

## Polimorfismo G894T da Óxido Nítrico-Sintetase Endotelial e o Prognóstico na Insuficiência Cardíaca

*Genetic Polymorphism G894T and the Prognosis of Heart Failure Outpatients*

Oziel Marcio Araujo Tardin<sup>1</sup>, Sabrina Bernardez Pereira<sup>1</sup>, Monica Wanderley Monçores Velloso<sup>1</sup>, Henrique Miller Balieiro<sup>2</sup>, Bruno Costa<sup>1</sup>, Thiago Oliveira e Alves<sup>1</sup>, Camila Giro<sup>1</sup>, Leandro Pontes Pessoa<sup>1</sup>, Georgina Severo Ribeiro<sup>1</sup>, Evandro Tinoco Mesquita<sup>1</sup>

Universidade Federal Fluminense<sup>1</sup>, Niterói, RJ; Escola de Medicina de Valença<sup>2</sup>, Valença, RJ – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Estudos prévios avaliaram o papel do polimorfismo genético da enzima óxido nítrico-sintetase endotelial sobre o prognóstico na insuficiência cardíaca. Entretanto, faltam estudos relacionando o G894T e a insuficiência cardíaca na população brasileira.

**Objetivo:** Avaliar a associação do G894T com o prognóstico de amostra de pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca.

**Métodos:** Coorte com 145 pacientes com insuficiência cardíaca sistólica, num segmento de 40 meses (média = 22 meses), em dois hospitais universitários do Estado do Rio de Janeiro. Foi avaliada a relação do G894T com os desfechos: remodelamento reverso; melhora da classe funcional (NYHA); taxas de mortalidade e hospitalização. Os diâmetros do átrio e ventrículo esquerdos e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo foram medidos na admissão e após 6 meses, para avaliação do remodelamento reverso. A melhora na classe funcional foi avaliada após 6 meses e as taxas de mortalidade e de hospitalização durante todo o seguimento. A raça foi autodeclarada. O polimorfismo G894T foi analisado por reação em cadeia de polimerase e por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição.

**Resultados:** A frequência genotípica foi GG (40%), GT (48,3%) e TT (11,7%), e a frequência alélica foi guanina (64,1%) e tiamina (35,8%). Não houve diferença entre as frequências genotípica ou alélica conforme a raça autodeclarada, tampouco conforme as características basais. Não houve relação entre o genótipo ou a frequência alélica e os desfechos analisados.

**Conclusão:** Não se observou associação do polimorfismo G894T (Glu298Asp) com o prognóstico de amostra de pacientes ambulatoriais brasileiros com insuficiência cardíaca sistólica. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(4):352-358)

**Palavras-chave:** Insuficiência Cardíaca; Polimorfismo Genético; Óxido Nítrico; Origem Étnica e Saúde.

### Abstract

**Background:** Previous studies have analyzed the role of the genetic polymorphism of endothelial nitric oxide synthase on heart failure prognosis. However, there are no studies relating the G894T and heart failure in Brazil.

**Objective:** To evaluate the association between G894T GP and the prognosis of a sample of Brazilian outpatients with heart failure.

**Methods:** Cohort study included 145 patients with systolic heart failure, followed for up to 40 months (mean = 22), at two university hospitals, in the State of Rio de Janeiro. We evaluated the relationship between G894T and the following outcomes: reverse remodeling, improvement in functional class (NYHA), and mortality and hospitalization rates. The diameters of the left atrium and ventricle, as well as the ejection fraction of the left ventricle, were evaluated at baseline and at 6 months to assess reverse remodeling. The improvement in functional class was evaluated after 6 months, and mortality rate and hospitalization were evaluated during follow-up. Race was self-declared. G894T polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

**Results:** The genotypic frequencies were GG (40%), GT (48.3%) and TT (11.7%). The allele frequency was guanine (64.1%) and thiamine (35.8%). There were no differences between the genotype or allelic frequencies according to self-declared race, either as baseline characteristics. There was no relationship between genotype or allele frequency and the outcome measures.

