

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TAFI (INIBIDOR DA  
FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA), DO PAI-1  
(INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO  
TIPO 1) E FREQUÊNCIA DE SEUS POLIMORFISMOS  
NA DISLIPIDEMIA**

ORIENTANDA: Izabela Ribeiro Santos

ORIENTADORA: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

COORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Natália Ferreira

BELO HORIZONTE - MG

2013

**IZABELA RIBEIRO SANTOS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TAFI (INIBIDOR DA FIBRINÓLISE  
ATIVADO PELA TROMBINA), DO PAI-1 (INIBIDOR DO  
ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1) E FREQUÊNCIA DE  
SEUS POLIMORFISMOS NA DISLIPIDEMIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Karina Braga Gomes Borges

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Natália Ferreira

**BELO HORIZONTE - MG**

**2013**

Santos, Izabela Ribeiro.

Avaliação dos níveis de TAFI (Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina), do PAI-1 (Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1) e frequência de seus polimorfismos na dislipidemia. [manuscrito] / Izabela Ribeiro Santos. – 2013.

112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Karina Braga Gomes Borges. Coorientadora: Cláudia Natália Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Polimorfismo (Genética) - Teses. 2. Genética - Teses. 3. Fatores de risco - Teses. 4. Dislipidemias. 5. Carboxipeptidase U. 6. Inibidor 1 de ativador de plasminogênio. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Ferreira, Cláudia Natália. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575.8

“Ciência - raciocínio científico - parece ser  
para mim um instrumento que irá percorrer  
um longo caminho para o futuro.”

(Vincent Van Gogh)

Dedico esse trabalho

À minha mãe, pelo amor, apoio e incentivo em meus estudos.

Ao Hudson, pelo apoio, amor, companheirismo, compreensão  
e incentivo para seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, coragem e determinação pela busca e aperfeiçoamento do conhecimento que tem me concedido a cada dia.

À minha orientadora, desde a iniciação científica, Prof<sup>a</sup>. Dra. Karina Braga Gomes Borges, pela confiança, incentivo e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, com dedicação, paciência, carinho e amizade. Muito obrigada.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Natália Ferreira. Muito obrigada pelo apoio, carinho, amizade e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do ICB pela oportunidade da realização deste mestrado. Agradeço aos professores da Genética por todos os ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante o mestrado.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia pelos ensinamentos, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, pela amizade, por ceder o laboratório de Biologia Molecular e contribuir com os trabalhos publicados. Às Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria das Graças Carvalho e Prof<sup>a</sup>. Dra. Luci Maria Santa'Ana Dusse e ao Prof. Adriano de Paula Sabino, pela amizade e por gentilmente cederem o laboratório de Hematologia.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia, que de alguma maneira contribuíram para este projeto.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular, Hematologia e Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo convívio, amizade e ótimo ambiente de trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Natália Câmara e Thalles Ribeiro, pela colaboração na realização dos testes moleculares.

Ao Rômulo Hudson Carvalho de Menezes, por estar ao meu lado sempre, por entender os dias em que estive ausente durante o mestrado, pelo amor, companheirismo, força e apoio, que me ajudou a superar os momentos difíceis e seguir em frente.

Aos meus familiares, pelo apoio, carinho e força que me proporcionaram ao longo dessa caminhada.

À minha mãe, Zildete Ribeiro da Silva, pelo apoio incondicional ao longo do mestrado e ao longo da vida. Pelo amor, pelo carinho e afeto. Obrigada por sempre acreditar em mim.

A todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a tornar este sonho realidade.

Muito Obrigada

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE QUADOS</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>3</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>6</b>
<b>2.1 LIPOPROTEÍNAS E SEU METABOLISMO</b>	<b>7</b>
<b>2.2 DISLIPIDEMIAS</b>	<b>8</b>
<b>2.3 ATEROSCLEROSE</b>	<b>12</b>
<b>2.4 DISLIPIDEMIA E HEMOSTASIA</b>	<b>15</b>
<b>2.4.1 HEMOSTASIA</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1.1 COAGULAÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1.2 FIBRINÓLISE</b>	<b>21</b>
<b>2.5 INIBIDOR DA FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA</b>	<b>23</b>
<b>2.6 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1</b>	<b>28</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>31</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>31</b>

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1 AMOSTRAGEM</b>	<b>33</b>
<b>4.2 MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.2.1 FATORES DE RISCO	35
4.2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	35
4.2.3 ANÁLISES HEMOSTÁTICAS	38
4.2.4 ANÁLISES MOLECULARES	39
4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS QUANTO AOS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E PERFIL LIPÍDICO</b>	<b>45</b>
<b>5.2 INIBIDOR DA FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA</b>	<b>48</b>
5.2.1 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	48
5.2.2 POLIMORFISMOS DO GENE <i>TAFI</i>	50
5.2.2.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E GENÓTIPOS DO GENE <i>TAFI</i> E SEUS HAPLÓTIPOS	50
5.2.2.2 EFEITO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>TAFI</i> EM SEUS NÍVEIS PLASMÁTICOS	56
<b>5.3 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1</b>	<b>62</b>
5.3.1 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	62
5.3.2 POLIMORFISMOS DO GENE <i>PAI-1</i>	64
5.3.2.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E GENÓTIPOS DO GENE <i>PAI-1</i>	64

5.3.2.2 EFEITO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>PAI-1</i> EM SEUS NÍVEIS PLASMÁTICOS	66
5.4 ANÁLISE MULTIVARIADA	69
6 DISCUSSÃO	71
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS PARA O PERFIL LIPÍDICO E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	72
6.2 INIBIDOR DA FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA	74
6.2.1 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	74
6.2.2 POLIMORFISMOS DO GENE <i>TAFI</i>	77
6.2.2.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E GENÓTIPOS DO GENE <i>TAFI</i> E SEUS HAPLÓTIPOS	77
6.2.2.2 EFEITO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>TAFI</i> EM SEUS NÍVEIS PLASMÁTICOS	80
6.3 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1	81
6.3.1 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	81
6.3.2 POLIMORFISMOS DO GENE <i>PAI-1</i>	83
6.3.2.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E GENÓTIPOS DO GENE <i>PAI-1</i>	83
6.3.2.2 EFEITO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>PAI-1</i> EM SEUS NÍVEIS PLASMÁTICOS	83
6.4 ANÁLISE MULTIVARIADA	84
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – COEP/UFMG	103

<b>ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – SOCOR</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE 1 – FICHA CLÍNICA</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE 3 – CERTIFICADOS DE APRESENTAÇÃO DE RESUMOS EM CONGRESSOS</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE 4 – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases do desenvolvimento da lesão aterosclerótica	13
Figura 2 – Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.	20
Figura 3 – Degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico	22
Figura 4 – Ativação e inativação do TAFI	24
Figura 5 – Ponto de conexão entre o sistema de coagulação e da fibrinólise, intermediado pelo complexo trombina/trombomodulina	25
Figura 6 – Gene <i>TAFI</i> e seus polimorfismos já descritos	26
Figura 7 – O gene <i>PAI-1</i> e os principais polimorfismos já descritos	29
Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corada por nitrato de prata obtido após reação de PCR, seguida de digestão enzimática com a endonuclease de restrição <i>SpeI</i> para o polimorfismo Thr325Ile (+1040C/T).	51
Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corada por nitrato de prata obtido após reação de PCR alelo-específica, para o polimorfismo +1542C/G.	51
Figura 10 – PCR em tempo real para o polimorfismo Ala147Thr.	52
Figura 11 – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo Thr325Ile	57
Figura 12 – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo Ala147Thr	57
Figura 13 – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo +1542C/G	58
Figura 14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corada por nitrato de prata obtido após reação de PCR alelo-específica, para o polimorfismo 4G/5G.	65
Figura 15 – Níveis de PAI-1 (em ng/mL) para o polimorfismo 4G/5G	67

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 – Características demográficas e clínicas entre os grupos estudados</b>	<b>45</b>
<b>Tabela 2 – Características demográficas e clínicas separadas por sexo entre os grupos estudados</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 3 – Variáveis bioquímicas entre os grupos estudados</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 4 – Variáveis bioquímicas entre os grupos estudados separados por sexo</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 5 – Níveis de TAFI plasmáticos entre os grupos estudados</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 6 – Níveis de TAFI plasmáticos entre os grupos estudados separados por sexo</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 7 – Correlação dos níveis de TAFI e os parâmetros bioquímicos e fatores de risco cardiovascular</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 8 – Mediana dos níveis de TAFI ente as usuárias de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal ou na menopausa</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 9 – Frequência do polimorfismo Thr325Ile entre os grupos e estratificada por sexo</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 10 – Frequência do polimorfismo Ala147Thr entre os grupos e estratificada por sexo</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 11 – Frequência do polimorfismo +1542C/G entre os grupos e estratificada por sexo</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 12 – Frequências dos haplótipos para o gene TAFI entre os grupos caso e controle</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 13 – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo Thr325Ile entre os grupos estratificados por sexo</b>	<b>59</b>

<b>Tabela 14 – Níveis de TAFI (em <math>\mu\text{g/mL}</math>) para o polimorfismo Ala147Thr</b>	<b>60</b>
<b>entre os grupos estratificados por sexo</b>	
<b>Tabela 15 – Níveis de TAFI (em <math>\mu\text{g/mL}</math>) para o polimorfismo +1542C/G</b>	<b>61</b>
<b>entre os grupos estratificados por sexo</b>	
<b>Tabela 16 – Níveis de PAI-1 plasmáticos entre os grupos estudados</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 17 – Níveis de PAI-1 plasmáticos entre os grupos estudados separados por sexo</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 18 – Correlação dos níveis de PAI-1 e os parâmetros bioquímicos e fatores de risco</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 19 – Mediana dos níveis de TAFI ente as usuárias de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e menopausa</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 20 – Frequência do 4G/5G entre os grupos e estratificada por sexo</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 21 – Níveis de PAI-1 (em <math>\text{ng/mL}</math>) para o polimorfismo 4G/5G</b>	<b>68</b>
<b>entre os grupos estratificados por sexo</b>	
<b>Tabela 22 – Modelo final da análise de regressão linear logística multivariada</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 23 – Modelo final da análise de regressão linear logística multivariada para o sexo feminino</b>	<b>70</b>
<b>Tabela 24 – Modelo final da análise de regressão linear logística multivariada para o sexo masculino</b>	<b>70</b>

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1 – Valores de referência para o diagnóstico de dislipidemia em indivíduos acima de 20 anos de idade</b>	<b>11</b>
<b>Quadro 2 – Critérios de exclusão de indivíduos dislipidêmicos e grupo controle</b>	<b>34</b>
<b>Quadro 3 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos polimorfismos pesquisados</b>	<b>40</b>
<b>Quadro 4 – Protocolos da reação de PCR para amplificação dos polimorfismos pesquisados</b>	<b>41</b>
<b>Quadro 5 – Concentrações dos reagentes utilizados para a reação de PCR para amplificação dos polimorfismos pesquisados</b>	<b>41</b>
<b>Quadro 6 – Protocolo de digestão enzimática para o polimorfismo Thr325Ile</b>	<b>42</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>A</b>	<b>Adenina</b>
<b>a2-AP</b>	<b><math>\alpha</math>2-antiplasmina</b>
<b>aa</b>	<b>Aminoácidos</b>
<b>Ala</b>	<b>Alanina</b>
<b>AT</b>	<b>Antitrombina</b>
<b>AVC</b>	<b>Acidente vascular cerebral</b>
<b>C</b>	<b>Citosina</b>
<b>CBP2</b>	<b>Carboxipeptidase B2</b>
<b>CETP</b>	<b>Proteína de transferência de ésteres de colesterol</b>
<b>COEP-UFMG</b>	<b>Comitê de Ética em Pesquisas da UFMG</b>
<b>CPR</b>	<b>Carboxipeptidase R</b>
<b>CPU</b>	<b>Carboxipeptidase U</b>
<b>CT</b>	<b>Colesterol total</b>
<b>DA</b>	<b>Doença aterosclerótica</b>
<b>DAC</b>	<b>Doença arterial coronariana</b>
<b>DCV</b>	<b>Doenças cardiovasculares</b>
<b>dNTPs</b>	<b>Desoxirribonucleotídeos</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilenodiamino tetra-acético</b>
<b>ELISA</b>	<b><i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ou ensaio imuno enzimático ligado à enzima</b>
<b>FII</b>	<b>Fator II</b>

<b>FIIa</b>	<b>Fator II ativado</b>
<b>FIX</b>	<b>Fator IX</b>
<b>FIXa</b>	<b>Fator IX</b>
<b>FT</b>	<b>Fator tecidual</b>
<b>FV</b>	<b>Fator V</b>
<b>FVa</b>	<b>Fator V ativado</b>
<b>FVII</b>	<b>Fator VII</b>
<b>FVIIa</b>	<b>Fator VII ativado</b>
<b>FVIII</b>	<b>Fator VIII</b>
<b>FvW</b>	<b>Fator de Von Willebrand</b>
<b>FX</b>	<b>Fator X</b>
<b>FXa</b>	<b>Fator X ativado</b>
<b>FXI</b>	<b>Fator XI</b>
<b>FXIa</b>	<b>Fator XI ativado</b>
<b>G</b>	<b>Guanina</b>
<b>HDL</b>	<b>Lipoproteína de alta densidade</b>
<b>HDL-C</b>	<b>Colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade</b>
<b>HF</b>	<b>Hipercolesterolemia familiar</b>
<b>HFC</b>	<b>Hiperlipidemia familiar combinada</b>
<b>HRP</b>	<b>Enzima peroxidase</b>
<b>IAM</b>	<b>Infarto agudo do miocárdio</b>
<b>IC</b>	<b>Intervalo de confiança</b>

<b>IDL</b>	<b>Lipoproteína de densidade intermediária</b>
<b>Ile</b>	<b>Isoleucina</b>
<b>IM</b>	<b>Infarto do miocárdio</b>
<b>IMC</b>	<b>Índice de massa corporal</b>
<b>Kb</b>	<b>Kilobases</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltons</b>
<b>LDL</b>	<b>Lipoproteína de baixa densidade</b>
<b>LDL-C</b>	<b>Colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade u LDL</b>
<b>LDL-r</b>	<b>Receptor de LDL-C</b>
<b>Lp(a)</b>	<b>Lipoproteína (a)</b>
<b>LPL</b>	<b>Lipase Lipoprotéica</b>
<b>mRNA</b>	<b>RNA mensageiro</b>
<b>NCEP</b>	<b><i>National Cholesterol Education Program</i></b>
<b>OPD</b>	<b>Ortofenilenodiamina</b>
<b>OR</b>	<b><i>Odds Ratio</i></b>
<b>PAI-1</b>	<b>Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PC</b>	<b>Proteína C</b>
<b>pCPB</b>	<b>Plasma carboxipeptidase B</b>
<b>PCR</b>	<b><i>Polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase</b>
<b>PCR</b>	<b>Proteína C Reativa</b>
<b>PCR-us</b>	<b>Proteína C Reativa ultrassensível</b>

<b>PDF</b>	<b>Produtos de degradação da fibrina</b>
<b>Pró-CPU</b>	<b>Procarboxypeptidase U</b>
<b>Pro-pCPB</b>	<b>Procarboxypeptidase B plasmática</b>
<b>Pró-RCP</b>	<b>Procarboxypeptidase R</b>
<b>PS</b>	<b>Proteína S</b>
<b>Qm</b>	<b>Quilomícrons</b>
<b>RFLP</b>	<b><i>Restriction fragment length polymorphisms</i> ou polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição</b>
<b>SBC</b>	<b>Sociedade brasileira de cardiologia</b>
<b>SCA</b>	<b>Síndrome coronariana aguda</b>
<b>SERPINE1</b>	<b>Gene da serpine peptidase inhibitor, clade E, member 1</b>
<b>SNPs</b>	<b><i>Single nucleotide polymorphism</i> ou polimorfismo de um único nucleotídeo</b>
<b>SPSS</b>	<b><i>Statistical Package for Social Sciences</i></b>
<b>T</b>	<b>Timina</b>
<b>TAFI</b>	<b><i>Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i> ou inibidor da fibrinólise ativado pela trombina</b>
<b>TAFIa</b>	<b>TAFI ativado</b>
<b>TAFIai</b>	<b>TAFI inativo</b>
<b>TAFI-AP</b>	<b>Peptídeo de ativação de TAFI</b>
<b>TFPI</b>	<b>Inibidor da via do fator tecidual</b>
<b>TG</b>	<b>Triglicérides</b>
<b>Thr</b>	<b>Treonina</b>

<b>t-PA</b>	<b>Ativador do plasminogênio do tipo tecidual</b>
<b>TRH</b>	<b>Terapia de reposição hormonal</b>
<b>TVP</b>	<b>Trombose venosa profunda</b>
<b>UFMG</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>u-PA</b>	<b>Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase</b>
<b>VLDL</b>	<b>Lipoproteína de densidade muito baixa</b>

## RESUMO

As doenças cardiovasculares constituem um problema de saúde pública, com morbidade e mortalidade elevadas, afetadas por fatores de risco associados, como o diabetes mellitus, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial, obesidade e as dislipidemias. Estas se definem como alterações do metabolismo lipídico que modificam os níveis das lipoproteínas, constituindo um dos principais fatores de risco para a aterosclerose e suas complicações. A dislipidemia influencia o sistema hemostático, especialmente na redução da fibrinólise. Várias proteínas compõem o sistema fibrinolítico e regulam a fibrinólise ao atuarem indiretamente na degradação do coágulo de fibrina, em especial o Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina (TAFI) e o Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1). Níveis aumentados de TAFI têm sido associados aos eventos cardiovasculares, assim como o aumento da concentração plasmática de PAI-1, o qual já é considerado, na literatura, como um fator de risco para estes eventos. Este estudo avaliou a associação de fatores de risco adquiridos, dos polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G no gene *TAFI* e 4G/5G no gene *PAI-1* e seus níveis plasmáticos com a dislipidemia investigando 109 indivíduos dislipidêmicos e 105 normolipêmicos. Foram realizadas análises bioquímicas do perfil lipídico e análises hemostáticas dos parâmetros TAFI e PAI-1 pelo método de ELISA, bem como análises moleculares, pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para verificar as frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos estudados. Foi observado que, dentre os fatores de risco, a hipertensão, o aumento do índice de massa corporal e a menopausa são mais frequentes em indivíduos dislipidêmicos e estes possuem maiores níveis de TAFI. Os alelos 325Ile, Ala147 e C foram associados a menores níveis plasmáticos da proteína. Os polimorfismos Thr325Ile e Ala147Thr demonstraram associação independente com a dislipidemia em indivíduos do sexo masculino. Para o polimorfismo 4G/5G e os níveis de PAI-1 não foi encontrada a mesma relação com a doença. Os resultados sugerem que apenas o TAFI está associado independente à dislipidemia.

**Palavras-chave:** dislipidemia, fator de risco, TAFI, PAI-1, polimorfismos.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a public health concern with high morbidity and mortality, affected by risk factors such as diabetes mellitus, smoking, physical inactivity, hypertension, obesity and dyslipidemia. Dyslipidemia is defined as alterations in lipid metabolism that change the levels of lipoproteins, constituting a major risk factor for atherosclerosis and its complications. Moreover, it affects the haemostatic system, especially in the fibrinolysis. Several proteins comprising the fibrinolytic system regulates fibrinolysis by acting indirectly on the degradation of the fibrin clot, specially the inhibitor by Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) and Plasminogen Activator Inhibitor type 1 (PAI-1). Increased levels of TAFI have been associated with cardiovascular events, as well as increased serum PAI-1, which is already considered as a risk factor for such events. This study evaluated the association of acquired risk factors, the polymorphisms Thr325Ile, Ala147Thr and +1542C/G in the TAFI gene and 4G/5G in the PAI-1 gene and its plasma levels with dyslipidemia through the investigation of 109 dyslipidemic and 105 normolipemic individuals. We conducted analyses of biochemical and lipidic profile, as well as hemostatic parameters (TAFI and PAI-1 by ELISA) and molecular analysis using Polymerase Chain Reaction (PCR) to verify the genotypic and allelic frequencies for the polymorphisms studied. It was observed that hypertension, increased body mass index and menopause are more common in dyslipidemic individuals and they have higher TAFI levels. The alleles 325Ile, Ala147 and C showed association with lower TAFI levels. Ala147Thr and Thr325Ile polymorphisms are independently associated with dyslipidemia in males. The 4G/5G polymorphism and PAI-1 levels were not related with the disease. The results suggest that only TAFI may be independently associated with dyslipidemia.

**Keywords:** dyslipidemia, risk factor, TAFI, PAI-1 polymorphisms.

## ***1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA***

Durante os últimos trinta anos, houve um declínio da mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) nos países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido nos países em desenvolvimento, entre os quais se inclui o Brasil. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde, esta situação tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nestes países.

