Thrombolysis in Myocardial Infarction* (TIMI) score. Participaram do estudo 221 pacientes com SCA e 95 sem SCA, selecionados no Real Hospital Português, situado em Recife, PE. Além, de 278 doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia, Recife, PE. Houve associação do gênero masculino (p = 0,0014; OR = 2,42) tabagismo (p = 0,0291; OR = 2,31) e dislipidemia (p < 0,0001; OR = 3,76) com a SCA. Existiu associação da variante c.20T>C do NPY com SCA (p = 0,0274; OR = 3,24), entre o grupo com SCA e o grupo saudável. Na análise entre as variantes e os fatores de risco no grupo com SCA, NPY c.84G>A foi associado com a hipertensão. A análise entre o TIMI e as variantes mostrou para a NPY c.20T>C (p = 0,0261; OR = 4,00) uma diferença entre os grupos TIMI baixo e intermediário/alto. Ocorreu um maior nível de metilação no grupo SCA e quando estratificado pelo TIMI, o grupo intermediário/alto apresentou um menor padrão de metilação. A variante NPY c.20T>C ao mesmo tempo em que pode ser um fator de risco para SCA pode influenciar com um efeito de proteção na gravidade da . Um perfil hipermetilado de DNA global no grupo com SCA foi associado ao risco de SCA, podendo se tornar um biomarcador para SCA. Em relação ao escore de risco TIMI, o baixo nível de metilação global se mostrou associado ao grupo intermediário/alto para SCA, possibilitando esse perfil hipometilado ser utilizado como um marcador para estratificar os pacientes para risco de morte ou de eventos cardiovasculares.

Palavras-chave: Síndrome Coronariana Aguda. Escore de Risco TIMI. Neuropeptídeo Y. Receptor 2 do NPY. Variantes. Metilação de DNA global.

Descritores Decs: Síndrome Coronariana Aguda. Neuropeptídeo Y. Receptores de Neuropeptídeo Y. Polimorfismo de Nucleotídeo Único (variantes). Metilação de DNA.

SOARES, Fábila Carla da Silva. **Evaluation of the influence of NPY and NPYR2 variants and of global DNA methylation on the severity of acute coronary syndrome.** 2018. Thesis (Doctoral in Biociences and Biothechnology for Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

ABSTRACT

The neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant neurotransmitters in the nervous system, which can stimulate angiogenesis, inflammation and adipogenesis in the abdominal region through NPY Receptor 2 (NPYR2). Alterations in its signaling were associated with Acute Coronary Syndrome (ACS). The study evaluated the relationship between variants c.20T>C, c.84G>A, c.150G>A, c.-485T>C of NPY and c.-1088C>T and c.-1116A>G of NPYR2, as well as of global DNA methylation, with the severity of SCA, through the *Thrombolysis in Myocardial Infarction* (TIMI) score. A total of 221 patients with ACS and 95 patients without ACS, all participated in the study from the Real Hospital Português, located in Recife, PE. In addition, of 278 blood donors of Fundação de Hematologia e Hemoterapia, Recife, PE. There was an association among male gender ($p = 0.0001$; OR = 2.42), smoking ($p = 0.0029$; OR = 2.31) and dyslipidemia ($p < 0.0001$; OR = 3.76) with ACS. Also, an association of variant c.20T>C ($p = 0,0274$; OR = 3,22), of NPY with SCA, between the group with ACS and the healthy group. In the analysis between variants and risk factors in the ACS group, NPY c.84G>A was associated with hypertension. The analysis between TIMI risk and the variants showed for NPY c.20T>C a significant difference between the low and intermediate/high TIMI risk groups ($p = 0.0223$; OR = 4.00). A higher methylation level was observed in the SCA group. When stratified by TIMI risk, the intermediate/high group presented a lower methylation pattern. The variant NPY c. 20T>C while it may be a risk factor for SCA it may influence with a protective effect to the severity of the disease. A hypermethylated global DNA profile in group with ACS may be associated with the risk of ACS, and may become a promising biomarker for ACS. Regarding the TIMI risk score, the low level of global methylation was most associated with the intermediate / high risk group for ACS, allowing this hypomethylated profile to be used as a marker to stratify patients to risk of death or cardiovascular events.

Key words: Acute Coronary Syndrome. TIMI Risk Score. Neuropeptide Y. NPY receptor 2. Variants. Global DNA methylation.

Decs Descriptors: Acute Coronary Syndrome. Neuropeptide Y. Neuropeptídeo Y receptors. Single Nucleotide Polymorphism (variants). Metilação de DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do neuropeptídeo Y.....	18
Figura 2 - Fontes e ações de NPY no cérebro e na periferia	20
Quadro 1 – Distribuição do NPY no organismo.....	21
Figura 3 - -- Esquema da síntese de NPY a partir do precursor pro-NPY	22
Figura 4 - Diferentes tipos de informações epigenéticas.....	27
Figura 5 - Representação esquemática do silenciamento gênico	29
Figura 6 - Categorização do risco TIMI	32
Figura 7 - Fatores de risco genéticos e ambientais que promovem o desenvolvimento e progressão da aterosclerose coronária	33
Figura 8 - A Doença arterial coronária é um processo de doença dinâmico.....	34
Figura 9 - Box-plot (mediana e quartis) do %CpG nos grupos SCA e sSCA	61
Figura 10 - Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos gêneros do grupo SCA.....	62
Figura 11 - Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos grupos esperado e precoce do SCA.....	62
Figura 12 - Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos grupos esperado e precoce por gêneros do grupo SCA.....	63
Figura 13 - Correlação de %CpG com o avanço da idade no grupo SCA	64
Figura 14 - Box-plot (média e quartis) de %CpG nos grupos de risco TIMI baixo e intermediário/alto do SCA.....	65
Figura 15 - Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos grupos de risco TIMI baixo e intermediário por gênero do grupo SCA	66
Figura 16 - Correlação entre o nível de %CpG e níveis séricos do NPY	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características biológicas, clínicas e hábitos de pacientes sSCA e SCA.....	47
Tabela 2 - Análise das variantes dos genes NPY e NPY2R nos grupos sSCA e SCA.....	50
Tabela 3- Análise das variantes dos genes NPY e NPY2R nos grupo Saudável e SCA.....	51
Tabela 4 - Análise das variantes dos genes NPY e NPY2R entre os graus de risco TIMI no grupo SCA	53
Tabela 5-. Análise da variante c.84G>A do NPY com as características biológicas, clínicas e hábito.	56
Tabela 6 - Análise da variante c.150G>A do NPY com as características biológicas, clínicas e hábito.	57
Tabela 7- Análise da variante c.-1116A> G do NPYR2 com as características biológicas, clínicas e hábito	60
Tabela 8 - Análise entre os grupos hipermetilado e hipometilado correspondentes as características biológicas, clínicas e hábitos de pacientes com SCA	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AI	Angina Instável
APP	Aminopeptidase P
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
c.	Sequência de referência de codificação de DNA
C	Citosina
CK-MB	Isoenzima MB da Creatina Quinase
CPON	<i>C-terminal Flanking Peptide of NPY</i>
DC	Doença Coronariana
DAC	Doença Arterial Coronariana
DM2	Diabetes Tipo 2
DPPIV	Dipeptidil-peptidase IV
DNA	Ácido Desoxirribonucleotídeo
DNMTs	DNA metiltransferases
DMRs	Regiões Diferencialmente Metiladas
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ECG	Eletrocardiograma
EPCs	Células Endoteliais Progenitoras
FE	Fração de ejeção
FRS	Framingham Risk Score
G	Guanina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IAMCS-ST	Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnívelamento do SegmentoST
IAMSS-ST	Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnívelamento do Segmento ST
IC	Intervalo de Confiança
Leu	Leucina
LINEs	Long Interspersed Nucleotide Elements

LTRs	Repetições Terminais Longas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N	Número Amostral
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
NPY	Neuropeptídeo Y
NPYR	Receptor do Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PcR	Proteína c Reativa
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pb	Pares de bases
PP	Polipeptídeo Pancreático
Pro	Prolina
PYY	Peptídeo YY
RHC	Real Hospital do Coração
Rs	<i>reference</i> SNP
RHP	Real Hospital Português
RNA	Ácido Ribonucleotídeo
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
SINEs	Short Interspersed Nucleotide Elements
SNP	Polimorfismos de um Único Nucleotídeo
SAT	Satélite
TIMI	<i>Thrombolysis in Myocardial Infarction</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β1	Transforming Growth Factor Beta
Th	Linfócitos T <i>helper</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 Neuropeptídeo Y	20
2.1.1 Síntese do NPY	23
2.1.2 Receptores do NPY.....	25
2.1.3 Comunicação Neuroimune do NPY.....	26
2.1.4 Variantes no NPY e no NPYR2.....	26
2.2 Epigenética	28
2.2.1 Metilação de DNA.....	29
2.3 Síndrome Coronariana Aguda	31
2.3.1 Epidemiologia	31
2.3.2 Diagnóstico	32
2.3.3 Estratificação de Risco.....	33
2.3.4 Fisiopatologia da SCA	34
2.3.5 Doenças cardíacas e o NPY.....	36
2.3.6 Doenças cardíacas e epigenética.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Geral.....	38
3.2 Específicos	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 Desenho do estudo	39
4.2 População e local de estudo.....	39
4.2.1 Grupo de pacientes com SCA.....	39
4.2.2 Grupos de comparação	39
4.2.3 Nível de gravidade.....	40
4.3 Critérios de inclusão	40
4.4 Critérios de exclusão.....	40
4.5 Definição e categorização das variáveis.....	41
4.5.1 Variáveis dependentes.....	41
4.5.2 Variáveis independentes.....	41
4.6 Obtenção das amostras	42
4.7 Identificação das variantes.....	42

4.7.1	Extração e purificação de Ácidos Nucléicos.....	42
4.7.2	Determinação das frequências das variantes nos genes do NPY e do NPYR2.....	43
4.8	Avaliação do nível de metilação de DNA global	44
4.9	Dosagem dos níveis séricos do NPY e do NPYR2	44
4.10	Análise estatística	45
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	46
6	RESULTADOS	47
6.1	Caracterização da população estudada	47
6.2	Análise das variantes do NPY e do NPYR2 com a SCA	48
6.3	Relação das variantes com o risco TIMI	52
6.4	Relação entre as variantes e as características clínicas, biológicas e hábito.	54
6.5	Avaliação do perfil de metilação de DNA global nos grupos.....	63
6.6	Avaliação do perfil de metilação de DNA global com gênero e idade no grupo SCA	60
6.7	Avaliação do perfil de metilação de DNA global dentro do grupo do risco	62
6.8	Análise do perfil de metilação de DNA global com as características clínicas, biológicas e hábito.....	64
6.9	Análise entre os níveis séricos do NPY e do NPYR2 com a SCA, as variantes e com o padrão de metilação de DNA global	66
7	DISCUSSÃO	67
7.1	Relação das variantes do NPY e NPYR2 com a SCA, risco TIMI e características dos pacientes.....	67
7.2	Relação do perfil de metilação de DNA global com a SCA, risco TIMI e características dos pacientes	70
8	CONCLUSÕES.....	73
9	LIMITAÇÃO DO ESTUDO.....	74
10	PERSPECTIVAS DO ESTUDO	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PROCARDIO/REALCOR EM ABRIL DE 2014.....	87
	APÊNDICE A - TCLE PARA PACIENTES COM SCA	89
	APÊNDICE B - TCLE PARA PACIENTE INTERNADO NO HOSPITAL PORTUGUÊS, MAS SEM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CORONARIANA AGUDA.....	90

APÊNDICE C - TCLE PARA INDIVÍDUO SAUDÁVEL	91
APÊNDICE D - ANÁLISE DA VARIANTE C.20T>C DO <i>NPY</i> COM AS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, CLÍNICAS E HÁBITO	92
APÊNDICE E - ANÁLISE DA VARIANTE C.-485T>C DO <i>NPY</i> COM AS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, CLÍNICAS E HÁBITO	94
APÊNDICE F - ANÁLISE DA VARIANTE C.-1088C> T DO <i>NPYR2</i> COM AS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, CLÍNICAS E HÁBITO	96

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso e o sistema imunológico têm distintas estruturas anatômicas povoadas por tipos de células bastante diferentes e ainda assim eles possuem muitos objetivos em comum. Ambos os sistemas, nervoso e imunológico, são sensoriais e sentem mudanças no ambiente e proporciona respostas integradas que permitem a sobrevivência (STEINMAN, 2012).

Estudos indicam que os sistemas nervoso e imunológico estão envolvidos em uma via bidirecional e uma dessas comunicações ocorre entre neuropeptídeos e citocinas (DE LA FUENTE et al., 2000). Alguns neuropeptídeos influenciam a imunidade inata e adaptativa através da interação com células imune nos órgãos linfoides, na corrente sanguínea ou nos sítios de inflamação (BROGDEN et al., 2005; STERNBERG, 2006). Nesse sentido, foi identificado receptores de neuropeptídeos em leucócitos demonstrando assim que estes neuropeptídeos podem regular as funções desses leucócitos (BLALOCK, 1994). Dessa forma, fortalece o conceito dessa interação dos sistemas neuro e imune.

Crescentes evidências sugerem que o neuropeptídeo Y (NPY) desempenha um papel modulador importante no sistema imune, com efeitos sobre a função dos macrófagos, células B e T, assim como na capacidade estimuladora das células dendríticas (WHEWAY; HERZOG; MACKAY, 2007).

O neuropeptídeo Y foi identificado como um peptídeo de 36 aminoácidos, sendo um dos neurotransmissores mais abundantes do sistema nervoso central e periférico (BLOMQUIST; HERZOG, 1997). Ele também induz a proliferação de células vasculares do músculo liso em humanos, promovendo a formação e o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (MOVAFAGH et al., 2006). A atuação do NPY é realizada através de receptores que incluem seis subtipos: NPYR1, NPYR2, NPYR3, NPYR4, NPYR5 e NPYR6 (BROTHERS; WAHLESTEDT, 2010) e que são encontrados em uma grande variedade de células e tecidos, como por exemplo, em neutrófilos no sangue periférico e em células do músculo cardíaco atrial direito (DIMITRIJEVIC´; STANOJEVIC´, 2013; EJAZ et al., 2011).

Além disso, o NPY foi encontrado nas terminações do nervo simpático cardíaco promovendo crescimento celular, tal como, angiogênese e arteriogênese, através da proliferação celular do músculo liso (MATYAL et al., 2012). Inclusive esse papel de ser um estimulador de angiogênese, assim como de inflamação e da adipogênese na região abdominal ocorre através do receptor NPYR2 (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012). Dessa maneira, o NPY pode influenciar a função cardíaca, exercendo assim papel importante na manutenção da

homeostase cardiovascular e, qualquer alteração na sua sinalização tem sido associada a disfunções cardiovasculares (ASMA; LOGERFO; PRADHAN, 2011).

Por outro lado, estudos vêm investigando variantes nos genes do NPY e do NPYR2 e associando à doenças cardíacas e/ou seus fatores de riscos, como as variantes do *NPY* c.20T>C (rs16139), c.84G>A (rs5572), c.150G>A (rs5573) e c.-485T>C (rs16147) (DE LUIS et al., 2017; BHASKAR et al., 2010a, 2010b; KARVONEN et al., 1998, 2001; SHAH et al., 2009; YU et al., 2010). As variantes do *NPYR2* c.-1088C>T (rs6857715) e c.-1116A>G (rs6857530) tem sido mais associadas à obesidade (CAMPBELL et al., 2007; SIDDIQ et al., 2007; TOREKOV et al., 2006; TREUTLEIN et al., 2017). Essa possível associação de variantes do *NPY*, dos seus receptores com doenças cardiovasculares, principalmente com a doença coronariana (LI et al., 2003; MACIA et al., 2012; MATYAL et al., 2012), tem mostrado que esse é um importante peptídeo na área da neuroimunomodulação (DIMITRIJEVIC´; STANOJEVIC´, 2013). Dessa maneira, há indícios de que o NPY regule a neuroinflamação no sistema cardiovascular (EJAZ; LOGERFO; PRADHAN, 2011).

Adicionalmente, análises na área da epigenética têm mostrado alterações no perfil dos níveis de metilação de DNA global em pacientes com doenças cardiovasculares (BACCARELLI et al., 2010), inclusive em doença coronariana (WEI et. al, 2014) e infarto do miocárdio (GUARRERA et al., 2015; KIM et al., 2010).

Além disso, considerando que as doenças cardíacas são influenciadas por fatores de risco, idade, genética, pode o perfil de metilação de DNA global mostrar como se encontra esse cenário, já que essas variáveis poderão determinar um padrão de metilação.

O NPY, seus receptores e um determinado perfil de metilação de DNA global podem se tornar um biomarcador para prognóstico de SCA, para estratificar o risco de morte ou de eventos cardiovasculares ou até mesmo um potencial alvo terapêutico contribuindo para outros tipos de tratamentos.

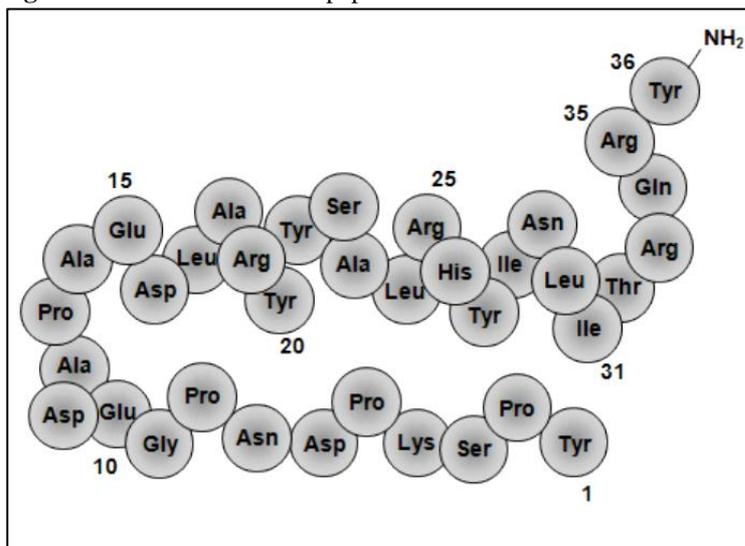
2 MARCO TEÓRICO

2.1 Neuropeptídeo Y

No início dos anos 70, o termo "neuropeptídeo" foi utilizado pela primeira vez por David de Wied em peptídeos relacionados com peptídeos hormonais, mas com atividade biológica não endócrina no cérebro. Esta noção inicial avalia os neuropeptídeos como uma classe específica de sinais químicos produzidos pelos neurônios, liberados em uma forma regulada e agindo em outras células neurais. Os neuropeptídeos são codificados por mais de 70 genes em genomas de mamíferos e podem ser agrupados em pelo menos 10 subfamílias de acordo com características estruturais, para os quais existem receptores frequentemente compartilhados ou relacionados (BURBACH, 2010).

O NPY foi identificado como um peptídeo de 36 aminoácidos, possuindo um resíduo de tirosina (Y) no terminal NH₂ e uma amida tirosina no terminal COOH e um resíduo tirosina (na posição 36) e outros 4 resíduos na posição 1, 20, 21 e 27. A abreviatura do resíduo de tirosina e a letra "Y", dando o nome ao neuropeptídeo. O NPY foi isolado inicialmente a partir de cérebro de porco (SCHWARTZ et al., 1990; TATEMOTO, 1982) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura do neuropeptídeo Y



Fonte: Álvaro (2008)

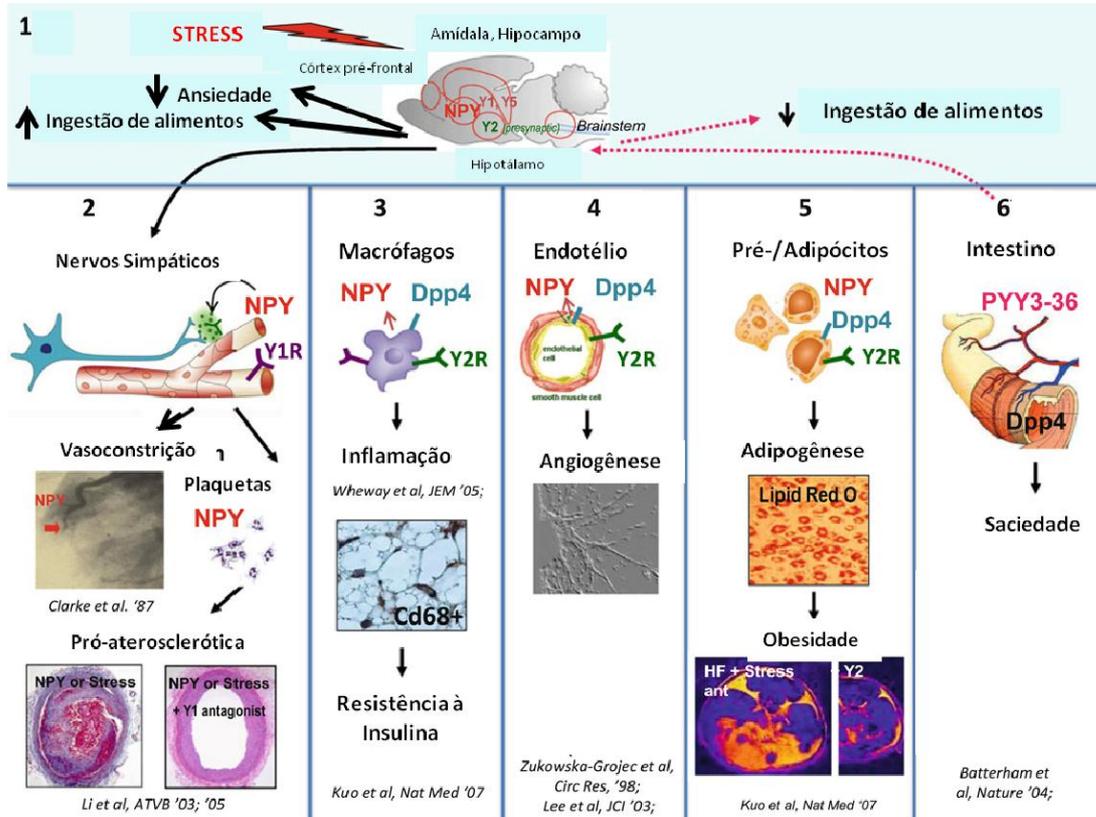
O NPY pertence a uma família de peptídeos, a família do NPY, que inclui o peptídeo YY (PYY) e o polipeptídeo pancreático (PP) (TATEMOTO, 1982; SCHWARTZ et al.,

1990). O NPY tem permanecido extremamente bem conservado durante a maior parte da evolução dos vertebrados, inclusive pode ser identificado em peixes cartilaginosos. O NPY apresenta 92% da sequência idêntica, ao se comparar um tipo de peixe do gênero *Torpedo* e mamíferos, uma distância evolutiva de mais de 400 milhões de anos. Sendo considerado um dos neuropeptídeos mais conservados evolutivamente entre as espécies. A forte conservação da sequência de NPY sugere que ele facilita muitas funções importantes e/ou possui múltiplas vias de interação com outras moléculas (COLMERS; WAHLESTEDT, 1993).

Em relação à distribuição e atuação do NPY no organismo, como um neurotransmissor simpático ubíquo, presente tanto no interior e fora do sistema nervoso, o NPY exerce os seus efeitos em quase todos os tecidos e sistemas de regulação no organismo. Centralmente, o NPY é um ansiolítico estresse responsivo e age como o mais poderoso estimulante da fome dentro do corpo. Também foi proposto que o NPY, atuando centralmente, poderia ser responsável pelo início da cascata de acontecimentos que conduzem à libertação de cortisol em resposta ao stress. Além disso, os efeitos centrais de NPY revelaram um potencial papel em distúrbios de alteração de humor, tais como ansiedade, depressão, alcoolismo, esquizofrenia e síndrome de stress pós- traumático, onde os níveis de NPY são conhecidos por estarem reduzidos (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012; EATON; SALLEE; SAH, 2007).

Na periferia, o NPY pode ser encontrado em três grupos principais: os nervos simpáticos, medula adrenal, e plaquetas (Figura 2) (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012).