**Conclusion:** No association was observed between the G894T polymorphism (Glu298Asp) and prognosis in this sample of Brazilian outpatients with systolic heart failure. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(4):352-358)

**Keywords:** Heart Failure; Polymorphism, Genetic; Nitric Oxide; Ethnicity and Health.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Oziel Marcio Araujo Tardin •

Rua Coronel Moreira Cesar, 63/501, Icaraí. CEP 24230-050, Niterói, RJ – Brasil

E-mail: dr.ozieltardin@cardiol.br, ozieltardin@gmail.com

Artigo recebido em 18/12/12; revisado em 10/04/13; aceito em 15/4/13.

DOI: 10.5935/abc.20130167

## Introdução

A evolução, o prognóstico e a resposta terapêutica dos pacientes com insuficiência cardíaca não são uniformes. Essa variação interpessoal no comportamento da doença tem muitas causas, dentre as quais os fatores genéticos<sup>1-7</sup>. Diversos polimorfismos genéticos têm sido implicados; dentre os mais estudados, está o G894T (Glu298Asp), no qual a mudança do nucleotídeo Guanina (G) pela Tiamina (T) na posição 894 do éxon 7 do gene leva à substituição do aminoácido ácido Glutâmico (Glu) pelo Ácido Aspártico (Asp), na posição 298, da enzima Óxido Nítrico-Sintetase Endotelial (ONSe), responsável pela produção do Óxido Nítrico (ON) no endocárdio e endotélio<sup>8-16</sup>.

O estudo GRACE, cuja amostra populacional foi composta por brancos europeus, avaliou o impacto do polimorfismo Glu298Asp da ONSe sobre a sobrevida em pacientes com insuficiência cardíaca, e a variante Asp298 foi associada à pior sobrevida livre de eventos, particularmente em pacientes com miocardiopatia não isquêmica<sup>17</sup>.

No estudo A-HeFT, os pacientes afro-americanos com insuficiência cardíaca sistólica tiveram redução da taxa de mortalidade e de hospitalização em resposta à combinação Dinitrato de Isossorbida e Hidralazina (ISDN/HYD), que agia como um doador de ON<sup>18</sup>. O estudo GRAHF, um subestudo genético do A-HeFT, demonstrou que apenas os pacientes homozigotos Glu298Glu apresentaram melhora no escore composto: hospitalização, mortalidade e melhor qualidade de vida<sup>19</sup>.

Notadamente, esses estudos possuem amostras populacionais com forte predomínio étnico, e com uma distribuição genotípica intimamente relacionada à cor ou raça autodeclarada. Em estudo desenvolvido no Brasil, Velloso e cols.<sup>20</sup> avaliaram amostra de pacientes com insuficiência cardíaca e controles saudáveis, não verificando diferença na distribuição da frequência alélica (G/T) em função da cor autodeclarada<sup>20</sup>.

Faltam estudos relacionando o G894T (Glu298Asp) e a insuficiência cardíaca na população brasileira, o que permite pensar que, talvez, os resultados dos estudos internacionais possam não ser aplicáveis diretamente à realidade brasileira, que possui uma população fortemente miscigenada.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação do polimorfismo G894T (Glu298Asp) e o prognóstico de pacientes ambulatoriais brasileiros com insuficiência cardíaca sistólica.

## Métodos

### População do estudo

Tratou-se de um estudo observacional, de coorte prospectiva, multicêntrico, desenvolvido em clínicas de insuficiência cardíaca do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense (UFF) e no Hospital Geral da Escola de Medicina de Valença, ambos no Estado do Rio de Janeiro, no período de dezembro de 2005 a março de 2009. O estudo incluiu 145 pacientes ambulatoriais com insuficiência cardíaca predominantemente sistólica, do Sistema Único de Saúde (SUS). Amostra de conveniência.

Os critérios de inclusão foram: idade  $\geq 18$  anos, história e exame físico compatíveis com insuficiência cardíaca e ecocardiograma com Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE)  $\leq 50\%$  (Simpson). Os critérios de exclusão foram: miocardite em atividade, Infarto do Miocárdio (IM) há menos de 3 meses, Terapia de Ressincronização Cardíaca (TRC), episódio de morte súbita abortada ou presença de desfibrilador implantável, angioplastia ou cirurgia cardíaca programadas para os próximos 12 meses.