As DCV são um problema de saúde pública, uma vez que muitos indivíduos com alterações no perfil lipídico não são diagnosticados ou não são tratados adequadamente, elevando assim o risco de eventos coronarianos. Correspondem às principais causas de morte no Brasil, compreendendo cerca de 30% do total de óbitos declarados de doenças crônicas não transmissíveis, com 320 mil registros no ano de 2010.

As DCV são multifatoriais e sua prevenção é baseada na identificação de fatores de risco associados, que se dividem em modificáveis e não modificáveis, de acordo com a possibilidade de intervenção sobre os mesmos. Os fatores não modificáveis incluem a idade, o sexo e a história familiar positiva para doença arterial coronariana (DAC) precoce. Entre os modificáveis estão o diabetes mellitus, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial, obesidade e as dislipidemias. As dislipidemias têm sido, portanto, citadas como um dos principais fatores de risco para a aterosclerose e suas complicações.

A prevalência das dislipidemias é variável de acordo com a população estudada e depende dos hábitos dietéticos, culturais ou adquiridos, das características genéticas e do estilo de vida das mesmas. Ainda são poucos os estudos de prevalência das dislipidemias no Brasil, sendo que ainda não existem dados epidemiológicos nacionais. No entanto, alguns estudos têm mostrado alta prevalência no nosso país, que varia de 3,1% a 46,5% em crianças e adolescentes de algumas regiões. Os dados relativos à população adulta mostram uma prevalência de dislipidemia de 12% a 26% em moradores de capitais brasileiras, com níveis de triglicérides  $\geq 201$ mg/dL encontrados em 25,1% dos adultos, colesterol total  $\geq 240$ mg/dL em 27,3%, LDL-colesterol  $\geq 160$ mg/dL em 26,0% e HDL-colesterol  $< 40$ mg/dL em 25,4% dos adultos pesquisados.

É amplamente sabido que a atividade do sistema hemostático contribui de maneira importante para os eventos coronarianos agudos. Vários estudos sugerem que marcadores de hipofibrinólise e de ativação endotelial possuem valor preditivo importante para avaliar o risco de eventos cardiovasculares agudos, especialmente em indivíduos com idade inferior a 60 anos. No entanto, até o presente momento, não foram conduzidos estudos sobre a importância do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) e do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) em indivíduos dislipidêmicos na população brasileira e existem poucos estudos relacionando TAFI e dislipidemia, em diferentes populações.

Desta forma, a avaliação dos níveis de TAFI e PAI-1 em pacientes com dislipidemia e sua correlação com os polimorfismos dos genes *TAFI* e *PAI-1* é de grande importância para posterior validação destes biomarcadores na avaliação de risco cardiovascular. Este trabalho tem por objetivo contribuir para melhor entendimento desta lacuna e propõe uma avaliação destas variáveis em um estudo do tipo caso-controle.

## ***2 REVISÃO DA LITERATURA***

## 2.1 LIPOPROTEÍNAS E SEU METABOLISMO

Os lípidos, representados principalmente por triglicérides, fosfolípidos e colesterol, são partículas hidrofóbicas e, por isso, são transportados na circulação sanguínea e linfática pelas lipoproteínas (Passarelli *et al*, 2007).

As lipoproteínas são macromoléculas constituídas por uma fração lipídica e outra proteica, o que permite o transporte de lípidos obtidos por via exógena e endógena para os tecidos. Estas são divididas em cinco categorias, de acordo com a sua composição e densidade (Martinez, 2003):

- Quilomícrons (Qm): maiores lipoproteínas e menos densas, formadas no intestino. Participam da via exógena de lípidos e transportam cerca de 90% dos triglicérides (TG) provenientes da dieta. É relativamente pobre em colesterol e fosfolípidos e apresenta cerca de 1 a 2% de proteína.
- Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL): lipoproteína de origem hepática. É também rica em TG, originados do metabolismo endógeno e possui pequena porção de colesterol.
- Lipoproteína de densidade intermediária (IDL): possui teor de lipídios intermediário entre VLDL e LDL, formada pela depleção do TG da VLDL e tem conteúdo formado predominantemente por colesterol esterificado.
- Lipoproteína de baixa densidade (LDL): formada a partir da IDL, com elevada concentração de colesterol esterificado (50%) e função fisiológica de fornecer substrato de colesterol às células do organismo pelo receptor de LDL (LDL-r).
- Lipoproteína de alta densidade (HDL): é a menor das lipoproteínas em tamanho. Formada no fígado e no intestino, é responsável pelo transporte reverso do colesterol, retirando-o das células, e trocando-o com outras lipoproteínas ou levando-o diretamente ao fígado, onde este colesterol não utilizado pelos tecidos extra-hepáticos será excretado na bile ou utilizado para produção de mais VLDL.

## 2.2 DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias se apresentam como uma das principais distúrbios metabólicos, podendo ser classificadas como alterações do metabolismo lipídico que modificam os níveis das lipoproteínas na circulação sanguínea e as concentrações dos seus diferentes componentes. As dislipidemias estão relacionadas aos níveis anormais de TG, e/ou alterações do colesterol total (CT), colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e lipoproteína (a) [Lp(a)] plasmática (Martinez, 2003; Prado & Dantas, 2002). Essas alterações lipídicas têm sido exaustivamente estudadas devido à sua forte relação com as DCV (Martinez, 2003). Com exceção da idade, a dislipidemia, principalmente em relação às altas concentrações de LDL-C e baixas de HDL-C, é o fator preditivo mais importante para o desenvolvimento de DAC e de suas complicações (Vapaatalo & Mervaala, 2001; Martinez, 2003; Forti & Diament, 2006).

Classificam-se as dislipidemias de acordo com a sua etiologia em primárias ou secundárias. As dislipidemias primárias ou genéticas são decorrentes de alterações no metabolismo de LDL-C, HDL-C e TG, podendo se manifestar com a influência do ambiente (Martinez, 2003; Martinez, 2004). Na classificação genética, as dislipidemias se dividem em monogênicas, causadas por um só gene, e poligênicas, causadas pela associação de diversas mutações ou polimorfismos que isoladamente não causariam a doença.

As dislipidemias genéticas primárias são divididas em três classes principais, de acordo com a sua manifestação clínica decorrente da alteração do metabolismo das lipoproteínas (Martinez, 2003):

- Metabolismo de LDL-C:
  - Hipercolesterolemia familiar (HF): É uma doença monogênica autossômica dominante, em que há uma mutação no alelo para o LDL-r, levando a um aumento dos níveis de LDL-C circulantes.
  - Hiperlipidemia familiar combinada (HFC): É a dislipidemia primária mais prevalente, possui herança autossômica dominante e é

poligênica. Há uma produção aumentada de VLDL no fígado e redução da remoção de VLDL e quilomícrons, com aumento dos níveis séricos de CT e LDL-C.

- Hipercolesterolemia poligênica: Multifatorial, é causada por fatores genéticos e ambientais com alto risco de desenvolvimento de aterosclerose, em que há aumento de CT, geralmente por aumento de LDL.
- Metabolismo de HDL-C
  - Hiperalfalipoproteinemia: caracterizada pelo aumento das concentrações de HDL-C, causada principalmente por mutações no gene da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP).
- Metabolismo de TG
  - Hipertrigliceridemia familiar: Desordem genética autossômica dominante, com fenótipo de níveis elevados de triglicérides.
  - Hiperquilomicronemia: Doença autossômica recessiva rara, caracterizada pela ausência de atividade da Lipase Lipoprotéica (LPL) ou da apolipoproteína CIII, ativadora obrigatória da LPL, que provoca acúmulo de quilomícrons. Como o metabolismo de VLDL-C também está comprometido, os triglicérides também estão elevados.
  - Disbetalipoproteinemia: Também conhecida como hiperlipoproteinemia do tipo III, na qual há acúmulo tanto dos remanescentes de quilomícrons, quanto dos remanescentes de VLDL (IDL).

Para a classificação fenotípica ou bioquímica, são considerados os níveis plasmáticos de CT, LDL-C, TG e HDL-C. Estas dosagens bioquímicas compreendem o perfil lipídico (SBC, 2007). É recomendável que esta caracterização laboratorial das dislipidemias seja feita no indivíduo com um estado metabólico estável, em dieta habitual, sem atividade física e ingestão de álcool pelo menos 24 e 72 horas antes da coleta do sangue, respectivamente,

e sem medicação hipolipemiante há pelo menos quatro semanas antes do exame (Martinez, 2004).

O perfil lipídico é determinado pelas dosagens bioquímicas do CT, da fração HDL-C e dos TG, após jejum de 12 horas. A fração LDL-C pode ser calculada pela equação de Friedewald ( $LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$ ), onde  $TG/5$  representa o colesterol ligado à VLDL ou VLDL colesterol (VLDL-C), ou diretamente dosado no plasma (Martinez, 2004). A dosagem direta do LDL-C é indicada quando a equação é imprecisa, nos casos de pacientes com hipertrigliceridemia ( $TG > 400 \text{ mg/dL}$ ), hepatopatia colestática crônica, diabetes melitus ou síndrome nefrótica (SBC, 2007).

A classificação laboratorial segundo o perfil lipídico compreende quatro tipos principais bem definidos (SBC, 2001; SBC, 2007) (**Quadro 1**):

- Hipercolesterolemia isolada – Elevação isolada do colesterol total, em geral representada por aumento do LDL-C.
- Hipertrigliceridemia isolada – Elevação isolada dos triglicérides, em geral representada por aumento das VLDL-C, ou dos quilomícrons, ou de ambos.
- Hiperlipidemia mista – Valores aumentados do colesterol total e dos triglicérides séricos.
- HDL-C baixo – Isolado ou em associação com aumento de LDL-C e/ou de triglicérides.

**Quadro 1** – Valores de referência para o diagnóstico de dislipidemia em indivíduos acima de 20 anos de idade

<b>Lípides</b>	<b>Valores (mg/dL)</b>	<b>Categoria</b>
<b>CT</b>	<200	Ótimo
	200-239	Limítrofe
	≥240	Alto
<b>LDL-C</b>	<100	Ótimo
	100 -129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥190	Muito alto
<b>HDL-C</b>	<40 em homens <50 em mulheres	Baixo
	>60	Alto
<b>TG</b>	<150	Ótimo
	150-200	Limítrofe
	200-249	Alto
	≥500	Muito alto

Adaptado das III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) Arq Bras Cardiol. 2001.

As dislipidemias secundárias estão associadas aos hábitos de vida inadequados, como etilismo, sedentarismo, dieta inadequada (National Cholesterol Education Program - NCEP, 2001) e a uma série de co-morbidades como diabetes mellitus, obesidade, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, ou ao uso de medicamentos como anticoncepcionais, diuréticos, betabloqueadores, anabolizantes e corticosteroides (Martinez, 2003; SBC, 2007).

A importância da classificação etiológica das dislipidemias em primária ou secundária deve-se ao fato de que muitos casos são revertidos com o controle da doença de base, enquanto as primárias são apenas controláveis com medicamentos e mudança no estilo de vida. (Martinez, 2004).

## 2.3 ATEROSCLEROSE

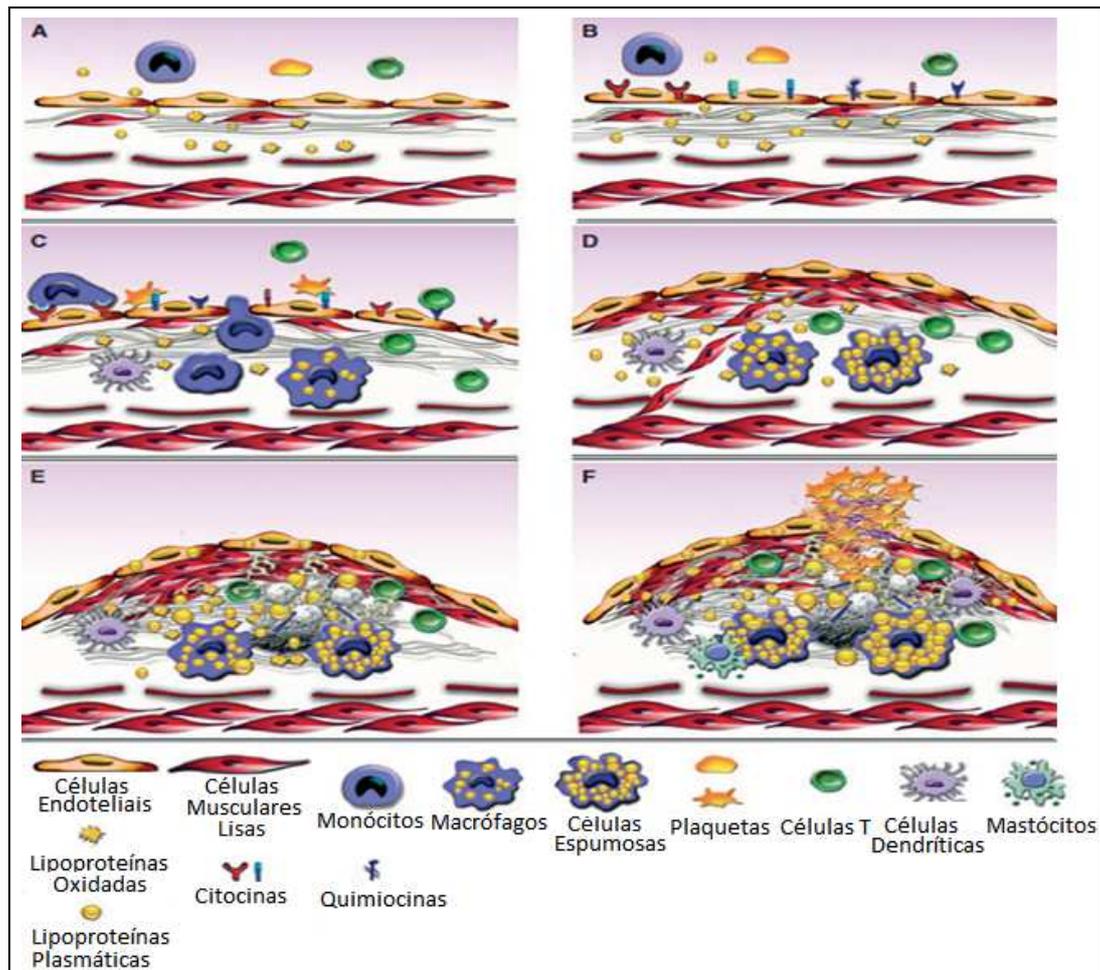
A aterosclerose constitui uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Ineu *et al.*, 2006), sendo a maior responsável pelas DCV (Wouters *et al.*, 2005).

Por definição, a doença aterosclerótica (DA) é uma doença complexa, de origem multifatorial e multigênica (Manduteanu & Simionescu; 2012), caracterizada por um processo inflamatório crônico das artérias musculares grandes, médias (coronárias e artérias das extremidades inferiores) e das artérias elásticas (aorta, carótidas e ilíacas), e por um espessamento da parede do vaso a partir de um depósito de lípidos na parte interna e externa da camada íntima, com formação de placas ateromatosas recobertas por uma cápsula fibrosa (Martinez, 2003; Choy *et al.*, 2004;).

A sua evolução é lenta e progressiva (Giroldo *et al.*, 2007), embora a DA seja considerada uma doença típica de meia idade, surgindo aproximadamente aos 45 anos nos homens e 55 anos nas mulheres. É neste período que surgem as principais manifestações clínicas de DAC, forma mais frequente e letal da DA, como o infarto do miocárdio (IM), acidente vascular cerebral (AVC) e doença vascular periférica (Martinez, 2003; de França & Alves, 2006).

A presença de fatores de risco, como a elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de Qm), hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo, tabagismo, infecções e estresse, aceleram o processo aterogênico por agressão ao endotélio vascular (Vapaatalo & Mervaala, 2001; SBC, 2007, Giroldo *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da placa aterosclerótica é um processo gradual e contínuo, no qual a inflamação está presente em todos os estágios, conforme mostrado na **Figura 1**.



**Figura 1** - Fases do desenvolvimento da lesão aterosclerótica a partir de uma lesão endotelial. A – Ativação da célula endotelial a partir do acúmulo de lipoproteínas na circulação sanguínea. B – Processo inflamatório com aumento de expressão de moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas e aumento da permeabilidade celular. C – Recrutamento de células inflamatórias com fagocitose e oxidação dos lípidos presentes no meio e formação de células espumosas. D – Formação de uma cápsula fibrosa acompanhada pelo aumento da síntese de componentes da matriz extracelular. E – Formação de uma placa estável com núcleo lipídico necrótico rico em cristais de colesterol e espessamento da parede do vaso. F - Ruptura da placa instável, levando a um contato direto entre os fatores de tecidos e plaquetas circulantes e componentes de coagulação sanguínea provocando a formação de trombos que podem impedir parcialmente ou totalmente o fluxo de sangue levando a um ou outro infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral. (Adaptado de Manduteanu & Simionescu, 2012)

O acúmulo de lipoproteínas plasmáticas na camada íntima da artéria, especialmente a LDL, por interação com os componentes da matriz extracelular, leva a uma disfunção endotelial, aumentando a permeabilidade da

camada íntima às lipoproteínas, que são retidas no espaço subendotelial e sofrem o processo de oxidação (**Figura 1A**) (Lima *et al.*, 2006a). As partículas de LDL-oxidadas são muito imunogênicas, e seus produtos têm atividade quimiotática que aumenta a disfunção endotelial. A superfície endotelial expressa moléculas de adesão leucocitária e sintetiza citocinas e quimiocinas responsáveis pelo início de uma reação inflamatória robusta, com a atração de células circulantes, como monócitos e linfócitos (**Figura 1B**) (Manduteanu & Simionescu; 2012). Os monócitos migram para o espaço subendotelial, onde são ativados e diferenciados em macrófagos, que são responsáveis pela fagocitose das partículas de LDL-oxidadas (Lima *et al.*, 2006a). Os macrófagos repletos de lípidos são chamados de células espumosas e constituem o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (**Figura 1C**) (SBC, 2007).

Fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias produzidas pelos macrófagos, linfócitos T, por células endoteliais e células musculares lisas da camada média arterial que tiveram sua proliferação estimulada por mediadores da inflamação e migraram para a camada íntima e estão envolvidos na patogênese da aterosclerose (Lima *et al.*, 2006a; SBC, 2007). A interação destes fatores resulta em uma resposta fibroproliferativa que faz a estria gordurosa evoluir para uma placa aterosclerótica complexa (Lima *et al.*, 2006a), que é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e formada pela capa fibrosa, rica em colágeno, que contém núcleo lipídico rico em colesterol (**Figura 1D e 1E**) (SBC, 2007).

As placas ateroscleróticas ou ateromatosas podem ser classificadas em estáveis ou instáveis. A estabilidade das placas depende da espessura e composição da capa fibrosa (Lima *et al.*, 2006a). As estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno e possuem uma capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores (SBC, 2007). As instáveis apresentam grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente, capa fibrótica fina, e atividade inflamatória intensa, principalmente nas junções entre a placa e a parede do vaso sanguíneo adjacente a ela, com grande infiltração de macrófagos ativados, que degradam os constituintes da matriz

extracelular da placa fibrosa, o seu núcleo lipídico e o seu tecido conjuntivo, levando à sua fragilização e ruptura (Martinez, 2003; SBC, 2007).

A ruptura da capa fibrosa expõe, na corrente sanguínea, fatores teciduais, material lipídico e colágeno, que induzem a agregação plaquetária e a formação de trombos (**Figura 1F**) (Lima *et al.*, 2006a). Este processo é também conhecido como aterotrombose, um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SBC, 2007).

Embora o estreitamento da parede e a oclusão vascular seja uma manifestação clínica frequentemente causada pela formação da placa aterosclerótica, a ruptura da placa aterosclerótica instável, com consequente instalação de um trombo, é a principal causa das síndromes coronarianas agudas (Martinez, 2003).

O papel da hiperlipidemia é bem conhecido na evolução da doença aterosclerótica (Eitzman *et al.*, 2000), bem como a participação dos mecanismos da hemostasia na formação da placa de ateroma. A hiperlipidemia aumenta a formação da placa aterosclerótica e induz a formação de trombos que vão ocluir as artérias. Uma vez estabelecida a lesão aterosclerótica, plaquetas e fatores da coagulação atuam para produzir o trombo, que obstrui a artéria e interrompe o fluxo sanguíneo, causando morte tecidual (Martinez, 2003).

## 2.4 DISLIPIDEMIA E HEMOSTASIA

A ligação entre a dislipidemia e o sistema hemostático situa-se em três pontos fundamentais: na célula endotelial, nas plaquetas e fatores da coagulação e na fibrinólise (Martinez, 2003).