Figura 2 - Fontes e ações de NPY no cérebro e na periferia



Fonte: Adaptado de Hirsch e Zukowska (2012, tradução nossa)

Legenda: 1-6 mostram regiões centrais e periféricas dentro do corpo onde se encontra o NPY. 1 - o cérebro, o NPY e seus receptores são expressos em muitas regiões pós-sináptica (Y1, Y5) e pré-sináptica (Y2) sensíveis ao stress (o hipotálamo e hipocampo), onde o peptídeo exerce potentes atividades orexígena e ansiolítica. Na periferia, 2-6, existem fontes de expressão de NPY neuronal (2) e não neuronais (3-6). No sistema cardiovascular (secretado dos nervos simpáticos e plaquetas-2), NPY medeia a vasoconstrição induzida pelo estresse, hiperplasia vascular e aterosclerose através do seu receptor Y1. Nas células do sistema imunológico (3), o NPY é indúziuvel e pode mediar ou qualquer ação ou anti-inflamatórias através de seu receptor Y1 em macrófagos. No sistema autócrino/parácrino das células endoteliais (4), o NPY convertido pela dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) para NPY3-36, um agonista seletivo do receptor de Y2 promove angiogênese e vascularização de tecidos isquêmicos e não-isquêmicos. NPY quando aumentado em ratinhos transgênicos que aumenta o nível basal de fibras capilares no membro posterior, enquanto que os ratinhos Y2Rs mostram uma diminuição no número de fibras capilares, em comparação com WT (4). NPY, DPPIV, e Y2Rs são também indúziuveis em adipócitos (5) onde eles mediam adipogênese e obesidade induzida por estresse e dieta. Finalmente, o NPY e PYY são expressados no sistema gastrointestinal, mas é o PYY intestinal (6) quando convertido para PYY3-36 por DPPIV, que é conhecido por induzir saciedade agindo no receptor pré-sináptico Y2 no hipotálamo para suprimir a ingestão de alimentos

Estudo mostrou que o NPY é sintetizado nos nervos pós-ganglionares que inervam os órgãos linfóides e é liberado após estimulação neuronal (ROMANO et al., 1991). Clinicamente, evidências demonstraram um aumento do NPY no plasma em pacientes com hipertensão (WOCIAL et al., 1995), insuficiência cardíaca crônica (CALLANAN et al., 2007;

MCDERMOTT; BELL 2007), e insuficiência renal (BALD; GERIGK; RASCHER, 1997), onde o fluxo simpático é aumentada (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012).

No quadro 1 pode ser observada a distribuição do NPY no organismo.

Quadro 1- Distribuição do NPY no organismo.

Distribuição	Referências bibliográficas
Medula espinal, mesencéfalo, metencéfalo	Silva et al., 2005a
Córtex, hipotálamo, gânglio basal, tálamo, septo, estriado, amígdala	Allen et al., 1983; de Quidt and Emson, 1986a, Silva et al., 2005 ^a
Hipocampo, nomeadamente no giro Dentado	Caberlotto et al., 2000
Lóbulo occipital e córtex temporal	Adrian et al., 1983; Beal et al., 1987; Delalle et al., 1997
Hipófise	Grunditz et al., 1984; Jones et al., 1989; Silva et al., 2005a
Glândulas sebáceas e lacrimais	Ebara et al., 1992; Kirch et al., 1996; Seifert et al., 1996
Mucosa nasal	Zhao et al., 1998; Knipping et al., 2003
Baço, pâncreas, ilhéus de Langerhans, coração	Ahmed et al., 1997; Ponery and Adeghate, 2000; Adeghate et al., 2001; Lambert et al., 2002
Células endoteliais	Jackerott and Larsson, 1997; Jacques et al., 2003; Silva et al., 2005b
Cólon, neurónios entéricos, esfíncter pilórico	Rettenbacher and Reubi, 2001; Cox and Tough, 2002; Lindstrom and Ekblad, 2002; Anitha et al., 2006
Fígado e timo	Kranz et al., 1997; Esteban et al., 2001b
Glândulas supra-renais	de Quidt and Emson, 1986b; Fernandez-Vivero et al., 1993; Pelto-Huikko, 1989; Cavadas et al., 2001

Fonte: Adaptado de Álvaro (2008) e Salgado (2007).

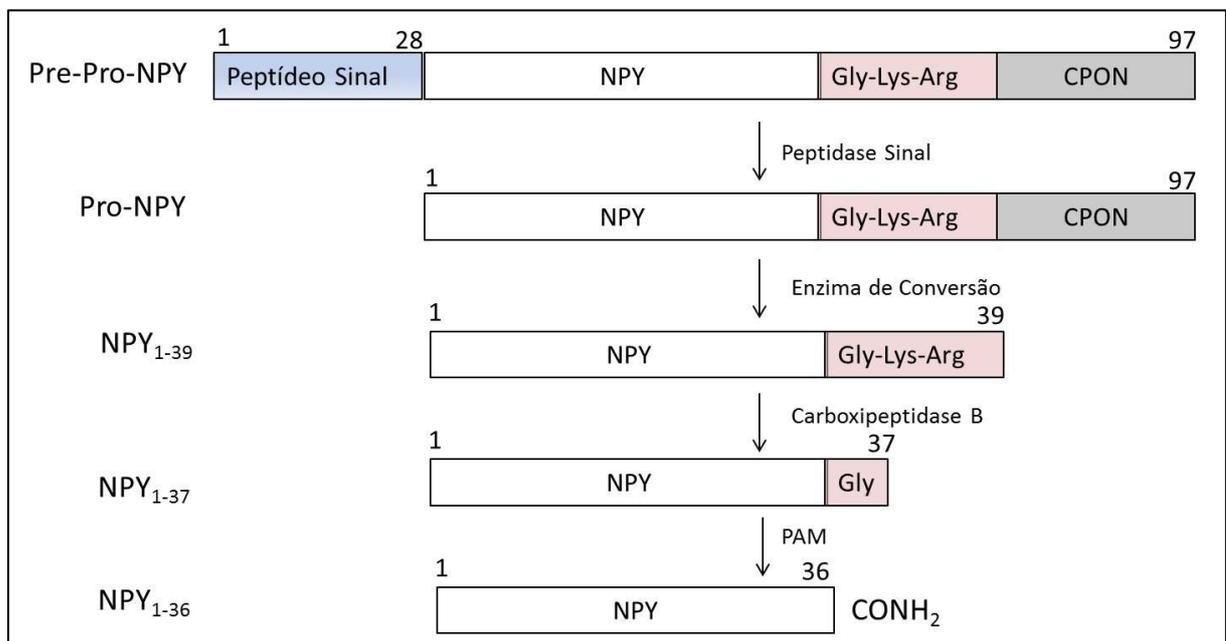
2.1.1. Síntese do NPY

Semelhante a todos os polipeptídeos e proteínas, o NPY é produzido por clivagem de um peptídeo precursor, sintetizado nos ribossomas e transportado para o lúmen do retículo endoplasmático e, deste, para o complexo de Golgi, a qual é seguida pela sua translocação para a rede trans-Golgi, onde o peptídeo é armazenado até nova ativação. A maioria do NPY é armazenada em grandes vesículas densa-core (MICHEL, 2004).

O precursor do NPY é o pro-peptídeo de 97 aminoácidos (pré-pro-NPY) (MINTH et al., 1984). O peptídeo sinal de 28 aminoácidos é removido, resultando o pro-NPY, com 69

aminoácidos. O pro-NPY consiste no NPY₁₋₃₉, em que um grupo de três aminoácidos no terminal carboxílico, Gly37-Lys-Arg39, está flanqueado por um grupo de 33 aminoácidos (o CPON, “C-terminal Flanking Peptide of NPY”, peptídeo flanqueador do NPY, no terminal carboxílico). Posteriormente, o NPY₁₋₃₉ sofre à ação da enzima carboxipeptidase B (CPB), gerando o NPY₁₋₃₇, então essa forma é amidada pela enzima peptil-glicina-aminoxigenase (PAM) na extremidade C-terminal (BRADBURY; FINNIE; SMYTH et al., 1982; MEDEIROS; TURNER, 1996) resultando no NPY₁₋₃₆ que vem a ser a forma biologicamente ativa do NPY (MEDEIROS; TURNER, 1996) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da síntese de NPY a partir do precursor pro-NPY



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2002).

O NPY pode sofrer mais proteólise e ser clivado em diferentes tamanhos. A aminopeptidase P (APP) e dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) são duas principais aminopeptidases responsáveis pela clivagem do NPY para NPY₂₋₃₆ e NPY₃₋₃₆, respectivamente (HÖRSSTEN et al., 2004). Esta proteólise, no entanto não inativa o NPY, mas em vez disso, suprime a sua afinidade para o receptor Y1 e mantém a afinidade do peptídeo para os receptores NPYR2 e NPYR5. Desta forma, as peptidases, e em particular a DPPIV, que existe em abundância em células endoteliais, células epiteliais, células do sistema imunológico e, pode atuar como uma enzima de conversão, determinando os tipos de atividades que os peptídeos do tipo NPY podem exercer (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012).

2.1.2 Receptores do NPY

Para exercer a sua função o NPY interage com receptores acoplados a proteína G, dos quais cinco tem sido clonados de mamíferos (NPYR1, NPYR2, NPYR4, NPYR5 e npyr6). A Família dos receptores do NPY é a mesma família para todos os membros da família do NPY, o NPY, o PP e o PYY, e inclui: o receptor NPYR1, inicialmente caracterizado como um receptor pós-sináptico; o receptor NPYR2, que é considerado um receptor pré-sináptico; o receptor Y3, cuja clonagem ainda não foi descrita; o receptor NPYR4, que foi o primeiro receptor identificado para o PP; o receptor NPYR5, que está envolvido na regulação do apetite; e o receptor npyr6, que, apesar de já ter sido clonado e a sua expressão genética resultar em proteínas funcionais em coelhos e camundongos, ainda não tem função conhecida em primatas (MICHEL et al., 1998). Aos subtipos NPYR1, NPYR2 e NPYR5 ligam preferencialmente o NPY e o PYY, enquanto que ao NPYR4 liga, preferencialmente, o PP (ÁLVARO, 2008).

O NPYR1 é abundantemente expresso no sistema nervoso central (SNC) e nos vasos sanguíneos (COLMERS; WAHLESTEDT, 1993; GRUNDEMAR et al., 1992). Uma das principais funções desse receptor tem sido associada à vasoconstrição (CAPURRO; HUIDOBRO-TORO, 1999; WIEST et al., 2006) e também à proliferação de células do músculo liso (ZUKOWSKA-GROJEC et al., 1998).

O efeito pós-sináptico vasoconstritor do NPY sobre os vasos sanguíneos coronários se baseia predominantemente na ativação do NPYR1 (PRIETO et al., 1988). Sob condições fisiopatológicas, pode-se esperar que o peptídeo contribua para a lesão isquêmica no coração através de uma via mediada pelo NPYR1 (GULLESTAD et al., 2000).

O NPYR2 está localizado, principalmente, a nível pré-sináptico e está implicado na inibição da liberação de neurotransmissores (MICHEL et al., 1998). Na área cardíaca este receptor tem significativa importância, pois ele está envolvido no processo de angiogênese (EKSTRAND et al, 2003; LEE et al., 2003; ZUKOWSKA-GROJEC et al., 1998).

Periféricamente, através do seu NPYR1, o NPY potencia os efeitos das catecolaminas para produzir uma vasoconstrição potente e prolongada, além de regular independentemente a longo prazo a vasoconstrição em face de ativação prolongada do sistema nervoso simpático (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012).

O NPY é também um estimulador de angiogênese através do NPYR2 e NPYR5 e, adicionalmente, desempenha vários papéis significativos no sistema imunitário, mais provável através do NPYR1. A ativação do NPYR1, resultando níveis elevados de NPY, também tem

sido implicado em doenças tais como a aterosclerose, onde aumenta o NPY devido à administração exógena ou endógena após a exposição ao estresse crônico que pode apresentar vasos hipersensíveis à angioplastia e pode induzir lesões oclusivas que se assemelham a placas ateroscleróticas avançadas. Além, NPY3-36, um produto clivado de NPY, foi mostrado que promove a angiogênese, inflamação, e a adipogênese na gordura visceral abdominal através do seu receptor de Y2 (HIRSCH; ZUKOWSKA, 2012).

2.1.3 Comunicação Neuroimune do NPY

Estudos com animais experimentais demonstraram que o NPY diminuiu a produção da citocina pro-inflamatória TNF- α após a estimulação com o lipopolissacárideo (PUERTO et al., 2005). Por outro lado, aumentou a produção da citocina anti-inflamatória TGF- β 1 (ZHOU; XU; JIANG, 2008). Este fato revelou a capacidade do NPY de também diminuir a reação inflamatória, (DIMITRIJEVIC'; STANOJEVIC', 2013). Adicionalmente, a ingestão do NPY (administrado de forma oral) inibiu a inflamação pela diminuição da Th17 e citocinas Th1 aumentando as citocinas Th2 no Sistema Nervoso Central (BROD; BAUER, 2012). Além disso, foi observado que o efeito inibitório do NPY na fagocitose foi mediado através da ativação dos receptores NPYR1 e demonstrando que o papel do NPY na regulação da fagocitose de células da microglia é promissor, uma vez este neuropeptídeo demonstra uma forte ação inibidora sobre as respostas relacionadas com a microglia ativada (FERREIRA et al., 2011).

No entanto, durante uma resposta imune/inflamatória o NPY pode exercer efeitos pró-inflamatórios através do recrutamento de células dendríticas imaturas, mas podem exercer efeitos anti-inflamatórios promovendo uma polarização de Th2 (BUTTARI et al., 2014). Isso demonstra que o NPY pode possuir um papel modulador dentro do organismo.

2.1.4 Variantes no NPY e no NPYR2

O gene NPY está localizado na posição 7p15.1, possui quatro exons (BAKER; HORT; BALL, 1995) e tem 7,7 kb de comprimento (WETHERILL et al., 2008).

Estudos investigaram a variante c. 20T>C (rs16139) que foi identificada na região codificadora do gene do NPY localizado no cromossomo 7p15.1, T1128C, no qual ocorre uma substituição da base timina para a citosina resultando na substituição da leucina por prolina na posição 7 (Leu7Pro) no peptídeo sinal do pré-pro-NPY. A leucina tem uma

cadeia lateral alifática hidrofóbica e favorece a formação de α -hélices. A prolina tem uma estrutura cíclica que influencia consideravelmente a arquitetura da proteína secundária e terciária, não favorece a formação de α -hélices, mas em vez disso introduz quebras e torções em partes α -helicoidais do esqueleto do péptido. Devido a estas diferenças químicas entre prolina e leucina, a substituição de Pro (7) para Leu (7) no peptídeo sinal pode levar a alterações no processamento celular dessa molécula no retículo endoplasmático, o que por sua vez poderia resultar em modificações na biodisponibilização do NPY ou na cinética de liberação da molécula (KARVONEN et al., 1998). Inclusive a c. 20T>C (rs16139) pode levar alteração na síntese, empacotamento e secreção do NPY, levando a um aumento deste (MITCHELL et al., 2008).

Estudos tem associado a c.20T>C (rs16139) à hipertensão (LIFTON, 1996, MORRIS; GRIFFITHS, 1998), à doença aterosclerótica acelerada (KARVONEN et al., 1998; KARVONEN et al., 2001), assim como à obesidade em crianças (KRISHNAN et al., 2017).

A evidência de associação da variante a c. 20T>C (rs16139) com complicações mais graves que derivam de hipertensão e /ou aterosclerose é mais convincente (MCDERMOTT; BELL 2007). Devido à sua potente ação vasoconstritora com potencial para induzir isquemia (ROSENWINKEL et al., 2001) e a correlação dos níveis plasmáticos elevados de NPY com condições isquêmicas (ULLMAN et al., 1990), o NPY tem sido considerado um gene candidato para infarto do miocárdio.

A frequência portadora do alelo C varia de 6-15% em Populações caucasianas, mas é muito baixa ou ausente em populações orientais (DING, 2003; JIA et al., 2005). Mais recentemente esta variante foi encontrada com uma alta frequência (5,9%) na população iraniana com doença arterial coronariana (MASOUDI-KAZEMABAD et al., 2012).

Outras variantes no gene do NPY vêm sendo estudadas, como a c.84G>A (rs5572) e a c.150G>A (rs5573)c, para obesidade e hipertensão inclusive com análise de haplótipos com o Leu7Pro e mostrando que o Leu7Pro está associado com a hipertensão (BHASKAR et al., 2010a; BHASKAR et al., 2010b). Estas diferenças na frequência do alelo e frequências de haplótipos entre as populações serão úteis em estudos de associação ou análise de ligação para identificar potencial funcional variação neste local, o qual pode estar associado com muitos mecanismos fisiológicos (BHASKAR et al., 2007).

A variante c.-485T>C do NPY (rs16147) se encontra localizada na região promotora deste gene (DOMSCHKE et al., 2008). Evidências mostraram que essa variante levou a alteração da expressão do NPY in vitro como provavelmente influencia os níveis de expressão do mRNA in vivo (SOMMER et al., 2010; ZHOU et al., 2008). Estudos mostraram uma

associação da variante c.-485T>C com o desenvolvimento da aterosclerose precoce (SHAH et al., 2009) e com acidente vascular cerebral (KIM et al., 2009, 2010; YU et al., 2010). Recentemente outros resultados demonstraram uma relação dessa variante como diabetes tipo 2 (PATEL et al., 2014) e com um efeito de redução a resistência à insulina (DE LUIS et al., 2017).

O NPY2R está localizado na posição 4q32.1 e possui um tamanho de 8,447 kb, incluindo dois exons e codifica uma proteína com 381 aminoácidos (TAKIGUCHI et al., 2010, WETHERILL et al., 2008).

Variantes do NPYR2 também vêm sendo investigadas e associadas a fatores de risco para doenças cardíacas. Estudos mostraram que a variante c.-1088C> T (rs6857715) pode influenciar o aumento da expressão gênica em células neuroendócrinas (WEI et al., 2013), como está relacionada a obesidade severa ou obesidade (LIJUN et al., 2005, SIDDIQ et al., 2007, TREUTLEIN et al., 2017), assim como a c.-1116A> G (rs6857530) também se encontra associada a obesidade (CAMPBELL et al., 2007; TOREKOV et al., 2006). E ambas estão relacionadas com baixos níveis séricos de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (TAKIGUCHI et al., 2010).

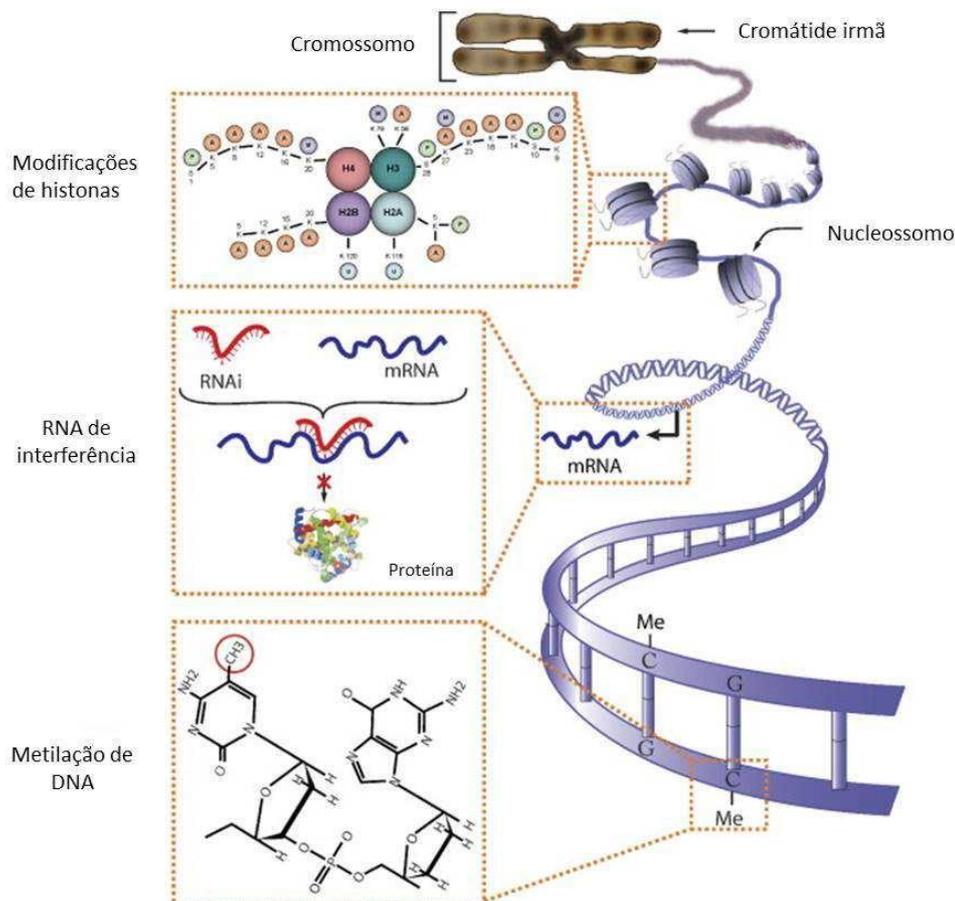
2.2 Epigenética

O termo "epigenética" define os estudos de mudanças hereditárias na expressão do gene e organização da cromatina que não são codificados no DNA genômico. A herança epigenética representa um mecanismo crítico que permite uma propagação notavelmente estável de estados de atividade do gene ao longo de muitas gerações celulares. O campo da epigenética tem recebido notável atenção nos últimos anos, devido à percepção de que a herança epigenética é essencial para o desenvolvimento e processos celulares críticos, tais como a transcrição de genes, diferenciação e proteção contra genomas virais. Os mecanismos epigenéticos são versáteis e adaptados para a função da memória celular específica não só durante o desenvolvimento, mas também durante o tempo de vida. Consistente com a importância de mecanismos epigenéticos, a desregulação de estados epigenéticos está intimamente ligada a doenças humanas, mais notavelmente o câncer (SAWAN et al., 2008).

O epigenoma é influenciado por fatores ambientais ao longo da vida. Os nutricionais que podem ter efeitos profundos sobre a expressão de genes específicos por modificação epigenética como o envelhecimento, pois sabe-se agora que os organismos envelhecidos, isto é, aqueles de idade avançada, têm modificado assinaturas epigenéticas (WILSON, 2008).

Informação epigenética que cumpra os critérios de hereditariedade podem ser classificados em três tipos distintos: metilação do DNA, modificações de histonas e RNAs não-codificantes (Figura 4) (SAWAN et al., 2008). Esses mecanismos ou informações podem ser responsáveis por ativar ou inativar genes que regulam o crescimento celular, proliferação, apoptose, e assim determinam o momento em que o gene pode ser expresso durante o desenvolvimento (ADCCOCK et al., 2007).

Figura 4 - Diferentes tipos de informações epigenéticas



Fonte: Adaptado de Sawan et al. (2008, tradução nossa).

Nota: Metilação de DNA, modificações de histonas, e silenciamento de gene mediado por RNA constituem três mecanismos distintos de regulação epigenética. A metilação do DNA é uma modificação covalente da citosina (C), que está localizado 5' para uma guanina (G) em um dinucleótido CpG. Modificações de histonas (cromatina) referem-se a modificações pós-traducionais covalente das caudas N-terminais de quatro histonas nucleares (H3, H4 H2A e H2B). O mecanismo mais recente da herança epigenética envolve RNAs, que seja na forma microRNA ou Xist pode alterar estados de expressão de genes na forma hereditária.

2.2.1 Metilação de DNA

A metilação do DNA ocorre por uma adição covalente de um grupo metil no carbono 5' do anel de citosina, resultando em 5-metilcitosina (BIRD , 2002). A adição de grupos metil

é realizada por uma família de enzimas, as DNA metiltransferases (DNMTs), essas que catalisam essa adição desses grupos para os resíduos de citosina do DNA (BAYLIN, 2005).

Os dinucleotídeos CpG estão distribuídos de forma escassa em grande parte no genoma dos mamíferos, mas ocorrem densamente em regiões chamadas ilhas CpG. Estas regiões variam entre 0,5 kb e 4 kb de comprimento e são encontrados principalmente em regiões promotoras de genes funcionais. Cerca de metade dos genes no genoma humano contém ilhas CpG, e dentro destas, a maioria das citosinas não estão metiladas em tecidos normais. (BELSHAW, 2008; BIRD, 1986; JOHNSON). Não ocorrendo dessa forma no cromossomo X inativado das mulheres e nos genes imprintados (EFSTRATIADIS, 1994; MOHANDAS et al., 1981).