A raça foi autodeclarada. A etiologia isquêmica foi considerada nos pacientes com história de IM prévio, confirmado por eletrocardiograma, testes funcionais compatíveis com isquemia ou cineangiogramografia mostrando estenose  $\geq 50\%$  de um vaso epicárdico.

Após inclusão, os pacientes tinham consultas médicas com cardiologistas, realizadas a cada 3 meses ou menos, se a equipe julgasse necessário, sendo acompanhados por um período mínimo de 12 meses e máximo de 40 meses (média = 22). O tratamento da insuficiência cardíaca seguiu as orientações das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca<sup>21</sup>. Na admissão, foram realizadas coleta de sangue para exames laboratoriais (hemoglobina, glicemia, creatinina e sódio) e análise genética. Foram realizados ecocardiogramas na admissão e após 6 meses.

Os desfechos analisados foram: óbito durante todo o seguimento, internação durante todo o seguimento, melhora da classe funcional (NYHA) após 6 meses e remodelamento reverso após 6 meses. As hospitalizações foram contabilizadas nas consultas médicas subsequentes, enquanto os óbitos foram confirmados por contato telefônico com familiares e/ou revisão de prontuários. A classe funcional (NYHA) foi avaliada na admissão e após 6 meses de seguimento. Os ecocardiogramas realizados aos 6 meses foram comparados aos da admissão, considerando-se remodelamento reverso (melhora ecocardiográfica) a presença de um ou mais dos seguintes parâmetros: (1) aumento na FEVE  $\geq 20\%$ ; (2) aumento na FEVE  $\geq 10\%$ ; ou (3) redução  $\geq 5\%$  no diâmetro diastólico do Átrio Esquerdo (AE) e/ou do Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo (DDVE).

O Estudo foi conduzido em conformidade com os princípios da Declaração de Helsinki, e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética das Instituições. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado.

### Análise molecular do polimorfismo do gene da ONSe

O polimorfismo Glu298Asp (G894T) causado por uma transverso de base G para base T, localizado no éxon 7 do gene que codifica a ONSe foi analisado por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e por análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP, sigla do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*). A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 mL, sendo utilizados: 50 a 100 ng de DNA genômico, após ajuste da concentração, 15 pmol de cada oligonucleotídeo sense 5'-AAGCCAGGAGACAGTGGATGG-3' e antisense 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3', 1 U de Taq DNA polimerase. Fermentas, tampão de reação (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM), 200 mM

de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Após desnaturação a 94°C por 5 minutos, as amostras foram amplificadas em um programa de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 58°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C para extensão, em um termociclador Techne modelo Progene. Em seguida as amostras foram submetidas à extensão final em um ciclo de 7 minutos a 72°C. Os amplicons foram avaliados em gel de agarose a 2%, usando um marcador de 100 pares de base como indicador de tamanho.

O fragmento de 248 pares de base amplificado foi digerido com a enzima de restrição (RFLP) Ban II, que reconhece a base C do códon 298 gerando dois fragmentos de 163 e 85 pares de base na presença do Aminoácido Acido Glutâmico. O padrão de genótipos definido em gel de agarose a 2% foi: dois fragmentos, de 163 e de 85 bp, para o homozigoto Glu298, e um único fragmento de 248 pares de base identificando o homozigoto Asp298; indivíduos heterozigotos foram identificados pela presença de fragmentos contendo 248, 163 e 85 pares de base.

### Análise estatística

As informações observadas foram descritas em tabelas e expressas como média  $\pm$  desvio padrão, para as variáveis numéricas, e frequência e percentagem, para variáveis categóricas. Para a análise das variáveis ecocardiográficas, foram utilizados o teste *t* de Student (pareado e para classe funcional - informação categórica) e o teste de McNemar.

A relação das variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas com o genótipo (GG, GT ou TT) foi acessada por análise de variância univariada ou Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica).

A relação entre as variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas, bem como das taxas de sobrevida e sobrevida livre de eventos (hospitalização) com o genótipo, foi avaliada pelos seguintes métodos:

para comparações com informações categóricas, foi aplicado o teste do qui-quadrado ou exato de Fisher;

para comparações com informações numéricas, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes ou Mann-Whitney. A homogeneidade das variâncias entre os subgrupos foi analisada utilizando-se Bartlett;

análise de regressão logística foi utilizada para identificar variáveis que predizem (ou explicam) os desfechos ou respostas terapêuticas.