A hiperlipidemia está associada a um estado de hipercoagulabilidade, como demonstrado em alguns estudos (Georgieva *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2012). A célula endotelial, que é em geral uma superfície não trombogênica, na presença de estímulos como a presença de níveis elevados de lípidos, adquire propriedades pró-coagulantes. A exposição das células endoteliais a altas concentrações de colesterol, principalmente lipoproteínas LDL-C oxidadas,

pode levar à ativação destas células, com posterior recrutamento de monócitos, conforme exposto acima. (Martinez, 2003). Partículas de LDL-C e os lípidos oxidados são capazes de induzir a expressão de FT (Palomo *et al.*, 2006), que tem sua expressão amplificada pelas citocinas, especialmente IL-1, liberada pelos monócitos recrutados (Martinez, 2003).

Além da ativação das células endoteliais, a hiperlipidemia pode levar a modificações e descontinuidade no endotélio, provocando um estado de hiperagregabilidade plaquetária, com adesão das plaquetas às estruturas subendoteliais (Georgieva *et al.*, 2004). A ativação das plaquetas é importante na fase inicial da aterogênese (Martinez, 2003).

Outra alteração provocada pela hiperlipidemia é a redução da atividade fibrinolítica, o que pode favorecer a ocorrência de eventos tromboembólicos pela permanência do coágulo de fibrina (Martinez, 2003). Esta redução da fibrinólise em indivíduos com hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia já foi demonstrada em vários estudos (Georgieva *et al.*, 2004; Palomo *et al.*, 2006; Karásek *et al.*, 2011).

## **2.4.1 Hemostasia**

### **2.4.1.1 Coagulação**

A hemostasia inclui o equilíbrio entre os processos de coagulação sanguínea, ativação plaquetária e reconstituição vascular, para manter o sangue em estado líquido e dentro dos vasos, após a retirada de coágulos e restabelecimento da integridade do vaso (Versteeg *et al.*, 2013).

De acordo com o modelo atual da teoria da coagulação sanguínea, baseada em superfícies celulares (Ferreira *et al.*, 2010), esta pode ser dividida em três fases distintas, sendo iniciação, amplificação e propagação, representadas na **Figura 2**.

- Fase de iniciação:

A fase de iniciação é classicamente associada à via extrínseca da coagulação (Versteeg *et al.*, 2013).

A superfície vascular lesada expõe à corrente sanguínea as células subendoteliais, tais como células de músculo liso e fibroblastos, liberando substâncias que normalmente não estão presentes no interior dos vasos (Franco, 2001). Essas células expressam o fator tecidual (FT) em sua superfície, o qual age como um iniciador-chave do processo da coagulação (Versteeg *et al.*, 2013). O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular (Ferreira *et al.*, 2010).

O FT exposto pelas células vasculares, uma vez ligado ao fator (F) VII inativo da coagulação presente no sangue, rapidamente o ativa em FVII ativado (FVIIa), formando o complexo FVIIa/FT. (Ferreira *et al.*, 2010). Em indivíduos saudáveis, aproximadamente 1% da concentração plasmática total de FVII está presente na sua forma ativada na circulação. Assim, o FVIIa é capaz de se ligar diretamente ao FT expresso. Considerando que somente o complexo FVIIa/FT exibe função enzimática ativa, esse complexo é também capaz de ativar o FVII em processo denominado de “auto ativação” (Franco, 2001).

O complexo resultante FVIIa/FT catalisa a clivagem e ativação de FIX e FX em FIXa e FXa, respectivamente, que possuem funções distintas e separadas na iniciação da coagulação do sangue (Hoffman & Monroe, 2007). O FXa, associado com o seu co-factor, o FVa, forma um complexo chamado de protrombinase, na superfície da células que expressam o FT, e gera uma pequena quantidade de trombina, que converte a protrombina (FII) em trombina (FIIa) (Versteeg *et al.*, 2013), em quantidade insuficiente para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação. O FV pode ser ativado pelo FXa ou por proteases não coagulantes (Ferreira *et al.*, 2010).

Acredita-se que as reações responsáveis pela iniciação da coagulação ocorram constantemente fora do espaço vascular em indivíduos saudáveis a todo o tempo, gerando pequenas quantidades de fatores ativados. Isso ocorre porque a maioria dos fatores de coagulação pode deixar o sistema vascular e ser capaz de percorrer os espaços entre os tecidos, e suas formas ativadas são encontradas na linfa. Assim, uma pequena atividade da via do FT ocorre

todo o tempo no espaço extra vascular, já que uma grande parte do FT extracelular é ligado ao FVIIa, mesmo na ausência de um ferimento, produzindo assim baixos níveis de FIXa, FXa e trombina nessas condições (Hoffman & Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

Este processo de coagulação basal é, no entanto, mantido em separado dos principais componentes da hemostasia (plaquetas e FVIII ligado ao fator de Von Willebrand - FvW) por uma parede vascular intacta e não leva à formação do coágulo de fibrina. O processo da coagulação somente segue para a fase de amplificação quando há dano vascular, permitindo que plaquetas e FVIII-FvW entrem em contato com o tecido extra vascular onde se aderem às células que expressam FT (Hoffman, 2003; Hoffman & Monroe, 2007).

- Fase de amplificação:

Embora a pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação não seja suficiente para gerar o coágulo de fibrina, esta possui várias funções importantes (Hoffman, 2003). Quando um vaso é lesado, plaquetas escapam de dentro dos vasos, se ligam ao colágeno e a outros componentes da matriz extracelular no sítio da lesão, onde são parcialmente ativadas, resultando em um tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária (Ferreira *et al.*, 2010). O processo de coagulação é iniciado de forma mais eficaz quando a pequena quantidade de trombina gerada nas células que expressam o FT desencadeia a ativação completa das plaquetas (Hoffman & Monroe, 2007), iniciando o processo hemostático que culmina na formação de fibrina estável, consolidando o tampão plaquetário inicial. Este processo é chamado de hemostasia secundária (Ferreira *et al.*, 2010). As plaquetas ativadas alteram a permeabilidade de suas membranas, permitindo a entrada de íons cálcio e saída de substâncias quimiotáticas que atraem os fatores da coagulação para sua superfície, além de liberarem FV parcialmente ativados.

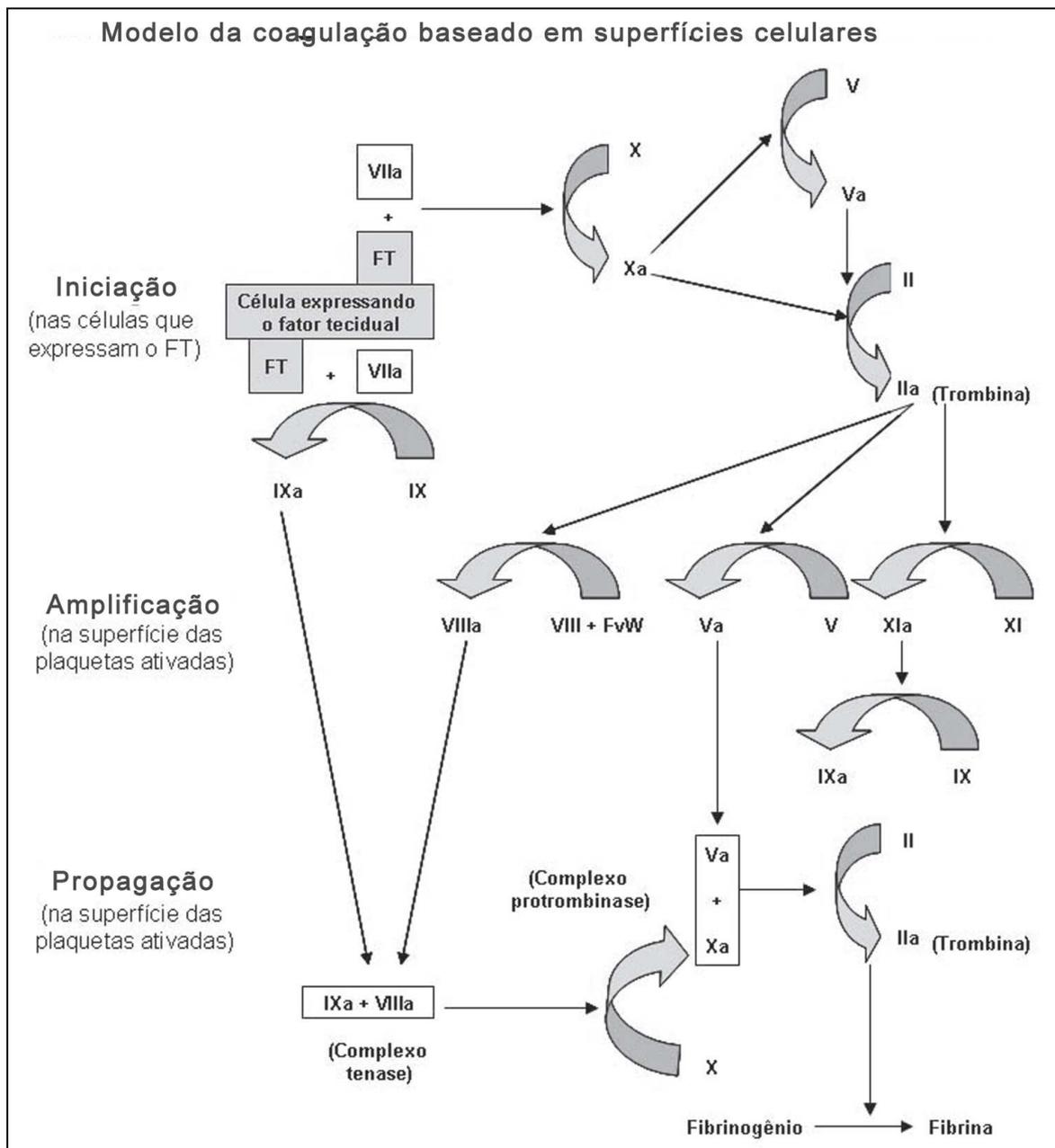
Outra função da pequena quantidade de trombina gerada nas células é a ativação dos FV e FVIII na superfície das plaquetas ativadas. Assim, o complexo fator VIII/vWF é dissociado, liberando o vWF para mediar adicional adesão e agregação das plaquetas no local da lesão (Hoffman, 2003). A

trombina converte o FV derivado das plaquetas em FVa, ampliando a atividade do complexo protrombinase, e converte o FVIII em FVIIIa, que atua como um cofator para FIXa aumentando a geração FXa. Além disso, a trombina também ativa o FXI a FXIa na superfície das plaquetas (Versteeg, et al 2013).

- Fase de propagação:

A fase de propagação é iniciada rapidamente pelo recrutamento, por mecanismos quimiotáticos, de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão.

O FIXa formado na iniciação pelo complexo FT/FVIIa difunde-se e também se liga à superfície das plaquetas ativadas, formando o complexo tenase (Hoffman & Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010). Uma quantidade adicional de FIXa pode também ser produzida pelo seguinte mecanismo: o FXIa, que está ligado à superfícies de plaquetas e é ativado pela quantidade de trombina inicial, pode ativar mais FIX em IXa. (Hoffman & Monroe, 2007). O complexo FIXa/FVIIIa catalisa a conversão de FX para FXa na superfície da plaqueta, já que o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada. O FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, formando o complexo protrombinase, que converte grande quantidade de protrombina (FII) em quantidades suficientes de trombina, que formam massivamente as fibras de fibrina pela conversão e clivagem do fibrinogênio, que se polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial. (Ferreira, *et al.*, 2010; Versteeg, et al 2013).



**Figura 2** - Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares. FT – Fator tecidual. A – Fator ativado. FVIIa – Fator VII da coagulação. FX – Fator X da coagulação. FV – Fator V da coagulação. FII – Fator II da coagulação ou protrombina. FIIa – trombina. FIX - Fator IX da coagulação. FVIII - Fator VIII da coagulação. FvW – Fator de Von Willebrand. FV - Fator V da coagulação. FXI – Fator XI da coagulação. (Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

Embora este modelo atual da teoria da coagulação sanguínea esteja ganhando atenção, a divisão clássica entre via intrínseca e extrínseca ainda é amplamente utilizada (Versteeg *et al.*, 2013).

As reações bioquímicas da coagulação do sangue devem ser estritamente reguladas, de modo a evitar ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e oclusão trombótica do vaso (Franco, 2001).

Para controlar a disseminação da ativação da coagulação, a atividade das proteases na ativação dos fatores da coagulação é regulada por numerosas proteínas inibitórias, que atuam como anticoagulantes naturais. São eles: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS), e a antitrombina (AT) (Franco, 2001; Ferreira *et al.*, 2010).

Em condições fisiológicas, com ausência de lesão vascular, há predomínio dos mecanismos anticoagulantes sobre os pró-coagulantes, mantendo-se assim a fluidez do sangue (Franco, 2001).

#### **2.4.1.2 Fibrinólise**

O trombo formado no processo de coagulação deve ser removido para que o fluxo sanguíneo seja restabelecido, sendo essa dissolução do coágulo realizada pelo sistema fibrinolítico, do qual faz parte o plasminogênio (Martinez, 2003).

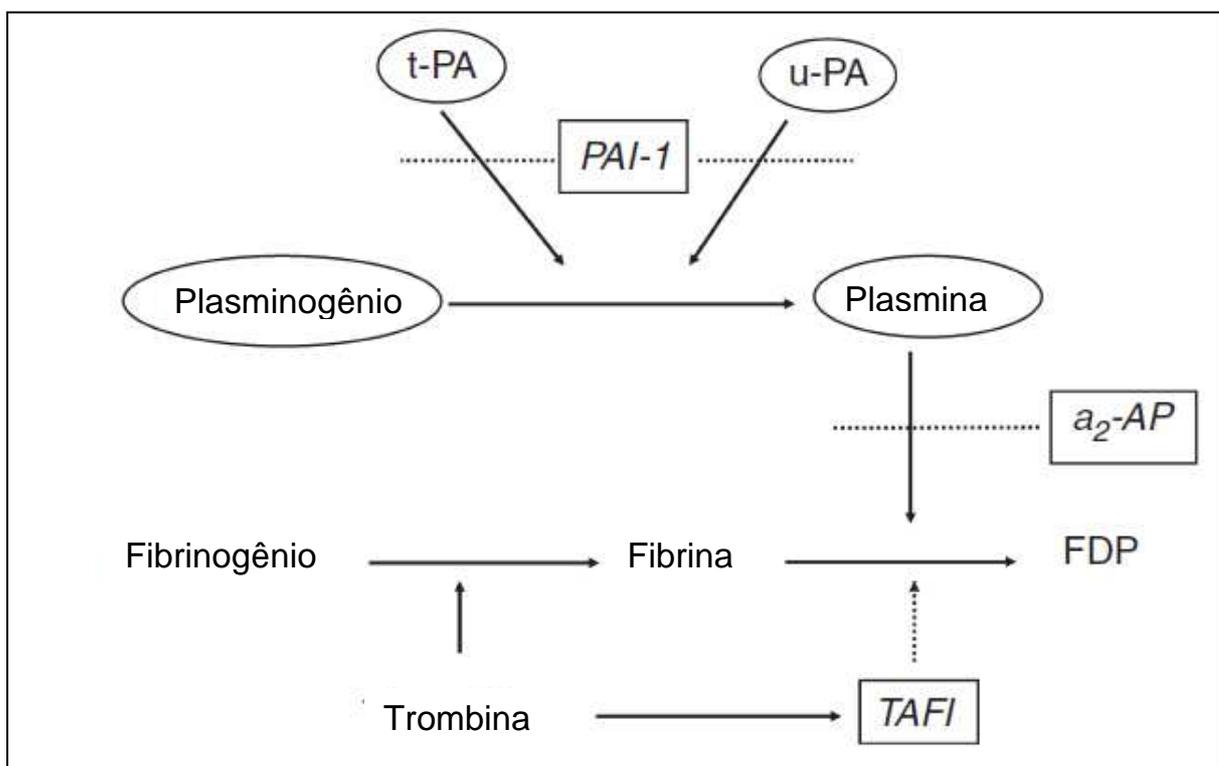
A ativação do plasminogênio pode ser mediada por duas enzimas diferentes: o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). O t-PA atua principalmente na ativação para dissolução da fibrina na circulação sanguínea, enquanto que a ativação pelo u-PA acontece durante a proteólise pericelular como, por exemplo, a remodelação do tecido ou invasão tumoral (Rijken & Lijnen, 2009). Todas as enzimas que fazem parte do sistema de ativação do plasminogênio (plasmina, t-PA e u-PA) são serino-proteases (Van De Craen *et al.*, 2012).

Essa conversão do plasminogênio em plasmina é feita a partir de interações específicas dos sítios de ligação de lisina do plasminogênio e do t-PA com resíduos de lisina C-terminal da molécula de fibrina parcialmente degradada (Mosnier & Bouma, 2006). Em seguida, a plasmina degrada o coágulo insolúvel de fibrina em pequenos fragmentos solúveis, denominados produtos de degradação da fibrina (PDF), cujo principal é o Dímero-D, dessa

forma, auxiliando na desobstrução do vaso e na restauração do fluxo sanguíneo local (Van De Craen *et al.*, 2012).

O controle da fibrinólise é feito pela  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP), que atua regulando a plasmina, pelos inibidores da ativação do plasminogênio (PAI-1, PAI-2, PAI-3, e outras proteases), ou indiretamente pelo TAFI (Van De Craen *et al.*, 2012), que atua modificando a fibrina. Este controle é tão importante que a atividade fibrinolítica prejudicada tem sido associada a complicações trombóticas agudas da aterosclerose (Santamaría *et al.*, 2003).

A **Figura 3** ilustra como ocorre o processo do sistema fibrinolítico.



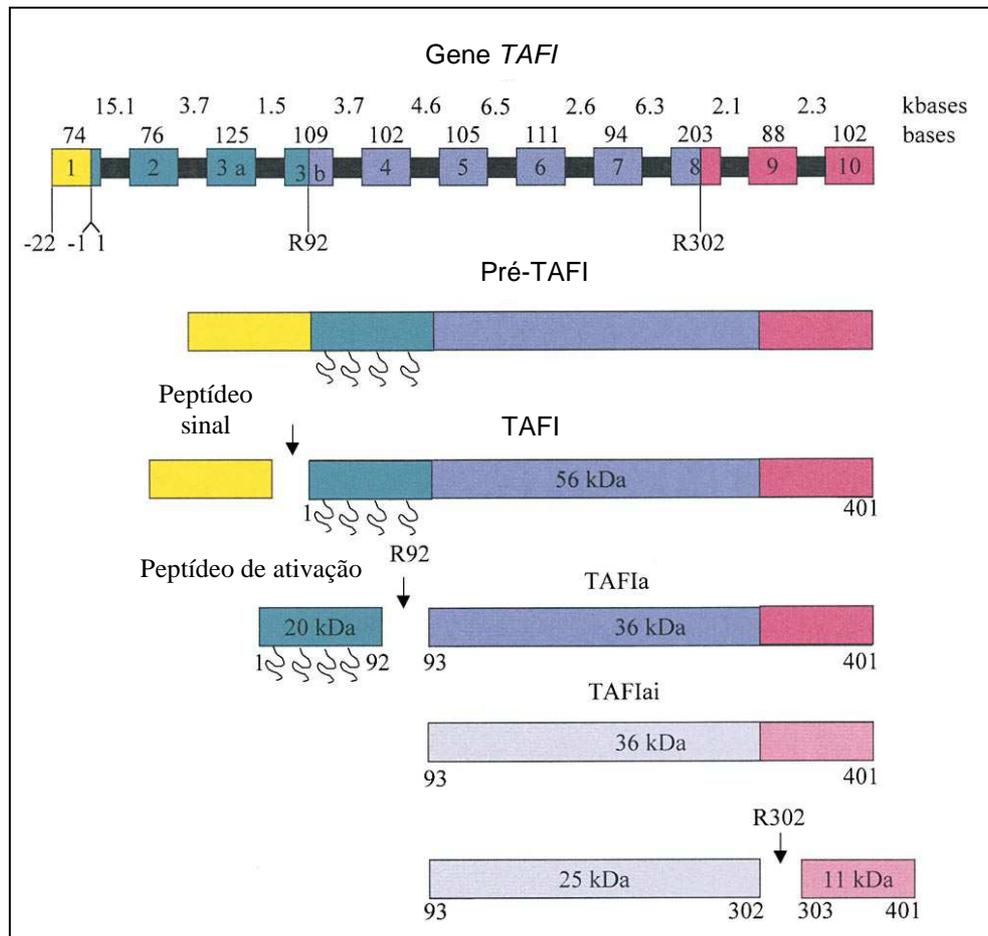
**Figura 3** – Degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico. t-PA – ativador do plasminogênio do tipo tecidual. u-PA – o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase. PAI-1 – inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1.  $\alpha_2$ -AP –  $\alpha_2$  antiplasmina. PDF – produtos de degradação de fibrina. TAFI – inibidor da fibrinólise ativado pela trombina. (Adaptado de Rijken & Lijnen, 2009)

## 2.5 INIBIDOR DA FIBRINÓLISE ATIVADO PELA TROMBINA

Um novo componente do sistema fibrinolítico foi identificado e designado como TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor), que atua como um inibidor da fibrinólise ativado pela trombina, cujo papel foi primeiramente descrito por Bajzar *et al.*, em 1995. O TAFI ocupa importante papel na hemostasia, funcionando com um potente inibidor da fibrinólise na sua forma ativada (TAFIa) (Franco *et al.*, 2001, Santamaría *et al.*, 2003).