Aproximadamente 90% da metilação do DNA ocorrem em áreas não codificantes do genoma em células normais. 5mC constitui aproximadamente 1% de todas as bases de DNA e é encontrado quase exclusivamente como metilação do dinucleotídeo CpG. A maioria dos CpGs metilados é encontrada em elementos de DNA repetitivos (satélite SAT2 e SAT3, elementos nucleares intercalantes longos - LINEs, elementos nucleares intercalantes curtos - SINEs e Repetições terminais longas - LTRs) sugerindo que a metilação da citosina evoluiu como uma defesa contra transposons e outros elementos parasitas. Esta evidência levou alguns a teorizar que a metilação global do DNA pode ser a primeira linha de defesa do genoma contra o insulto ambiental (GUERRERO-PRESTON; HERBSTMAN; GOLDMAN, 2011).

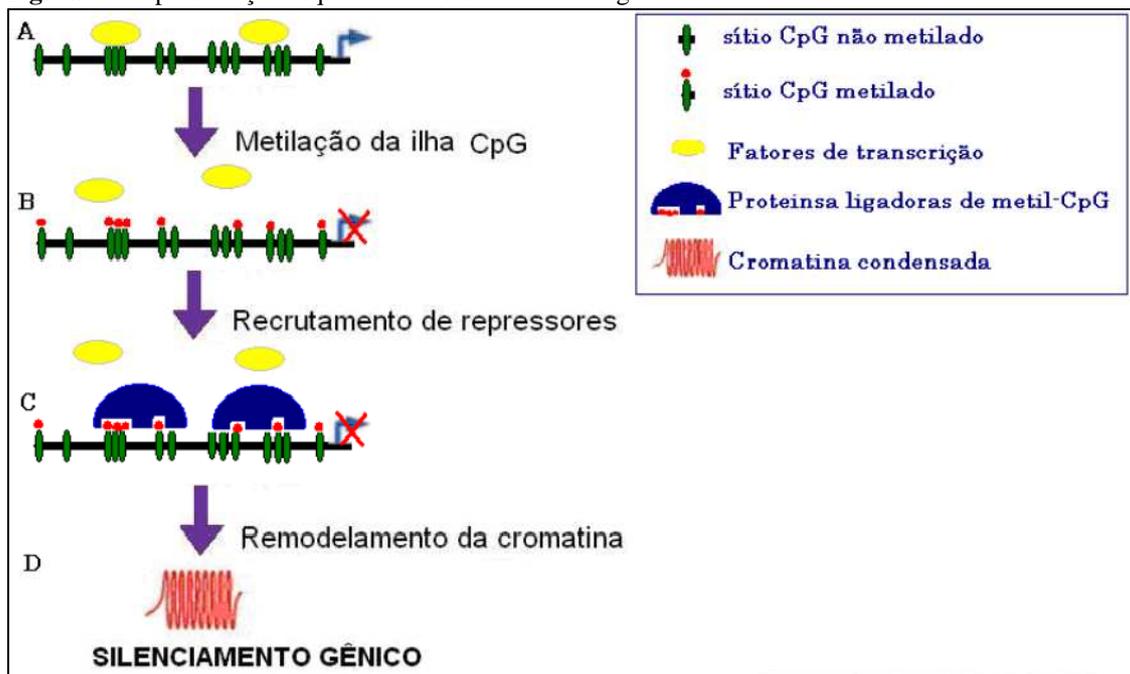
A metilação é a modificação mais comum no DNA eucariótico, tendo sido ativamente investigada, devido a sua habilidade de alterar a expressão do gene. Mudanças nos parâmetros da metilação podem ocorrer na forma de hipometilação ou hipermetilação. A hipometilação no DNA está associado à reativação do gene ou a instabilidades cromossomais. A hipermetilação na região promotora dos genes por outro lado está envolvida na repressão transcricional (DE SMET; LORIOT; BOON, 2004; EDEN et al., 2003; GOPISETTY; RAMACHANDRAN; SINGAL, 2006; JONES; BAYLIN, 2002).

Quando ocorre metilação na região promotora pode acontecer recrutamento de repressores como as proteínas que se ligam a grupos metil, remodelamento da cromatina e/ou inibição da ligação de fatores de transcrição (como AP-2, myc, NFK), levando a interrupção da transcrição, e conseqüentemente, da expressão gênica (Figura 5) (GALRÃO, 2011).

A metilação do DNA reprime a transcrição diretamente pela inibição da ligação de fatores de transcrição, e indiretamente pelo recrutamento de proteínas que se ligam ao CpG metilado (JIRTLE; SKINNER, 2007). Em tecido de mamíferos, o estado não metilado está

associado com uma estrutura de cromatina aberta e com transcrição ativa, enquanto que o DNA metilado recruta complexos de proteínas que promovem a deacetilação das histonas que leva a compactação da cromatina silenciando genes (JOHNSON; BELSHAW, 2008).

Figura 5 - Representação esquemática do silenciamento gênico



Fonte: Galvão (2011)

Legenda: A) Os sítios CpGs encontram-se desmetilados, há ligação dos fatores de transcrição e expressão gênica. B) Os sítios CpG encontram-se metilados, C) os sítios metilados não possibilitam a ligação dos fatores de transcrição, havendo recrutamento de complexos repressores (proteínas que se ligam a grupos metilas e desacetilases de histonas) que resultam em D) remodelamento da cromatina e consequentemente silenciamento gênico.

Estudos veem associando níveis baixos de metilação de DNA global com o risco de doenças cardiovasculares (BACCARELLI et al., 2010), como com o risco de doença coronariana (WEI et al., 2014) e infarto do miocárdio (GUARRERA et al., 2015). No entanto, outras pesquisas evidenciaram uma relação entre um alto nível de metilação de DNA global com doença arterial coronariana (SHARMA et al., 2008, 2014), assim como com o infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (KIM et al., 2010).

2.3 Síndrome Coronariana Aguda

2.3.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCV) são a causa número 1 de morte em todo o mundo. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2012, representando 31% de todas as mortes do mundo. Dessas mortes, estima-se que 7,4 milhões foram devido à doença arterial coronariana e 6,7 milhões foram devido a acidente vascular cerebral. Mais de três quartos das mortes por DCV ocorrem em países de baixa e média renda (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

No Brasil ocorreram em 2011, 335.213 óbitos por doenças do aparelho circulatório, o que corresponde a 28,6% do total, sendo que as maiores taxas ocorreram nas regiões Sudeste e Nordeste. Desses óbitos, 103.486 ocorreram por isquemia cardíaca, sendo 6.540 só no estado de Pernambuco (BRASIL, 2014).

2.3.2 *Diagnóstico*

A síndrome coronariana aguda (SCA) é causada pela obstrução das artérias coronárias e abrange grupos de sintomas clínicos compatíveis com isquemia miocárdica aguda, do tipo Infarto Agudo do Miocárdio e Angina Instável (THEROUX; FUSTER, 1998).

Na SCA estão incluídas angina instável, infarto do miocárdio sem Supra do segmento ST (IAMSS-ST) e infarto do miocárdio com Supra do segmento ST (IAMCS-ST) (THEROUX; FUSTER, 1998; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2010).

O diagnóstico da SCA é baseado na avaliação dos sintomas e sinais clínicos por exemplo: história clínica de dor torácica sugestiva de isquemia, avaliação dos fatores de risco para doença aterosclerótica e dados do exame físico completo incluindo a frequência cardíaca, pressão arterial, eletrocardiograma (alterações eletrocardiográficas isquêmicas), e dosagem de marcadores bioquímicos de lesão miocárdica (níveis elevados), dos quais troponina é o mais comumente usado. A SCA tem diversas causas, e o diagnóstico de infarto do miocárdio é classificado de acordo com a III definição universal de infarto do miocárdio (CASAGRANDE, 2002; EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, 2012; HERREN; MACKWAY-JONES, 2001; MISTRY; VESELY, 2012).

O eletrocardiograma (ECG) é recomendado pelas diretrizes clínicas como um teste de primeira linha que deve ser realizado imediatamente. O ECG tem boa especificidade (97%), mas baixa sensibilidade (28%) em SCA (FESMIRE; PERCY; BARDONER, 1998). Esta avaliação é de importância crucial, pois os biomarcadores cardíacos são normalmente

indisponíveis inicialmente (CORCORAN; GRANT; BERRY, 2015).

É importante salientar que além dos dados clínicos e alterações eletrocardiográficas, atualmente utilizados para o diagnóstico das SCAs, os marcadores bioquímicos de lesão miocárdica tradicionalmente mais usados são a troponina e a CK- MB – fração MB da creatinofosfoquinase (KELLER et al., 2009; RECHLIN et al., 2009).

A CK-MB por muito tempo tem sido considerada um marcador para o diagnóstico de IAM, porém é menos sensível e específica, em comparação com as troponinas cardíacas (ANDERSON, 2007). O surgimento de ensaios de alta sensibilidade (hs-troponina cTn) é um avanço importante para o teste de diagnóstico para a SCA. Outros potenciais biomarcadores incluem proteína de ligação de ácidos graxos do tipo cardíaco (H-FABP); biomarcadores de inflamação sistêmica, como a proteína C reativa (CRP); marcadores de disfunção ventricular, peptídeo natriurético cerebral (BNP); e coceptina e albumina modificada pela isquemia (RAZZOUK et al., 2012).

Apesar de estar associado com pior prognóstico, troponina, por si só não é uma medida precisa de risco quando comparados com os escores de risco que incorporam variáveis clínicas, o ECG, e biomarcadores (YAN; YAN; TAN, 20017).

2.3.3 Estratificação de Risco

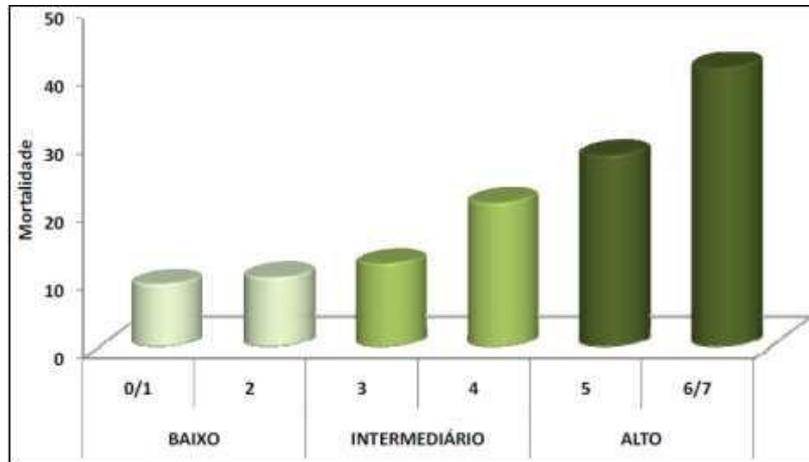
O grupo de investigação *Thrombolysis in Myocardial Infarction* (TIMI) propôs uma classificação simples de prognóstico que categoriza o risco de morte e de eventos cardiovasculares e define para os pacientes uma a melhor estratégia terapêutica para cada caso (ANTMAN et al., 2000).

A estratificação TIMI classifica o risco de morte dos pacientes de acordo com a presença de sete variáveis prognósticas: 1) idade ≥ 65 anos; 2) antecedente de doença arterial coronária $\geq 50\%$; 3) uso de ácido acetilsalicílico nos últimos sete dias; 4) presença de três ou mais fatores de risco para Doença Arterial Coronária (DAC); 5) dois ou mais episódios de angina em 24 horas; 6) desvio do segmento ST $\geq 0,5\text{mm}$ e 7) elevação dos marcadores de necrose miocárdica (ANTMAN et al., 2000).

Como o peso estimado para cada uma das sete variáveis foi de magnitude semelhante, o escore foi calculado determinando-se o valor de 01 (um) quando uma variável estava presente. A simples soma aritmética do número de variáveis presentes constituiu o escore de risco TIMI para cada paciente. No modelo inicial, houve progressivo e significativo aumento da taxa de eventos com o aumento do escore de risco TIMI, e os pacientes foram

categorizados em baixo risco (0 a 2 pontos), risco moderado (3 a 4 pontos) e alto risco (5 a 7 pontos) (Figura 6).

Figura 6 - Categorização do risco TIMI



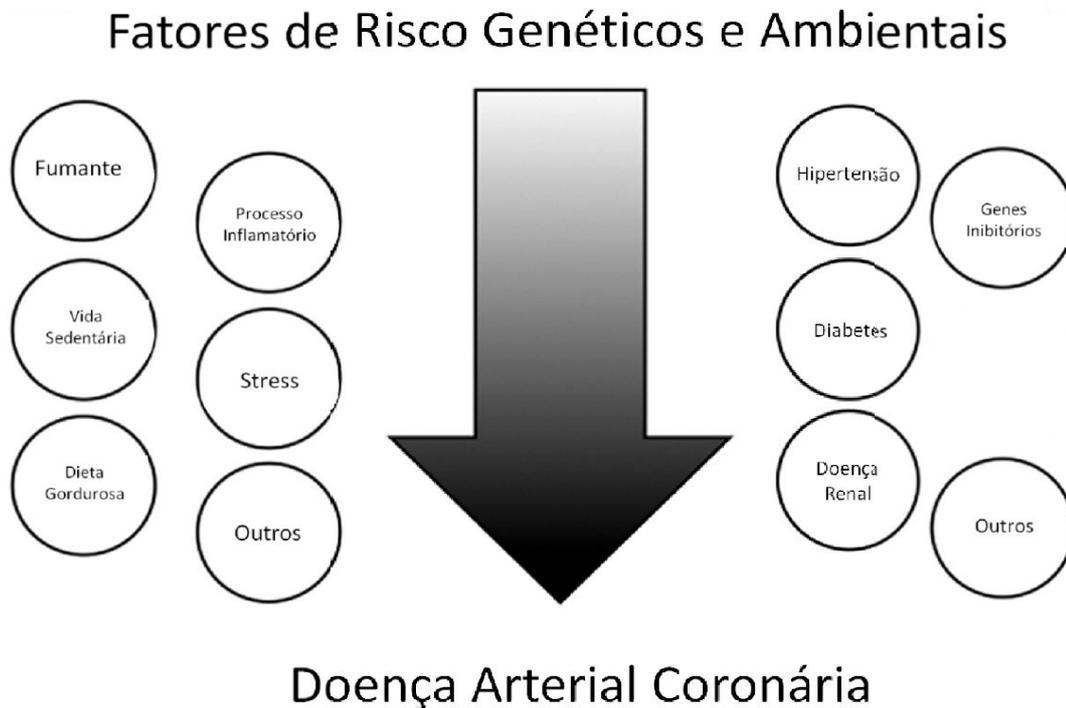
Fonte: Antman et al. (2000, tradução nossa).

Além do TIMI, outros escores são utilizados para mensurar o risco de mortalidade ou de eventos cardiovasculares, como o HEART e o *Global Registry of Acute Coronary Events* (GRACE) (MARCOON et al., 2013; SATILMISOGLU et al., 2017; SIX et al., 2013).

2.3.4 Fisiopatologia da SCA

Os fatores genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica e progressão da doença (BOUDOULAS et al., 2016) estão apresentados esquematicamente na Figura 7.

Figura 7 - Fatores de risco genéticos e ambientais que promovem o desenvolvimento e progressão da aterosclerose coronária.



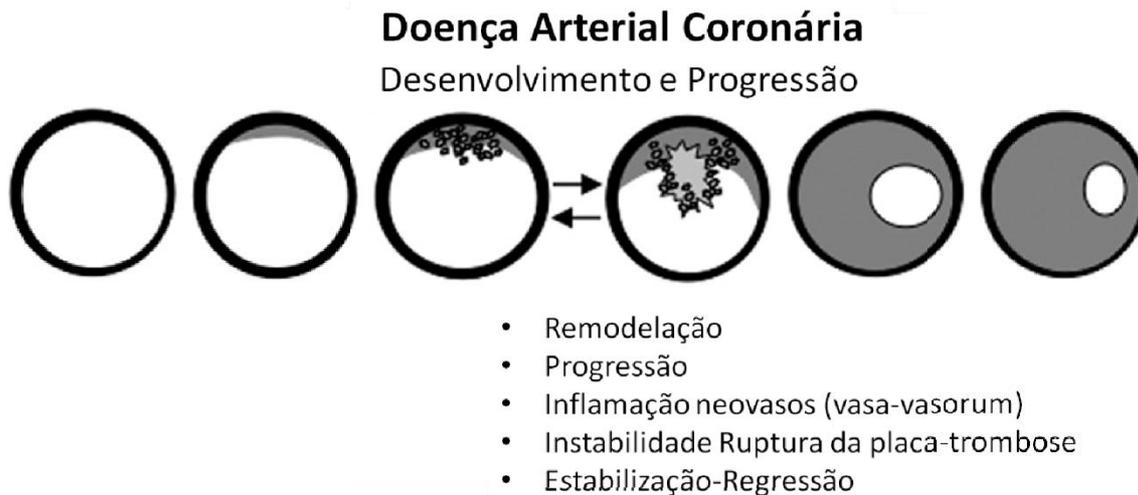
Fonte: Adaptado de Boudoulas et al. (2016, tradução nossa).

Fortes evidências científicas indicam que a ativação inflamatória é importante na iniciação e manutenção e progressão de aterosclerose. A cascata inflamatória tem sido implicada durante toda a formação da placa, desde as fases iniciais de disfunção endotelial para o desenvolvimento de síndromes coronarianas agudas (SCA). Índícios recentes indicam que os primeiros estágios na aterosclerose são de natureza inflamatória. A presença de macrófagos, linfócitos T, células dendríticas e mastócitos em lesões ateroscleróticas; a detecção de expressão de antígenos HLA de classe II; e o achado de secreção de várias citocinas aponta para o envolvimento de mecanismos imune inflamatórios na patogênese da aterosclerose. A evidência para um papel da inflamação na ruptura de placa foi demonstrada pela localização da inflamação em locais de ruptura de placas. No entanto, o foco de inflamação pode não estar precisamente no interior do vaso coronário em si, mas sim no miocárdio lesionado distal para a placa rompida (CENTURIÓN, 2016).

Na figura 8 pode ser observado que a aterosclerose coronária é um processo de doença dinâmico. Quando uma placa aterosclerótica se desenvolve na parede de uma artéria coronária, a artéria sofre remodelação em que a superfície luminal da artéria e a área da placa não está linearmente relacionada. O processo inflamatório e neovasos (vasa vasorum) podem

estar presentes na superfície da placa. Após a ruptura de uma placa aterosclerótica, trombose pode ocorrer que conduz a progressão da doença (mais frequentemente) e/ou para uma síndrome coronariana aguda. A placa estável pode se tornar instável e uma placa instável pode ser estabilizada (setas bidirecionais) (BOUDOULAS et al, 2016).

Figura 8 - A Doença arterial coronária é um processo de doença dinâmico.



Fonte: Adaptado de Boudoulas et al. (2016).

2.3.5 Doenças cardíacas e o NPY

Desde primeiros estudos que demonstraram a relação do NPY com a área cardíaca, em animais foi sugerido que o NPY cardíaco é liberado de nervos simpáticos durante o infarto do miocárdio induzido experimentalmente (HAN et al., 1989) e demonstraram que os níveis do plasma do NPY são elevados em síndromes coronárias agudas e durante a insuficiência ventricular esquerda em humanos onde eles se correlacionam de forma positiva com a gravidade da insuficiência cardíaca e o Y1 com a mortalidade (HULTING et al., 1990, ULLMAN et al., 1994).

Outro estudo mais recente avaliando pacientes com infarto agudo do miocárdio com supra ST ao longo de 24h do ciclo de atividade clínica sendo tratados com intervenção coronária percutânea primária (PPCI) para STEMI foi observado que os níveis plasmáticos de NPY da amostra de sangue periférico foram significativamente elevados nas primeiras 6h, mas permanecendo elevados em comparação com o intervalo normal. Também o nível de NPY no plasma também se correlacionou com a resolução da elevação do segmento ST e o tamanho do enfarte avaliado por liberação total de troponina (CUCULI et al., 2013).

Polimorfismos do gene NPY estão associadas a um risco aumentado de início precoce da aterosclerose (SHAH et al., 2009), um aumento no risco da progressão acelerada da aterosclerose (KARVONEN et al., 2001; YU et al., 2010), infarto do miocárdio e morte súbita (YU et al., 2010).

2.3.6 Doenças cardíacas e epigenética

A metilação anormal do DNA tem sido reconhecida como um importante fator subjacente ao desenvolvimento e progressão em várias doenças comuns. A maioria dos estudos realizados até agora se têm concentrado sobre o câncer e apenas alguns têm investigado o papel de mecanismos epigenética, tais como a metilação do DNA, no desenvolvimento de doença cardiovascular (ZAINA, 2014a). Inclusive indícios mostram que alterações epigenéticas podem contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose, em particular, a metilação do DNA pode influenciar o início e progressão da doença (ZAINA et al., 2014b).

Mudanças no microRNA, nos padrões de metilação do DNA e na estrutura de histona têm sido implicados nas vulnerabilidades de doenças cardiovasculares através de gerações (THORNBURG, 2015).

Pesquisas preliminares trazem indícios sobre as correlações entre a metilação do DNA, histonas modificações, e os mecanismos baseados em RNA com DCV incluindo aterosclerose, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, e hipertrofia cardíaca (SCHIANO et al., 2015).

Um estudo fornece evidências de que a hipermetilação anormal no promotor do DDAH2 (gene que regula a função das células endoteliais progenitoras- EPCs) está positivamente relacionada à disfunção de EPCs em pacientes com doença arterial coronariana (NIU et al., 2014).

Outros dados mostram resultados modestos, mas consistentes e significativos, relacionados a mudanças de metilação do DNA (hipometilação de quatro sítios CpG localizados dentro da sequência do gene MIR10B) em tecidos vasculares, indicando a importância de mecanismos epigenéticos na aterosclerose (NAZARENKO et al., 2015).

Adicionalmente, considerando o papel do NPY e dos seus receptores na neuroimunomodulação das doenças cardíacas e as evidências da importância da atuação dos mecanismos epigenéticos nessas doenças, se faz necessário um melhor entendimento desse cenário.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a influência das variantes do NPY, do NPYR2 e do nível de metilação de DNA global em pacientes com a síndrome coronariana aguda estratificados pelo escore de risco TIMI.

3.2 Específicos

- a) Avaliar o nível de gravidade da SCA através do escore de risco TIMI;
- b) Verificar a frequência das variantes do *NPY* [c.20T>C (rs16139), c.84G>A (rs5572), c.150G>A (rs5573) e c.-485T>C (rs16147)] e do *NPYR2* [c.-1088C> T rs6857715) e c.-1116A> G (rs6857530)] e sua associação com a SCA;
- c) Avaliar associação das variantes com o escore de risco TIMI e com as características clínicas, biológicas e hábito dos pacientes;
- d) Verificar associação do nível de metilação de DNA global com a SCA;
- e) Avaliar a relação do nível de metilação de DNA global com o escore de risco TIMI e com características clínicas, biológicas e hábito dos pacientes;
- f) Verificar os níveis séricos do NPY e do NPYR2 e sua relação com a SCA;
- g) Avaliar associação das variantes e do perfil de metilação de DNA global com os níveis séricos do NPY e do NPYR2.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Estudo observacional, analítico de corte transversal, com comparação entre grupos.

4.2 População e local de estudo

O estudo foi realizado com pacientes internados no Real Hospital do Coração (RHC) que pertence ao Real Hospital Português (RHP), situado em Recife – PE, no período de 2014 até 2018. Participaram pacientes adultos, acima de 18 anos de idade, de ambos os sexos, sabidamente coronarianos. Todos foram submetidos ao eletrocardiograma, ecocardiografia, a cineangiocardiografia, além das dosagens de marcadores de lesão miocárdica (CK-MB e troponina).

4.2.1 Grupo de pacientes com SCA

O grupo SCA foi composto por pacientes internados no RHP com diagnóstico de SCA (n = 221). Adicionalmente, foram coletados nos prontuários dados a respeito da presença de fatores de risco para SCA, como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo e dislipidemia. Houve uma estratificação neste grupo em dois subgrupos: esperado (homem \geq 65 anos; mulher \geq 55 anos) e precoce (homem $<$ 65 anos; mulher $<$ 55 anos) e esse ponto de corte (idade) está relacionado a faixa de idade que normalmente são encontrados indivíduos com SCA ou pode ser considerado um desenvolvimento precoce da SCA.