Métodos não paramétricos foram utilizados para as variáveis não normalmente (Gaussianas) distribuídas devido à dispersão de informações e rejeição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O critério para determinar significância foi 5%. A análise estatística foi conduzida utilizando-se o software SAS 6.11 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## Resultados

### Perfil geral da amostra

A população do estudo encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (qui-quadrado = 0,387;  $p = 0,53$ ). As características basais encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características basais

Idade (anos)	58,8 $\pm$ 13,0
Átrio esquerdo (mm)	46,4 $\pm$ 7,8
DDVE (mm)	67,9 $\pm$ 9, 7
FEVE (%)	35,5 $\pm$ 9,2
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	25,8 $\pm$ 5,1
Hemoglobina (g/dL)	13,5 $\pm$ 1,8
Creatinina (mg/dL)	1,24 $\pm$ 0,73
Sódio (Meq/L)	139,2 $\pm$ 3,6
Masculino (%)	67,8
<b>Raça autodeclarada (%)</b>	
Não afro-brasileiros	50,7
Afro-brasileiros	49,3
Diabetes (%)	34,9
Fibrilação atrial (%)	15,8
Etiologia isquêmica (%)	46,6
Hipertensão (%)	74,0
<b>NYHA (%)</b>	
I	33,6
II	41,8
III	23,2
IV	1,4
<b>Genótipo (%)</b>	
GG	40,0
GT	48,3
TT	11,7
<b>Frequência alélica (%)</b>	
G	64,1
T	35,8

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; G: guanina; T: timina.

### Características genotípicas e clínicas

Não houve diferença na distribuição genotípica ou na frequência alélica, de acordo com a raça autodeclarada. Tampouco se observou diferença nas características clínicas, laboratoriais ou ecocardiográficas de admissão em relação ao genótipo (Tabela 2). Observou-se tendência à maior frequência de etiologia isquêmica entre os pacientes com o genótipo TT.

### Genótipo e terapêutica

Não houve diferença estatisticamente significativa na terapia padrão, para insuficiência cardíaca, entre os subgrupos de genótipos. No entanto, observou-se maior utilização da aspirina, na admissão, no subgrupo de pacientes homozigotas TT (Tabela 3).

Tabela 2 - Características basais versus genótipo

	GG	GT	TT	Valor de p
Idade (anos)	56,0 ± 12,3	59,9 ± 13,7	63,4 ± 11,7	0,073
Masculino (%)	58,6	74,3	76,5	NS
<b>Raça autodeclarada (%)</b>				
Não afro-brasileiro	43,1	54,3	64,7	NS
Afro-brasileiro	56,9	45,7	35,3	
Etiologia isquêmica (%)	41,4	44,3	70,6	0,095
Diabetes (%)	39,7	28,6	41,2	NS
Fibrilação atrial (%)	13,8	15,7	23,5	NS
Hipertensão	75,9	70,0	82,4	NS
<b>NYHA (%)</b>				
I	37,9	35,7	11,8	NS
II	37,9	40,0	58,8	
III/IV	24,2	24,3	29,4	
Anemia (%)	30,4	34,8	29,4	NS
Creatinina > 1,5	14,0	21,4	5,9	NS
Sódio < 135 (%)	10,5	5,7	0,0	NS
Átrio esquerdo (mm ± DP)	47,3 ± 8,5	45,5 ± 7,2	47,5 ± 7,6	NS
DDVE (mm ± DP)	69,1 ± 9,7	67,6 ± 9,9	64,8 ± 9,2	NS
FEVE (%) ± DP)	33,8 ± 9,4	36,3 ± 9,0	38,5 ± 8,7	NS
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> ± DP)	26,5 ± 5,4	25,6 ± 5,1	25,0 ± 3,7	NS

NS: não significativo; DP: desvio padrão; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Tabela 3 - Terapêutica versus genótipo