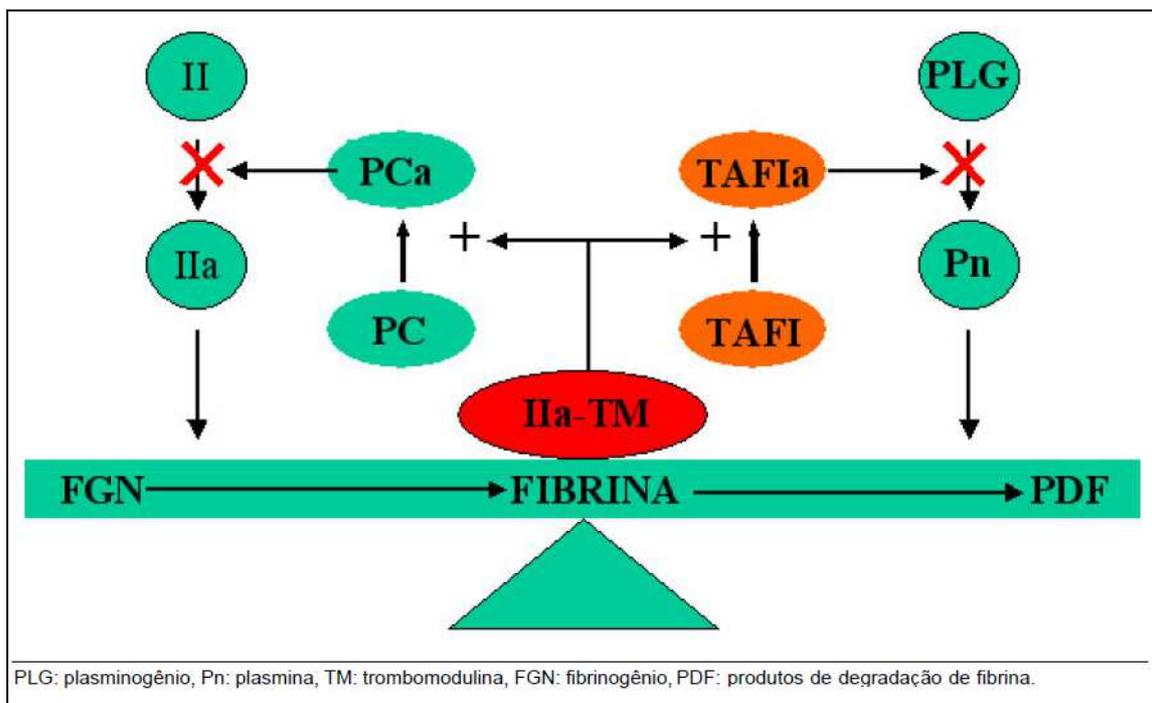
A sua identificação foi realizada por grupos independentes, resultando em diferentes nomenclaturas para a mesma proteína. Assim, as denominações TAFI ativado (TAFIa), plasma carboxipeptidase B (pCPB), carboxipeptidase U (CPU), ou carboxipeptidase R (CPR) são utilizadas na literatura para designar o TAFIa, a enzima ativa. Já as nomenclaturas TAFI, procarboxipeptidase U (pró-CPU), plasma procarboxipeptidase B (pro-pCPB), ou procarboxipeptidase R (pró-RCP), são utilizadas para indicar o zimogênio TAFI (Mosnier & Bouma, 2006).

O TAFI é um zimogênio plasmático sintetizado principalmente no fígado e também pelos megacariócitos como um prepropeptídeo de 423 aa. O peptídeo sinal N-terminal de 22 aa é removido intracelularmente após sua secreção. A ativação do TAFI, conforme mostrado na **Figura 4**, ocorre por uma única clivagem no aminoácido Arg-92, resultando na liberação de um peptídeo de ativação (TAFI-AP) do domínio catalítico, que gera a enzima ativa TAFIa. Subsequentemente, TAFIa é inativado por uma mudança de conformação para a forma inativa (TAFIai), seguida de uma clivagem proteolítica, resultando em fragmentos de 25 kDa e 11 kDa (Bouma & Meijers, 2003).



**Figura 4** – Ativação e inativação do TAFI. (Adaptado de Bouma *et al.*, 2001)

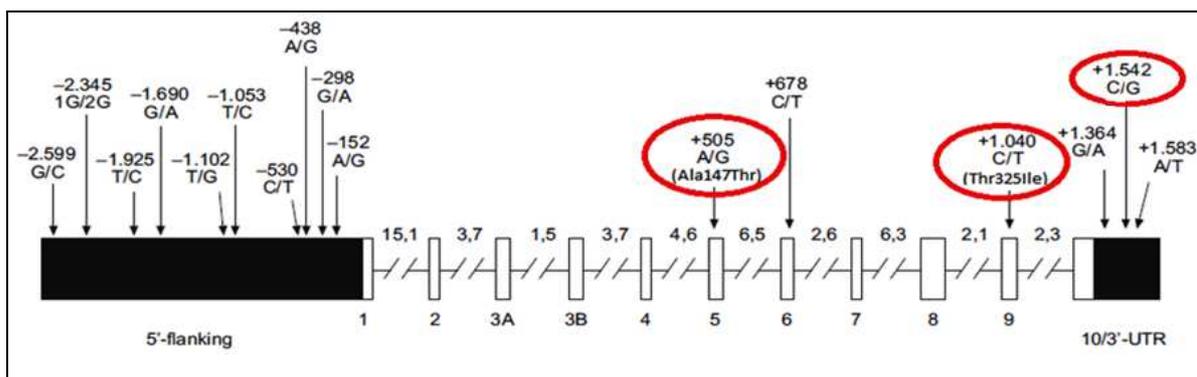
O TAFI é ativado pela trombina (Bajzar *et al.*, 1995), pelo complexo trombina - trombosmodulina (Bajzar *et al.*, 1996) ou pela plasmina (Mao *et al.*, 1999). Após a sua clivagem forma-se a enzima ativa - TAFIa, que é capaz de inibir a fibrinólise ao remover resíduos de lisina carboxi-terminal da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo. Assim, a fibrina perde a sua propriedade de ser cofator do plasminogênio, reduzindo, conseqüentemente, a produção de plasmina (Boffa & Koschinsky, 2007). Desta forma, o TAFI representa um ponto de conexão entre os sistemas da coagulação e o fibrinolítico. (Franco, 2001) (**Figura 5**).



**Figura 5** – Ponto de conexão entre o sistema de coagulação e da fibrinólise, intermediado pelo complexo trombina/trombomodulina. (Adaptado de Franco, 2001)

O gene humano *TAFI*, também denominado *CPB2* (Carboxipeptidase B2), está localizado no cromossomo 13q14.11, contendo 11 éxons de aproximadamente 48kb (Declerck, 2011). O TAFIa contém 309 aa, correspondente a uma massa molecular de 35 kDa (Nesheim, 2003).

Vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do gene do TAFI têm sido descritos, e forte correlação entre estes polimorfismos e os níveis de TAFI tem sido demonstrada (Boffa & Koschinsky, 2007) (**Figura 6**). Os SNPs estão presentes na região 5' flanqueadora, na região codificadora e na região 3'- UTR, sendo que muitos destes polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação entre si (Franco *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2001; Brouwers *et al.*, 2001; Boffa & Koschinsky, 2007)



**Figura 6** – Gene *TAFI* e seus polimorfismos já descritos. As barras em preto representam as regiões 5' e 3' não traduzidas do gene. As barras em branco representam os éxons. (Adaptado de González *et al.*, 2010).

O polimorfismo +1040C/T (rs1926447) na região codificadora do gene *TAFI*, identificado por Brouwers *et al* em 2001, localiza-se no éxon 9 e corresponde a substituição de uma citosina por uma timina na posição 1040 do gene, levando a uma mudança do aminoácido Treonina (Thr) para uma Isoleucina (Ile) na posição 325 da proteína *TAFI* (González *et al.*, 2010). Esta variante, também denominada de Thr325Ile, tem um impacto sobre a estabilidade térmica da enzima e suas propriedades antifibrinolíticas. A presença da Ile na posição 325 torna a enzima duas vezes mais estável, e resulta em um aumento de 30-60% no efeito antifibrinolítico, quando comparado com a Thr nesta posição (Schneider *et al.*, 2002), levando ainda a menores níveis de *TAFI* circulantes (Brouwers *et al.*, 2003; Ladenvall *et al.*, 2007; Tàssies *et al.*, 2009).

O polimorfismo +505A/G (rs3742264), primeiramente descrito por Zhao *et al* em 1998, também está presente na região codificadora do gene *TAFI*, no éxon 5 (Ladenvall *et al.*, 2007). A alteração de uma Guanina por uma Adenina na posição 505 na sequência do DNA leva a uma mudança do aminoácido Alanina (Ala) para uma Treonina (Thr), na posição 147 da proteína. Este polimorfismo também é conhecido como Ala147Thr. A presença da Guanina, e consequentemente da Alanina, leva a menores níveis de *TAFI* circulantes (Henry *et al.*, 2001; Brouwers *et al.*, 2003; Tàssies *et al.*, 2009).

O polimorfismo +1542C/G (rs940), presente na região 3'-UTR, foi primeiramente descrito por Henry *et al* em 2001. A troca de uma Citosina por

uma Guanina afeta a instabilidade do mRNA, levando a menores níveis de TAFI plasmáticos (Boffa *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado a associação entre elevados níveis plasmáticos de TAFI e os fatores de risco convencionais para doenças cardiovasculares (Boffa *et al.*, 2008), TVP (Martini *et al.*, 2006; Meltzer *et al.*, 2009; Meltzer *et al.*, 2010) e DAC (Tregouet *et al.*, 2009), pela inibição da fibrinólise proveniente do aumento do TAFIa (Declerck, 2011). Níveis elevados do antígeno TAFI também foram encontrados em mulheres com hipercolesterolemia (Santamaría *et al.*, 2003).

Outros estudos afirmam que existe uma relação entre os níveis elevados de TAFI e trombose arterial, mas resultados ainda são controversos (de Bruijne *et al.*, 2009; Declerck, 2011). Um estudo demonstrou o efeito protetor de níveis elevados TAFI contra o IM (Juhan-Vague *et al.*, 2003). Essas discrepâncias entre as associações de TAFI e estas doenças ou condições pode ser explicada pelos diferentes métodos utilizados para determinar os níveis plasmáticos de TAFI, incluindo calibradores e amostras de referência, e devido às várias isoformas de TAFI exibirem diferentes reatividades em alguns kits de ELISA, comercialmente disponíveis, levando a uma subestimação da isoforma 325Ile, que exibe um maior efeito antifibrinolítico (Declerck, 2011).

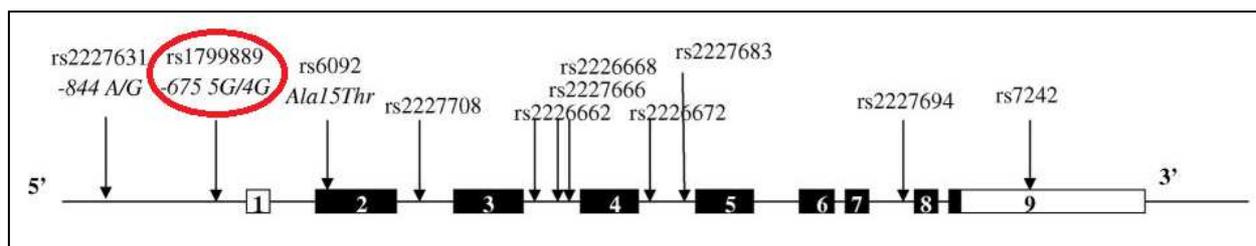
## 2.6 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1

O Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1), também conhecido como SERPINE1 (serpine peptidase inhibitor, clade E, member 1), pertence à superfamília dos inibidores de serina proteases (serpina), sendo o principal regulador da atividade fisiológica de t-PA e u-PA (Brown, 2010).

O PAI-1 é uma glicoproteína de cadeia única composta por 379 aminoácidos (aa), com um peso molecular de 48 kDa. Sua síntese ocorre em vários tecidos e tipos celulares, como células endoteliais, megacariócitos, células musculares lisas, fibroblastos, monócitos/macrófagos, adipócitos, endométrio, peritônio, células do fígado, células mesoteliais e miócitos cardíacos. É armazenado principalmente em plaquetas, embora possa também ser secretado diretamente para a corrente sanguínea ou depositado sobre a matriz subendotelial (Cesari *et al.*, 2010). Ao formar um complexo covalente com as serino-proteases t-PA e u-PA, inibe estes ativadores do plasminogênio (Van De Craen *et al.*, 2012).

O gene do PAI-1, também denominado *SERPINE1*, está localizado no cromossomo 7q22 e contém 8 íntros e 9 éxons (Ringelstein *et al.*, 2012). As concentrações plasmáticas de PAI-1 parecem ser determinadas geneticamente (Cesari *et al.*, 2010).

Vários polimorfismos já foram descritos na literatura para o gene do PAI-1, alguns dos quais estão associados com a atividade plasmática e níveis desta proteína (Eriksson *et al.*, 1998). O polimorfismo mais importante corresponde à inserção/deleção 4G/5G, que se caracteriza pela presença de quatro ou cinco resíduos de guanina na região promotora do gene *PAI-1* (-6755G/4G, rs1799889) (Koch *et al.*, 2010; Al-Hamodi *et al.*, 2012). O gene *PAI-1* e seus polimorfismos estão representados na **Figura 7**.



**Figura 7** – O gene *PAI-1* e os principais polimorfismos já descritos. Os blocos representam os exons. (Adaptado de Morange *et al.*, 2007).

A presença de uma guanina adicional na região promotora (alelo 5G) pode interferir com o processo de transcrição, inibindo-a. Assim, carreadores do genótipo 4G4G tendem a ter maiores níveis de PAI-1 plasmáticos, com maior atividade da enzima, e homozigotos 5G5G possuem menores concentrações de PAI-1 (Morange *et al.*, 2007; Cesari *et al.*, 2010; Li, 2012).

O PAI-1 é considerado um fator de risco para a ocorrência de eventos cardiovasculares (Van De Craen *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstraram uma correlação positiva entre o alelo 4G e aumento de risco para trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar, trombose arterial, trombose venosa cerebral (Ringelstein *et al.*, 2012), e aumento do risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) (Boekholdt *et al.*, 2001), embora um estudo brasileiro envolvendo pacientes com AVC isquêmico não tenha encontrado essa mesma associação (de Paula Sabino *et al.*, 2011).

A expressão elevada de PAI-1 também foi demonstrada em placas ateroscleróticas, induzida por altas concentrações de VLDL, sugerindo que o PAI-1 pode desempenhar um papel importante na aterogênese (Eriksson *et al.*, 1998).

Estudos também demonstraram que níveis plasmáticos de PAI-1 estão elevados em indivíduos com hiperlipidemia, em especial os hipertrigliceridêmicos, levando a uma atividade fibrinolítica prejudicada (Akanji & Al-Shayji, 1998; Karásek *et al.*, 2009; Karásek *et al.*, 2011). Outro estudo ainda encontrou uma associação do polimorfismo 4G/5G do PAI-1 com elevados níveis de triglicérides em pacientes com síndrome metabólica (Al-Hamodi *et al.*, 2012).

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de fatores de risco adquiridos, dos polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G no gene *TAFI* e 4G/5G no gene *PAI-1* e seus níveis em indivíduos dislipidêmicos e normolipêmicos.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Comparar, entre um grupo de indivíduos dislipidêmicos e um grupo de normolipêmicos, os seguintes parâmetros:
  - A frequência dos fatores de risco adquiridos;
  - O perfil lipídico;
  - A frequência dos polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G do gene *TAFI*.
  - A frequência do polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1*.
  - Os níveis de TAFI e PAI-1.
- Correlacionar a presença dos polimorfismos citados com os níveis de TAFI e PAI-1 nos dois grupos estudados.
- Correlacionar os parâmetros bioquímicos e hemostáticos.
- Avaliar a associação independente das variáveis estudadas e a dislipidemia.

## ***4 MATERIAL E MÉTODOS***

#### 4.1 AMOSTRAGEM

Os indivíduos dislipidêmicos (grupo caso) e normolipêmicos (grupo controle) foram selecionados a partir de um banco de amostras, armazenado em freezer a - 80°C, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foi obtido livre acesso à ficha clínica dos indivíduos selecionados (**Apêndice 1**), cuidadosamente preenchida por um médico, e ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado pelo participante (**Apêndice 2**), permitindo a utilização de amostras depositadas no banco. Após essa etapa, as amostras daqueles indivíduos que atendiam aos critérios de inclusão/exclusão, conforme descritos abaixo, foram selecionados para estudo.

Um total de 214 indivíduos adultos foi incluído, compreendendo indivíduos dislipidêmicos (n = 109) e indivíduos normolipêmicos (n = 105) avaliados por exames clínicos e laboratoriais.

As coletas de sangue das amostras deste banco foram realizadas em local adequado, no Hospital SOCOR e na Refinaria Gabriel Passos, por um profissional farmacêutico, com habilidade técnica e experiência para a realização do procedimento, entre os anos de 2006-2009.

Sob o ponto de vista ético, o projeto em questão recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisas da UFMG (COEP-UFMG), com o parecer de número ETIC 446/04, e do Hospital SOCOR, como parte integrante de um projeto maior intitulado “Análise da frequência de mutação e tipificação de genótipos clinicamente relacionados à hipercolesterolemia em indivíduos em Minas Gerais”.

## **Critérios de Inclusão e Exclusão**

### • **Dislipidêmicos - Critérios de Inclusão**

Foram incluídos indivíduos que se enquadraram nos critérios descritos abaixo:

- Faixa etária de 30 a 60 anos.
- Indivíduos de ambos os sexos, com diagnóstico clínico prévio de dislipidemia, comprovado em exame laboratorial e não estando em uso de drogas hipolipemiantes. Os valores de corte utilizados para classificá-los como dislipidêmicos estão de acordo com a indicação da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2007): Hipercolesterolemia isolada: CT  $\geq$  240 mg/dL e ou LDL-C  $\geq$  160 mg/dL. Hipertrigliceridemia isolada: TG  $\geq$  200 mg/dL. Hiperlipidemia mista: CT  $\geq$  240 mg/dL e/ou LDL-C  $\geq$  160 mg/dL, além de TG  $\geq$  200 mg/dL. Diminuição isolada do HDL-C ou associada a aumento de TG ou LDL-C: HDL-C  $\leq$  40mg/dL.

### • **Dislipidêmicos - Critérios de Exclusão**

A existência de dislipidemias secundárias ou de qualquer uma das situações listadas no **Quadro 2** resultou na exclusão do indivíduo do estudo.

**Quadro 2** – Critérios de exclusão de indivíduos dislipidêmicos e grupo controle.

<b>CLÍNICOS</b>	<b>MEDICAMENTOSOS</b>
Diabetes mellitus	Corticóides
Hipotireoidismo	Anabolizantes
Síndrome nefrótica	Isotretinoína
Insuficiência renal crônica	Ciclosporina
Doença hepática	Antiretrovirais
Doença autoimune	Antiinflamatórios não esteróides
Câncer	Anticoagulantes orais
Gravidez	Estatinas
Intolerância à glicose	Fibratos

- **Normolipêmicos - Critérios de Inclusão**

Os indivíduos selecionados para o grupo controle apresentavam a mesma situação socioeconômica dos indivíduos dislipidêmicos. Foram incluídos indivíduos que se enquadraram nos critérios abaixo:

- Faixa etária: 30 a 60 anos.
- Indivíduos de ambos os sexos, sem diagnóstico clínico prévio de dislipidemia, comprovado através de exames laboratoriais recentes. Tendo como base a classificação laboratorial das dislipidemias da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2007), foram incluídos no estudo os indivíduos que apresentavam valores de CT inferior a 200 mg/dL, LDL-C inferior 130 mg/dL, TG inferior a 150 mg/dL e HDL-C superior a 40 mg/dL.

- **Controles - Critérios de Exclusão**

A existência de dislipidemias ou de qualquer uma das situações listadas no **Quadro 2** resultou na exclusão do indivíduo.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Fatores de risco**

A presença das variáveis consideradas como fatores de risco (sedentarismo, tabagismo, etilismo, hipertensão arterial, uso de anticoncepcional oral, menopausa e terapia de reposição hormonal - TRH) foi obtida a partir da ficha clínica e avaliada com base nas recomendações da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2007). A obesidade foi medida pelo índice de massa corporal (IMC), preconizado pela OMS (Rezende *et al.*, 2006).