4.2.2 Grupos de comparação

Foram compostos por dois grupos, um grupo de pacientes internados no RHP sem SCA (sSCA), possuindo fibrilação atrial (n = 95) e um grupo saudável, formado por doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope) (n = 278). Neste último grupo, os indivíduos são submetidos a uma triagem por onde são realizadas entrevistas e exames laboratoriais para HIV, doença de chagas, hepatite C, sífilis e HTLV 1 e 2, para posteriormente serem considerados aptos para doação.

4.2.3 *Nível de gravidade*

O grupo SCA foi estratificado pelo escore de risco TIMI e constituídos por aqueles considerados de baixo, intermediário e alto risco (ANTMAN et al., 2000).

Na classificação para gravidade são considerados sete fatores de risco. Para cada fator é atribuído valor 0 ou 1, caso esteja ausente ou presente no caso clínico em questão. A presença de cada fator de risco adiciona um ponto ao escore total, que varia de zero a sete. Os pacientes foram avaliados da seguinte maneira: idade superior a 65 anos; três fatores de risco concomitantes para doença arterial coronariana; lesão prévia em artéria coronária > 50%; desvio do segmento ST durante a apresentação inicial; dois ou mais eventos anginosos nas últimas 24 horas; uso de ácido acetilsalicílico nos últimos sete dias; e elevação de marcadores séricos (ANTMAN et al., 2000). São considerados de baixo risco os pacientes que no final obtiverem 1 a 2 pontos, de médio risco 3 a 4 pontos e de alto risco 5 a 7 pontos.

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, pacientes com diagnóstico comprovado de SCA, após realização de exame físico, de eletrocardiograma, e de dosagem de marcadores de lesão miocárdica. Para os indivíduos saudáveis, doadores do banco de sangue foram previamente submetidos a uma triagem através de entrevista e posteriormente exames laboratoriais para certificar que os doadores estão em boas condições de saúde. Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.4 Critérios de exclusão

Para o grupo SCA e sSCA, foram excluídos do estudo indivíduos em uso de anti-inflamatórios, pacientes com traumas recentes, pacientes com história de processo infeccioso em atividade ou neoplasias e aqueles que não concordaram com a participação no estudo.

Foram excluídos do grupo saudável aqueles que apresentaram sorologia positiva para doenças infectoparasitárias e aqueles cujos exames sorológicos não foram encontrados no banco de dados.

4.5 Definição e categorização das variáveis

4.5.1 Variáveis dependentes

Foram consideradas variáveis dependentes à SCA:

- a) Escore de risco TIMI – definido pelo risco de morte e categorizado em risco baixo, intermediário ou moderado e alto;
- b) Número de lesões arteriais – definida por exame angiográfico e categorizada em 0, ≤ 2 e > 2 ;
- c) Fração de ejeção (FE) – definida por exame ecocardiográfico e categorizada em $\leq 50\%$ e $> 50\%$;
- d) Proteína c Reativa (PcR) – definida por exames laboratoriais, o seu valor normal dependerá da idade e do gênero e categorizada em normal (não) ou alterada (sim);
- e) CK-MB massa – dosagem acima de 5,6 ng/mL, categorizada em sim (dosagem acima de 5,6 ng/mL) ou não (normal);
- f) Troponina I – dosagem acima de 0,11 ng/mL, categorizada em sim (dosagem acima de 0,11 ng/mL) ou não (normal).

4.5.2 Variáveis independentes

Foram consideradas variáveis independentes à SCA:

- a) Gênero – Feminino ou masculino;
- b) Idade - Anos completos no momento da entrada ao RHP ou da coleta do material biológico;
- c) Início da SCA - Idade que o indivíduo estava quando foi diagnosticado com SCA, no momento da entrada ao RHP ou da coleta do material biológico, sendo levado em consideração o grupo esperado (Homem ≥ 65 anos; Mulher ≥ 55 anos) e precoce (Homem < 65 anos; Mulher < 55 anos);
- d) As variantes dos genes *NPY* e *NPYR2*:
 - *NPY* c. 20T>C (rs16139) - TT, TC/CC;
 - *NPY* c.84G>A (rs5572) - GG, GA/AA;
 - *NPY* c.150G>A (rs5573) - GG, GA/AA;

- NPY c.-485T>C (rs16147) - TT, TC/CC;
 - NPY2R c.-1088C>T (rs6857715) - TT, TC/CC;
 - NPY2R c.-1116A>G (rs6857530) - AA, AG/GG.
- e) Metilação de DNA global - Nível de metilação no DNA (hipermetilado ou hipometilado);
- f) Tabagismo – Consumo de qualquer quantidade diária de tabaco e categorizado em sim (tabagista) ou não;
- g) Dislipidemias – Alterações nos valores normais para colesterol, LDL, HDL ou triglicerídeos, categorizado em sim (alterado) ou não;
- h) Diabetes – Paciente em tratamento com hipoglicemiantes ou 2 episódios de glicemia em jejum \geq 126 mg/dL, categorizado em sim (diabético) ou não;
- i) Hipertensão - Pacientes em uso de antihipertensivos ou pressão arterial \geq 140/90mmHg em duas aferições, categorizado em sim (hipertenso) ou não;
- j) Dosagem dos níveis séricos do NPY e do NPYR2.

4.6 Obtenção das amostras

Durante a realização dos exames de rotina no RHC, que incluem as dosagens de CK-MB e troponina, e também coletados dois tubos, totalizando 10 ml de sangue (um tubo seco para dosagens do NPY e do NPYR2, e outro tubo com EDTA para análise das variantes dos genes e da metilação de DNA global).

4.7 Identificação das variantes

4.7.1 Extração e purificação de Ácidos Nucléicos

O DNA genômico foi extraído utilizando o “kit” illustra blood genomicPrep Mini Spin, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare Life Sciences).

4.7.2 Determinação das frequências das variantes nos genes do NPY e do NPYR2

As regiões onde se localizam as variantes de interesse para o gene do NPY, c. 20T>C

(rs16139), c.84G>A (rs5572), c.150G>A (rs5573) (BHASKAR et al., 2007), foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers utilizados para amplificar 516pb do exon 2 foram:

Forward - 5'CCTGGGTTCTCTCTGCGGGACTG'3

Reverse - 5'CCCATTTTGTGTAGAGTGTGCCCTGT'3.

Como controle negativo, foram utilizados os reagentes sem adição de DNA.

A genotipagem das variantes do *NPY* foi realizada por PCR convencional utilizando a Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (Invitrogen Life Technologies), para volume final de 25 µl (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5%.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, em seguida, 35 ciclos compostos por desnaturação (95 °C por 1 minuto), anelamento (60 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C, por 45 segundos) e, por fim, uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram encaminhados ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (NPT/CPqAM) para sequenciamento, os quais foram analisados no programa Chromas Lite 2.01.

A análise das variantes do *NPY*, c.-485T> C (rs16147) (Assay ID C__2267279_10), e do *NPYR2*, c.-1088C>T (rs6857715) (Assay ID C__29013142_10) e c.-1116A>G (rs6857530) (Assay ID C__44837_30), foi realizada através de PCR em tempo real usando sondas específicas (Applied biosystems). A genotipagem foi realizada utilizando o 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos, e 40 ciclos compostos por desnaturação (92 °C por 15 segundos), anelamento (60 °C por 60 segundos) e extensão (60 °C, por 60 segundos) e, por fim, uma extensão final de 60 °C por 60 segundos.

4.8 Avaliação do nível de metilação de DNA global

Para quantificar o DNA genômico foi utilizado o NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo scientific, Wilmington, DE). Os níveis de metilação de DNA global foram obtidos através de um kit comercial baseado em ELISA (5-mC DNA ELISA Kit, Zymo Research, Irvine, CA, EUA). O kit permite a detecção de 5-metilcitosina (5-mC) global no DNA, pois contém um anticorpo monoclonal sensível e específico para 5-mC.

O 5-mC DNA ELISA é um kit de alto rendimento que possui uma placa de 96 poços e a porcentagem de 5-mC em uma amostra de DNA (100 ng) que pode ser quantificada com precisão a partir de uma curva padrão gerada com controles (100 ng) incluídos no kit.

As amostras de DNA foram desnaturadas e incubadas na placa, seguindo o protocolo do fabricante e finalmente mensuradas na absorvância de 405 nm usando o leitor de placa de Elisa Multiskan FC (Thermo scientific).

A quantificação de metilação global do DNA (%5-mC) foi obtida através de uma equação derivada da regressão polinomial de segunda ordem [%5-mC (x)= e(y-b/m)], e posteriormente ajustada para %CpG de metilação multiplicando pelo fator 8,2. Esse fator foi obtido a partir da divisão dos sítios CpG/comprimento do genoma de *Escherichia coli* (0,0747) pelo de humano (0,0091). A razão pela qual foi ajustado para a metilação de %CpG em humano é porque os DNAs padrão (controles) são compostos de DNA de E. coli metilado e não metilado, e esses DNAs tem um número maior de sítios CpG do que a maioria das espécies de mamíferos. Portanto, os valores das amostras são calculados diretamente da curva padrão e teriam um % 5mC ligeiramente menor do que o %5mC global real.

Para cada amostra, a análise de metilação foi realizada em duplicata.

4.9 Dosagem dos níveis séricos do NPY e do NPYR2

O NPY e o NPYR2 foram dosados no soro através dos kits Human NPY (Neuropeptide Y) ELISA Kit (MyBioSource) e do Human Neuropeptide Y Receptor Y2 ELISA Kit, respectivamente, utilizando o método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para obtenção de suas concentrações. Todas as etapas seguiram o protocolo específico contido nos kits. As leituras e os cálculos das concentrações referentes às dosagens em questão foram realizados usando o leitor de placa de Elisa Multiskan FC (Thermo scientific) e mensuradas na absorvância de 450 nm.

4.10 Análise estatística

A análise foi realizada no Laboratório de Métyodos Quantitativos do Departamento de Saúde Coletiva (NESC) do IAM-Fiocruz e foi utilizado o software R (The R Project for Statistical Computing, R Development Core Team) – versão 2.10. Primeiramente, foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo também o uso de

algumas medidas descritivas. Para a análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste qui-quadrado, e quando necessário Fisher. Também se utilizou uma abordagem com a análise univariada de cada uma das variáveis independentes com a variável resposta, onde a força de associação entre as variáveis independentes e a variável resposta foi expressa pela Razão de Chances “Odds Ratio (OR)” com intervalo de confiança 95%. Para o cálculo da Razão de Chances foi utilizado a regressão logística (binomial/multinomial).

Na análise das variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas e, para a análise comparativa das variáveis foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou T-Student. A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre duas variáveis contínuas e as demais conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto intitulado: “Avaliação da influência do neuropeptídeo Y na síndrome coronariana aguda” se encontra inserido no projeto: “Preditores para a síndrome coronariana aguda: avaliação do valor prognóstico de biomarcadores e polimorfismos genéticos na estratificação de risco”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Procárdio/Realcor do Real Hospital Português (CAAE: 03187512.2.0000.5202 /parecer nº 631.090), em abril de 2014 (Anexo A).

Os pacientes com SCA (Apêndice A) e sSCA (Apêndice B) do RHP, além dos indivíduos saudáveis do Hemope (Apêndice C) participantes do estudo foram orientados sobre a pesquisa em questão e assinaram o TCLE.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da população estudada

De um total de 221 pacientes com SCA, a maioria (76,02%) foi do gênero masculino. Esta distribuição também foi observada para o grupo sSCA e saudável sendo 52,69% (49/93) e 84,17% (234/278), respectivamente.

As medianas das idades dos pacientes com SCA, sem SCA e grupo saudável foram 60, 63 e 45 anos, respectivamente, não foram encontradas diferenças entre os grupos SCA e sSCA ($p = 0,7775$) mas foi encontrada entre os grupos com SCA e saudável ($p < 0,0001$).

Os pacientes com a SCA foram classificados de acordo com o risco TIMI, apresentando uma distribuição de 34,84% (77/221) com nível baixo, 46,61% (103/221) nível intermediário e 18,55% (41/221) nível alto. (Tabela 1).

Foi observado inicialmente que a SCA estaria associada ao gênero, tabagismo, diabetes e dislipidemia, mas não com a hipertensão, porém com a análise de regressão multivariada a variável diabetes perdeu a significância (Tabela 1). Em relação ao gênero, foi demonstrado que os homens possuem uma chance em torno de duas vezes a mais de desenvolver a SCA comparado às mulheres. Os indivíduos tabagistas também teriam em torno de duas vezes de chances de ter SCA quando comparado aos não tabagistas. E os indivíduos com dislipidemia possuem um pouco acima de três vezes de chances de ter a SCA quando comparados aos não portadores desse fator de risco.

Tabela 1 - Características biológicas, clínicas e hábitos de pacientes sSCA e SCA.

(continua)

Características	sSCA		SCA		OR	IC 95%		p
	N*	%	N (221)	%		Inf	Sup	
GÊNERO								
Feminino	49	52,69	168	76,02	1,00			
Masculino	44	47,31	53	23,98	2,42	1,41	4,15	0,0014
TABAGISMO								
Não	82	89,13	162	73,3	1,00			
Sim	10	10,87	59	26,7	2,31	1,13	5,13	0,0291
DISLIPIDEMIA								
Não	66	71,74	89	40,27	1,00			
Sim	26	28,26	132	59,73	3,24	1,90	5,95	< 0,0001

Tabela 1 - Características biológicas, clínicas e hábitos de pacientes sSCA e SCA (conclusão).

Características	sSCA		SCA		OR	IC 95%		p
	N*	%	N (221)	%		Inf	Sup	
TIMI								
Baixo	-	-	77	34,84	-	-	-	-
Intermediário	-	-	103	46,61	-	-	-	-
Alto	-	-	41	18,55	-	-	-	-
Alteração de PcR								
Não	-	-	71	35,50	-	-	-	-
Sim	-	-	129	64,50	-	-	-	-
NE	-	-	21		-	-	-	-
LA								
0	-	-	13	6,37	-	-	-	-
≤2	-	-	104	50,98	-	-	-	-
>2	-	-	87	42,65	-	-	-	-
NE	-	-	17		-	-	-	-
TROPONINA I > 0,11 ng/mL								
Não	-	-	31	14,16	-	-	-	-
Sim	-	-	188	85,84	-	-	-	-
NE	-	-	2		-	-	-	-
CK-MB massa >5,6 ng/MI								
Não	-	-	63	31,34	-	-	-	-
Sim	-	-	138	68,66	-	-	-	-
NE	-	-	20		-	-	-	-
FE								
<50%	-	-	71	33,18	-	-	-	-
≥50%	-	-	122	57,01	-	-	-	-
NE	-	-	21	9,81	-	-	-	-

Fonte: a autora

Nota: *O N amostral dentro do grupo sSCA varia (para gênero = 93 e tanto tabagismo, diabetes, hipertensão e dislipidemia = 92); NE: Dados não encontrados; TIMI: TIMI risk; PcR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística - OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p:valor de p.

6.2 Análise das variantes do NPY e do NPYR2 com a SCA

Os grupos SCA e saudável apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$) para todas as variantes dos *NPY* e *NPYR2*. No grupo sSCA, as variantes *NPY* c.150G>A, *NPYR2* c.-1088C>T e c.-1116A>G mostraram estar em HWE, não se encontraram em equilíbrio gênico as *NPY* c.20T>C e *NPY* c.84 G>A. Logo, não houve a realização de análises estatísticas envolvendo essas duas populações.

A *NPY* c.20T>C mostrou como maioria o genótipo TT (94,57%) no grupo com SCA,

enquanto que 5,43% dos pacientes possuem o genótipo TC. No grupo sSCA, 94,51% das amostras apresentaram genótipo TT, enquanto que 5,49% apresentaram o genótipo TC ou CC (Tabela 2). No grupo saudável, 96,40% das amostras apresentaram genótipo TT, enquanto que apenas 3,60% apresentaram o genótipo TC e quando realizada a análise após o ajuste pela idade foi verificada um ganho de associação entre essa variante e a SCA, que antes estava com $p = 0,3251$ para o TC/CC e $p = 0,3307$ para o alelo C e posteriormente ficou com $p = 0,0274$ para o TC/CC e $p = 0,0294$ para o alelo C, com chances em torno de três vezes do indivíduo que possui o genótipo TC/CC ou o alelo C desenvolver a SCA, como pode ser observado na tabela 3.

Em relação a NPY c.84G>A, os resultados mostram que 93,67% dos pacientes com SCA apresentaram genótipo GG, enquanto que 6,33% dos pacientes apresentaram genótipos GA ou AA. Os resultados mostraram que 92,31% das amostras de indivíduos sSCA apresentaram genótipo GG, enquanto que apenas 7,69% apresentaram genótipo GA ou AA (Tabela 2). Os resultados mostraram que 94,96% das amostras de indivíduos saudáveis apresentaram genótipo GG, enquanto que apenas 5,04% apresentaram genótipo GA ou AA. Não houve associação com a NPY c.84G>A e a SCA, entre as populações dos grupos SCA e saudável (Tabela 3).

Os resultados da NPY c.150G>A mostraram que 24,89% dos pacientes com SCA tem genótipo GG, enquanto 75,11% desses apresentam genótipos GA/AA. Entre os pacientes sSCA, 32,97% apresentam o genótipo GG, enquanto 67,03% apresentam o GA ou AA (Tabela 2). Em relação ao grupo saudável, o genótipo GG estava presente em 27,34%, enquanto 72,66% apresentaram GA/AA (Tabela 3). Não houve diferença estatística entre as populações dos três grupos.

No que se refere a variante do NPY c.-485T>C, 26,61%, do grupo SCA possuem genótipo TT, enquanto 73,39% desses apresentam genótipos TC/CC. Entre os pacientes sSCA, 25,81% tem o genótipo TT, enquanto 74,19% apresentam o TC/CC. Não existe associação entre essa variante e SCA (Tabela 2). No grupo saudável, os indivíduos possuem 24,22% do genótipo TT, enquanto 75,78% apresentaram TC/CC (Tabela 3). Nas duas análises realizadas com as três populações não encontramos associação entre a c.-485T>C e a SCA.

Em relação a NPYR2 c.-1088C>T, a distribuição genotípica no SCA mostrou que 17,65% têm o genótipo TT, enquanto 82,35% possuem TC/CC. No grupo sSCA, 24,21% dos pacientes apresentaram genótipo TT, enquanto 75,79% tinham os genótipos TC/CC (Tabela 2). No grupo saudável, 21,57% de indivíduos apresentaram o genótipo TT, enquanto 78,43% foram compostos do genótipo TC/CC (Tabela 3). Nas duas análises realizadas com as três

populações não encontramos associação entre a c.-485T>C e a SCA.

Os resultados relacionados à NPY2R c.-1116A> G mostraram que os pacientes do grupo SCA apresentam 33,48% o genótipo AA, enquanto 66,52% possuem o genótipo AG ou GG. No grupo sSCA, 26,32% apresentam o genótipo AA, enquanto que 73,68% tem o genótipo AG ou GG (Tabela 2). Nos indivíduos do grupo saudável, 21,50% possuem o genótipo AA, enquanto 78,50% têm AG/GG (Tabela 3). Quando realizada a análise regressão logística foi verificada uma associação da c.-1116A> G com a SCA ($p = 0,0054$ para o AG/GG e $p = 0,0109$ para o alelo G), entre o grupo saudável e SCA, porém após o ajuste pela idade houve a perda dessa associação ($p = 0,4619$ para o AG/GG e $p = 0,2982$ para o alelo G), como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 2 - Análise das variantes dos genes *NPY* e *NPY2R* nos grupos sSCA e SCA

(continua)

Variantes	sSCA		SCA		OR	IC 95%		p
	N**	%	N	%		Inf	Sup	
NPY c.20T> C (rs16139)								
TT	86	94,51	209	94,57	*			
TC/CC	5	5,49	12	5,43	*	*	*	*
Alelos								
T	176	96,7	430	97,29	*			
C	6	3,3	12	2,71	*	*	*	*
NPY c.84G>A (rs5572)								
GG	84	92,31	207	93,67	*			
GA/AA	7	7,69	14	6,33	*	*	*	*
Alelos								
G	174	95,6	427	96,6	*			
A	8	4,4	15	3,4	*	*	*	*
NPY c.150G>A (rs5573)								
GG	30	32,97	55	24,89	1,00			
GA/AA	61	67,03	166	75,11	1,48	0,87	2,52	0,1463
Alelos								
G	98	53,85	220	49,77	1,00			
A	84	46,15	222	50,23	1,18	0,82	1,69	0,4027

Tabela 2 - Análise das variantes dos genes NPY e NPYR2 nos grupos sSCA e SCA

(conclusão)

Variantes	sSCA		SCA		OR	IC 95%		p
	N**	%	N	%		Inf	Sup	
NPY c.-485T>C (rs16147)***								
TT	24	25,81	58	26,61	1,00			
TC/CC	69	74,19	160	73,39	0,96	0,55	1,65	0,8836
Alelos								
T	87	46,77	224	51,38	1,00			
C	99	53,23	212	48,62	0,83	0,58	1,19	0,3354
NPYR2 c.-1088T>C (rs6857715)								
TT	23	24,21	39	17,65	1,00			
TC/CC	72	75,79	182	82,35	1,49	0,82	2,66	0,1796
Alelos								
T	92	48,42	188	42,53	1,00			
C	98	51,58	254	57,47	1,27	0,89	1,81	0,2010
NPYR2 c.-1116A> G (rs6857530)								
AA	25	26,32	74	33,48	1,00			
AG/GG	70	73,68	147	66,52	0,71	0,41	1,20	0,2089
Alelos								
A	95	50	257	58,14	1,00			
G	95	50	185	41,86	0,72	0,45	1,14	0,1699

Fonte: a autora

Nota: * Dados não analisados; **: O N amostral nas populações das variantes do grupo sSCA varia (para as NPY c.20T> C, NPY c.84G>A e NPY c.150G>A = 91; NPY c.-485T>C = 93; NPYR2 c.-1088C> T = 95; NPYR2 c.-1116A> G = 95); ***: O N amostral no grupo SCA é de 218; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p.

Tabela 3 - Análise das variantes dos genes NPY e NPYR2 nos grupo Saudável e SCA.

(continua)

Variantes	Saudável		SCA		OR	IC 95%		p-valor	OR _{Idade}	IC 95%		p
	N*	%	N (221)	%		Inf	Sup			Inf	Sup	
NPY c.20T> C (rs16139)												
TT	268	96,4	209	94,57	1,00				1,00			
TC/CC	10	3,6	12	5,43	1,54	0,65	3,71	0,3251	3,22	1,14	9,23	0,0274
Alelos												
T	546	98,2	430	97,29					1,00			
C	10	1,8	12	2,71	1,52	0,65	3,64	0,3307	3,09	1,11	8,65	0,0294
NPY c.84G>A (rs5572)												
GG	264	94,96	207	93,67	1,00				1,00			
GA/AA	14	5,04	14	6,33	1,28	0,59	2,76	0,5320	1,66	0,61	4,47	0,3189
Alelos												
G	542	97,48	427	96,6	1,00				1,00			
A	14	2,52	15	3,4	1,36	0,64	2,87	0,415	1,74	0,66	4,51	0,2579

Tabela 3 - Análise das variantes dos genes *NPY* e *NPYR2* nos grupo Saudável e SCA.