	Admissão				Após 6 meses			
	GG	GT	TT	Valor de p	GG	GT	TT	Valor de p
Inibidor da enzima de conversão de angiotensina (%)	80,4	76,2	93,3	NS	76,5	66,7	73,3	NS
Bloqueador do receptor de angiotensina (%)	17,7	12,7	0,0	NS	23,5	27,0	20,0	NS
Betabloqueador (%)	76,5	65,1	73,3	NS	92,2	87,3	93,3	NS
Espirinolactona (%)	66,7	50,8	60,0	NS	70,6	68,3	73,3	NS
Furosemida (%)	64,7	65,1	60,0	NS	62,8	63,5	66,7	NS
Hidralazina (%)	7,8	7,9	6,7	NS	13,7	11,1	13,3	NS
Nitrato (%)	35,3	25,4	53,3	NS	33,3	36,5	46,7	NS
Digoxina (%)	64,7	47,6	53,3	NS	54,9	52,4	40,0	NS
Amiodarona (%)	3,9	4,8	0,0	NS	3,9	4,8	0,0	NS
Tiazídicos (%)	19,6	25,4	40,0	NS	11,8	15,9	20,0	NS
Bloqueador de canal de cálcio (%)	9,8	15,9	26,7	NS	9,8	15,9	26,7	NS
Aspirina (%)	37,3	54,0	73,3	0,031	47,1	61,9	73,3	NS
Estatina (%)	41,2	38,1	66,7	NS	52,9	54,0	80,0	NS
Varfarina (%)	19,6	14,3	13,3	NS	17,7	11,1	20,0	NS

NS: não significativo.

### Genótipo e remodelamento reverso

O genótipo não apresentou relação com as alterações ecocardiográficas observadas ao longo do estudo.

Analisando as variáveis simultaneamente e utilizando a regressão logística, observou-se que maior AE ( $p = 0,0005$ ) e menor DDVE ( $p = 0,009$ ), na admissão, associaram-se à redução do diâmetro do AE  $\geq 5\%$ . A presença de fibrilação atrial ( $p = 0,0002$ ) e menor AE ( $p = 0,004$ ), na admissão, foram associados à redução do DDVE  $\geq 5\%$  após 6 meses.

A CF (NYHA) II ( $p = 0,006$ ) e III/IV ( $p = 0,030$ ), assim como a menor FEVE ( $p = 0,023$ ) na admissão, associaram-se ao aumento de FEVE  $\geq 10\%$  após 6 meses. Menor FEVE ( $p = 0,0001$ ) e ausência de hiponatremia ( $p = 0,02$ ) na admissão foram associadas ao aumento da FEVE  $\geq 20\%$  após 6 meses.

### Genótipo e melhora da CF (NYHA)

A melhora da CF (NYHA), após 6 meses, não se relacionou ao genótipo ou frequência alélica.

Apenas creatinina  $> 1,5$  mg/dL e pior CF III/IV, na admissão, associaram-se à melhora evolutiva da CF, após 6 meses ( $p = 0,025$  and  $0,0001$ , respectivamente).

### Impacto do genótipo sobre a sobrevida ou hospitalização

Durante o seguimento, 15 pacientes (10,3%) morreram. Trinta e quatro pacientes (23,4%) tiveram uma admissão hospitalar; nove pacientes (6,2%) tiveram duas; enquanto três pacientes (2,1%) tiveram três ou mais admissões hospitalares.

Após a regressão logística, apenas um maior DDVE na admissão se relacionou independentemente à morte ( $p = 0,004$ ), enquanto um maior AE ( $p = 0,02$ ) e CF III/IV ( $0,004$ ) na admissão se relacionaram à hospitalização.

A média do DDVE foi  $75,6 \pm 14,7$  mm no grupo que evoluiu a óbito versus  $67,1 \pm 8,8$  mm no grupo que sobreviveu durante o seguimento ( $p = 0,017$ ). Nos pacientes que tiveram ao menos uma admissão hospitalar, a média do AE foi  $48,6 \pm 8,6$  mm versus  $45,6 \pm 7,1$  mm no grupo sem internação ao longo do seguimento ( $p = 0,017$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida ou na hospitalização em relação ao genótipo ou à frequência alélica (curva de Kaplan-Meier, teste de log-rank) (Gráfico 1).