### **4.2.2 Análises Bioquímicas**

Os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo foram determinados em um estudo anterior do nosso grupo, realizado por Cláudia Natália Ferreira, em 2010 (Ferreira, 2010).

A metodologia utilizada nessa determinação para os seguintes parâmetros foi:

- Triglicérides: Os níveis plasmáticos de TG foram determinados pelo conjunto diagnóstico BIOCLIN® TRIGLICÉRIDES LÍQUIDO ESTÁVEL cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

Valor de referência: Ótimo: < 150 mg/dL

Limítrofe: 150 – 200 mg/dL

Alto: 200 – 499 mg/dL

Muito alto: ≥ 500 mg/dL

- Colesterol total: O CT plasmático foi determinado pelo kit diagnóstico BIOCLIN® COLESTEROL MONOREAGENTE cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

Valor de referência: Desejável < 200 mg/dL

Aceitável: 200 – 239 mg/dL

Elevado > 240 mg/dL

- HDL-Colesterol: A determinação do HDL-C plasmático foi realizada por meio do conjunto diagnóstico BIOCLIN® COLESTEROL HDL DIRETO cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

Valor de referência:

Mulheres: Desejável > 65 mg/dL

Médio Risco: 45-65 mg/dL

Alto Risco < 45 mg/dL

Homens: Desejável > 55 mg/dL

Médio Risco: 35-55 mg/dL

Alto Risco < 35 mg/dL

- LDL-Colesterol: A concentração do LDL-C plasmático foi estimada utilizando-se a fórmula descrito por FRIEDEWALD et al. (1972). Neste método, os níveis de CT, TG e HDLc são previamente determinados e as concentrações obtidas são expressas em mg/dL. O VLDL-C é estimado como o

valor de TG plasmático dividido por cinco (TG/5), e o LDL-C pode ser calculado usando-se a seguinte equação:

$$\text{LDL-C} = \text{colesterol total} - [\text{HDL-C} + (\text{TG}/5)]$$

Valor de referência: Ótimo <100 mg/dL

Desejável: 100 – 129 mg/dL

Limítrofe: 130 – 159 mg/dL

Alto: 160 – 189 mg/dL

Muito alto: ≥190 mg/dL

- Lipoproteína(a): A determinação plasmática da Lp(a) foi realizada por meio do kit diagnóstico BIOTÉCNICA® LIPOPROTEÍNA (a) TURBIDIMETRIA cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado.

Valor de referência: até 30 mg/dL.

- Colesterol não-HDL: O colesterol não-HDL foi calculado para cada participante, subtraindo-se o valor do CT plasmático pelo valor plasmático do HDL-C.
- Proteína C Reativa (PCR) ultrasensível: A determinação quantitativa da PCR-us foi realizada no soro por meio do conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA® PCR – ULTRASSENSÍVEL TURBIDIMETRIA, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado.

Valor de referência: até 3 mg/L

Todas as dosagens bioquímicas citadas anteriormente foram realizadas utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus (Roche®) em sistema completamente automatizado, seguindo o procedimento técnico recomendado pelo fabricante. Foram utilizados soros-controle específicos para verificar o desempenho dos ensaios.

### 4.2.3 Análises Hemostáticas

- Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1):

O parâmetro hemostático PAI-1 foi determinado por Cláudia Natália Ferreira, em 2010 (Ferreira, 2010). A sua determinação foi realizada no plasma citratado, usando o conjunto diagnóstico IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA (American Diagnostica® Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O teste de ELISA para a determinação do PAI-1 se baseia especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. Os antígenos presentes na amostra de plasma, no caso PAI-1, se ligam a anticorpos monoclonais específicos (anti PAI-1 de rato) fixados à superfície da placa. Após incubação, os antígenos não capturados são retirados por lavagens sucessivas. Em seguida, adicionam-se anticorpos policlonais de cabra conjugados com peroxidase, que vão se ligar a determinantes antigênicos do PAI-1 capturados na etapa anterior. Os anticorpos conjugados com peroxidase (horseradish peroxidase – HRP) que não se ligaram ao PAI-1 são, posteriormente, retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase (HRP) ligada ao segundo anticorpo, com o substrato ortofenilenodiamina (OPD), na presença de peróxido de hidrogênio, gerando um produto de coloração amarela. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se laranja. A intensidade da cor produzida (determinada espectrofotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de PAI-1 na amostra plasmática.

Valor de referência: 2 a 47 ng/mL

OBS: o fabricante recomenda que cada laboratório determine a faixa de valor de referência para PAI-1.

- Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI):

A determinação quantitativa do TAFI plasmático foi realizada neste estudo em amostra de plasma colhido em citrato, armazenada a - 80°C no banco de amostras, por meio do kit diagnóstico *VisuLize™* TAFI Antigen Kit (Affinity Biologicals Incorporated®, Canada), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O teste de ELISA para a determinação do TAFI se baseia no mesmo princípio já descrito para o PAI-1. Porém, a captura dos antígenos TAFI presentes nos plasmas testados é feita por anticorpos policlonais humanos.

Valor de referência: 5,8 a 10,0 µg/mL

OBS: o fabricante recomenda que cada laboratório determine a faixa de valor de referência para o TAFI.

#### 4.2.4 Análises Moleculares

As amostras de DNA foram obtidas a partir de 200µL de sangue total colhido em EDTA armazenado em freezer - 80°C, segundo o protocolo do fabricante e os reagentes do conjunto “Biopur Kit Extração Mini Spin Plus” – Biometrix®.

Os polimorfismos foram pesquisados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

- PCR alelo-específica para o polimorfismo +1542C/G do gene *TAFI* e 4G/5G do gene *PAI-1*.
- PCR seguida de restrição enzimática (RFLP) para o polimorfismo Thr325Ile do gene *TAFI*.
- PCR em Tempo Real para o polimorfismo Ala147Thr do gene *TAFI*.

Para a PCR alelo-específica do gene *TAFI* e 4G5G do gene *PAI-1* e a PCR-RFLP do gene *TAFI* foram utilizadas as sequências de oligonucleotídeos e as condições de amplificação segundo Henry *et al* (2001) e Brouwers *et al*

(2003), respectivamente, e descritas nos quadros abaixo (**Quadro 3 e 4**). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 15 µL em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®, USA).

Na preparação destas reações de PCR, foram utilizados os seguintes reagentes: oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela IDT®, com concentração estoque de 100µM, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) ThermoScientific Inc®, tampão IB Phoneutria® 10X (15mM de MgCl<sub>2</sub>, 500mM de KCl, 100mM de Tris-HCl pH 8,4 e 1% de Triton-X-100) e Taq DNA polimerase Phoneutria®. As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR, as sequências dos oligonucleotídeos e o protocolo de reação encontram-se apresentadas nos **Quadros 3, 4 e 5**.

**Quadro 3** – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos polimorfismos pesquisados

Polimorfismos	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores	Digestão	Fragmentos esperados
<b>TAFI Thr325Ile</b>	F: 5'-TGCTTCCAGTCTCTAGTAGC-3' 58 °C	Spel	T: 216 pb
	R: 5'-CAGTTGTATTACATGTGACC-3'		C: 166, 50 pb
<b>TAFI +1542C/G</b>	F: 5'-CCAGCAAGACCAAATCA-3'	-	Comum: 408 pb
	R1: 5'-ATT ACC GTG GAG CAA AC-3'		Alelo-específica: 238 pb
	R2 - Alelo C: 5'-AGTCAAACGTCGAAACT-3'		
	R3 - Alelo G: 5'-AGTCAAACGTCGAAAGT-3'		
<b>PAI-1 4G/5G</b>	4G5G F: 5'-AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT-3'	-	Comum: 260 pb
	4G5G R: 5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3'		Alelo-específica: 139 pb
	4G: 5'-GTCTGGACACGTGGGGA-3'		
	5G: 5'-GTCTGGACACGTGGGGG-3'		

**Quadro 4** – Protocolos da reação de PCR para amplificação dos polimorfismos pesquisados

<b>Estágios de Temperaturas</b>					
<b>Polimorfismos</b>	<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>
Thr325Ile	94°C - 4 min	94°C - 1 min	60°C - 1 min	72°C - 1 min	72°C - 5 min
	1 ciclo		32 ciclos		1 ciclo
+1542C/G	95°C - 2 min	95°C - 45 seg	60°C - 1 min	72°C - 1 min	72°C - 5 min
	1 ciclo		40 ciclos		1 ciclo
PAI-1 4G/5G	95°C - 5 min	95°C - 1min	57°C - 1 min	72°C - 1 min	72°C - 5 min
		15 ciclos			
	1 ciclo	95°C - 1min	52°C - 1 min	72°C - 1 min	1 ciclo
20 ciclos					

**Quadro 5** – Concentrações dos reagentes utilizados para a reação de PCR para amplificação dos polimorfismos pesquisados

<b>Reagentes e sua concentração</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>L) / tubo para os polimorfismos</b>		
	<b>Thr325Ile</b>	<b>+1542C/G</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>
dNTP's (25 $\mu$ M)	1,5	1,5	2,0
Tampão (10X)	1,5	1,5	1,5
Oligo Senso (F) e Antiseno (R) (10 $\mu$ M)	F = 0,2	F = 0,6	4G5G F = 1,0
	R = 0,2	R1 = 0,2	4G5G R = 1,0
		R2 = 0,6	4G = 1,3
		R3 = 0,6	5G = 1,6
Taq DNA Polimerase (5u/ $\mu$ L)	0,25	0,5	0,3
DNA (Concentração média = 30,0ng/ $\mu$ L)	1,0	1,0	1,5
H <sub>2</sub> O qsp	15	15	19,8

Após a detecção do fragmento específico em gel de poliacrilamida a 6%, uma alíquota de 10µL da reação de amplificação para o polimorfismo Thr325Ile foi digerida com a endonuclease de restrição *SpeI*, de concentração 10U/µL, de acordo com o protocolo apresentado no **Quadro 6**. Essa mistura foi então incubada, em banho-maria a 37°C, por no mínimo 8 horas.

**Quadro 6** – Protocolo de digestão enzimática para o polimorfismo Thr325Ile

Reagentes	µL/tubo
Tampão de enzima (10X)	2,0
Enzima <i>SpeI</i> (10u/µL)	0,3
Produto de PCR amplificado	10,0
H <sub>2</sub> O qsp	19,7

Após amplificação ou digestão enzimática, quando aplicável, os fragmentos descritos foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados com solução de nitrato de prata (Sambrook, 1989).

As amostras foram genotipadas para o polimorfismo Ala147Thr por PCR em Tempo Real utilizando o sistema de discriminação alélica com a sonda de hidrólise TaqMan® SNP Genotyping Assays, no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, USA), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

#### 4.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico SPSS, versão 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc; Chicago, Illinois). A avaliação de normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foram realizados os testes de qui-quadrado para a comparação das frequências dos fatores de risco categóricos, genotípicos e alélicas. As variáveis contínuas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil por não terem seguido a normalidade. Foram utilizados os testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney, com correção de Bonferroni, para a

comparação destas variáveis entre três ou dois grupos, respectivamente. Foi utilizado o teste de Spearman para a correlação entre as variáveis. Os valores de  $p < 0,05$ , ou  $p < 0,02$ , quando utilizada a correção de Bonferroni, foram considerados significativos. A análise dos haplótipos foi realizada com o software PHASE, versão 2.1.1 (Stephens et al, 2001; Stephens and Donnelly, 2003).

Para a análise de regressão linear logística foi feita primeiramente uma análise univariada com as seguintes variáveis: frequência genotípica e alélica do polimorfismo Thr325Ile, frequência genotípica e alélica do polimorfismo Ala147Thr, frequência genotípica e alélica do polimorfismo +1542C/G, frequência genotípica e alélica do polimorfismo 4G/5G, sexo, idade, IMC, níveis plasmáticos de TAFI e PAI-1, sedentarismo, tabagismo, etilismo, hipertensão, uso de contraceptivos, TRH e menopausa. Foram selecionadas aquelas que apresentaram  $p < 0,2$  para entrarem na análise de regressão linear logística multivariada, cujo modelo final será descrito na seção de resultados, na **Tabela 22**. Este modelo final seguiu a adequação segundo o teste de Hosmer and Lemeshow. Também foi feita a análise de regressão linear logística multivariada separando os grupos por sexo masculino e feminino. Da mesma maneira também foram selecionadas aquelas que apresentaram  $p < 0,2$  para entrarem na análise de regressão linear logística multivariada, cujo modelo final está descrito na seção de resultados, para o sexo masculino e feminino nas **Tabelas 23 e 24**, respectivamente. Este modelo final também seguiu a adequação segundo o teste de Hosmer and Lemeshow.

## ***5 RESULTADOS***

## 5.1 Caracterização dos grupos estudados quanto aos fatores de risco cardiovascular e perfil lipídico

A caracterização dos grupos quanto aos dados demográficos, bem como os fatores de risco cardiovascular associados com a dislipidemia, o número de indivíduos avaliados e a porcentagem de cada variável entre os grupos, são apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1** - Características demográficas e clínicas entre os grupos estudados

Variável	Dislipidêmicos (n = 109)	Normolipêmicos (n = 105)	p
Idade (anos)	49 (9) <sup>(a)</sup>	47 (8) <sup>(a)</sup>	ns
Sexo (F/M)	F = 41 (37,6%) M = 68 (62,4%)	F = 61 (58,1%) M = 44 (41,9%)	0,004
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,9 (5,3) <sup>(a)</sup>	24,8 (3,6) <sup>(a)</sup>	<0,001
Sedentarismo	55 (50,5%)	51 (48,6%)	ns
Tabagismo	20 (18,3%)	18 (17,1%)	ns
Etilismo	7 (6,4%)	2 (1,9%)	ns
Hipertensão	30 (27,5%)	10 (9,5%)	0,001
Anticoncepcional <sup>(b)</sup>	1 (2,4%)	7 (11,5%)	ns
Menopausa <sup>(b)</sup>	22 (53,7%)	14 (23,0%)	0,003
Terapia de reposição hormonal <sup>(b)</sup>	4 (9,8%)	6 (9,8%)	ns

(a) Valores como mediana e intervalo interquartilico, (b) Frequência apenas em mulheres, ns = não significativo. F = Feminino. M = Masculino.

Os grupos estudados apresentaram homogeneidade em relação à idade, e diferiram quanto às variáveis sexo e IMC, sendo que a presença de mulheres foi maior no grupo normolipêmico e a de homens no grupo dislipidêmico.

Com relação aos fatores de risco cardiovascular, observou-se uma diferença significativa apenas para a variável hipertensão, sendo mais frequente no grupo de dislipidêmicos. Foi encontrado também um maior número de mulheres no climatério quando comparado ao grupo controle.

Como os grupos diferiram em relação à variável sexo, as variáveis foram re-analisadas dividindo-se os grupos entre homens e mulheres. Os dados são apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Características demográficas e clínicas separadas por sexo entre os grupos estudados

Variável	Masculino		p	Feminino		p
	Dislipidêmicos (n = 68)	Normolipêmicos (n = 44)		Dislipidêmicos (n = 41)	Normolipêmicos (n = 61)	
Idade (anos)	48 (8) <sub>(a)</sub>	48 (8) <sub>(a)</sub>	ns	51 (8) <sub>(a)</sub>	47 (8) <sub>(a)</sub>	0,008
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,8 (5,2) <sub>(a)</sub>	24,5 (3,38) <sub>(a)</sub>	<0,001	27,6 (5,4) <sub>(a)</sub>	24,8 (4,05) <sub>(a)</sub>	0,013
Sedentarismo	34 (50,0%)	24 (54,5%)	ns	21 (51,2%)	27(44,3%)	ns
Tabagismo	12 (17,6%)	12 (27,3%)	ns	8 (19,5%)	6 (9,8%)	ns
Etilismo	7 (10,3%)	1 (2,3%)	ns	0	1 (1,6%)	ns
Hipertensão	17 (25,0%)	4 (9,1%)	0,047	13 (31,7%)	6 (9,8%)	0,009
Anticoncepcional	-	-	-	1 (2,4%)	7 (11,5%)	ns
Menopausa	-	-	-	22 (53,7%)	14 (23,0%)	0,003
Terapia de reposição hormonal	-	-	-	4 (9,8%)	6 (9,8%)	ns

(a) Valores como mediana e intervalo interquartilico. ns = não significativo.

Analisando o grupo do sexo masculino, os homens com dislipidemia apresentaram maior IMC e uma maior frequência de hipertensão arterial em relação aos homens do outro grupo. O grupo das mulheres dislipidêmicas apresentou idade ligeiramente superior, bem como o IMC, frequência de hipertensão e menopausa, quando comparado ao grupo de normolipêmicas.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos analisados e do perfil lipídico são apresentados na **Tabela 3**

**Tabela 3** – Variáveis bioquímicas entre os grupos estudados

Variável	Dislipidêmicos (n=109)	Normolipêmicos (n=105)	p
Colesterol Total	226 (59)	183 (32)	<0,001
Triglicérides	160 (136)	96 (58,5)	<0,001
HDL-C	44 (15)	56 (16,5)	<0,001
PCR	1,5 (2,3)	2,1 (3,15)	ns
VLDL	32 (27,2)	19,2 (11,7)	<0,001
LDL-C	142,4 (53,4)	106,4 (26)	<0,001
Lp(a)	15,2 (25,7)	13,1 (21,65)	ns
Fração não HDL	179 (49)	126	<0,001

Valores expressos como mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. ns = não significativo. Unidades: Colesterol Total, Triglicérides, HDL-C, VLDL, LDL-C, Lp(a), e Fração não HDL – mg/dL; PCR – mg/L.

Conforme esperado, por ser critério de inclusão, foi observada diferença significativa nos valores do perfil lipídico entre os dois grupos. Para as variáveis bioquímicas Lp(a) e PCR não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Os dados também são apresentados, na **Tabela 4**, dividindo-se os grupos por sexo.

**Tabela 4** – Variáveis bioquímicas entre os grupos estudados separados por sexo

Variável	Masculino		p	Feminino		p
	Dislipidêmicos (n = 68)	Normolipêmicos (n = 44)		Dislipidêmicos (n = 41)	Normolipêmicos (n = 61)	
Colesterol Total	223,00 (60)	179,00 (37,5)	<0,001	235,50 (62,75)	184,00 (29,5)	<0,001
Triglicérides	181,00 (158)	111,50 (64,75)	<0,001	128,50 (104,25)	87,00 (58,5)	<0,001
HDL-C	41,00 (16)	49,50 (18)	0,001	46,50 (18)	58,00 (16)	<0,001
PCR	1,50 (1,85)	2,15 (3,23)	ns	2,05 (2,7)	2,00 (3,1)	ns
VLDL	36,20 (31,6)	22,30 (12,95)	<0,001	25,70 (20,85)	17,40 (11,7)	0,001
LDL-C	138,40 (57,9)	103,20 (33,95)	<0,001	150,60 (44,95)	107,80 (24,7)	<0,001
Lp(a)	10,90 (19,8)	12,50 (21,23)	ns	21,10 (40,9)	13,90 (22,5)	ns
Fração não HDL	178,00 (47)	125,00 (32,25)	<0,001	180,50 (58,2)	127,00 (26)	<0,001

Valores expressos como mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. ns = não significativo. Unidades: Colesterol Total, Triglicérides, HDL-C, VLDL, LDL-C, Lp(a), e Fração não HDL – mg/dL; PCR – mg/L.

Após classificar os indivíduos de acordo com o sexo, foram observadas as mesmas diferenças, quando comparados os grupos de dislipidêmicos e normolipêmicos, conforme apresentado na **Tabela 3**.

## 5.2 Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina

### 5.2.1 Determinações plasmáticas

Os resultados obtidos para os níveis plasmáticos de TAFI estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Níveis de TAFI plasmáticos entre os grupos estudados

Variável	Dislipidêmicos (n=109)	Normolipêmicos (n=105)	p
TAFI	8,5 (2,1)	7,3 (1,99)	<0,001

Valores expressos como mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. Unidade TAFI: µg/mL.

Observou-se diferença significativa para as medianas de TAFI plasmático entre os grupos, sendo este maior no grupo dos dislipidêmicos.

Esses resultados também são apresentados, na **Tabela 6**, dividindo-se os grupos por sexo. Foram observadas as mesmas diferenças para as medianas de TAFI quando comparados os grupos de dislipidêmicos e normolipêmicos.

**Tabela 6** – Níveis de TAFI plasmáticos entre os grupos estudados separados por sexo

Variável	Masculino		p	Feminino		p
	Dislipidêmicos (n = 68)	Normolipêmicos (n = 44)		Dislipidêmicos (n = 41)	Normolipêmicos (n = 61)	
TAFI	8,20 (1,4)	7,550 (2,06)	0,02	9,50 (1,92)	7,04 (1,84)	<0,001

Valores expressos como mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. Unidade TAFI: µg/mL.