(conclusão)

Variantes	Saudável		SCA		OR	IC 95%		p-valor	OR _{idade}	IC 95%		p
	N*	%	N (221)	%		Inf	Sup			Inf	Sup	
NPY												
c.150G>A (rs5573)												
GG	76	27,34	55	24,89	1,00				1,00			
GA/AA	202	72,66	166	75,11	1,14	0,76	1,70	0,5366	1,30	0,75	2,27	0,3549
Alelos												
G	289	51,98	220	49,77	1,00				1,00			
A	267	48,02	222	50,23	1,09	0,85	1,40	0,4889	1,22	0,88	1,71	0,2376
NPY c.-485T>C (rs16147)**												
TT	31	24,22	58	26,61	1,00				1,00			
TC/CC	97	75,78	160	73,39	0,88	0,53	1,45	0,6240	0,76	0,40	1,42	0,3928
Alelos												
T	121	47,27	224	51,38	1,00				1,00			
C	135	52,73	212	48,62	0,85	0,62	1,16	0,2966	0,77	0,52	1,14	0,1951
NPYR2 c.-1088T>C (rs6857715)												
TT	44	21,57	39	17,65	1,00				1,00			
TC/CC	160	78,43	182	82,35	1,28	0,79	2,08	0,3089	0,92	0,49	1,75	0,8040
Alelos												
T	201	49,26	188	42,53	1,00				1,00			
C	207	50,74	254	57,47	1,31	1,00	1,72	0,0493	1,15	0,80	1,64	0,447
NPYR2 c.-1116A>G (rs6857530)												
AA	46	21,5	74	33,48	1,00				1,00			
AG/GG	168	78,5	147	66,52	0,54	0,35	0,83	0,0054	0,81	0,46	1,43	0,4619
Alelos												
A	212	49,53	257	58,14	1,00				1,00			
G	216	50,47	185	41,86	0,71	0,54	0,92	0,0109	0,83	0,58	1,18	0,2982

Fonte: a autora

Nota: *O N amostral nas populações das variantes do grupo saudável varia (para as NPY c.20T>C, NPY c.84G>A e NPY c.150G>A = 278; NPY c.-485T>C = 128; NPYR2 c.-1088C>T = 204; NPYR2 c.-1116A>G = 214); **: O N amostral no o grupo SCA é de 218; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p; OR_{IDADE}: Odds Ratio ajustada pela idade.

6.3 Relação das variantes com o risco TIMI

Foi observada uma associação entre o risco TIMI com a variante NPY c.20T>C. A

NPY c.20T>C apresentou diferença ($p = 0,0261$; $OR = 4,00$) entre os grupos de risco TIMI baixo e intermediário/alto. No grupo de risco TIMI baixo, a distribuição genotípica foi de 89,61% TT e 10,39% TC/CC, enquanto no grupo de risco TIMI intermediário/alto, 97,22% possuem o genótipo TT e 2,78% os TC/CC (Tabela 4).

Em relação a variante NPY c.84 G>A, o grupo de risco TIMI baixo apresentou uma distribuição de 92,21% para GG e 7,79% GA/AA, enquanto no grupo de risco TIMI intermediário/alto, 94,44% possuem o genótipo GG e 5,56% os GA/AA (Tabela 4). Não foi observada diferença estatística entre essa variante e o risco TIMI.

Para a variante NPY c.150 G>A, o grupo de risco TIMI baixo teve uma distribuição de 28,57% para GG e 71,43% GA/AA, enquanto o grupo de risco TIMI intermediário/alto apresentou 22,92% para GG e 77,08% para GA/AA (Tabela 4). Não foi observada associação entre essa variante e o risco TIMI.

A variante NPY c.-485T>C foi encontrada no grupo de risco TIMI baixo com uma distribuição de 27,63% para TT e de 72,37% TC/CC e o grupo de risco TIMI intermediário/alto mostrou 26,06% para TT e 73,94% para TC/CC (Tabela 4). Não foi houve associação entre essa variante e o risco TIMI.

Em relação a variante c.-1088 C> T do *NPYR2*, o grupo de risco TIMI baixo possui uma distribuição de 18,18% para TT e 81,82% TT/TC e o grupo de risco TIMI intermediário/alto teve 17,36% para TT e 82,64% para TT/TC (Tabela 4). Não foi observada diferença estatística entre essa variante e o risco TIMI.

A *NPYR2* c.-1116A> G, o grupo de risco TIMI baixo apresentou 25,97% do genótipo AA e 74,03% para AG/GG. No grupo de risco intermediário/alto do TIMI, 37,50% dos pacientes possuem genótipo AA e 62,50% os AG/GG (Tabela 4). E também essa variante não apresentou associação com o risco TIMI.

Tabela 4 - Análise das variantes dos genes NPY e NPYR2 entre os graus de risco TIMI no grupo SCA

(continua)

Variantes	Escore de risco TIMI						
	Baixo (n = 77)		Intermediário/Alto (n = 144)		Intermediário/Alto* x Baixo		
	N	%	n	%	OR	95% IC	p -
NPY c.20T> C (rs16139)							
TT	69	89,61	140	97,22	1		
TC/CC	8	10,39	4	2,78	4,00	1,23 - 16,66	0,0261

Tabela 4 - Análise das variantes dos genes *NPY* e *NPYR2* entre os graus de risco TIMI no grupo SCA (conclusão)

Variantes	Escore de risco TIMI						
	Baixo (n = 77)		Intermediário/Alto (n = 144)		Intermediário/Alto* x Baixo		
	N	%	n	%	OR	95% IC	p
NPY c.84G>A (rs5572)							
GG	71	92,21	136	94,44	1		
AG/AA	6	7,79	8	5,56	1,43	0,46 - 4,35	0,5173
NPY c.150G>A (rs5573)							
GG	22	28,57	33	22,92	1		
GA/AA	55	71,43	111	77,08	0,74	0,39 - 1,41	0,3551
NPY c.-485T>C (rs16147)**							
TT	21	27,63	37	26,06	1		
TC/CC	55	72,37	105	73,94	0,92	0,49 - 1,75	0,802
NPYR2 c.-1088T>C (rs6857715)							
TT	14	18,18	25	17,36	1		
TC/CC	63	81,82	119	82,64	0,83	0,45 - 1,49	0,5300
NPYR2 c.-1116A> G (rs6857530)							
AA	20	25,97	54	37,50	1		
AG/GG	57	74,03	90	62,50	1,72	0,93 - 3,22	0,0852

Fonte: a autora

Nota: * Referência; **Possue o N amostral de 76 do grupo TIMI baixo e 142 no Intermediário/Alto; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p

6.4 Relação entre as variantes e as características clínicas, biológicas e hábito

Também foi analisada a existência de associação entre as seis variantes com gênero, início da SCA, gênero/tempo, tabagismo, diabetes, hipertensão, dislipidemia, níveis alterados da proteína C-reativa (PCR), número de lesões arteriais, níveis alterados da troponina, níveis alterados da CK-MB massa e a fração de ejeção no grupo SCA.

Em relação a variante c.20T>C do *NPY* não foi observado associação com as variáveis (Apêndice D). No entanto, a variante *NPY* c.84G>A se mostrou associada à hipertensão, indicando que indivíduos dentro do grupo SCA que não possuem os genótipos GA/AA tem uma chance de risco de 3,57 a mais de ter a hipertensão ($p = 0,0223$; $OR = 3,57$), como pode ser observado na tabela 5.

Na *NPY* c.150G>A é demonstrada uma forte tendência para um fator de proteção de 48% para dislipidemia no grupo SCA ($p = 0,0532$; $OR = 0,52$), como se pode verificar na

tabela 6. Em relação às variantes NPY c.-485T>C (Apêndice E) e NPYR2 c.-1088C>T (Apêndice F) nenhuma associação foi encontrada com as variáveis.

Entretanto, a variante NPYR2 c.-1116A>G mostrou associação com o tempo de início da SCA (Tabela 7), indicando que o indivíduo que possui essa variante tem quase duas vezes de chances de desenvolver a síndrome precocemente ($p = 0,0253$; OR = 1,91).

Tabela 5 - Análise da variante c.84G>A do NPY com as características biológicas, clínicas e hábitos (continua).

Variáveis	NPY c.84G>A (rs5572)				OR	IC 95%		p
	GG		GA/AA			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
GÊNERO								
Masculino	156	75,36	12	85,71	1,00			
Feminino	51	24,64	2	14,29	0,51	0,08	1,95	0,3881
INÍCIO DA SCA								
Esperado	95	45,89	4	28,57				
Precoce	112	54,11	10	71,43	2,12	0,69	7,93	0,2162
GÊNERO/TEMPO								
Masculino								
Esperado	54	34,62	3	25	1,00			
Precoce	102	65,38	9	75	1,5882	0,45	7,38	0,501
Feminino								
Esperado	41	80,39	1	50	1,00			
Precoce	10	19,61	1	50	4,1	0,15	109,92	0,333
Esperado								
Homem	54	44,26	3	60	1,00			
Mulher	68	55,74	2	40	0,5294	0,07	3,30	0,4945
Precoce								
Homem	102	82,26	9	90				
Mulher	22	17,74	1	10	0,5152	0,03	2,95	0,539
TABAGISMO								
Não	150	72,46	12	85,71	1,00			
Sim	57	27,54	2	14,29	2,27	0,60	14,29	0,2903
DIABETES								
Não	117	56,52	9	64,29	1,00			
Sim	90	43,48	5	35,71	1,38	0,46	4,55	0,5715
HIPERTENSÃO								
Sim	45	21,74	7	50,00	1,00			
Não	162	78,26	7	50,00	3,57	1,18	11,11	0,0223

Tabela 5 - Análise da variante c.84G>A do NPY com as características biológicas, clínicas e hábitos. (conclusão)

Variáveis	NPY c.84G>A (rs5572)				OR	IC 95%		p
	GG		GA/AA			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
HIPERTENSÃO								
Sim	45	21,74	7	50,00	1,00			
Não	162	78,26	7	50,00	3,57	1,18	11,11	0,0223
DISLIPIDEMIA								
Não	84	40,58	5	35,71	1,00			
Sim	123	59,42	9	64,29	0,81	0,2427	2,4390	0,7198
Ateração de PcR								
Não	65	34,76	6	46,15	1,00			
Sim	122	65,24	7	53,85	0,62	0,20	2,00	0,4100
LA								
0	11	5,79	2	14,29	1,00			
≤2	96	50,53	8	57,14	0,46	0,09	2,43	0,3597
>2	83	43,68	4	28,57	0,26	0,04	1,62	0,1503
TROPONINA > 0,11 ng/mL								
Não	30	14,63	1	7,14	1,00			
Sim	175	85,37	13	92,86	2,23	0,42	41,22	0,4481
CK-MB massa >5,6 ng/mL								
Não	58	30,85	5	38,46	1,00			
Sim	130	69,15	8	61,54	0,71	0,23	2,45	0,5688
FE								
<50%	66	36,67	5	38,46	1,00			
≥50%	114	63,33	8	61,54	0,93	0,30	3,17	0,8969

Fonte: a autora

Nota: PcR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p

Tabela 6 - Análise da variante c.150G>A do NPY com as características biológicas, clínicas e hábito.

(continua)

Variáveis	NPY c.150G>A (rs5573)				OR	IC 95%		p
	GG		GA/AA			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
GÊNERO								
Masculino	41	74,55	127	76,51	1,00			
Feminino	14	25,45	39	23,49	0,90	0,45	1,86	0,7680
INÍCIO DA SCA								
Esperado	26	47,27	73	43,98	1,00			
Precoce	29	52,73	93	56,02	1,14	0,62	2,11	0,6701
GÊNERO/TEMPO								
Masculino								
Esperado	15	36,59	42	33,07	1,00			
Precoce	26	63,41	85	66,93	1,1676	0,5509	2,4166	0,6796

Tabela 6 - Análise da variante c.150G>A do NPY com as características biológicas, clínicas e hábito.

(conclusão)

Variáveis	NPY c.150G>A (rs5573)				OR	IC 95%		p
	GG		GA/AA			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
Feminino								
Esperado	11	78,57	31	79,49	1,00			
Precoce	3	21,43	8	20,51	0,9462	0,2254	4,899	0,9422
Esperado								
Homem	15	41,67	42	46,15	1,00			
Mulher	21	58,33	49	53,85	0,8333	0,3771	1,8107	0,647
Precoce								
Homem	26	83,87	85	82,52	1,00			
Mulher	5	16,13	18	17,48	1,1012	0,3943	3,5899	0,8616
TABAGISMO								
Não	42	76,36	120	72,29	1,00			
Sim	13	23,64	46	27,71	1,24	0,62	2,59	0,5543
DIABETES								
Não	34	61,82	92	55,42	1,00			
Sim	21	38,18	74	44,58	1,30	0,70	2,46	0,4069
HIPERTENSÃO								
Não	10	18,18	42	25,30	1,00			
Sim	45	81,82	124	74,70	0,66	0,29	1,37	0,2830
DISLIPIDEMIA								
Não	16	29,09	73	43,98	1,00			
Sim	39	70,91	93	56,02	0,52	0,26	0,99	0,0532
Alteração de PcR								
Não	20	41,67	51	33,55	1,00			
Sim	28	58,33	101	66,45	1,41	0,72	2,74	0,3069
LA								
0	3	5,56	10	6,67	1,00			
≤2	27	50	77	51,33	0,86	0,22	3,34	0,8224
>2	24	44,44	63	42	0,79	0,20	3,11	0,7330
TROPONINA > 0,11 ng/mL								
Não	7	12,96	24	14,55	1,00			
Sim	47	87,04	141	85,45	0,88	0,33	2,07	0,7723
CK-MB massa >5,6 ng/mL								
Não	21	38,89	42	28,57	1,00			
Sim	33	61,11	105	71,43	1,59	0,82	3,05	0,1639
FE								
<50%	19	44,19	52	34,67	1,00			
≥50%	24	55,81	98	65,33	1,49	0,74	2,97	0,2553

Fonte: a autora

Nota: PcR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p

Tabela 7 - Análise da variante c.-1116A> G do *NPYR2* com as características biológicas, clínicas e hábitos.
(continua)

Variáveis	NPYR2 c.-1116A> G (rs6857530)				OR	IC 95%		p
	AA		AG/GG			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
GÊNERO								
Masculino	53	71,62	115	78,23	1,00			
Feminino	21	28,38	32	21,77	0,70	0,37	1,34	0,2787
INÍCIO DA SCA								
Esperado	41	55,41	58	39,46	1,00			
Precoce	33	44,59	89	60,54	1,91	1,09	3,37	0,0253
GÊNERO/TEMPO								
Masculino								
Esperado	23	43,4	34	29,57	1,00			
Precoce	30	56,6	81	70,43	1,8265	0,9275	3,5934	0,0802
Feminino								
Esperado	18	85,71	24	75	1,00			
Precoce	3	14,29	8	25	2	0,4983	10,1178	0,3524
Esperado								
Homem	23	48,94	34	41,46	1,00			
Mulher	24	51,06	48	58,54	1,3529	0,657	2,7931	0,4114
Precoce								
Homem	30	78,95	81	82,65	1,00			
Mulher	8	21,05	17	17,35	0,787	0,3145	2,1008	0,6172
TABAGISMO								
Não	55	74,32	107	72,79	1,00			
Sim	19	25,68	40	27,21	1,08	0,58	2,07	0,8077
DIABETES								
Não	41	55,41	85	57,82	1,00			
Sim	33	44,59	62	42,18	0,91	0,52	1,60	0,7319
HIPERTENSÃO								
Não	16	21,62	36	24,49	1,00			
Sim	58	78,38	111	75,51	0,85	0,43	1,64	0,6354
DISLIPIDEMIA								
Não	30	40,54	59	40,14				
Sim	44	59,46	88	59,86	1,02	0,57	1,79	0,9539
Alteração de PcR								
Não	24	34,29	47	36,15	1,00			
Sim	46	65,71	83	63,85	0,92	0,50	1,69	0,7923
LA								
0	5	7,35	8	5,88	1,00			
≤2	35	51,47	69	50,74	1,23	0,38	4,05	0,7307
>2	28	41,18	59	43,38	1,32	0,39	4,39	0,6541

Tabela 7 - Análise da variante c.-1116A> G do *NPYR2* com as características biológicas, clínicas e hábitos.
(conclusão)

Variáveis	NPYR2 c.-1116A> G (rs6857530)				OR	IC 95%		p
	AA		AG/GG			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
TROPONINA > 0,11 ng/mL								
Não	13	58,82	18	56,62	1,00			
Sim	60	41,18	128	43,38	1,54	0,70	3,33	0,2752
CK-MB massa >5,6 ng/mL								
Não	20	30,30	43	31,85	1,00			
Sim	46	69,70	92	68,15	0,93	0,49	1,75	0,8241
FE								
<50%	26	40,00	45	35,16	1,00			
≥50%	39	60,00	83	64,84	1,23	0,66	2,27	0,5099

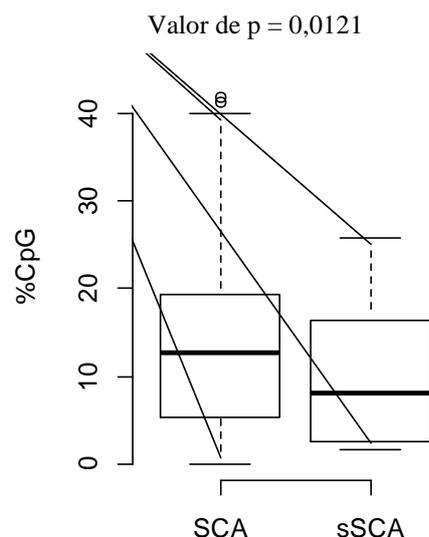
Fonte: a autora

Nota: PCR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p

6.5 Avaliação do perfil de metilação de DNA global nos grupos

Os grupos SCA e sSCA possuem perfis de metilação diferentes ($p = 0,0121$), assim como podemos observar na figura 9. O grupo SCA se mostrou com um nível de metilação de DNA global mais elevado comparado ao sSCA.

Figura 9 - Box-plot (mediana e quartis) do %CpG nos grupos SCA e sSCA.



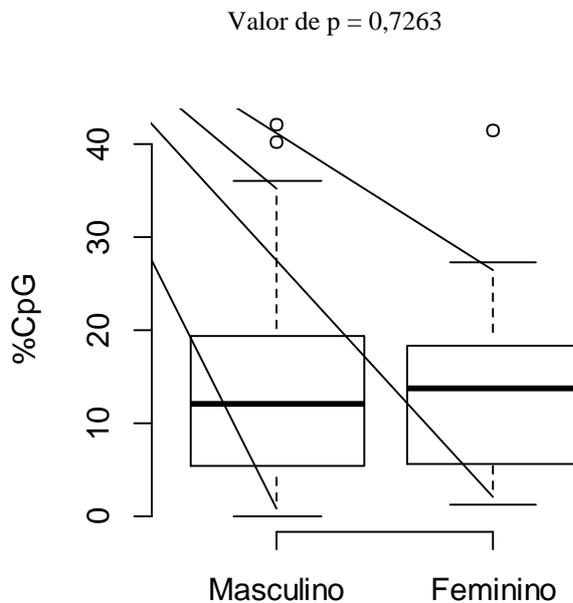
Fonte: a autora

Legenda: Medianas de %CpG no grupo SCA (12,62%) e do sSCA (8,16%); p (Teste Mann-Whitney)

6.6 Avaliação do perfil de metilação de DNA global com gênero e idade no grupo SCA

Comparando os gêneros masculino e feminino podemos observar que não existe diferença estatística nos perfis de metilação (Figura 10), porém quando analisando os grupos esperado e precoce obteve-se uma diferença significativa ($p = 0,0486$), ou seja, eles compõem perfis de metilação diferentes (Figura 11). Ao separar os grupos esperado e precoce por gênero é observado que é o gênero masculino ($p = 0,0278$) que está influenciando o resultado do esperado e precoce geral, apresentando o grupo de homens precoce (homen < 65 anos) com um perfil de hipermetilação comparado ao esperado (homen ≥ 65 anos; Figura 12A). Como pode ser verificado na figura 12B, dentro do gênero feminino (esperado, ≥ 55 anos e precoce < 55 anos) não houve diferença estatística.

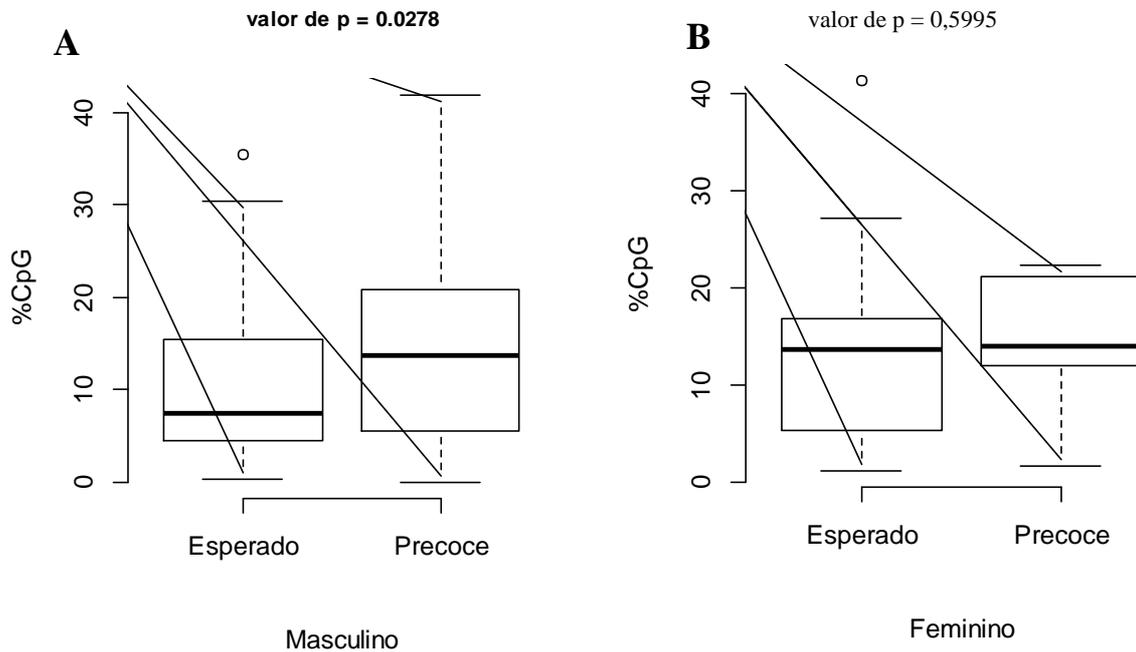
Figura 10- Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos gêneros do grupo SCA



Fonte: a autora

Legenda Medianas de %CpG no gênero masculino (12,02%) e no feminino (13,63%); valor de p (Mann-Whitney)

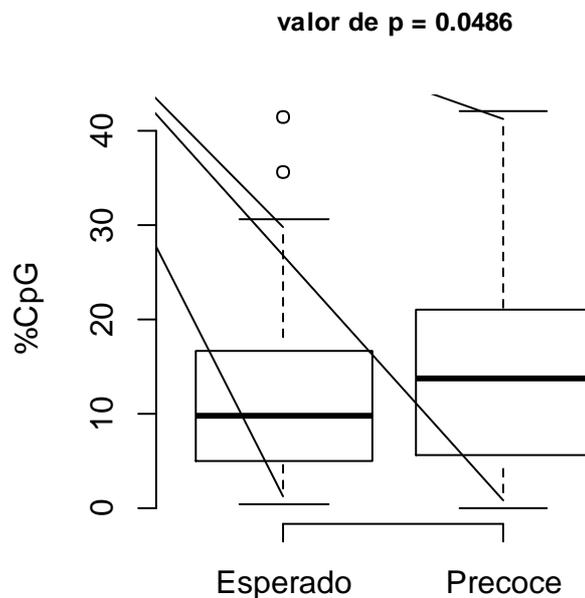
Figura 12- Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos grupos esperado e precoce por gêneros do grupo SCA



Fonte: a autora

Legenda: A = Medianas de %CpG no grupo esperado (7,45%) e precoce (13,76%) do gênero masculino .
 B = Medianas de %CpG no grupo esperado (13,63%) e precoce (13,92%) do feminino .
 Valor de p (Mann-Whitney)

Figura 11- Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos grupos esperado e precoce do SCA



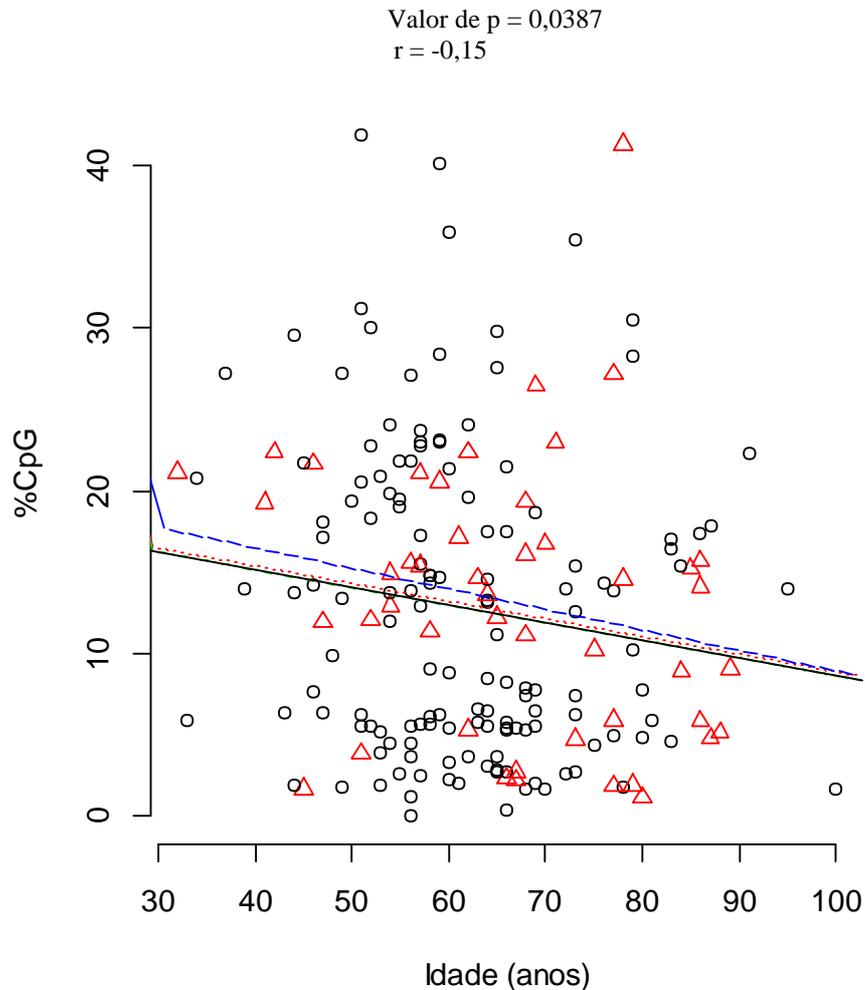
Fonte: a autora

Legenda: Medianas de %CpG do grupo esperado (9,63%) e do precoce (13,76%); valor de p (Mann-Whitney)

Também pode ser observado na figura 13, onde é demonstrada a correlação entre o nível

de metilação e a idade, de ambos os gêneros, que à medida que a idade avança ocorre uma diminuição no padrão de metilação ($p = 0,0387$; $r = -0,15$), fazendo com que o DNA se torne hipometilado.