## Discussão

A amostra populacional do presente estudo mostrou importantes diferenças em relação aos estudos prévios envolvendo o polimorfismo genético da ONSe: os pacientes se dividiram de forma praticamente igualitária entre os autodeclarados brancos (50,7%) e os autodeclarados afro-brasileiros (49,7%), o que o distingue de estudos anteriores como o GRACE<sup>17</sup>, com 90,4% de brancos, e A-HeFT<sup>18</sup>, com 100% de afro-americanos. Ainda, diferentemente do que mostraram estudos anteriores, nos quais o alelo G foi mais prevalente entre os negros e o alelo T entre os brancos<sup>17,19,22</sup>, não se observou, no presente estudo, associação entre a cor ou raça autodeclarada e a distribuição genotípica ou frequência alélica. Além disso,

a distribuição genotípica foi 40% para Glu298Glu, 48,7% para Glu298Asp e 11,7% para Asp298Asp, enquanto a da população do A-HeFT foi 79% para Glu298Glu, 20% para Glu298Asp e 1% para Asp298Asp<sup>19</sup> e, no GRACE, 67% para Glu298Glu, 31% para Glu298Asp e 2% para Asp298Asp, para negros, e de 41% para Glu298Glu, 45% para Glu298Asp e 14% para Asp298Asp, para brancos<sup>17,18</sup>.

As grandes diferenças na distribuição da raça autodeclarada e da frequência e distribuição genotípica, entre as amostras do presente estudo e dos estudos prévios, que avaliaram o polimorfismo G894T (Glu298Asp), permitem pensar que, talvez, os resultados dos estudos internacionais não sejam diretamente aplicáveis aos pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca.

Após os resultados do estudo A-HeFT, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o BiDil® (ISDN/HYD) para pacientes negros com insuficiência cardíaca sistólica, o que representou o primeiro medicamento aprovado para uma raça específica.

O impacto social e econômico da insuficiência cardíaca no Brasil é muito grande<sup>23-25</sup>. A hidralazina e o nitrato são medicamentos de baixo custo, sua associação à terapêutica padrão tem o potencial de melhorar o prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca sistólica e com a variante Glu298Glu<sup>19</sup>. Dessa forma, é de grande importância o conhecimento adequado da variabilidade genética do polimorfismo Glu298Asp na população brasileira e o possível impacto da associação ISDN/HYD em pacientes com insuficiência cardíaca no Brasil, independentemente da raça autodeclarada.

Outro achado digno de nota é que se verificou a tendência à maior frequência da etiologia isquêmica ( $p = 0,09$ ) entre os pacientes homocigotas TT, que também tiveram uma maior taxa de utilização de ácido acetilsalicílico ( $p = 0,03$ ), o que coincide com os achados de outros estudos<sup>17,26,27</sup>.

Certas limitações são inerentes a este estudo. A primeira é a amostra, provavelmente pequena para um estudo genético ( $n = 145$ ). Além disso, foi baixa a taxa de utilização da associação hidralazina/nitrato e uma terapia baseada em doadores de ON (como a hidralazina e nitrato) poderia ter influenciado na relação entre o polimorfismo estudado e os desfechos analisados. Além disso, estudos genéticos atuais não se baseiam na análise de apenas um gene, mas de um conjunto de haplótipos relacionados ou mesmo milhares de polimorfismos genéticos simultaneamente, como no *Genome-Wide Association Studies* (GWAS), que utiliza informações do HapMap<sup>28-30</sup>.

## Conclusão

Este estudo não encontrou associação entre o genótipo ou a frequência alélica do polimorfismo genético G894T (Glu298Asp) da ONSe e os desfechos de morte, hospitalização, melhora na classe funcional (NYHA) e remodelamento reverso em pacientes ambulatoriais brasileiros com insuficiência cardíaca sistólica.