A **Tabela 7** apresenta as correlações dos níveis plasmáticos de TAFI e com os parâmetros bioquímicos e os fatores de risco quando somados os dois grupos dislipidêmicos e normolipêmicos.

**Tabela 7** – Correlação entre os níveis de TAFI, parâmetros bioquímicos e fatores de risco cardiovascular

Variável	TAFI	p
Sexo	r = 0,121	ns
Idade	r = 0,158	0,023
IMC	r = 0,151	0,027
Colesterol Total	r = 0,195	<0,001
TG	r = 0,318	<0,001
HDL	r = - 0,309	<0,001
PCR	r = 0,040	ns
VLDL	r = 0,278	<0,001
LDL-C	r = 0,221	0,001
Lpa	r = 0,067	ns
Fração não HDL	r = 0,301	<0,001
Sedentarismo	r = 0,060	ns
Tabagismo	r = 0,092	ns
Etilismo	r = 0,093	ns
Hipertensão	r = 0,202	0,003
Contraceptivos <sup>(a)</sup>	r = - 0,195	0,004
Menopausa <sup>(a)</sup>	r = 0,258	<0,001
Reposição hormonal <sup>(a)</sup>	r = - 0,062	ns

(a) Apenas para o grupo de mulheres. ns = não significativo. N<sup>o</sup> de participantes = 214.

Os níveis de TAFI mostraram correlação significativa com idade, IMC, parâmetros do perfil lipídico, presença de hipertensão, uso de contraceptivos orais e menopausa.

Como as correlações de TAFI não foram significativas para a variável sexo, a tabela dividindo-se os grupos por sexo não será apresentada. No entanto, esta variável foi comparada no grupo do sexo feminino, a fim de identificar se o uso de contraceptivos orais, reposição hormonal ou a menopausa poderiam interferir na mediana deste parâmetro. Os dados são apresentados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Mediana dos valores de TAFI entre as usuárias de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal ou na menopausa

<b>Contraceptivos Orais</b>			
<b>Variável</b>	<b>Usuária (n = 8)</b>	<b>Não usuária (n = 94)</b>	<b>p</b>
TAFI ( $\mu\text{g/mL}$ )	6,90 (2,08)	8,22 (2,30)	0,017
<b>Menopausa</b>			
	<b>Presente (n = 36)</b>	<b>Ausente (n = 66)</b>	<b>p</b>
TAFI ( $\mu\text{g/mL}$ )	8,98 (2,05)	7,25 (2,23)	<0,001
<b>Terapia de Reposição Hormonal</b>			
	<b>Usuária (n = 10)</b>	<b>Não usuária (n = 92)</b>	<b>p</b>
TAFI ( $\mu\text{g/mL}$ )	8,10 (1,84)	7,80 (2,45)	ns

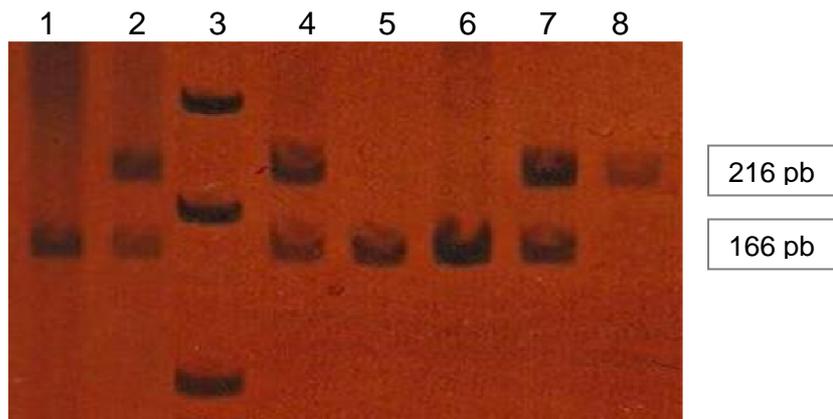
ns: não significativo. n = número de mulheres. Nº total de mulheres = 102.

Conforme observado na tabela anterior, os níveis de TAFI foram inferiores nas mulheres em uso de contraceptivo, mas não sofreram alteração com a reposição hormonal. Além disso, o estado pós-menopausa propiciou um aumento dos seus níveis.

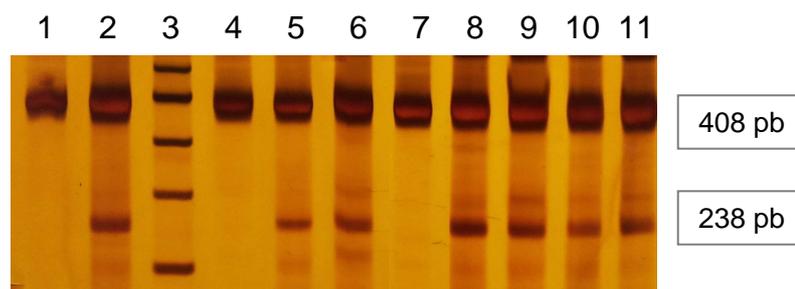
## 5.2.2 Polimorfismos do gene *TAFI*

### 5.2.2.1 Distribuição das frequências dos alelos e genótipos do gene *TAFI* e seus haplótipos

As **Figuras 8 e 9** apresentam os resultados obtidos por eletroforese dos fragmentos gerados após PCR ou digestão enzimática para a identificação genotípica dos polimorfismos Thr325Ile e +1542C/G, respectivamente.

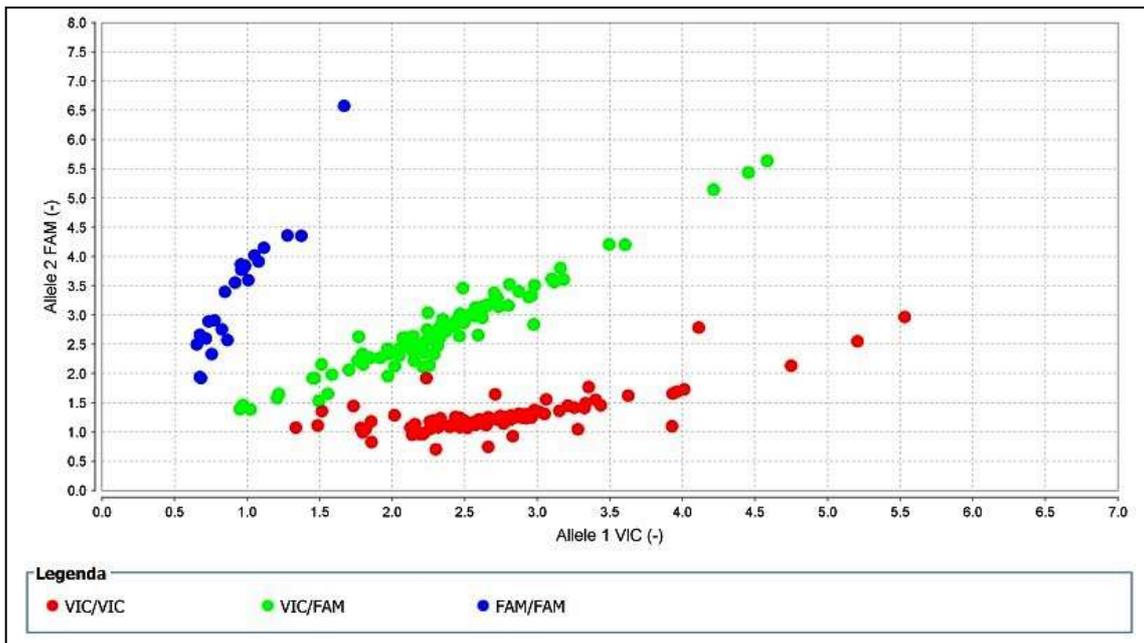


**Figura 8** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corada por nitrato de prata obtido após reação de PCR, seguida de digestão enzimática com a endonuclease de restrição *SpeI* para o polimorfismo Thr325Ile (+1040C/T). Canaleta 3 - padrão de peso molecular (1Kb); canaletas 1, 5, 6 - indivíduos homocigotos CC; canaletas 2, 4 e 7 - indivíduos heterocigotos CT; canaleta 8 - indivíduo homocigoto TT.



**Figura 9** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corada por nitrato de prata obtido após reação de PCR alelo-específica, para o polimorfismo +1542C/G. A cada duas canaletas tem-se o resultado de um paciente único. Canaleta 3 - padrão de peso molecular (1Kb); canaletas 1 e 2, 4 e 5 – indivíduos homocigoto para o alelo G; canaletas 6 e 7 – indivíduo homocigoto para o alelo C; canaletas 8 e 9, 10 e 11 – indivíduos heterocigotos CG.

A **Figura 10** ilustra o resultado obtido para a genotipagem após a discriminação alélica realizada pela PCR em tempo real para o polimorfismo Ala147Thr.



**Figura 10** – PCR em tempo real para o polimorfismo Ala147Thr. Os pontos vermelhos correspondem ao genótipo GG, marcado com a sonda VIC; os pontos azuis representam o genótipo AA, marcado com a sonda FAM e os pontos verdes representam os indivíduos heterozigotos GA, marcados com VIC e FAM.

As **Tabelas 9, 10, e 11** apresentam, respectivamente, os dados referentes aos resultados obtidos para as frequências genótípicas e alélicas para os polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G do gene *TAFI* para os grupos normolipêmico e dislipidêmico e de acordo com o sexo.

**Tabela 9** – Frequência do polimorfismo Thr325Ile entre os grupos dislipidêmico e normolipêmico estratificados por sexo

<b>Dislipidêmicos (n = 109)</b>		<b>Normolipêmicos (n = 104)</b>		p	OR	IC	
Genótipos	n	Frequência (%)	n				Frequência (%)
TT	12	11,00	7	6,70	0,145	2,134 0,711-6,599	
TC	48	44,00	36	34,60	0,082	1,660 0,900-3,068	
CC	49	45,00	61	58,70	Referência	- -	
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
T	72	33,03	50	24,04	0,159	1,56	0,802 - 3,040
C	146	66,97	158	75,96			

<b>Sexo Feminino Dislipidêmicas (n = 41)</b>		<b>Sexo Feminino Normolipêmicas (n = 60)</b>		p	OR	IC	
Genótipos	n	Frequência (%)	n				Frequência (%)
TT	3	7,30	6	10,00	0,999	1,00 0,171-5,376	
TC	21	51,20	20	33,30	0,093	2,100 0,830-5,350	
CC	17	41,50	34	56,70	Referência	- -	
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
T	27	32,93	32	26,67	0,355	1,332	0,695 - 2,557
C	55	67,07	88	73,33			

<b>Sexo Masculino Dislipidêmicos (n = 68)</b>		<b>Sexo Masculino Normolipêmicos (n = 44)</b>		p	OR	IC	
Genótipos	n	Frequência (%)	n				Frequência (%)
TT	9	13,20	1	2,30	0,033*	7,594 0,875-170,284	
TC	27	39,70	16	36,40	0,422	1,427 0,592-3,443	
CC	32	47,10	27	61,40	Referência	- -	
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
T	45	33,09	18	20,45	0,037*	1,923	0,982-3,792
C	91	66,91	70	79,55			

\*diferença significativa. Para o polimorfismo Thr325Ile não foi possível a amplificação de uma amostra do grupo normolipêmico.

**Tabela 10** – Frequência do polimorfismo Ala147Thr entre os grupos e estratificada por sexo

<b>Dislipidêmicos (n = 109)</b>		<b>Normolipêmicos (n = 105)</b>		p	OR	IC	
Genótipos	n	Frequência (%)	n				Frequência (%)
AA	7	6,40	16	15,20	0,012*	0,297 0,099-0,863	
GA	46	42,20	51	48,60	0,092	0,612 0,331-1,130	
GG	56	51,40	38	36,20	Referência	- -	
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
A	60	27,52	83	39,52	0,073	0,583	0,309 - 1,099
G	158	72,48	127	60,48			

<b>Sexo Feminino Dislipidêmicas (n = 41)</b>		<b>Sexo Feminino Normolipêmicas (n = 61)</b>		p	OR	IC	
Genótipos	n	Frequência (%)	n				Frequência (%)
AA	2	4,90	8	13,10	0,287	0,338 0,044-2,034	
GA	19	46,30	26	42,60	0,974	0,987 0,397-2,451	
GG	20	48,80	27	44,30	Referência	- -	
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
A	23	28,05	42	34,43	0,359	0,755	0,396 - 1,435
G	59	71,95	80	65,57			

<b>Sexo Masculino Dislipidêmicos (n = 68)</b>		<b>Sexo Masculino Normolipêmicos (n = 44)</b>		p	OR	IC	
Genótipos	n	Frequência (%)	n				Frequência (%)
AA	5	7,40	8	18,20	0,016*	0,191 0,042-0,828	
GA	27	39,70	25	56,80	0,011*	0,330 0,126-0,852	
GG	36	52,90	11	25,00	Referência	- -	
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
A	37	27,21	41	46,59	0,003*	0,417	0,221 - 0,785
G	99	72,79	47	53,41			

\*diferença significativa.

**Tabela 11** – Frequência do polimorfismo +1542C/G entre os grupos e estratificada por sexo

		<b>Dislipidêmicos (n = 108)</b>		<b>Normolipêmicos (n = 103)</b>			
Genótipos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
CC	10	9,30	4	3,90	0,162	2,500	0,664-10,152
CG	43	39,80	44	42,70	0,936	0,977	0,535-1,784
GG	55	50,90	55	53,40	Referência		-
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
C	63	29,17	52	25,24	0,524	1,225	0,626 - 2,402
G	153	70,83	154	74,76			

		<b>Sexo Feminino Dislipidêmicas (n = 41)</b>		<b>Sexo Feminino Normolipêmicas (n = 59)</b>			
Genótipos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
CC	3	7,30	2	3,40	0,392	2,325	0,278-22,252
CG	18	43,90	26	44,10	0,867	1,073	0,434-2,652
GG	20	48,80	31	52,50	Referência	-	-
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
C	24	29,27	30	25,42	0,524	1,225	0,626 - 2,402
G	58	70,73	88	74,58			

		<b>Sexo Masculino Dislipidêmicos (n = 67)</b>		<b>Sexo Masculino Normolipêmicos (n = 44)</b>			
Genótipos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
CC	7	10,40	2	4,50	0,465	2,400	0,399-18,418
CG	25	37,20	18	40,90	0,905	0,952	0,397-2,286
GG	35	52,20	24	54,50	Referência	-	-
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
C	39	29,10	22	25,00	0,524	1,225	0,626 - 2,402
G	95	70,90	66	75,00			

Para o polimorfismo +1542C/G não foi possível a amplificação de uma amostra do grupo dislipidêmico e duas amostras do grupo normolipêmico.

Não foi observada diferença significativa para as frequências alélica e genotípica para os polimorfismos Thr325Ile e +1542C/G entre os grupos estudados. Para o polimorfismo +1542C/G, este resultado se manteve quando foram separados os grupos por sexo, no entanto, para o polimorfismo Thr325Ile, observou-se uma maior frequência do alelo T e do genótipo TT em homens dislipidêmicos, quando comparado ao grupo controle do mesmo sexo.

Para o polimorfismo Ala147Thr, foi observada uma maior frequência do genótipo GG e uma tendência à maior frequência do alelo G no grupo de

indivíduos dislipidêmicos. No entanto, esta diferença só foi evidenciada em indivíduos dislipidêmicos do sexo masculino, sendo que a frequência deste alelo e genótipo não se mostrou diferente entre as mulheres.

A **Tabela 12** mostra as frequências encontradas para os possíveis haplótipos referentes aos polimorfismos avaliados no gene *TAFI* nos grupos estudados. Foram excluídos os genótipos CGC, CAC, TAG e TAC por apresentarem frequência inferior a 5% em qualquer um dos grupos estudados.

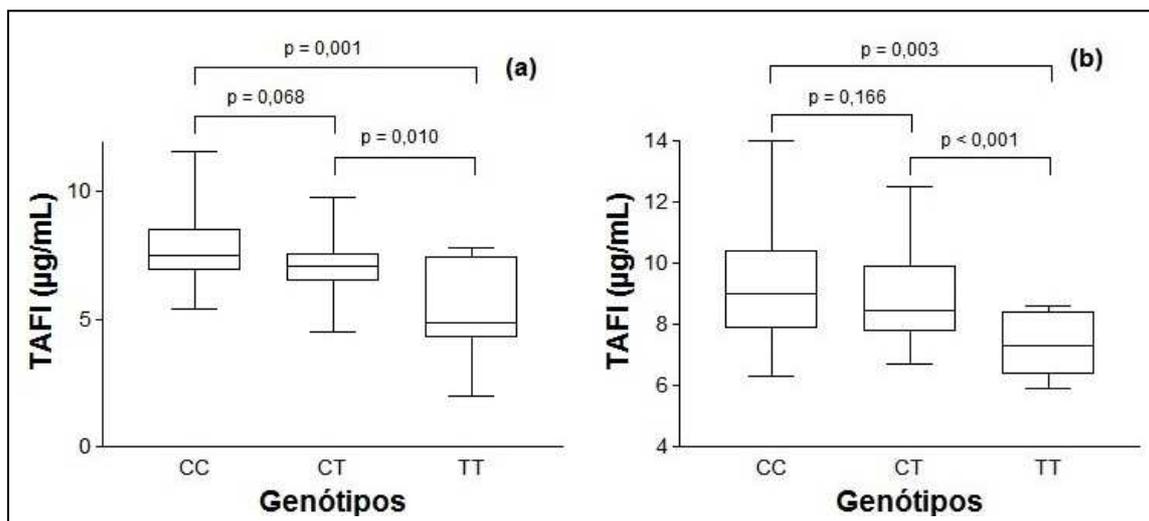
**Tabela 12** – Frequências dos haplótipos do gene *TAFI* entre os grupos caso e controle

Haplótipos possíveis			Frequências		p	OR	IC
Thr325Ile	Ala147Thr	1542C/G	Grupo Caso (n=108)	Grupo Controle (n=102)			
C	G	G	0,39	0,31	Referência	-	-
C	A	G	0,26	0,37	0,127	0,561	0,271-1,159
T	G	G	0,05	0,06	0,482	0,635	0,150-2,639
T	G	C	0,27	0,17	0,496	1,300	0,572-2,967

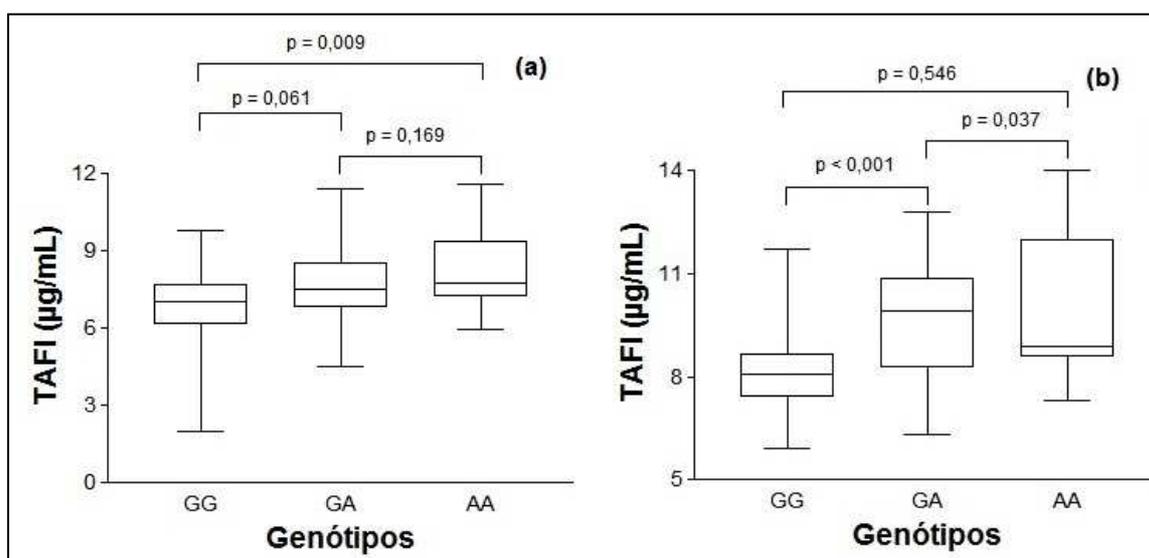
Não foi observada nenhuma diferença significativa com relação à frequência haplotípica, quando comparados os grupos de dislipidêmicos e normolipêmicos.