Figura 13- Correlação de %CpG com o avanço da idade no grupo SCA



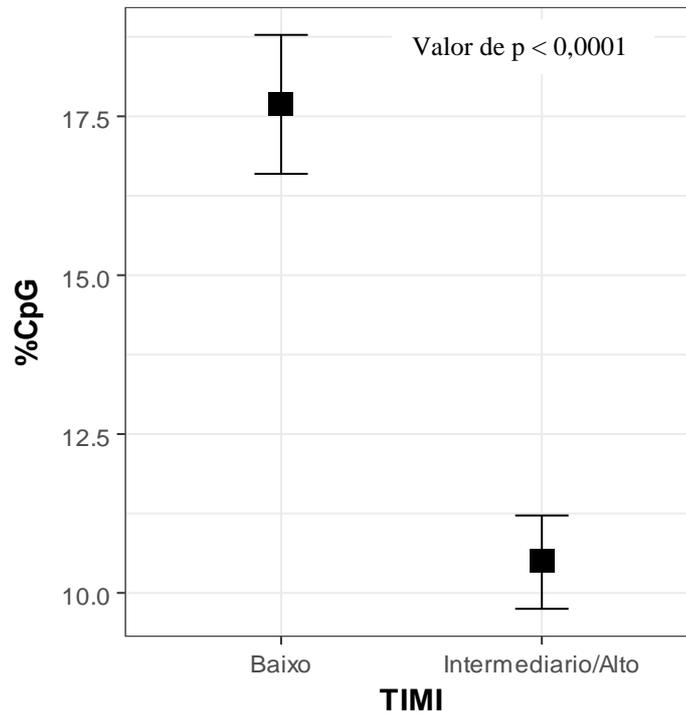
Fonte: a autora

Legenda: Triângulos vermelhos: mulheres; círculos: homens. Linha preta: correlação entre a idade e o %CpG em ambos os gêneros; linha tracejada azul: correlação entre a idade e o %CpG para o gênero feminino; linha pontilhada vermelha: correlação entre a idade e o %CpG para o gênero masculino; valor de p e r (correlação de Pearson)

6.7 Avaliação do perfil de metilação de DNA global dentro do grupo do risco TIMI

Quando estratificado, os pacientes com SCA pelo TIMI (baixo, intermediário/alto) foi observado diferença ($p < 0,0001$) nos perfis de metilação entre os dois grupos. O grupo TIMI baixo apresentou um nível mais elevado de metilação de DNA, enquanto o intermediário/alto mostrou um padrão de metilação diminuído (Figura 14).

Figura 14- Box-plot (média e quartis) de %CpG nos grupos de risco TIMI baixo e intermediário/alto do SCA

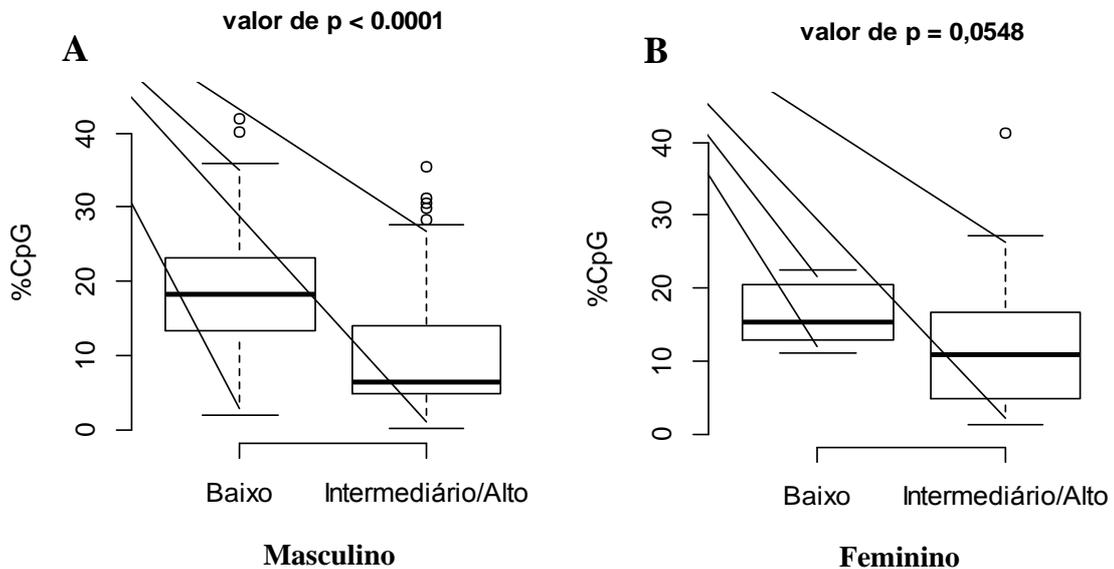


Fonte: a autora

Legenda: Médias de %CpG do grupo de risco TIMI baixo (17,69%) e do intermediário/alto (10,49%); valor de p (T-Student).

Ao observar os grupos estratificados pelo TIMI por gênero se pode perceber que o gênero masculino está exercendo uma maior influência no resultado geral do grupo TIMI, existindo diferença significativa (Figura 15A) no perfil de metilação de DNA entre os grupos baixo e intermediário/alto ($p < 0,001$). Em relação ao gênero feminino, houve uma tendência para a diferença entre os grupos TIMI (Figura 15B).

Figura 15- Box-plot (mediana e quartis) de %CpG nos grupos de risco TIMI baixo e intermediário por gênero do grupo SCA



Fonte: a autora

Legenda: A = Medianas de %CpG do grupo TIMI baixo (18,18%) e do intermediário/alto (6,36%) no gênero masculino. B = Medianas de %CpG no grupo TIMI baixo (15,21%) e do intermediário/alto (10,81%) no feminino. Valor de p (Mann-Whitney)

6.8 Análise do perfil de metilação de DNA global com as características clínicas, biológicas e hábito

Foi utilizado um cut off 8,16 % CpG correspondente a mediana do resultado dos níveis de metilação do grupo sSCA para categorizar as amostras do grupo SCA em hipometilado e hipermetilado. Os resultados demonstraram que existe diferença significativa ($p= 0,0376$) no perfil de metilação entre os homens do grupo esperado (homen ≥ 65), como pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8 - Análise entre os grupos hipermetilado e hipometilado correspondentes as características biológicas, clínicas e hábitos de pacientes com SCA.

(continua)

Variáveis	Cut Off 8,16 %CpG				p
	Hipermetilado		Hipometilado		
	N	%	N	%	
GÊNERO					
Masculino	79	70,54	64	82,05	0,1013
Feminino	33	29,46	14	17,95	

Tabela 8 - Análise entre os grupos hipermetilado e hipometilado correspondentes as características biológicas, clínicas e hábitos de pacientes com SCA.

(conclusão)

Variáveis	Cut Off 8,16 %CpG				p
	Hipermetilado		Hipometilado		
	N	%	N	%	
INÍCIO DA SCA					
Esperado	64	57,14	36	46,15	0,1787
Precoce	48	42,86	42	53,85	
GÊNERO/TEMPO					
Homem ≥ 65	23	20,54	30	38,46	0,0376
Mulher ≥ 55	25	22,32	12	15,38	
Homem < 65	56	50,00	34	43,59	
Mulher < 55	8	7,14	2	2,56	
TABAGISMO					
Não	82	73,21	58	74,36	0,9930
Sim	30	26,79	20	25,64	
DIABETES					
Não	63	56,25	47	60,26	0,6885
Sim	49	43,75	31	39,74	
DISLIPIDEMIA					
Não	44	39,29	30	38,46	1,0000
Sim	68	60,71	48	61,54	
HIPERTENSÃO					
Não	27	24,11	18	23,08	1,0000
Sim	85	75,89	60	76,92	
Alteração de PcR					
Não	40	38,83	23	34,33	0,6657
Sim	63	61,17	44	65,67	
LA					
0	6	5,94	4	5,56	0,6531
≤2	53	52,48	33	45,83	
>2	42	41,58	35	48,61	
FE					
<50%	31	31,63	28	39,44	0,3751
≥50%	67	68,37	43	60,56	
CK-MB massa >5,6 ng/mL					
Não	30	29,13	19	26,76	0,8654
Sim	73	70,87	52	73,24	
TROPONINA > 0,11 ng/mL					
Não	15	13,39	8	10,53	0,7175
Sim	97	86,61	68	89,47	

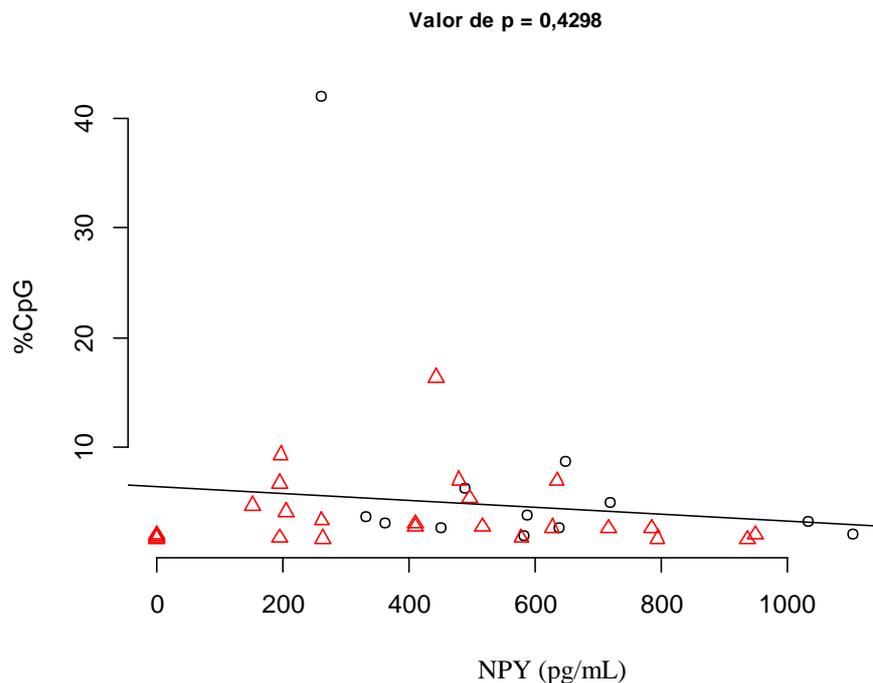
Fonte: a autora

Nota: Cut off 8,16 % CpG: correspondente a mediana do resultado dos níveis de metilação do grupo sSCA; PcR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; p-valor (Qui-Quadrado / Teste Exato de Fisher).

6.9 Análise entre os níveis séricos do NPY e do NPYR2 com a SCA, as variantes e com o padrão de metilação de DNA global

Não houve diferença significativa entre os níveis séricos do NPY com a SCA ($p = 0,3973$), quando comparado o grupo SCA e sSCA. Como também não foi encontrada diferença em relação às variantes, NPY c.84G>A ($p = 0,8000$), NPY c.150G>A ($p = 0,9344$), NPY c.-485T>C ($p = 0,5407$), NPYR2 c.-1088C>T ($p = 0,5764$) e NPYR2 c.-1116A>G ($p = 0,6256$), em relação à NPY c. 20T>C não foi possível realizar a análise por causa do N amostral insuficiente. Assim como não foi demonstrada uma relação significativa ($p = 0,4298$) entre o nível de metilação de DNA global com o nível sérico do NPY na correlação realizada (Figura 16). Em relação ao experimento relacionado ao NPYR2, os resultados foram abaixo da sensibilidade ($<0,188\text{ng/ml}$).

Figura 16- Correlação entre o nível de %CpG e níveis séricos do NPY.



Fonte: a autora

Legenda: Triângulos: sSCA (n = 25), círculos: SCA (n = 15). Valor de p (Mann-Whitney)

7 DISCUSSÃO

A população avaliada neste presente estudo pertence à população brasileira que é conhecida por possuir uma importante miscigenação.

Em relação à heterogeneidade da população brasileira, estudos utilizando métodos de identidade genética avaliaram as estimativas de ancestralidade de indivíduos nascidos nas cinco regiões geopolíticas brasileiras e observaram que a ancestralidade europeia tinha uma contribuição importante (77,1%), seguida das contribuições africana (14,3%) e ameríndia (8,5%) (LINS et al., 2010). Pena et al. (2011) também demonstraram que em todas as regiões estudadas do Brasil, a linhagem europeia foi predominante, com proporções que variaram de 60,6% no Nordeste a 77,7% no Sul.

Adicionalmente, Ferreira et al. (2006) demonstraram numa população de São Paulo, que essa era constituída de 79% de contribuições de europeus, 14% de africanos e 7% de ameríndios nativos brasileiros, assim como uma população do Rio de Janeiro também possuía uma influência ancestral predominante europeia (de 55.2% a 58.6%) e uma menor contribuição africana (de 31.1% a 30.3%) e ameríndia (de 13.7% a 11.0%) (Manta et al., 2013).

7.1 Relação das variantes do NPY e NPYR2 com a SCA, risco TIMI e características dos pacientes

A frequência do alelo P7 de NPY c.20T>C varia de 6 a 15% em populações caucasianas, mas é muito baixa ou ausente nas populações leste da europa (DING, 2003; JIA et al., 2005). As maiores frequências alélicas foram encontradas nos países nórdicos, além disso, o NPY c.20T>C provavelmente originou-se do norte da Europa e depois se espalhou para as regiões vizinhas (DING, 2003).

Devido à sua alta atividade no sistema nervoso simpático, o NPY tem sido associado à hipertensão, doença cardíaca congestiva e outras doenças relacionadas ao sistema cardiovascular (MCDERMOTT BELL, 2007). A variante NPY c.20T>C tem sido associada a patologias cardiovasculares, como a progressão acelerada e precoce da aterosclerose (KARVONEN et al., 1998, 2001), infarto agudo do miocárdio e doença vascular cerebral em portadores de hipertensão (WALLERSTEDT et al., 2004).

Foi observado no presente estudo depois de realizada uma regressão logística ajustada pela idade, que a variante c.20T>C ganhou importância significativa, demonstrando que a

presença do genótipo TC/CC ou do alelo C pode estar relacionada ao risco de desenvolver a SCA. Corroborando com Masoudi-Kazemabad et al (2012) que em uma população iraniana mostraram associação entre NPY c.20T>C e doença arterial coronariana, e considerando que a ancestralidade da população brasileira é predominantemente europeia, principalmente com Wallerstedt et al. (2004) que demonstraram a existência da associação dessa variante com o infarto agudo do miocárdio em uma população hipertensa sueca.

Ao mesmo tempo, quando estratificamos o grupo de risco TIMI foi verificado que os genótipos TC/CC estão mais frequentes no grupo TIMI de baixo risco, indicando uma chance de quatro a mais de o indivíduo ser caracterizado como TIMI baixo, sugerindo um efeito protetor para a gravidade na SCA, já que os indivíduos que possuem os genótipos TC/CC teriam uma menor probabilidade de estarem no grupo de risco intermediário/alto.

A variante NPY c.20T>C foi inicialmente associada ao aumento dos níveis séricos de colesterol e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (KARVONEN et al., 1998), bem como em indivíduos obesos e saudáveis (KARVONEN et al., 2001). Em um estudo posterior com mulheres finlandesas com doença cardíaca coronária foi observada associação com níveis séricos de colesterol total, mas não com LDL (ERKKILA et al., 2002). No entanto, em nosso estudo, nenhuma associação foi encontrada entre a NPY c.20T>C e a dislipidemia.

Recentemente, um estudo demonstrou que NPY c.20T>C está relacionado à susceptibilidade ao diabetes tipo 2 (DM2) e também foi associada ao metabolismo lipídico alterado na população indiana de Gujarat (PATEL et al., 2016), bem como à retinopatia diabética em DM2 (NISKANEN et al., 2000). No entanto, no presente estudo não houve associação entre essa variante estudada e diabetes.

Bhaskar et al. (2010b) avaliaram a relação da variante NPY c.20T>C com a hipertensão e encontraram associação entre NPY c.20T>C e a doença (BHASKAR et al., 2010b). Não foi observada associação entre esta variante e a hipertensão arterial neste estudo, porém neste caso não foi possível uma comparação mais aprofundada, pois o estudo acima avaliou uma população indiana.

Nossos resultados não apresentaram associação entre a variante NPY c.84G>A e a SCA, corroborando com Shah et al. (2009) que não mostraram a existência de uma associação dessa variante com o início precoce da aterosclerose na população americana e europeia. Por outro lado, em nosso estudo foi encontrada uma associação entre NPY c.84G>A e hipertensão, indicando que os pacientes com SCA e com os genótipos GA/AA teria uma maior probabilidade de possuir hipertensão.

Em relação à NPY c.150G>A não se mostrou associada à hipertensão, corroborando

com Bhaskar et al. (2010b) que avaliaram a relação entre esta variante com hipertensão, (BHASKAR et al., 2010b). Por outro lado, foi observada uma forte tendência de associação dessa variante com a dislipidemia, inclusive sugerindo um fator de proteção de 48% para dislipidemia no grupo SCA.

Estudos com população coreana e chinesa mostraram que a variante c.-485T>C do NPY pode ser considerada um fator de risco genético ou estar envolvida com acidente vascular cerebral (KIM et al., 2009, 2010; YU et al., 2010). Assim como Shah et al. (2009) demonstraram associação dessa variante com o risco de desenvolvimento de aterosclerose precoce. Nos nossos resultados não foi observado associação dessa variante com a SCA, corroborando com um estudo com Iranianos onde não houve com doença arterial coronariana (PARIZADEH et al., 2014), porém seria importante considerar que o nosso N amostral para essa variante no grupo saudável foi consideravelmente menor comparado as populações das outras variantes desse grupo e a especificidade da população brasileira.

Em relação ao diabetes, o presente estudo não demonstrou a existência de uma associação com a c.-485T>C do NPY, discordando de Patel et al. (2014).

Além disso, considerando que para a variante c.-485T>C do NPY também pode ocorrer a substituição do alelo A pelo G e isso provocar a perda do consenso do fator de transcrição Sp1 (DE LUIS et al., 2016).

Evidências mostraram que variantes na região 5' do *NPY2R* estão associadas à obesidade. Entre estas variantes, a *NPY2R* c.-1088C>T foi associada à obesidade em populações indianas de Pima e francesas (MA et al., 2005, SIDDIQ et al., 2007), como está implicada a obesidade em pacientes alemães com depressão (TREUTLEIN et al., 2017). Esta variante está relacionada com o baixo nível sérico de colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) na população japonesa (TAKIGUCHI et al., 2010).

Além disso, um estudo demonstrou que esse polimorfismo influencia a ligação do fator de transcrição FOX|1, a fim de alterar a expressão gênica em células neuroendócrinas e, consequentemente, características cardiometabólicas (WEI et al., 2013). No entanto, os resultados do presente estudo não apontaram a existência de associação dessa variante com a SCA.

Outra variante, a *NPY2R* c.-1116A>G também foi associada à obesidade em uma população de dinamarqueses caucasianos (TOREKOV et al., 2006) e Takiguchi et al. (2010) relacionaram esta variante ao HDL-C na população japonesa.

No entanto, um estudo com uma população de adolescentes negros da África do Sul demonstrou que não houve associação da c.-1116A> G com a obesidade (LOMBARD et al.,

2012). Considerando a obesidade um importante fator de risco para doenças cardíacas, nossos resultados mostraram que a c.-1116A>G foi associada aos pacientes categorizados como grupo precoce para SCA, indicando que o indivíduo que possui essa variante tem em torno de duas vezes de chances de desenvolver a síndrome precocemente.

7.2 Relação do perfil de metilação de DNA global com a SCA, risco TIMI e características dos pacientes

Estudo analisando elementos nucleares intercalares longos (LINE-1) numa população americana verificou que o baixo nível de metilação global em células do sangue está a eventos cardiovasculares sugerindo que a hipometilação de DNA no sangue pode ser usada como um marcador para identificar pessoas com risco para eventos cardiovasculares (BACCARELLI et al., 2010).

Posteriormente, Wei et al. (2014) demonstraram em uma população chinesa que o nível de metilação do LINE-1 estava inversamente relacionada ao risco de doença coronariana (WEI et al., 2014). No ano seguinte, outro trabalho realizado com uma população europeia observou que os perfis de metilação (hipometilação em LINE-1) podem estar associados ao risco de infarto do miocárdio em homens europeus, inclusive podendo ser um promissor biomarcador para avaliação de risco individual para IM (GUARRERA et al., 2015).

Por outro lado, no presente estudo foi encontrado um perfil hipermetilado de DNA no grupo SCA quando comparado ao grupo sSCA. Corroborando com Sharma et al. (2008) que observaram em uma população indiana um alto nível de metilação global em pacientes com doença arterial coronariana (DAC). Em seguida, esse grupo demonstrou a associação de 72 regiões diferencialmente metiladas (DMRs) hipermetiladas com a DAC (SHARMA et al., 2014). Adicionalmente, um estudo com uma população chinesa de Singapura também demonstrou uma relação positiva da metilação global com a prevalência de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão e/ou diabetes em homens utilizando sequências Alu e de DNA satélite (KIM et al., 2010).

O processo de desmetilação pode se dá pela atuação das proteínas Tet, uma dioxigenase, através da oxidação catalisada por ela, seguida pela descarboxilação constitui uma via para a desmetilação ativa do DNA, porém essas proteínas foram encontradas diminuídas em lesões ateroscleróticas (HE et al., 2011; ITO et al., 2011), ocasionando assim um perfil hipermetilado. Adicionalmente, foi observada uma relação entre uma dieta aterogênica em roedores com a hipermetilação de DNA global (YOO et al., 2012), como para

DM2 (WILLIAMS et al., 2012, MAGHBOOLI et al., 2015), demonstrando que fatores de risco cardiovascular como dieta, estilo de vida e outros, assim como a herança de padrões epigenéticos ou interação entre variantes genéticas e epigenoma podem levar a um epigenoma anormal o que, por sua vez, resulta em um padrão transcricional aterogênico (GUARDIOLA et al., 2016).