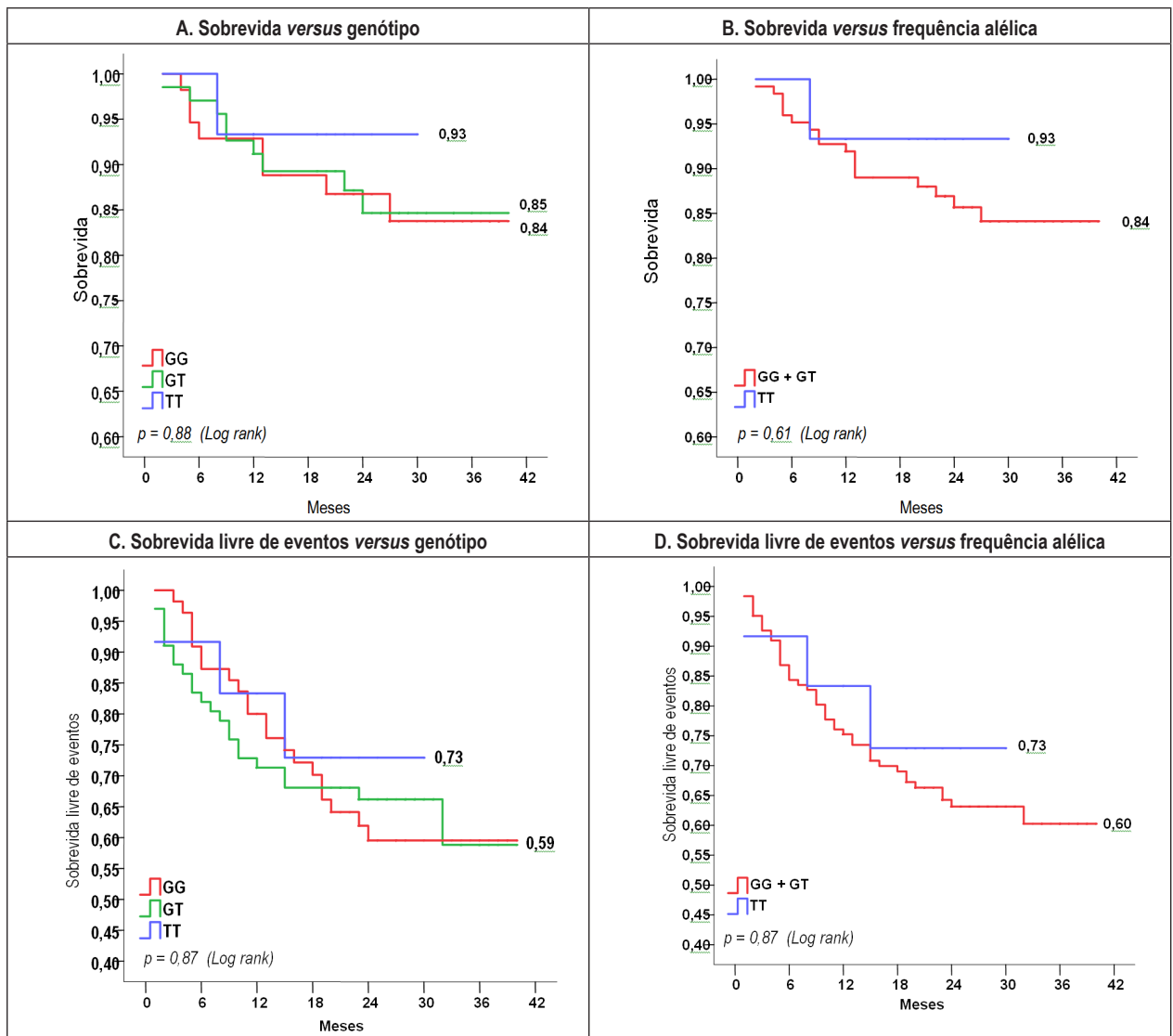


Gráfico 1 - Sobrevida e sobrevida livre de eventos versus genótipo e frequência alélica.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtenção de dados e Análise e interpretação dos dados: Tardin OMA, Pereira SB, Velloso MWM, Balieiro HM, Costa B, Alves TO, Giro C, Pessoa LP, Ribeiro GS, Mesquita ET; Análise estatística e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Tardin OMA, Pereira SB, Mesquita ET; Redação do manuscrito: Tardin OMA, Mesquita ET.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPERJ.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Ozziel Marcio Araujo Tardin pela Universidade Federal Fluminense.