#### 5.2.2.2 Efeito dos polimorfismos do gene *TAFI* em seus níveis plasmáticos

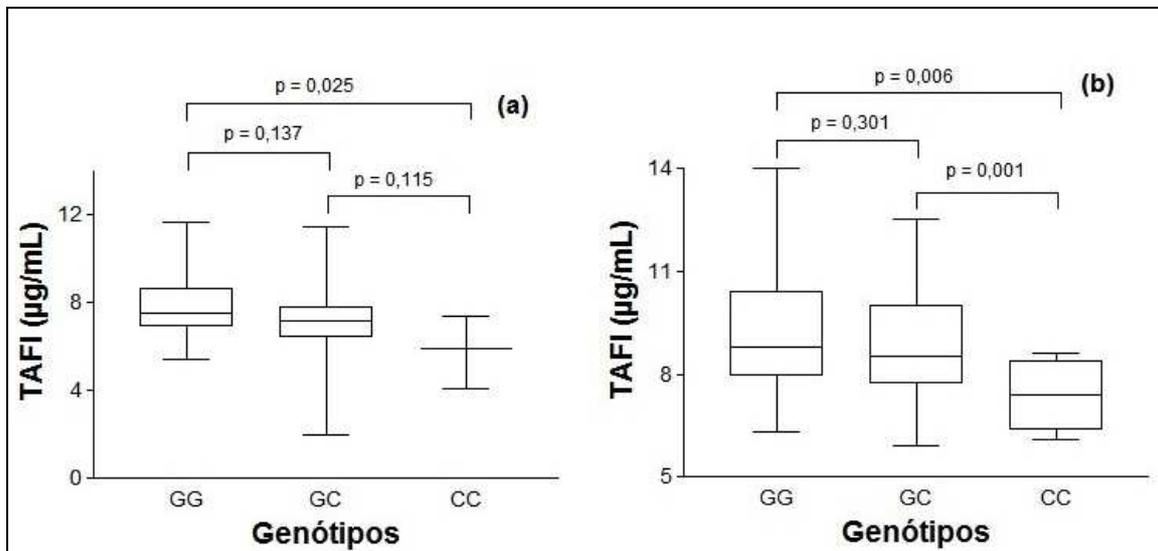
As **Figuras 11, 12 e 13** apresentam a comparação entre as medianas dos níveis plasmáticos de TAFI para cada genótipo dos polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G, respectivamente, para o grupo controle e grupo dislipidêmico.



**Figura 11** – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo Thr325Ile. (a) grupo controle; (b) grupo dislipidêmico



**Figura 12** – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo Ala147Thr. (a) grupo controle; (b) grupo dislipidêmico



**Figura 13** – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo +1542C/G. (a) grupo controle; (b) grupo dislipidêmico.

Os níveis de TAFI também são apresentados nas **Tabelas 13, 14 e 15**, respectivamente para os polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G do gene *TAFI*, para o sexo masculino e sexo feminino.

**Tabela 13** – Níveis de TAFI (em µg/mL) para o polimorfismo Thr325Ile entre os grupos estratificados por sexo

<b>Sexo Feminino</b>				
	<b>CC(n = 34)<sup>(1)</sup></b>	<b>CT (n = 20)<sup>(2)</sup></b>	<b>TT (n = 6)<sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,062 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n = 60)</b>	7,26 (2,10)	7,00 (1,23)	4,62 (3,71)	0,591 <sup>(b)</sup>
				0,013* <sup>(c)</sup>
				0,072 <sup>(d)</sup>
	<b>CC (n = 17)<sup>(1)</sup></b>	<b>CT (n = 21)<sup>(2)</sup></b>	<b>TT (n = 3)<sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,048* <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n = 41)</b>	10,10 (2,10)	8,7 (1,85)	8,3 (2,70)	0,078 <sup>(b)</sup>
				0,039* <sup>(c)</sup>
				0,190 <sup>(d)</sup>
<b>Sexo Masculino</b>				
	<b>CC (n = 27)<sup>(1)</sup></b>	<b>CT (n = 16)<sup>(2)</sup></b>	<b>TT (n = 1)<sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,026 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n = 44)</b>	8,00 (2,14)	7,3 (0,95)	4,95 (0,50)	0,032 <sup>(b)</sup>
				0,071 <sup>(c)</sup>
				0,118 <sup>(d)</sup>
	<b>CC (n = 32)<sup>(1)</sup></b>	<b>CT (n = 27)<sup>(2)</sup></b>	<b>TT (n = 9)<sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,012* <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n = 68)</b>	8,6 (2,18)	8,2 (2,10)	7,1 (2,05)	0,484 <sup>(b)</sup>
				0,004* <sup>(c)</sup>
				0,015* <sup>(d)</sup>

\* Diferença significativa pela Correção de Bonferroni, valor de  $p < 0,02$ . (1) Grupo 1 - Genótipo CC; (2) Grupo 2 - Genótipo CT; (3) Grupo 3 - Genótipo TT. (a) Teste de Kruskal Wallis para os grupos 1, 2 e 3, seguido do teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 2(b); Mann-Whitney para os grupos 1 e 3 e Mann-Whitney para os grupos 2 e 3(d). n = número de participantes.

**Tabela 14** – Níveis de TAFI (em  $\mu\text{g/mL}$ ) para o polimorfismo Ala147Thr entre os grupos estratificados por sexo

<b>Sexo Feminino</b>				
	<b>GG (n = 27) <sup>(1)</sup></b>	<b>GA (n = 26) <sup>(2)</sup></b>	<b>AA (n = 8) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,431 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n = 61)</b>	6,7 (1,70)	7,11 (2,21)	7,25 (1,63)	0,298 <sup>(b)</sup>
				0,269 <sup>(c)</sup>
				0,858 <sup>(d)</sup>
	<b>GG (n = 20) <sup>(1)</sup></b>	<b>GA (n = 19) <sup>(2)</sup></b>	<b>AA (n = 2) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,005* <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n = 41)</b>	8,50 (2,0)	10,10 (1,70)	8,7 (0,40)	0,001* <sup>(b)</sup>
				0,701 <sup>(c)</sup>
				0,190 <sup>(d)</sup>
<b>Sexo Masculino</b>				
	<b>GG (n = 11) <sup>(1)</sup></b>	<b>GA (n = 25) <sup>(2)</sup></b>	<b>AA (n = 8) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,041 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n = 44)</b>	7,2 (1,10)	7,50 (1,84)	9,35 (2,17)	0,292 <sup>(b)</sup>
				0,012* <sup>(c)</sup>
				0,055 <sup>(d)</sup>
	<b>GG (n = 36) <sup>(1)</sup></b>	<b>GA (n = 27) <sup>(2)</sup></b>	<b>AA (n = 5) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,001* <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n = 68)</b>	7,75 (1,13)	9,00 (2,80)	9,5 (4,05)	0,001* <sup>(b)</sup>
				0,036 <sup>(c)</sup>
				0,897 <sup>(d)</sup>

\* Diferença significativa pela Correção de Bonferroni, valor de  $p < 0,02$ . (1) Grupo 1 - Genótipo CC; (2) Grupo 2 - Genótipo CT; (3) Grupo 3 - Genótipo TT. (a) Teste de Kruskal Wallis para os grupos 1, 2 e 3, seguido de um teste de comparação múltipla (Mann-Whitney) para os grupos 1 e 2(b); Mann-Whitney para os grupos 1 e 3 e Mann-Whitney para os grupos 2 e 3(d). n = número de participantes.

**Tabela 15** – Níveis de TAFI (em  $\mu\text{g/mL}$ ) para o polimorfismo +1542C/G entre os grupos estratificados por sexo

<b>Sexo Feminino</b>				
	<b>GG (n = 31) <sup>(1)</sup></b>	<b>GC (n = 26) <sup>(2)</sup></b>	<b>CC (n = 2) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,287 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n = 59)</b>	7,30 (2,18)	7,01 (1,57)	5,50 (2,80)	0,414 <sup>(b)</sup>
				0,186 <sup>(c)</sup>
				0,259 <sup>(d)</sup>
	<b>GG (n = 20) <sup>(1)</sup></b>	<b>GC (n = 18) <sup>(2)</sup></b>	<b>CC (n = 3) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,211 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n = 41)</b>	9,85 (2,13)	9,05 (1,85)	8,30 (1,30)	0,426 <sup>(b)</sup>
				0,115 <sup>(c)</sup>
				0,185 <sup>(d)</sup>
<b>Sexo Masculino</b>				
	<b>GG (n = 24) <sup>(1)</sup></b>	<b>GC (n = 18) <sup>(2)</sup></b>	<b>CC (n = 2) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,134 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n = 44)</b>	8,00 (2,22)	7,45 (1,75)	6,16 (2,41)	0,204 <sup>(b)</sup>
				0,123 <sup>(c)</sup>
				0,211 <sup>(d)</sup>
	<b>GG (n = 35) <sup>(1)</sup></b>	<b>GC (n = 25) <sup>(2)</sup></b>	<b>CC (n = 7) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,015* <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n = 67)</b>	8,6 (2,3)	8,3 (1,95)	7,1 (2,10)	0,481 <sup>(b)</sup>
				0,006* <sup>(c)</sup>
				0,011* <sup>(d)</sup>

\* Diferença significativa pela Correção de Bonferroni, valor de  $p < 0,02$ . (1) Grupo 1 - Genótipo CC; (2) Grupo 2 - Genótipo CT; (3) Grupo 3 - Genótipo TT. (a) Teste de Kruskal Wallis para os grupos 1, 2 e 3, seguido de um teste de comparação múltipla (Mann-Whitney) para os grupos 1 e 2(b); Mann-Whitney para os grupos 1 e 3 e Mann-Whitney para os grupos 2 e 3(d). n = número de participantes.

As medianas de TAFI, para o polimorfismo Thr325Ile, foram menores no genótipo TT. Quando os grupos são estratificados por sexo, esse perfil se manteve, sendo que os níveis de TAFI para o genótipo TT são menores nas mulheres, quando se reúne todas as participantes do estudo.

Para o polimorfismo Ala147Thr, as medianas dos níveis de TAFI foram menores na presença do genótipo GG, e estes são menores nas mulheres.

Em relação ao polimorfismo +1542C/G, observa-se que estes níveis são menores para o genótipo CC, e esta diminuição é maior no grupo dos homens dislipidêmicos.

### 5.3 Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1

#### 5.3.1 Determinações plasmáticas

Os resultados obtidos para os níveis plasmáticos de PAI-1 estão apresentados na **Tabela 16**.

**Tabela 16** – Níveis de PAI-1 plasmáticos entre os grupos estudados

Variável	Dislipidêmicos (n=109)	Normolipêmicos (n=105)	p
PAI-1	57,8 (42,5)	50,8 (39,7)	ns

Valores expressos como mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. ns = não significativo. Unidade PAI-1 – ng/mL.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação aos níveis plasmáticos de PAI-1.

Esses resultados também são apresentados, na **Tabela 17**, dividindo-se os grupos por sexo e também não foram observadas diferenças significativas para as medianas de PAI-1 quando comparados os grupos de dislipidêmicos e normolipêmicos.

**Tabela 17** – Níveis de PAI-1 plasmáticos entre os grupos estudados separados por sexo

Variável	Masculino		p	Feminino		p
	Dislipidêmicos (n = 68)	Normolipêmicos (n = 44)		Dislipidêmicos (n = 41)	Normolipêmicoss (n = 61)	
PAI-1	61,50 (42)	51,10 (32,8)	ns	45,50 (46,5)	50,80 (42,9)	ns

Valores expressos como mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. ns = não significativo. Unidade PAI-1 – ng/mL.

A **Tabela 18** apresenta as correlações dos níveis plasmáticos de PAI-1 e com os parâmetros bioquímicos e os fatores de risco quando somados os dois grupos dislipidêmicos e normolipêmicos

**Tabela 18** – Correlação entre os níveis de PAI-1, parâmetros bioquímicos e fatores de risco cardiovascular

Variável	PAI-1	p
Sexo	r = 0,077	ns
Idade	r = - 0,011	ns
IMC	r = 0,402	<0,001
Colesterol Total	r = 0,069	ns
TG	r = 0,262	<0,001
HDL	r = - 0,199	0,003
PCR	r = 0,251	<0,001
VLDL	r = 0,242	<0,001
LDL-C	r = 0,023	ns
Lpa	r = - 0,057	ns
Fração não HDL	r = 0,131	ns
Sedentarismo	r = 0,227	0,001
Tabagismo	r = 0,085	ns
Etilismo	r = 0,140	0,040
Hipertensão	r = 0,127	ns
Contraceptivos <sup>(a)</sup>	r = - 0,058	ns
Menopausa <sup>(a)</sup>	r = - 0,080	ns
Reposição hormonal <sup>(a)</sup>	r = - 0,126	ns

(a) Apenas para o grupo de mulheres. ns = não significativo. N° de participantes = 214.

Os níveis de PAI-1 foram significativamente correlacionados com as variáveis IMC, TG, HDL, VLDL, PCR e para os fatores de risco sedentarismo e etilismo.

Como as correlações de PAI-1 não foram significativas para a variável sexo, as tabelas dividindo-se os grupos por sexo não serão apresentadas. No entanto, estas variáveis foram comparadas no grupo do sexo feminino, a fim de identificar se o uso de contraceptivos orais, reposição hormonal ou a menopausa poderiam interferir na mediana destes parâmetros. Os dados são apresentados na **Tabela 19**.

**Tabela 19** – Mediana dos valores de PAI-1 entre as usuárias de contraceptivos orais, reposição hormonal ou na menopausa

<b>Contraceptivos Orais</b>			
<b>Variável</b>	<b>Usuária (n = 8)</b>	<b>Não usuária (n = 94)</b>	<b>p</b>
PAI-1 (ng/mL)	43,90 (24,80)	49,20 (43,85)	ns
<b>Menopausa</b>			
	<b>Presente (n = 36)</b>	<b>Ausente (n = 66)</b>	<b>p</b>
PAI-1 (ng/mL)	47,20 (45,03)	51,90 (41,15)	ns
<b>Terapia de Reposição Hormonal</b>			
	<b>Usuária (n = 10)</b>	<b>Não usuária (n = 92)</b>	<b>p</b>
PAI-1 (ng/mL)	46,60 (26,80)	51,05 (44,65)	ns

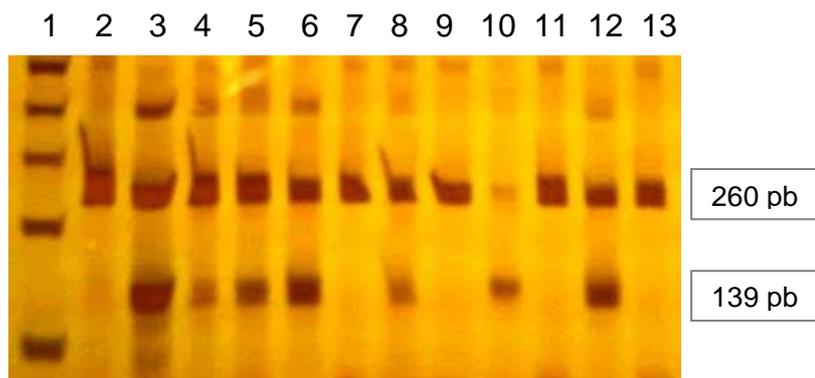
ns: não significativo. n= número de mulheres. Nº total de mulheres = 102.

Os níveis de PAI-1 não sofreram alteração mesmo com o uso de contraceptivo/reposição hormonal ou climatério.

### 5.3.2 Polimorfismo do gene *PAI-1*

#### 5.3.2.1 Distribuição das frequências dos alelos e genótipos do gene *PAI-1*

A **Figura 14** apresenta os resultados obtidos por eletroforese dos fragmentos gerados após PCR para a identificação genotípica do polimorfismo 4G/5G.



**Figura 14** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corada por nitrato de prata obtido após reação de PCR alelo-específica, para o polimorfismo 4G/5G. A cada duas canaletas tem-se o resultado de um paciente. Canaleta 1 - padrão de peso molecular (1Kb); canaletas 2 e 3 – indivíduo homozigoto 5G5G; canaletas 4 e 5 – indivíduo heterozigoto 4G5G; canaletas 6 e 7, 8 e 9, 10 e 11, 12 e 13 – indivíduos homozigotos 4G4G.

A **Tabela 20** apresenta os dados referentes aos resultados obtidos para as frequências genóticas e alélicas para o polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1* para os grupos normolipêmico e dislipidêmico e de acordo com o sexo.

**Tabela 20** – Frequência do polimorfismo 4G/5G entre os grupos e estratificada por sexo

		Dislipidêmicos (n = 108)		Normolipêmicos (n = 103)			
Genótipos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
4G4G	22	20,40	24	23,30	0,628	0,825	0,352 - 1,932
4G5G	56	51,90	52	50,50	0,924	0,969	0,485 - 1,937
5G5G	30	27,80	27	26,20	Referência	-	-
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
4G	100	46,30	100	48,54	0,644	0,914	0,612 - 1,364
5G	106	53,70	116	51,46			

		Sexo Feminino Dislipidêmicas (n = 41)		Sexo Feminino Normolipêmicas (n = 61)			
Genótipos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
4G4G	10	24,40	14	23,00	0,571	0,659	0,182 - 2,361
4G5G	18	43,90	35	57,40	0,145	0,475	0,161 - 1,391
5G5G	13	31,70	12	19,70	Referência	-	-
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
4G	38	46,34	63	51,64	0,478	0,809	0,444 - 1,473
5G	44	53,66	59	48,36			

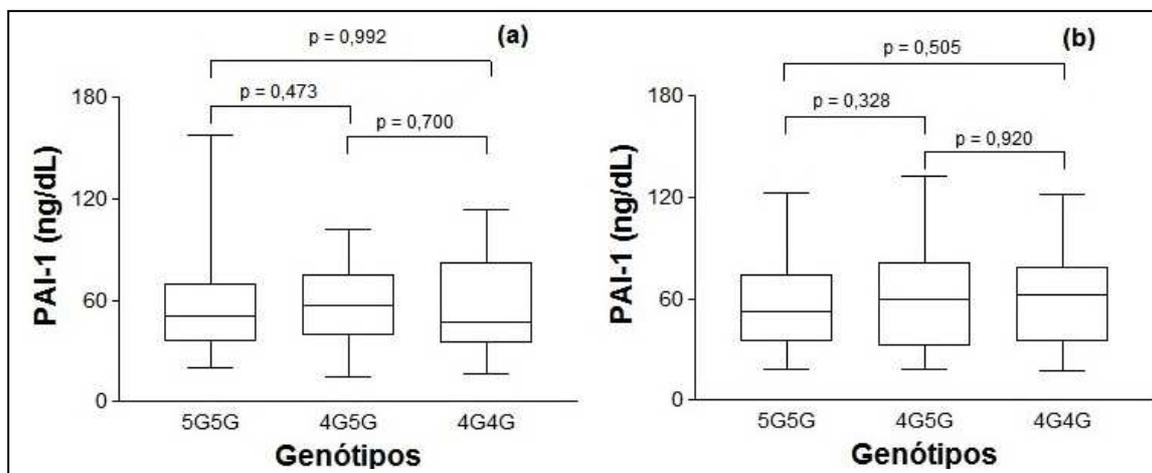
		Sexo Masculino Dislipidêmicos (n = 67)		Sexo Masculino Normolipêmicos (n = 42)			
Genótipos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
4G4G	12	17,90	10	23,80	1,000	1,059	0,310 - 3,625
4G5G	38	56,70	17	40,50	0,169	1,972	0,731 - 5,356
5G5G	17	25,40	15	35,70	Referência	-	-
Alelos	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	p	OR	IC
4G	62	46,27	37	44,05	0,781	1,094	0,609 - 1,956
5G	72	53,73	47	55,95			

Para o polimorfismo 4G/5G não foi possível a amplificação de uma amostra do grupo dislipidêmico e duas amostras do grupo normolipêmico.

Não foi observada diferença significativa para as frequências alélica e genotípica para o polimorfismo 4G/5G entre os grupos estudados e este resultado se manteve quando os grupos foram separados por sexo.

### 5.3.2.2 Efeito do polimorfismo do gene *PAI-1* em seus níveis plasmáticos

A **Figura 15** apresenta a comparação entre as medianas dos níveis plasmáticos de PAI-1 para cada genótipo dos polimorfismos 4G/5G, para o grupo controle e grupo dislipidêmico.



**Figura 15** – Níveis de PAI-1 (em ng/mL) para o polimorfismo 4G/5G. (a) Grupo controle; (b) Grupo dislipidêmico.

Os níveis de PAI-1 também são apresentados na **Tabela 21** para o polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1*, para o sexo masculino e sexo feminino.