Outro estudo com chineses mostrou a existência da associação entre o baixo nível de metilação de LINE -1 com o alto risco de acidente vascular cerebral isquêmico em homens, não encontrando alguma relação em mulheres (LIN et al., 2014). No entanto, nossos resultados não mostraram diferença no perfil de metilação de DNA global entre os gêneros.

Nos resultados do presente estudo foi mostrado que com o avanço da idade ocorre uma diminuição do grau de metilação e que esse perfil de hipometilação na idade mais avançada estava relacionado aos homens. Concordando com Wilson e Jones (1983) e Fuke et al. (2004) que demonstraram a existência de uma relação inversa entre o nível de metilação global e idade. Um estudo com uma população de mulheres brasileiras no período pós-menopausa sem evidências de doença clínica utilizou o escore de Framingham (FRS), onde as participantes foram estratificadas em dois grupos, baixo risco e intermediário/alto risco. Eles encontraram que o baixo nível de metilação global está relacionado com o risco intermediário/alto quando comparado com o grupo de baixo risco para doença cardiovascular (RAMOS et al., 2016). O FRS e o risco TIMI levam em consideração fatores de riscos semelhantes, neste presente estudo também foi observado um padrão de metilação global baixo para o grupo TIMI intermediário/alto comparado ao TIMI baixo.

Sabe-se que existe uma relação significativa entre um alto nível de concentração de homocisteína (hiper-homocisteinemia) no plasma de indivíduos com doenças cardíacas (LIU et al., 2015; MA et al., 2017), inclusive apontando que na medida em que ocorre uma progressão da severidade da doença arterial coronariana os níveis de homocisteína aumentam (SKIBIŃSKA et al., 2004) e que a hiper-homocisteinemia vêm sendo associada a perfis de hipometilação de DNA global (YANG et al., 2014; WEI et al., 2014).

Diante disso, podemos sugerir que os pacientes categorizados no TIMI intermediário/alto podem possuir um nível mais alto de homocisteína quando comparado ao grupo TIMI baixo, ocasionando assim um perfil hipometilado para esse grupo de maior risco para SCA. Também é possível que a variável idade esteja influenciando esse resultado, pois no grupo intermediário/alto foram encontrados os pacientes com a idade mais avançada, que inclusive um estudo observou o aumento da homocisteína com o avanço da idade (SELHUB et al., 1993).

8 CONCLUSÕES

Diante de nossos resultados podemos sugerir algumas conclusões:

- a) A variante c.20T>C do NPY contribui para o desenvolvimento da SCA;
- b) A variante c.20T>C do NPY exerce um efeito protetor em relação à gravidade da SCA;
- c) A variante NPY c.84G>A é um fator de proteção em relação hipertensão em pacientes com SCA;
- d) A variante NPYR2 c.-1116A>G contribui para o desenvolvimento da SCA precocemente;
- e) O perfil de DNA global hipermetilado por sua associação com o desenvolvimento da SCA é um potencial biomarcador;
- f) O perfil de DNA global hipometilado por sua associação ao grupo intermediário + alto de risco TIMI, contribui para o entendimento da evolução natural da doença com relação à idade dos pacientes.

9 LIMITAÇÃO DO ESTUDO

Consideramos que o número de indivíduos estudados pode limitar as conclusões dos nossos resultados. Principalmente que os pacientes estudados pertencem à população brasileira, que é miscigenada, e não houve uma separação de grupos étnicos.

10 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

- a) Realizar uma análise de haplótipo com as variantes estudadas;
- b) Comparar os níveis de homocisteína nos pacientes estratificados pelo risco TIMI com os níveis de metilação de DNA global;
- c) Estudos futuros de larga escala serão importantes para melhor avaliar mecanismos epigenéticos da SCA nessa população.

REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. **Oncology**, Basel, v. 74, n. 1-2, p. 50-60, 2008.
- ADCOCK, I. M. et al. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Current opinion in immunology**, Philadelphia v. 19, n. 6, p. 694-700, 2007.
- ÁLVARO, Ana Rita Costa Silva. **O neuropeptídeo Y e os seus receptores na retina: da proliferação celular à neuroprotecção**. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.
- ANTMAN, E. M. et al. The TIMI risk score for unstable angina/non–ST elevation MI: a method for prognostication and therapeutic decision making. **Jama**, Chicago, v. 284, n. 7, p. 835-842, 2000.
- BACCARELLI, A. et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, Baltimore, v. 21, n. 6, p. 819, 2010.
- BAKER, E. et al. Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15. 1 by nonisotopic in situ hybridization. **Genomics**, San Diego, v. 26, n. 1, p. 163-164, 1995.
- BALD, M.; GERIGK, M.; RASCHER, W. Elevated plasma concentrations of neuropeptide Y in children and adults with chronic and terminal renal failure. **American journal of kidney diseases**, New York, v. 30, n. 1, p. 23-27, 1997.
- BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Basel, v. 2, n. S1, p. S4, 2005.
- BHASKAR, L. V. K. S. et al. Allelic variation in the NPY gene in 14 Indian populations. **Journal of human genetics**, Tokyo, v. 52, n. 7, p. 592-598, 2007.
- BHASKAR, L. V. K. S. et al. Neuropeptide Y gene functional polymorphism influences susceptibility to hypertension in Indian population. **Journal of human hypertension**, Houndmills, v. 24, n. 9, p. 617, 2010a.
- BHASKAR, L. V. K. S. et al. Neuropeptide Y gene polymorphisms are not associated with obesity in a South Indian population. **European journal of clinical nutrition**, London, v. 64, n. 8, p. 868, 2010b.
- BOUDOULAS, K. Dean et al. Coronary atherosclerosis: pathophysiologic basis for diagnosis and management. **Progress in cardiovascular diseases**, New York, v. 58, n. 6, p. 676-692, 2016.
- BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, London, v. 321, n. 6067, p. 209-213, 1986.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and development**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.
- BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology**

today, Cambridge, v. 15, n. 11, p. 504-511, 1994.

BLOMQVIST, A. G.; HERZOG, Herbert. Y-receptor subtypes—how many more?. **Trends in neurosciences**, Cambridge, v. 20, n. 7, p. 294-298, 1997.

BRADBURY, A. F.; FINNIE, M. D. A.; SMYTH, D. G. Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. **Nature**, London, v. 298, n. 5875, p. 686, 1982.

BROD, S. A.; BAUER, V. L. Ingested (oral) neuropeptide Y inhibits EAE. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v. 250, n. 1, p. 44-49, 2012.

BROGDEN, K. et al. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. **Nature immunology**, New York, v. 6, n. 6, p. 558-564, 2005.

BROTHERS, S. P.; WAHLESTEDT, Claes. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. **EMBO molecular medicine**, London, v. 2, n. 11, p. 429-439, 2010.

BURBACH, J. P. H. Neuropeptides from concept to online database www. neuropeptides. nl. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 626, n. 1, p. 27-48, 2010.

BUTTARI, B. et al. Neuropeptide Y induces potent migration of human immature dendritic cells and promotes a Th2 polarization. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 28, n. 7, p. 3038-3049, 2014.

CALLANAN, E. Y. et al. Renal and cardiac neuropeptide Y and NPY receptors in a rat model of congestive heart failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, Bethesda, v. 293, n. 6, p. F1811-F1817, 2007.

CAMPBELL, C. D. et al. Association studies of BMI and type 2 diabetes in the neuropeptide Y pathway: a possible role for NPY2R as a candidate gene for type 2 diabetes in men. **Diabetes**, New York, v. 56, n. 5, p. 1460-1467, 2007.

CAPURRO, D.; HUIDOBRO-TORO, J. P. The involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIBO 3304. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 376, n. 3, p. 251-255, 1999.

CASAGRANDE, E. L. Angina pectoris e infarto agudo do miocárdio. **Simpósio sobre diagnóstico de dor torácica. Revista AMRIGS**, Porto Alegre, n. 46, p. 9-12, 2002.

CENTURIÓN, O. A. Serum biomarkers and source of inflammation in acute coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, New York, v. 17, n. 2, p. 119-128, 2016.

CERHAN, J. R. et al. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. **Blood**, New York, v. 109, n. 12, p. 5439-5446, 2007.

CHICO, T. J. A.; MILO, M.; CROSSMAN, D. C. The genetics of cardiovascular disease: new insights from emerging approaches. **The Journal of pathology**, London, v. 220, n. 2, p. 186-197, 2010.

COLMERS, W. F.; WAHLESTEDT, C. **The biology of neuropeptide Y and related peptides**. Springer: Science & Business Media, 1993.

- CORCORAN, D.; GRANT, P.; BERRY, C. Risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: Risk scores, biomarkers and clinical judgment. **International Journal of Cardiology Heart & Vasculature**, Shannon, v. 8, p. 131-137, 2015.
- CRUJEIRAS, A. B. et al. Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. **Regulatory peptides**, Amsterdam, v. 186, p. 1-6, 2013.
- CUCULI, F. et al. Relationship of plasma neuropeptide Y with angiographic, electrocardiographic and coronary physiology indices of reperfusion during ST elevation myocardial infarction. **Heart**, London, v. 99, n. 16, p. 1198-1203, 2013.
- DE LA FUENTE, M. et al. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. **Life sciences**, Oxford, v. 67, n. 17, p. 2125-2135, 2000.
- DE LUIS, D. A. et al. Association of neuropeptide Y gene rs16147 polymorphism with cardiovascular risk factors, adipokines, and metabolic syndrome in patients with obesity. **Lifestyle Genomics**, Basel, v. 9, n. 5-6, p. 213-221, 2016.
- DE LUIS, D. A. et al. Polymorphism rs16147 of the Neuropeptide Y Gene Modifies the Response of Cardiovascular Risk Biomarkers and Adipokines to Two Hypocaloric Diets. **Journal of nutrigenetics and nutrigenomics**, Basel, v. 10, n. 1-2, p. 63-72, 2017.
- DE MEY, J. G. R.; MEGENS, R.; FAZZI, G. E. Functional antagonism between endogenous neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide in mesenteric resistance arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 324, n. 3, p. 930-937, 2008.
- DE OLIVEIRA GOMES, B. F. et al. Contribuição Relativa da Troponina Ultrassensível na Classificação de Risco pelo Timi Risk Score em Pacientes com Síndrome Coronariana Aguda sem Supra de ST. **Revista Brasileira de Cardiologia**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 277-281, 2011.
- DE SMET, C.; LORIOT, A.; BOON, T. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 24, n. 11, p. 4781-4790, 2004.
- DIMITRIJEVIĆ, M.; STANOJEVIĆ, S. The intriguing mission of neuropeptide Y in the immune system. **Amino acids**, Wien, v. 45, n. 1, p. 41-53, 2013.
- DING, B. Distribution of the NPY 1128C allele frequency in different populations. **Journal of neural transmission**, Wien, v. 110, n. 11, p. 1199-1204, 2003.
- DOMSCHKE, K. et al. Chromosome 4q31-34 panic disorder risk locus: Association of neuropeptide Y Y5 receptor variants. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, Hoboken, v. 147, n. 4, p. 510-516, 2008.
- DOS SANTOS MEDEIROS, M.; TURNER, A. J. Metabolism and functions of neuropeptide Y. **Neurochemical research**, New York, v. 21, n. 9, p. 1125-1132, 1996.
- EATON, K.; SALLEE, F. R.; SAH, R. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. **Current topics in medicinal chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 17, p. 1645-1659,

2007.

EDEN, A. et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science**, Washington, v. 300, n. 5618, p. 455-455, 2003.

EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of autosomal mammalian genes. **Current opinion in genetics and development**, London, v. 4, n. 2, p. 265-280, 1994.

EJAZ, A. et al. Expression of neuropeptide Y, substance P, and their receptors in the right atrium of diabetic patients. **Clinical and translational science**, London, v. 4, n. 5, p. 346-350, 2011a.

EJAZ, A.; LOGERFO, F. W.; PRADHAN, L. Diabetic neuropathy and heart failure: role of neuropeptides. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, 2011b. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/6E6FAE56E65E120A2DB0624667DB5BDF/S1462399411001979a.pdf/diabetic_neuropathy_and_heart_failure_role_of_neuropeptides.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2018.

EKSTRAND, A. J. et al. Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 100, n. 10, p. 6033-6038, 2003.

ERKKILÄ, A. T. et al. Association of leucine 7 to proline 7 polymorphism in the preproneuropeptide Y with serum lipids in patients with coronary heart disease. **Molecular genetics and metabolism**, Orlando, v. 75, n. 3, p. 260-264, 2002.

FERREIRA, R. et al. Neuropeptide Y inhibits interleukin-1 β -induced phagocytosis by microglial cells. **Journal of neuroinflammation**, London, v. 8, n. 1, p. 169, 2011.

FESMIRE, F. M. et al. Usefulness of automated serial 12-lead ECG monitoring during the initial emergency department evaluation of patients with chest pain. **Annals of emergency medicine**, Lansing, v. 31, n. 1, p. 3-11, 1998.

FUKE, C. et al. Age related changes in 5- methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC- based study. **Annals of human genetics**, London, v. 68, n. 3, p. 196-204, 2004.

GALRÃO, A. L. R. **Metilação do gene simpportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireóide**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GOPISETTY, G.; RAMACHANDRAN, K.; SINGAL, R.. DNA methylation and apoptosis. **Molecular immunology**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1729-1740, 2006.

GRUNDEMAR, L. et al. Characterization of vascular neuropeptide Y receptors. **British journal of pharmacology**, London, v. 105, n. 1, p. 45-50, 1992.

GUARDIOLA, M. et al. Epigenética en la arteriosclerosis. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, Barcelona, v. 28, n. 2, p. 102-119, 2016.

GUARRERA, S. et al. Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. **Clinical epigenetics**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 133, 2015.

GUERRERO-PRESTON, R.; HERBSTMAN, J.; GOLDMAN, L. R. Epigenomic biomarkers: global DNA hypomethylation as a biosensor of life-long environmental exposures. **Epigenomics**, London, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2011.

GULLESTAD, L. et al. Postexercise ischemia is associated with increased neuropeptide Y in patients with coronary artery disease. **Circulation**, Dallas, v. 102, n. 9, p. 987-993, 2000.

HAN, C. et al. Changes in cardiac neuropeptide Y after experimental myocardial infarction in rat. **Neuroscience letters**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 141-146, 1989.

HAN, S. et al. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 71-75, 2008.

HE, Y. et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, Washington, v. 333, n. 6047, p. 1303-1307, 2011.

HERREN, K. R.; MACKWAY-JONES, K. Emergency management of cardiac chest pain: a review. **Emergency Medicine Journal**, London, v. 18, n. 1, p. 6-10, 2001.

HIRSCH, D.; ZUKOWSKA, Z. NPY and stress 30 years later: the peripheral view. **Cellular and molecular neurobiology**, New York, v. 32, n. 5, p. 645-659, 2012.

HULTING, J. et al. Plasma neuropeptide Y on admission to a coronary care unit: raised levels in patients with left heart failure. **Cardiovascular research**, London, v. 24, n. 2, p. 102-108, 1990.

ITO, S. et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. **Science**, Washington, v. 333, n. 6047, p. 1300-1303, 2011.

JIA, C. et al. The T1128C polymorphism of neuropeptide Y gene in a Chinese population. **Archives of medical research**, México, v. 36, n. 2, p. 175-177, 2005.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature reviews genetics**, London, v. 8, n. 4, p. 253, 2007.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature reviews genetics**, London, v. 3, n. 6, p. 415, 2002.

JOHNSON, I. T.; BELSHAW, N. J. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 1346-1359, 2008.

KARVONEN, M. K. et al. Association of a leucine (7)-to-proline (7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. **Nature medicine**, New York, v. 4, n. 12, p. 1434, 1998.

KARVONEN, M. K. et al. Leucine7 to proline7 polymorphism in the prepro-neuropeptide Y is associated with the progression of carotid atherosclerosis, blood pressure and serum lipids in Finnish men. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 145-151, 2001.

KELLER, T. et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial

infarction. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 361, n. 9, p. 868-877, 2009.

KIM, No S. et al. Association of the C-399T promoter polymorphism of neuropeptide Y with susceptibility to ischemic stroke. **Clinical biochemistry**, Toronto, v. 42, n. 16-17, p. 1699-1704, 2009.

KIM, No S. et al. Age and sex dependent genetic effects of neuropeptide Y promoter polymorphism on susceptibility to ischemic stroke in Koreans. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 411, n. 17-18, p. 1243-1247, 2010.

LEE, E. W. et al. Impaired angiogenesis in neuropeptide Y (NPY)-Y2 receptor knockout mice. **Peptides**, New York, v. 24, n. 1, p. 99-106, 2003.

LI, L. et al. Neuropeptide Y-induced acceleration of postangioplasty occlusion of rat carotid artery. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Baltimore, v. 23, n. 7, p. 1204-1210, 2003.

LIN, R. et al. LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men. **Current neurovascular research**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 4-9, 2014.

LIU, C. et al. Hyperhomocysteinemia as a metabolic disorder parameter is independently associated with the severity of coronary heart disease. **Saudi medical journal**, Riyadh, v. 36, n. 7, p. 839, 2015.

LOMBARD, Z. et al. Appetite regulation genes are associated with body mass index in black South African adolescents: a genetic association study. **BMJ open**, London, v. 2, n. 3, p. e000873, 2012. Disponível em: < <https://bmjopen.bmj.com/content/2/3/e000873> >. Acesso: 15 mar. 2018.

LONG, Y. et al. Analysis of the prevalence of cardiovascular disease and associated risk factors for European-American and African-American populations in the state of Pennsylvania 2005–2009. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 111, n. 1, p. 68-72, 2013.

MA, Y. et al. Serum high concentrations of homocysteine and low levels of folic acid and vitamin B 12 are significantly correlated with the categories of coronary artery diseases. **BMC cardiovascular disorders**, London, v. 17, n. 1, p. 37, 2017.

MACIA, L. et al. Neuropeptide Y1 receptor in immune cells regulates inflammation and insulin resistance associated with diet-induced obesity. **Diabetes**, New York, v. 61, n. 12, p. 3228-3238, 2012.

MAGHBOOLI, Z. et al. Association between alterations in global DNA methylation and predisposing factors in diabetes: a high pressure liquid chromatography based study. **Minerva Medica**, Torino, v. 106, n. 4, p. 221-31, 2015.

MATYAL, R. et al. Neuropeptide Y improves myocardial perfusion and function in a swine model of hypercholesterolemia and chronic myocardial ischemia. **Journal of molecular and cellular cardiology**, New York, v. 53, n. 6, p. 891-898, 2012.

MATYAL, R. et al. Local infiltration of neuropeptide Y as a potential therapeutic agent against apoptosis and fibrosis in a swine model of hypercholesterolemia and chronic

myocardial ischemia. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 718, n. 1-3, p. 261-270, 2013.

MASOUDI-KAZEMABAD, A. et al. High frequency of Neuropeptide Y Leu7Pro polymorphism in an Iranian population and its association with coronary artery disease. **Gene**, Amsterdam, v. 496, n. 1, p. 22-27, 2012.

MCDERMOTT, B. J.; BELL, D. NPY and cardiac diseases. **Current topics in medicinal chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 17, p. 1692-1703, 2007.

MICHEL, M. C. et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. **Pharmacological reviews**, Baltimore, v. 50, n. 1, p. 143-150, 1998.

MINTH, C. D. et al. Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 81, n. 14, p. 4577-4581, 1984.

MISTRY, N. F.; VESELY, Mark R. Acute coronary syndromes: from the emergency department to the cardiac care unit. **Cardiology clinics**, v. 30, n. 4, p. 617-627, 2012.

MITCHELL, G. C. et al. A common single nucleotide polymorphism alters the synthesis and secretion of neuropeptide Y. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 53, p. 14428-14434, 2008.

MOVAFAGH, S. et al. Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 11, p. 1924-1926, 2006.

NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL EXCELLENCE. **Unstable Angina and NSTEMI**: the early management of unstable angina and non-ST-segment-elevation myocardial infarction; Clinical guideline 94. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2010.

NAZARENKO, M. S. et al. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122601, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4391864/>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

NISKANEN, L. et al. Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the neuropeptide Y gene is associated with enhanced carotid atherosclerosis in elderly patients with type 2 diabetes and control subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 6, p. 2266-2269, 2000.

NIU, P. et al. Hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to the dysfunction of endothelial progenitor cells in coronary artery disease patients. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 170, 2014.

PARIZADEH, S. A. et al. Lack of an association between a functional polymorphism in the neuropeptide Y gene promoter and the presence of coronary artery disease in an Iranian population. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 65, n. 4, p. 333-340, 2014.

PATEL, R. et al. Association of neuropeptide-Y (NPY) and interleukin-1beta (IL1B),

genotype-phenotype correlation and plasma lipids with Type-II diabetes. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164437, 2016. Disponível em: <
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0164437>>. Acesso: 10 mar. 2018.

PRIETO, D.; GARCÍA-SACRISTÁN, A.; SIMONSEN, U. Characterization of NPY receptors mediating contraction in rat intramyocardial coronary arteries. **Regulatory peptides**, v. 75, p. 155-160, 1998.

PUERTO, M. et al. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. **Journal of neuroimmunology**, v. 165, n. 1, p. 33-40, 2005.

RAMOS, R. B. et al. Association between global leukocyte DNA methylation and cardiovascular risk in postmenopausal women. **BMC medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 71, 2016.

RAZZOUK, L.; FUSARO, M.; ESQUITIN, R. Novel biomarkers for risk stratification and identification of lifethreatening cardiovascular disease: troponin and beyond. **Current cardiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 109-115, 2012.

REICHLIN, T. et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 9, p. 858-867, 2009.

ROMANO, T. A. et al. Neuropeptide-Y innervation of the rat spleen: another potential immunomodulatory neuropeptide. **Brain, behavior, and immunity**, v. 5, n. 1, p. 116-131, 1991.

ROPERCH, J. et al. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 566, 2013.

ROSENWINKEL, E. T. et al. Exercise and autonomic function in health and cardiovascular disease. **Cardiology clinics**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 369-387, 2001.

SAWAN, C. et al. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 642, n. 1, p. 1-13, 2008.

SCHIANO, C. et al. Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease. **Trends in pharmacological sciences**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 226-235, 2015.

SCHWARTZ, T. W. et al. Signal Epitopes in the Three- Dimensional Structure of Neuropeptide Y. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 611, n. 1, p. 35-47, 1990.

SELHUB, J. et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **Jama**, Chicago, v. 270, n. 22, p. 2693-2698, 1993.

SHAH, S. H. et al. Neuropeptide Y gene polymorphisms confer risk of early-onset atherosclerosis. **PLoS genetics**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. e1000318, 2009.

SHARMA, P. et al. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients. **DNA and cell biology**, New York, v. 27, n. 7, p. 357-365, 2008.

SHARMA, P. et al. Genome wide DNA methylation profiling for epigenetic alteration in coronary artery disease patients. **Gene**, Amsterdam, v. 541, n. 1, p. 31-40, 2014.

SHIN, S. H. et al. Identification of novel methylation markers in hepatocellular carcinoma using a methylation array. **Journal of Korean medical science**, Seoul, v. 25, n. 8, p. 1152-1159, 2010.

SIDDIQ, A. et al. Single nucleotide polymorphisms in the neuropeptide Y2 receptor (NPY2R) gene and association with severe obesity in French white subjects. **Diabetologia**, Berlin, v. 50, n. 3, p. 574-584, 2007.

SKIBIŃSKA, E. et al. Homocysteine and progression of coronary artery disease. **Kardiologia polska**, Warszawa, v. 60, n. 3, p. 197-205, 2004.

SOMMER, W. H. et al. Human NPY promoter variation rs16147: T> C as a moderator of prefrontal NPY gene expression and negative affect. **Human mutation**, New York, v. 31, n. 8, 2010.

STEINMAN, L. Lessons learned at the intersection of immunology and neuroscience. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 122, n. 4, p. 1146-1148, 2012.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 6, n. 4, p. 318, 2006.

TAKIGUCHI, E. et al. Variation in the 5'-flanking region of the neuropeptide Y2 receptor gene and metabolic parameters. **Metabolism: Clinical and Experimental**, New York, v. 59, n. 11, p. 1591-1596, 2010.

TATEMOTO, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 79, n. 18, p. 5485-5489, 1982.