## Referências

1. Norton RM. Clinical pharmacogenomics: applications in pharmaceutical R&D. *Drugs Discov Today*. 2001;6(4):180-5.
2. Silva PS, Lacchini R, Gomes Vde A, Tanus-Santos JE. Pharmacogenetic implications of the eNOS polymorphisms for cardiovascular action drugs. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(2):e27-34.
3. Gurwitz D, McLeod HL. Genome-wide association studies: powerful tools for improving drug safety and efficacy. *Pharmacogenomics*. 2009;10(2):157-9.
4. Mariotti S, Capparuccia C, Ripa C, Olivieri F, Lisa R, Procópio A, et al. [The role of molecular biology in the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2010;11(10):730-45.
5. Dayer P, Mérier G, Perrenoud JJ, Marmy A, Leemann T. Interindividual pharmacokinetic and pharmacodynamic variability of different beta blockers. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986;8 Suppl 6:S20-4.
6. Dragovic T, Ajdinovic B, Ilic V, Magić Z, Anđelković Z, Kocev N. [Individual renal hemodynamic response to chronic angiotensin II receptor blockade and the influence on the renin-angiotensin system gene polymorphisms]. *Med Pregl*. 2010;63(9-10):630-7.
7. Wilkinson E. From mechanics to genetics in cardiology. *Eur Heart J*. 2009;30(19):2291-3.
8. Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev*. 2002;7(4):407-22.
9. Viaro F, Nobre F, Evora PR. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arq Bras Cardiol*. 2000;74(4):380-93.
10. Katz SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Potharlanka P, Knecht M, et al. Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1999;99(16):2113-7.
11. Dias RC, Negrão CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(1):68-75.
12. Kao WH, Arking DE, Post W, Rea TD, Sotoodehnia N, Prineas RJ, et al. Genetic variations in nitric oxide Synthase 1 adaptor protein are associated with sudden death in US white community-based populations. *Circulation*. 2009;119(7):940-51.
13. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993;268(23):17478-88.
14. Dafni C, Drakoulis N, Landt O, Panidis D, Reczko M, Cokkinos DV. Association of eNOS E298D polymorphism and the risk of myocardial infarction in the Greek population. *BMC Med Genet*. 2010;11:133.
15. Binkley PF, Nunziata E, Liu-Stratton Y, Cooke G. A polymorphism of endothelial nitric oxide synthase promoter is associated with an increase in autonomic imbalance in patients with congestive heart failure. *Am Heart J*. 2005;149(2):342-8.
16. Hingorani AD, Jia H, Stevens P, Monteith P, Brown M, A common variant in exon 7 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene: identification by single strand conformation polymorphism analysis. *Clin Sci*. 1995;88(suppl):21.
17. MacNamara DM, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, et al. Effect of the Asp 298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2003;107(12):1598-602.
18. Taylor AL. The African-American Heart Failure Trial: a clinical trial update. *Am J Cardiol*. 2005;96(7B):44-8.
19. McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Venkitachalam L, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Card Fail*. 2009;15(3):191-8.
20. Velloso MW, Pereira SP, Gouveia L, Chermont S, Tardin OM, Gonçalves R, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls. *Nitric Oxide*. 2010;22(3):220-5.
21. Barretto AC, Drumond Neto C, Mady C, Albuquerque DC, Brindeiro Filho D, Braile DM, et al. / Sociedade Brasileira de Cardiologia. II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(supl. 4):1-30.
22. Serrano NC, Díaz LA, Casas JP, Hingorani AD, Moreno de Lucca D, Páez MC. Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population. *BMC Genet*. 2010;11:54.
23. Tavares LR, Victor H, Linhares JM, de Barros CM, Oliveira MV, Pacheco LC, et al. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca Descompensada em Niterói - Projeto EPICA - Niterói. *Arq Bras Cardiol*. 2004;82(2):125-8, 121-4.
24. Gauí EN, Klein CH, Oliveira GM. Mortality due to heart failure as a basic or contributory cause of death in three Brazilian states between 1999 and 2004. *Rev SOCERJ*. 2008;21(3):129-37.
25. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.
26. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(7):1506-10.
27. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu 298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999;100(14):1515-20.
28. Smith NL, Felix JF, Morrison AC, Demissie S, Glazer NL, Loehr LR, et al. Association of genome-wide variation with the risk of incident heart failure in adults of European and African ancestry: a prospective meta-analysis from the cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology (CHARGE) consortium. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(3):256-66.
29. Villard E, Perret C, Gary F, Proust C, Dilanian G, Hengstenberger C, et al. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2011;32(9):1065-76.
30. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-96.