TESTA, A. et al. Neuropeptide Y receptor Y2 gene polymorphism interacts with plasma neuropeptide Y levels in predicting left ventricular hypertrophy in dialysis patients. **Journal of hypertension**, London, v. 28, n. 8, p. 1745-1751, 2010.

THÉROUX, P.; FUSTER, Valentin. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. **Circulation**, Dallas, v. 97, n. 12, p. 1195-1206, 1998.

THORNBURG, K. L. The programming of cardiovascular disease. **Journal of developmental origins of health and disease**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 366-376, 2015.

THYGESEN, K. et al. Third universal definition of myocardial infarction. **European heart journal**, London, v. 33, n. 20, p. 2551-2567, 2012.

TOREKOV, S. S. et al. Variants in the 5' region of the neuropeptide Y receptor Y2 gene (NPY2R) are associated with obesity in 5,971 white subjects. **Diabetologia**, Berlin, v. 49, n. 11, p. 2653-2658, 2006.

TREUTLEIN, J. et al. Association between neuropeptide Y receptor Y2 promoter variant rs6857715 and major depressive disorder. **Psychiatric genetics**, Hoboken. 27, n. 1, p. 34-37, 2017.

- ULLMAN, B. et al. Elevation of plasma neuropeptide Y- like immunoreactivity and noradrenaline during myocardial ischaemia in man. **Journal of internal medicine**, Oxford, v. 228, n. 6, p. 583-589, 1990.
- ULLMAN, B.; HULTING, J.; LUNDBERG, J. M. Prognostic value of plasma neuropeptide-Y in coronary care unit patients with and without acute myocardial infarction. **European heart journal**, London, v. 15, n. 4, p. 454-461, 1994.
- VOELTER-MAHLKNECHT, S. Epigenetic associations in relation to cardiovascular prevention and therapeutics. **Clinical epigenetics**, Berlin, v. 8, n. 1, p. 4, 2016.
- WALLERSTEDT, S. M. et al. Association analysis of the polymorphism T1128C in the signal peptide of neuropeptide Y in a Swedish hypertensive population. **Journal of hypertension**, London, v. 22, n. 7, p. 1277-1281, 2004.
- WEI, Z. et al. Heredity and cardiometabolic risk: naturally occurring polymorphisms in the human neuropeptide Y2 receptor promoter disrupt multiple transcriptional response motifs. **Journal of hypertension**, London, v. 31, n. 1, p. 123, 2013.
- WEI, L. et al. Hipometilação do LINE-1 está Associada ao Risco de Doença Cardíaca Coronariana na População Chinesa. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, São Paulo, v. 102, n. 5, p. 481-488, 2014.
- WETHERILL, L. et al. Neuropeptide Y receptor genes are associated with alcohol dependence, alcohol withdrawal phenotypes, and cocaine dependence. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, New York, v. 32, n. 12, p. 2031-2040, 2008.
- WHEWAY, J.; HERZOG, H.; MACKAY, F. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. **Current topics in medicinal chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 17, p. 1743-1752, 2007.
- WIEST, R. et al. Enhanced Y1-receptor-mediated vasoconstrictive action of neuropeptide Y (NPY) in superior mesenteric arteries in portal hypertension. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 512-519, 2006.
- WILLIAMS, K. T.; SCHALINSKE, Kevin L. Tissue- specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. **Diabetes/metabolism research and reviews**, Chichester, v. 28, n. 2, p. 123-131, 2012.
- WILSON, V. L.; JONES, Peter A. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. **Science**, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1055-1057, 1983.
- WILSON, A. G. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 79, n. 8S, p. 1514-1519, 2008.
- WOCIAL, B. et al. Plasma neuropeptide Y and catecholamines in women and men with essential hypertension. **Blood pressure**, Oslo, v. 4, n. 3, p. 143-147, 1995.
- YAN, A. T. et al. Risk scores for risk stratification in acute coronary syndromes: useful but simpler is not necessarily better. **European heart journal**, London, v. 28, n. 9, p. 1072-1078, 2007.

- YANG, X. L. et al. Homocysteine induces blood vessel global hypomethylation mediated by LOX-1. **Genetics and molecular research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 3787-3799, 2014.
- YOO, T. et al. Hypermethylation of repetitive DNA elements in livers of mice fed an atherogenic diet. **Nutrition**, London, v. 28, n. 2, p. 127-130, 2012.
- YU, J. et al. Neuropeptide Y polymorphisms and ischemic stroke in Chinese population. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 411, n. 3-4, p. 242-245, 2010.
- ZAINA, S. Unraveling the DNA methylome of atherosclerosis. **Current opinion in lipidology**, London, v. 25, n. 2, p. 148-153, 2014a.
- ZAINA, S. et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. **Circulation: Genomic and Precision Medicine**, Hagerstown, p. 113.000441, 2014b. Disponível em : <
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGENETICS.113.000441>>. Acesso: 16 mar. 2015.
- ZHOU, J.; XU, Z.; JIANG, C.. Neuropeptide Y promotes TGF- β 1 production in RAW264. 7 cells by activating PI3K pathway via Y1 receptor. **Neuroscience bulletin**, Beijing, v. 24, n. 3, p. 155-159, 2008.
- ZHOU, Z. et al. Genetic variation in human NPY expression affects stress response and emotion. **Nature**, London, v. 452, n. 7190, p. 997, 2008.
- ZUKOWSKA-GROJEC, Z. et al. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. **Circulation research**, Dallas, v. 83, n. 2, p. 187-195, 1998.

**ANEXO A –PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PROCARDIO/REALCOR EM ABRIL DE 2014**

PROCARDIO DIAGNOSTICOS
E URGÊNCIAS
CARDIOLÓGICAS LTDA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Preditores para a síndrome coronariana aguda: avaliação do valor prognóstico de biomarcadores e polimorfismos genéticos na estratificação de risco.

Pesquisador: Sérgio Tavares Montenegro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03187512.2.0000.5202

Instituição Proponente: Procardio Diagnosticos e Urgências Cardiologicas LTDA

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 631.090

Data da Relatoria: 30/04/2014

Apresentação do Projeto:

Os autores apresentam resumo da Doença coronária e sua dificuldade na estratificação. Buscam novos marcadores na tentativa de facilitar a predição de risco e evitar desfechos desfavoráveis. A Síndrome Coronariana Aguda engloba o Infarto Agudo do Miocárdio e a Angina Instável. No IAM, apesar de expressivos avanços no diagnóstico e tratamento, a ICA aguda tem frequência acentuada com expressiva morbidade e mortalidade. Em decorrência da natureza heterogênea da SCA, há ampla variação de risco para ocorrência de óbito ou eventos isquêmicos recorrentes. Há evidências de que a investigação de marcadores bioquímicos e o estudo de polimorfismos genéticos podem estar relacionados com a susceptibilidade, a expressão e o desfecho da doença, incluindo a resposta terapêutica (Vasan, 2006), o que pode representar grande valia na predisposição e prognóstico da SCA. O estudo visa avaliar o valor dos marcadores genéticos, que podem ser potencialmente utilizados na estratificação clínica das doenças cardiovasculares, beneficiando o paciente através de uma prevenção mais incisiva.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a relação entre o escore de risco TIMI com os marcadores inflamatórios, de lesão miocárdica e polimorfismos genéticos na síndrome coronariana aguda.

Endereço: Rua Epaminondas de Melo, 119
Bairro: Derby CEP: 52.010-050
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (813)216-0550 Fax: (813)222-0244 E-mail: cepprocardiorealcor@hotmail.com

PROCARDIO DIAGNOSTICOS
E URGÊNCIAS
CARDIOLÓGICAS LTDA



Continuação do Parecer: 631.090

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Diante do baixo grau de invasividade a figura do paciente , apenas coleta de sangue , e o potencial benefício de identificar marcadores relevantes , o benefício é bastante superior ao pequeno risco.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem fundamentada e trata-se um tema atual. No Nordeste poucas pesquisas tem seguido esta linha , e o grupo do trabalho proposto já vem seguindo nessa linha. Este é mais um projeto que propoem para continuar a busca pelos marcadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O trabalho nao apresenta pendencias

Recomendações:

Nada a acrescentar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto relevante. Bem desenhado em grupo já bem estruturado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RECIFE, 30 de Abril de 2014

Assinador por:
Camila Sarteschi
(Coordenador)

Endereço: Rua Epaminondas de Melo, 119
Bairro: Derby CEP: 52.010-050
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (813)216-0550 Fax: (813)222-0244 E-mail: cepprocardiorealcon@hotmail.com

APÊNDICE A - TCLE PARA PACIENTES COM SCA

Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes

Título: Preditores para a síndrome coronariana aguda: avaliação do valor prognóstico de biomarcadores e polimorfismos genéticos na estratificação de risco.

Investigador:
Sérgio Tavares
Montenegro
Unidade: Real
Hospital do
Coração
Av. Agamenon Magalhães S/N Derby Recife-PE

Declaro que fui informado em detalhes sobre o estudo acima, que o mesmo segue as determinações éticas da resolução 196/1996 do conselho nacional de saúde e aceito participar do mesmo. Fui internado neste serviço com diagnóstico presumido de Síndrome Coronariana Aguda (SCA) e informado que a participação no estudo não irá interferir na conduta do médico assistente. O objetivo do estudo é coletar dados do prontuário, tais como: dados epidemiológicos, do exame clínico, exames realizados, tratamento efetuado e evolução clínica, durante o internamento e após um ano com a intenção de estabelecer um registro clínico dos pacientes com SCA e estabelecer marcadores bioquímicos e inflamatórios que possam desempenhar um papel importante na estratificação de risco, tornando a prevenção da SCA mais eficaz. Além disso, durante a retirada de sangue para os exames de rotina solicitados pelo médico, será obtida também, uma quantidade (10mL) de sangue para os exames de citocinas e de polimorfismo genético. Essa retirada de sangue não terá nenhum efeito danoso para minha saúde, podendo ocorrer apenas dor e/ou hematoma no local da punção. Esses exames consistem na análise de proteína do sangue que avaliam a resposta inflamatória de origem imunológica e na identificação de uma característica na população que aumenta o risco de se adquirir a SCA, respectivamente.

Fui informado ainda que os materiais coletados vão ficar guardados no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de castigo ou pressão por tal.

Ciente que minha identidade será preservada e minha participação é inteiramente voluntária, com a garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa, com liberdade de recusar a participar ou retirar a minha permissão, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, permito que dados arquivados no meu prontuário médico e o exame de sangue realizado sejam avaliados para o estudo. O benefício maior deste trabalho é traçar um perfil dos pacientes com SCA e indivíduos saudáveis para estabelecer uma meta para um diagnóstico, tratamento mais eficazes e avaliação do risco da doença.

Concordo, ainda, em seguir as instruções das pessoas que estão conduzindo e monitorando o estudo.

Data: ___ / ___ / ___

Nome do Paciente: _____ Assinatura: _____ Testemunha: _____ Assinatura: _____

Assinatura do responsável pelo projeto
Sérgio Tavares Montenegro

**APÊNDICE B -TCLE PARA PACIENTE INTERNADO NO HOSPITAL
PORTUGUÊS, MAS SEM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CORONARIANA AGUDA**

**Termo de consentimento livre e esclarecido para paciente internado no
Hospital Português mas sem diagnóstico de
doença coronariana aguda**

Título: Preditores para a síndrome coronariana aguda: avaliação do valor
prognóstico de biomarcadores e polimorfismos
genéticos na estratificação de risco.

Investigador:
Sérgio Tavares
Montenegro
Unidade: Real
Hospital do
Coração
Av. Agamenon Magalhães S/N Derby Recife-PE

Declaro que fui informado em detalhes sobre o estudo acima, que o mesmo segue as determinações éticas da resolução 196/1996 do conselho nacional de saúde e aceito participar do mesmo. Fui selecionado para participar do estudo e fazer parte do grupo controle-internado, isto é, sem o diagnóstico de Síndrome Coronariana Aguda-SCA, no entanto internado no Hospital Português com outros diagnósticos.

A minha participação será doando sangue, uma quantidade (5 ml) de sangue equivalente a uma colher de chá, para o exame de polimorfismo genético, essa retirada de sangue não terá nenhum efeito danoso para a minha saúde podendo ocorrer apenas dor e/ou hematoma no local da punção. Esse exame consiste na identificação de uma característica na população que aumenta o risco de se adquirir a SCA. Fui informado ainda, que os materiais coletados vão ficar guardados no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de castigo ou pressão por tal.

Ciente que minha identidade será preservada e minha participação é inteiramente voluntária, com a garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa, permito que o exame de sangue realizado seja avaliado para o estudo. O benefício maior deste trabalho é traçar um perfil dos pacientes com SCA, pacientes internados com outros diagnósticos mas sem SCA e indivíduos saudáveis para estabelecer uma meta para um diagnóstico, tratamento mais eficazes e avaliação do risco da doença.

Concordo, ainda, em seguir as instruções das pessoas que estão conduzindo e monitorando o estudo.

Data: ___ / ___ / ___

Nome do Paciente:

Assinatura: _____ Testemunha: Assinatura: _____

Assinatura do responsável pelo projeto

Sérgio Tavares Montenegro

APÊNDICE C - TCLE PARA INDIVÍDUO SAUDÁVEL

Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduo saudável

Título: Preditores para a síndrome coronariana aguda: avaliação do valor prognóstico de biomarcadores e polimorfismos genéticos na estratificação de risco.

Investigador:
Sérgio Tavares
Montenegro
Unidade: Real
Hospital do
Coração
Av. Agamenon Magalhães S/N Derby Recife-PE

Declaro que fui informado em detalhes sobre o estudo acima, que o mesmo segue as determinações éticas da resolução 196/1996 do conselho nacional de saúde e aceito participar do mesmo. Fui selecionado para participar do estudo e fazer parte do grupo controle-internado, isto é, sem o diagnóstico de Síndrome Coronariana Aguda-SCA.

A minha participação será doando sangue, para os exames de rotina solicitados pelo médico, e uma quantidade (5 ml) de sangue equivalente a uma colher de chá, para o exame de polimorfismo genético, essa retirada de sangue não terá nenhum efeito danoso para a minha saúde. Esse exame consiste na identificação de uma característica na população que aumenta o risco de se adquirir a SCA.

Ciente que minha identidade será preservada e minha participação é inteiramente voluntária, com a garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa, com liberdade de recusar a participar ou retirar a minha permissão, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, permito que dados arquivados no meu prontuário médico e o exame de sangue realizado sejam avaliados para o estudo. O benefício maior deste trabalho é traçar um perfil dos pacientes com SCA e indivíduos saudáveis para estabelecer uma meta para um diagnóstico, tratamento mais eficazes e avaliação do risco da doença.

Concordo, ainda, em seguir as instruções das pessoas que estão conduzindo e monitorando o estudo.

Data: ___/___/___

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____ Testemunha: Assinatura: _____

Assinatura do responsável pelo projeto

Sérgio Tavares Montenegro

**APÊNDICE D - ANÁLISE DA VARIANTE C.20T>C DO NPY COM AS
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, CLÍNICAS E HÁBITO**

Apêndice D - Análise da variante c.20T>C do *NPY* com as características biológicas, clínicas e hábito.
(continua)

Variáveis	NPY c.20T> C (rs16139)				OR	IC 95%		p
	TT		TC/CC			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
GÊNERO								
Masculino	158	75,60	10	83,33	1,00			
Feminino	51	24,40	2	16,67	0,62	0,09	2,45	0,5452
INÍCIO DA SCA								
Esperado	96	45,93	3	25,00	1,00			
Precoce	113	54,07	9	75,00	2,55	0,74	11,73	0,1695
GÊNERO/TEMPO								
Masculino								
Esperado	55	34,81	2	20,00	1,00			
Precoce	103	65,19	8	80,00	2,14	0,51	14,48	0,3476
Feminino								
Esperado	41	80,39	1	50	1,00			
Precoce	10	19,61	1	50	4,10	0,15	109,92	0,333
Esperado								
Homem	55	45,45	2	33,33	1,00			
Mulher	66	54,55	4	66,67	1,67	0,31	12,35	0,5638
Precoce								
Homem	103	82,4	8	88,89	1,00			
Mulher	22	17,6	1	11,11	0,59	0,03	3,43	0,6218
TABAGISMO								
Não	155	74,16	7	58,33	1,00			
Sim	54	25,84	5	41,67	2,05	0,59	6,69	0,2365
DIABETES								
Não	118	56,46	8	66,67	1,00			
Sim	91	43,54	4	33,33	0,65	0,17	2,13	0,4902
HIPERTENSÃO								
Não	50	23,92	2	16,67	1,00			
Sim	159	76,08	10	83,33	1,57	0,40	10,45	0,5674
DISLIPIDEMIA								
Não	87	41,63	2	16,67	1,00			
Sim	122	58,37	10	83,33	3,57	0,91	23,57	0,1063
Alteração de PcR								
Não	66	34,74	5	50,00	1,00			
Sim	124	65,26	5	50,00	0,53	0,14	1,98	0,3324
LA *								
0	11	5,67	2	20	1,00			

≤2	101	52,06	3	30	0,16	0,02	1,09	0,0609
>2	82	42,27	5	50	0,34	0,06	1,94	0,2228

Apêndice D - Análise da variante c.20T>C do *NPY* com as características biológicas, clínicas e hábito.
(conclusão)

Variáveis	NPY c.20T> C (rs16139)				OR	IC 95%		p
	TT		TC/CC			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
TROPONINA > 0,11 ng/mL								
Não	29	13,94	2	18,18	1,00			
Não	29	13,94	2	18,18	1,00			
Sim	179	86,06	9	81,82	0,73	0,18	4,94	0,6953
CK-MB massa >5,6ng/mL								
Não	60	31,25	3	33,33				
Sim	132	68,75	6	66,67	0,91	0,23	4,42	0,8953
FE								
<50%	69	37,10	2	28,57	1,00			
≥50%	117	62,90	5	71,43	1,47	0,31	10,49	0,648

Fonte: a autora

Nota: PCR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p; * Regressão Logística Multinomial.

**APÊNDICE E - ANÁLISE DA VARIANTE C.-485T>C DO NPY COM AS
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, CLÍNICAS E HÁBITO**

Apêndice E - Análise da variante c.-485T>C do *NPY* com as características biológicas, clínicas e hábito.

(continua)

Variáveis	NPY c.-485T>C (rs16147)				OR	IC 95%		p
	TT		TC/CC			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
GÊNERO								
Masculino	48	82,76	117	73,12	1,00			
Feminino	10	17,24	43	26,88	1,76	0,85	3,97	0,1462
INÍCIO DA SCA								
Esperado	25	43,1	73	45,62				
Precoce	33	56,9	87	54,37	0,90	0,49	1,65	0,7409
GÊNERO/TEMPO								
Masculino								
Esperado	17	35,42	39	33,33	1,00			
Precoce	31	64,58	78	66,67	1,0968	0,5347	2,2063	0,7974
Feminino								
Esperado	8	80	34	79,07	1,00			
Precoce	2	20	9	20,93	1,0588	0,2152	7,8266	0,9479
Esperado								
Homem	17	51,52	39	41,49	1,00			
Mulher	16	48,48	55	58,51	1,4984	0,6747	3,3479	0,3197
Precoce								
Homem	31	86,11	78	79,59	1,00			
Mulher	5	13,89	20	20,41	1,5897	0,5832	5,1084	0,3934
TABAGISMO								
Não	41	70,69	119	74,38	1,00			
Sim	17	29,31	41	25,62	0,83	0,43	1,65	0,5866
DIABETES								
Não	37	63,79	86	53,75	1,00			
Sim	21	36,21	74	46,25	1,52	0,82	2,85	0,1877
HIPERTENSÃO								
Não	18	31,03	33	20,62	1,00			
Sim	40	68,97	127	79,38	1,73	0,87	3,38	0,1110
DISLIPIDEMIA								
Não	25	43,10	62	38,75	1,00			
Sim	33	56,90	98	61,25	1,20	0,65	2,20	0,5621
Alteração de PcR								
Não	15	29,41	54	36,99	1,00			
Sim	36	70,59	92	63,01	0,71	0,35	1,39	0,3302
LA								
0	3	5,56	10	6,8	1,00			

≤2	27	50	76	51,7	0,84	0,22	3,30	0,8078
>2	24	44,44	61	41,5	0,76	0,19	3,01	0,6988

Apêndice E - Análise da variante c.-485T>C do *NPY* com as características biológicas, clínicas e hábito.

(conclusão)

Variáveis	NPY c.-485T>C (rs16147)				OR	IC 95%		p
	TT		TC/CC			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
TROPONINA > 0,11 ng/mL								
Não	6	10,34	24	15,19	1,00			
Sim	52	89,66	134	84,81	0,64	0,23	1,58	0,3644
CK-MB massa >5,6 ng/mL								
Não	16	28,57	46	32,39	1,00			
Sim	40	71,43	96	67,61	0,83	0,42	1,62	0,6016
FE								
<50%	15	28,85	55	39,86	1,00			
≥50%	37	71,15	83	60,14	0,61	0,30	1,20	0,1628

Fonte: a autora

Nota: PCR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p

**APÊNDICE F - ANÁLISE DA VARIANTE C.-1088C> T DO *NPYR2* COM AS
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, CLÍNICAS E HÁBITO**

Apêndice F - Análise da variante c.-1088C> T do *NPYR2* com as características biológicas, clínicas e hábito.

(continua)

Variáveis	NPYR2 c.-1088T>C (rs6857715)				OR	IC 95%		p
	TT		TC/CC			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
GÊNERO								
Masculino	52	72,22	116	77,85	1,00			
Feminino	20	27,78	33	22,15	0,74	0,39	1,42	0,3591
INÍCIO DA SCA								
Esperado	34	47,22	65	43,62				
Precoce	38	52,78	84	56,38	1,16	0,66	2,04	0,6143
GÊNERO/TEMPO								
Masculino								
Esperado	19	36,54	38	32,76	1,00			
Precoce	33	63,46	78	67,24	1,1818	0,59	2,3337	0,6326
Feminino								
Esperado	15	75	27	81,82	1,00			
Precoce	5	25	6	18,18	0,6667	0,1718	2,6597	0,5544
Esperado								
Homem	19	47,5	38	42,7	1,00			
Mulher	21	52,5	51	57,3	1,2143	0,5716	2,5748	0,6116
Precoce								
Homem	33	76,74	78	83,87	1,00			
Mulher	10	23,26	15	16,13	0,6346	0,2604	1,5944	0,3208
TABAGISMO								
Não	53	73,61	109	73,15	1,00			
Sim	19	26,39	40	26,85	1,02	0,55	1,96	0,9427
DIABETES								
Não	37	51,39	89	59,73	1,00			
Sim	35	48,61	60	40,27	0,71	0,40	1,26	0,2411
HIPERTENSÃO								
Não	14	19,44	38	25,50	1,00			
Sim	58	80,56	111	74,50	0,71	0,34	1,38	0,3210
DISLIPIDEMIA								
Não	29	40,28	60	40,27	1,00			
Sim	43	59,72	89	59,73	1,00	0,56	1,77	0,9989
Alteração de PcR								
Não	20	31,75	51	37,23	1,00			
Sim	43	68,25	86	62,77	0,78	0,41	1,47	0,4523
LA								

0	4	5,8	9	6,67	1,00			
≤2	30	43,48	74	54,81	1,10	0,31	3,83	0,8857
>2	35	50,72	52	38,52	0,66	0,19	2,31	0,5160

Apêndice F - Análise da variante c.-1088C> T do *NPYR2* com as características biológicas, clínicas e hábito. (conclusão)

Variáveis	NPYR2 c.-1088T>C (rs6857715)				OR	IC 95%		p
	TT		TC/CC			Inf	Sup	
	N	%	N	%				
TROPONINA > 0,11 ng/mL								
Não	11	15,49	20	13,51	1,00			
Sim	60	84,51	128	86,49	1,17	0,51	2,57	0,6943
CK-MB massa >5,6 ng/mL								
Não	22	15,49	41	13,51	1,00			
Sim	42	84,51	96	86,49	1,23	0,65	2,30	0,5268
FE								
<50%	22	34,38	49	37,98	1,00			
≥50%	42	65,62	80	62,02	0,86	0,45	1,59	0,6246

Fonte: a autora

Nota: PcR: Proteína c Reativa; FE: fração de ejeção; Regressão Logística OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p: valor de p