**Tabela 21** – Níveis de PAI-1(em ng/mL) para o polimorfismo 4G/5G entre os grupos estratificados por sexo

<b>Sexo Feminino</b>				
	<b>5G5G (n = 12) <sup>(1)</sup></b>	<b>4G5G (n = 35) <sup>(2)</sup></b>	<b>4G4G (n = 14) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,642 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n= 61)</b>	49,35 (52,65)	63,30 (37,30)	46,60 (35,45)	0,922 <sup>(b)</sup>
				0,560 <sup>(c)</sup>
				0,347 <sup>(d)</sup>
	<b>5G5G (n = 13) <sup>(1)</sup></b>	<b>4G5G (n = 18) <sup>(2)</sup></b>	<b>4G4G (n = 10) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,395 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n= 41)</b>	36,30 (36,45)	51,00 (48,28)	53,85 (54,78)	0,146 <sup>(b)</sup>
				0,693 <sup>(c)</sup>
				0,689 <sup>(d)</sup>
<b>Sexo Masculino</b>				
	<b>5G5G (n = 15) <sup>(1)</sup></b>	<b>4G5G (n = 17) <sup>(2)</sup></b>	<b>4G4G (n = 10) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,691 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Controle (n= 42)</b>	53,30 (23,00)	55,70 (26,45)	59,35 (49,18)	0,628 <sup>(b)</sup>
				0,461 <sup>(c)</sup>
				0,604 <sup>(d)</sup>
	<b>5G5G (n = 17) <sup>(1)</sup></b>	<b>4G5G (n = 38) <sup>(2)</sup></b>	<b>4G4G (n = 12) <sup>(3)</sup></b>	<b>p</b>
				0,847 <sup>(a)</sup>
<b>Grupo Dislipidêmico (n= 67)</b>	58,20 (36,85)	65,35 (55,93)	67,85 (53,50)	0,716 <sup>(b)</sup>
				0,744 <sup>(c)</sup>
				0,601 <sup>(d)</sup>

\* Diferença significativa pela Correção de Bonferroni, valor de  $p < 0,02$ . (1) Grupo 1 - Genótipo GG; (2) Grupo 2 - Genótipo GA; (3) Grupo 3 - Genótipo AA. (a) Teste de Kruskal Wallis para os grupos 1, 2 e 3. (b) Teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 2. (c) Teste de Mann-Whitney para os grupos 1 e 3. (d) Teste de Mann-Whitney para os grupos 2 e 3. n = número de participantes.

Não foi observada diferença significativa entre as medianas de PAI-1 em relação à presença do polimorfismo 4G/5G. Quando os grupos são estratificados por sexo, esse perfil se manteve.

## 5.4 Análise Multivariada

A análise multivariada de regressão logística foi realizada a partir de uma análise univariada, na qual foram selecionadas as variáveis independentes (todos os parâmetros avaliados neste estudo) que apresentaram um valor de  $p < 0,2$  na associação com a variável dependente (presença de dislipidemia). O modelo final está descrito na **Tabela 22**. Este modelo mostrou-se adequado segundo o teste de Hosmen and Lemeshow ( $p = 0,874$ ).

**Tabela 22** – Modelo final da análise multivariada de regressão logística

Variável Analisada	p	OR	IC
Genótipo AA (polimorfismo Ala147Thr)	<0,001	0,080	0,021 - 0,305
Genótipo GA (polimorfismo Ala147Thr)	<0,001	0,241	0,112 - 0,517
Sexo	<0,001	2,704	1,346 - 5,434
IMC	<0,001	3,953	1,953 - 8,004
TAFI ( $\mu\text{g/mL}$ )	<0,001	2,454	1,845 - 3,264

As variáveis que se mostraram independentemente associadas com a dislipidemia são a presença dos genótipos GA e GG (este último sendo o referencial do teste) do polimorfismo Ala147Thr do gene *TAFI*, os níveis plasmáticos de TAFI, o sexo masculino e o IMC, quando os grupos são analisados em conjunto.

Após separar os grupos por sexo masculino e feminino, a análise foi realizada na mesma maneira e o seguinte modelo final foi obtido, descrito nas **Tabelas 23 e 24**, respectivamente para o sexo feminino e masculino. Estes modelos finais também seguiram a adequação segundo o teste de Hosmen and Lemeshow ( $p = 0,420$  para o sexo feminino e  $p = 0,283$  para o sexo masculino).

**Tabela 23** – Modelo final da análise multivariada de regressão logística para o sexo feminino

Variável Analisada	P	OR (B)	IC
TAFI (µg/mL)	<0,001	3,380	2,101 - 5,438

**Tabela 24** – Modelo final da análise multivariada de regressão logística para o sexo masculino

Variável Analisada	p	OR (B)	IC
Genótipo AA (polimorfismo Ala147Thr)	<0,001	0,033	0,005 - 0,201
Genótipo GA (polimorfismo Ala147Thr)	0,002	0,169	0,056 - 0,510
Genótipo 4G5G (polimorfismo 4G/5G)	0,012	4,727	1,417 - 15,768
IMC	0,001	6,162	2,160 - 17,579
TAFI (µg/mL)	<0,001	2,301	1,500 - 3,529

Para o sexo feminino os níveis plasmáticos de TAFI estão independentemente relacionados com a ocorrência de dislipidemia. Já para o sexo masculino, os níveis plasmáticos de TAFI, a presença dos genótipos GA e GG do polimorfismo Ala147Thr do gene TAFI, dos genótipos 4G5G do polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1*, e IMC estão independentemente relacionados com a ocorrência da doença.

## **6 DISCUSSÃO**

## 6.1 Caracterização dos grupos para o perfil lipídico e fatores de risco cardiovascular

O presente estudo avaliou um grupo caso constituído por indivíduos dislipidêmicos e um grupo controle composto por normolipêmicos. Ao caracterizar a população deste estudo, foi observado um maior número de indivíduos hipertensos e com maior IMC (especificamente com sobrepeso -  $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$  – WHO, 2000) no grupo dislipidêmico, sendo estas características intimamente associadas, juntamente com a dislipidemia, ao maior risco de DCV (Araújo *et al.*, 2005; Jardim *et al.*, 2007; Talayero & Sacks, 2011).

Em função dos rígidos critérios de seleção, principalmente com exclusão de indivíduos sob uso de hipolipemiantes, não foi possível um pareamento por sexo entre os dois grupos estudados, sendo incluídos todos os indivíduos que seguiram os critérios propostos. Desta forma, as mesmas análises de caracterização da população foram apresentadas segundo a estratificação por sexo.

Um maior número de indivíduos com sobrepeso e hipertensão foi observado entre os indivíduos dislipidêmicos nos dois sexos. No entanto, o grupo de mulheres dislipidêmicas apresentou idade ligeiramente superior ao grupo controle, o que justificou o encontro de maior número de mulheres após a menopausa no grupo caso. Sabe-se que no climatério, devido à privação dos estrógenos, os níveis de CT estão aumentados, as partículas de LDL-C tornam-se mais densas e os níveis de HDL-C tendem a diminuir (Bittner, 2002), elevando o risco de DCV. Desta forma, a menopausa seria um fator de risco independente para o desenvolvimento de dislipidemias (Maturana *et al.*, 2007), o que justificaria os resultados encontrados.

No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação ao número de mulheres em uso de TRH e contraceptivos orais, sendo pequeno o número de usuárias, principalmente em relação ao último parâmetro. Portanto, não foi possível avaliar o envolvimento destes fármacos com a dislipidemia. No entanto, é importante ressaltar que a

TRH tem um papel importante no metabolismo dos lípides sanguíneos, sendo que a reposição com estrógenos e progesteronas tem uma influência favorável no perfil lipídico, com a diminuição dos níveis de CT e LDL-C e aumento dos níveis de HDL, tornando o perfil lipídico menos aterogênico, porém é observado o aumento nos níveis de TG (Kuller, 2003; Callejon *et al.*, 2009). Para o uso de contraceptivos, o seu efeito é variável em relação ao medicamento administrado, mas observa-se um aumento de CT, VLDL-C e LDL-C, com uma redução de HDL-C, elevando o risco cardiovascular (Bittner, 2002).

Com relação aos níveis lipídicos, estes se encontraram elevados no grupo dos dislipidêmicos, como já era esperado pelo delineamento experimental e critérios de inclusão estabelecidos (SBC, 2007). Essa diferença se manteve quando os grupos foram estratificados por sexo. Bittner *et al.* (2005), ao avaliar os níveis de lípides nas mulheres durante diferentes períodos da vida, observaram que os níveis de HDL-C das mulheres são cerca de 10mg/dL maiores que os dos homens. Já os níveis de LDL-C e colesterol não-HDL, que se apresentam menores nas mulheres jovens e de média idade, em comparação aos homens da mesma faixa etária, aumentavam no período da menopausa. O aumento dos níveis de LDL-C nas mulheres ao longo da vida é menor que o aumento observado nos homens. Os níveis de Lp(a) também aumentam com a idade nas mulheres, mas permanecem constantes nos homens (Bittner *et al.*, 2005).

Para os níveis de PCR, marcador de inflamação e risco cardiovascular, não foi encontrado diferença significativa entre os grupos estudados, sendo que a mediana desses níveis apresentou-se dentro do valor de referência considerado de risco moderado (entre 1,0 e 3,0 mg/L) em todos os grupos. Ridker *et al.* (2002), ao avaliar 27.939 mulheres participantes do Women's Health Study, com média de idade de 54,7 anos, observou que os níveis de PCR podem estar aumentados mesmo em pacientes com níveis normais de CT e LDL-C (Ridker *et al.*, 2002; Silva & Pais de Lacerda, 2013), não tendo, portanto, associação independente com a dislipidemia.

Também não foram encontradas, no presente estudo, diferenças nos níveis de Lp(a) entre os grupos estudados, não sendo esta lipoproteína capaz

de distinguir os indivíduos dislipidêmicos dos normolipêmicos. A Lp (a) tem sido considerada como fator de risco cardiovascular para desordens ateroscleróticas e trombóticas quando em concentrações elevadas (Boffa *et al.*, 2004), sendo que esta associação pode ser mais acentuada entre indivíduos com concentração elevada de LDL-C (Suk *et al.*, 2006; Nordestgaard *et al.*, 2010). Os resultados encontrados no presente trabalho são similares aos achados por Zlatohlávek *et al.* (2008), ao avaliarem 3.915 indivíduos portadores de dislipidemias e com presença de outros fatores de risco cardiovascular, e por Holanda *et al.* (2004) em indivíduos com e sem diabetes melitus tipo 2 que sofreram ataque cardíaco, os quais não encontraram correlação significativa entre os níveis de Lp (a) e lípides séricos. Porém, Lima *et al.* (2006b), ao avaliarem pacientes com DAC, consideraram a Lp (a) como sendo um marcador capaz de distinguir pacientes portadores de ateromatose grave, identificada por angiografia coronariana, de não portadores, mas este distúrbio não foi avaliado em nosso estudo (Lima *et al.*, 2006b).

## **6.2 Inibidor da Fibrinólise ativado pela trombina**

### **6.2.1 Determinações plasmáticas**

Conforme demonstrado nas **Tabelas 5 e 6**, a mediana dos níveis de TAFI foi maior no grupo dos dislipidêmicos em relação ao grupo controle, embora todas as medianas de TAFI estivessem dentro dos valores de referência recomendados. É possível que a lesão do endotélio desencadeada pela dislipidemia aumente a produção e ativação de trombina e, conseqüentemente, aumente os níveis de TAFI (Pucetti *et al.*, 2002). Recentemente, o TAFI tem sido implicado em processos anti-inflamatórios através da remoção do C terminal de argininas de mediadores inflamatórios (Colucci, 2012; Hugenholtz, 2013). Assim, sugere-se que o aumento da liberação de TAFI observado no grupo dislipidêmico possa ocorrer como resultado do aumento da geração de trombina e atue regulando negativamente a inflamação crônica normalmente encontrada nesses indivíduos.

Alguns trabalhos já demonstraram níveis elevados de TAFI em pacientes com hiperlipidemia, em especial com hipercolesterolemia (Pucetti *et al.*, 2002;

Malyszko *et al.*, 2003; Aso *et al.*, 2005; Gonzáles *et al.*, 2010). Puccetti *et al.*, 2002, em um estudo com pacientes dislipidêmicos, demonstraram que há uma maior atividade de TAFI neste grupo de pacientes, quando comparado com os controles normolipêmicos (Puccetti *et al.*, 2002). Aso *et al.*, (2005) reportaram uma correlação positiva de níveis de TAFI e LDL-C, sendo esta lipoproteína independentemente responsável pela variação de 46% dos níveis plasmáticos de TAFI em pacientes com diabetes melitus tipo 2, embora o mecanismo responsável por essa variância seja desconhecido (Aso *et al.*, 2005).

Santamaría *et al.* (2004) demonstraram que maiores níveis de TAFI estão presentes em mulheres com hipercolesterolemia e Juhan Vague *et al.* (2000), ao avaliar indivíduos em prevenção primária para DVC, observaram que maiores níveis de TAFI são encontrados em mulheres com idade superior a 30 anos. Como a mediana de idade nos dois grupos de mulheres do presente estudo foi superior a 30 anos, acredita-se que este efeito não tenha impactado nos resultados encontrados.

Os níveis de TAFI do presente estudo foram correlacionados, embora fracamente, com as variáveis: idade, IMC, CT, TG, VLDL, LDL-C, fração não-HDL e o fator de risco hipertensão. A correlação de TAFI e HDL-C foi inversa. Estes dados sugerem que maiores níveis de TAFI estão associados com perfil lipídico desfavorável, e que, juntamente com o fator de risco hipertensão e obesidade, poderão aumentar o risco de doenças cardiovasculares. Outros estudos também encontraram correlações semelhantes, como em Tregouet *et al.* (2009), no qual os níveis de TAFI foram correlacionados com as variáveis: idade, sexo feminino, IMC, CT, TG, PCR, tabagismo e hipertensão, sendo inversamente correlacionado com HDL-C. Meltzer *et al.*, (2009) ao avaliarem homens com o primeiro episódio de infarto do miocárdio, encontraram correlação positiva dos níveis de TAFI com TG e PCR. O presente trabalho não encontrou correlação de TAFI com PCR, provavelmente pelo fato de tanto o grupo de dislipidêmicos como o de normolipêmicos tenham apresentado valores de PCR dentro dos valores de referência, ou seja, abaixo dos níveis considerados de risco para doença coronariana.

Juhan Vague *et al.* (2000) também encontraram maiores níveis de TAFI relacionados com a idade, sendo estes maiores nas mulheres acima de 58 anos, e correlações positivas entre níveis de antígeno TAFI com IMC, pressão sanguínea sistólica e diastólica e entre a razão da circunferência cintura-quadril nos homens. Nas mulheres, os níveis de TAFI foram correlacionados com o IMC, a pressão sistólica, perfil lipídico e com a medida da espessura média da camada íntima da artéria (Juhan Vague *et al.*, 2000). Kural *et al.* (2010) encontraram, em seu estudo com paciente com síndrome metabólica, que os níveis de TAFI foram significativamente maiores nestes pacientes, quando comparado com o grupo controle, e que estes níveis foram positivamente correlacionados com valores plasmáticos de TG, sendo que um aumento nos valores de TG é um valor determinante para o aumento dos níveis de TAFI.

É interessante ressaltar que alguns trabalhos demonstraram o benefício do tratamento com estatinas não apenas na redução dos níveis lipídicos, mas também na redução dos níveis de TAFI circulantes, promovendo aumento da função fibrinolítica e redução do risco cardiovascular. Esta redução pode ser devido a um efeito não lipídico das estatinas (Bruni *et al.*, 2004; Guven *et al.*, 2006).

Foram encontrados, no presente estudo, maiores níveis de TAFI para as mulheres dislipidêmicas e no período da menopausa, além da correlação positiva com este último parâmetro. Embora nenhum trabalho tenha sido encontrado na literatura comparando diretamente estas duas variáveis, essa diferença pode estar relacionada com o papel do estrogênio no controle dos níveis de TAFI circulantes (Juhan Vague *et al.*, 2000).

As medianas de TAFI encontradas para as mulheres que faziam uso de TRH não diferiram daquelas que não estavam em uso de hormônios, bem como não foi encontrada correlação significativa dos níveis de TAFI e a TRH. Estes resultados estão de acordo com Cosman *et al.* (2005), que também não encontraram efeito significativo nos níveis de TAFI em mulheres em uso de TRH com estrogênio, tamoxifeno e raloxifeno. Porém, Post *et al.* (2002) e Juhan-Vague *et al.* (2000) encontraram uma diminuição dos níveis de TAFI em mulheres em uso de THR, quando comparado àquelas sem o uso do hormônio,

comprovando a interferência dos hormônios sexuais nos níveis de TAFI (Juhan-Vague *et al.*, 2000; Post *et al.*, 2002).

Para o uso de contraceptivos orais, as medianas de TAFI foram menores em mulheres que faziam uso destes medicamentos, no qual o TAFI foi correlacionado negativamente com o uso. Este resultado difere do encontrado na literatura. Meijers *et al.* (2000) demonstraram um pequeno aumento dos níveis de TAFI em mulheres em uso de contraceptivos orais, sendo esse aumento maior com o uso de contraceptivos contendo desogestrel em comparação com levonorgestrel. Embora o tipo de contraceptivo não tenha sido investigado no presente estudo, acredita-se que os resultados obtidos podem ser explicados por um mecanismo compensatório, uma vez que o estudo citado anteriormente demonstrou uma maior atividade fibrinolítica em pacientes em uso destas medicações em função do aumento de t-PA, plasminogênio e Dímero-D, já que o uso dos contraceptivos analisados provoca aumento de trombina, com conseqüente maior ativação de TAFI plasmático (Meijers *et al.*, 2000).

## **6.2.2 Polimorfismos do gene *TAFI***

### **6.2.2.1 Distribuição das frequências dos alelos e genótipos do gene *TAFI* e seus haplótipos**

O presente trabalho avaliou três polimorfismos no gene *TAFI*: Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G. Polimorfismos do gene *TAFI* não foram avaliados ainda em outros trabalhos com uma população semelhante à avaliada neste estudo. Foram investigados estes polimorfismos em indivíduos com DAC (Tregouet *et al.*, 2009), acidente vascular cerebral (AVC) (Landervall *et al.*, 2007), angina de peito (Brouwers *et al.*, 2003), IAM (Tàssies *et al.*, 2009) e trombose venosa profunda (TVP) (Martini *et al.*, 2006), condições clínicas em que a dislipidemia é um fator importante. Os únicos relatos de estudos com polimorfismos do gene *TAFI* no Brasil são reportados por Franco *et al.* (2001), em pacientes com TVP, e por Brandes *et al.* (2012), em mulheres com endometriose.

A frequência alélica para o polimorfismo Thr325Ile não foi diferente entre os grupos de dislipidêmicos e normolipêmicos. Quando os grupos foram separados por sexo, para o grupo do sexo feminino não foi encontrada diferença significativa. No entanto, para o grupo masculino, foi identificada uma associação cerca de 8 vezes maior entre o genótipo TT, bem como 2 vezes maior para o alelo T com a dislipidemia (**Tabela 9**). As frequências encontradas são semelhantes às descritas por Tássies *et al.* (2009), que encontraram uma frequência de C/T de 0,70/0,30 para os pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) e IM, e 0,68/0,32 para os controles. Brouwers *et al.* (2003) observaram uma frequência de C/T de 0,71/0,29 para os pacientes com angina de peito instável, e em seu estudo de 2001 (Brouwers *et al.*, 2001) encontraram uma frequência de 0,36 para o alelo T e 0,63 para o alelo C em amostras de doadores de sangue saudáveis. A distribuição de frequências genotípicas encontrada no presente estudo para o polimorfismo Thr325Ile também é semelhante àquela relatada por Morange *et al.* (2005), no estudo PRIME, que avaliaram e acompanharam a ocorrência de eventos cardiovasculares por 5 anos em homens com idade entre 50-59 anos sem história prévia. No estudo ATTAC, em pacientes com o primeiro evento de síndrome isquêmica cardíaca ou cerebral aguda, feito por de Bruijne *et al.* (2009), a frequência do alelo T encontrada foi de 0,29 entre os pacientes. Em pacientes do sexo masculino, com o primeiro episódio de IM, Meltzer *et al.* (2009) encontraram uma maior frequência do genótipo TT entre os casos, comparado com o controle, e uma chance de 1,2 vezes no desenvolvimento de infarto miocárdio em homens portadores deste genótipo.

Para o polimorfismo Ala147Thr, houve maior frequência do genótipo AA e uma tendência à maior frequência do alelo A entre os normolipêmicos. Essa diferença se confirmou apenas para o grupo masculino, quando os grupos foram estratificados por sexo. Tregouet *et al.* (2009), em um grupo de pacientes submetidos à angiografia coronariana, observaram a frequência de 0,68 para o alelo G e 0,32 para o alelo A neste grupo. Já Brouwers *et al.* (2003) encontraram, em pacientes com angina de peito instável, frequências de 0,33 para o alelo A e 0,67 para o alelo G. Tássies *et al.* (2009) em pacientes com

angina instável e IM encontraram frequências de 0,71 e 0,29, respectivamente, para o alelo G e A entre os pacientes.

Ao avaliar o polimorfismo +1542C/G, o presente estudo não encontrou diferenças para as frequências genotípicas e frequências alélicas entre os grupos estudados, mesmo quando estratificados por sexo, no qual estas frequências se mantiveram (**Tabela 10**). A literatura reporta frequências inversas às encontradas neste estudo. Morange *et al*, (2005) encontraram uma frequência de 0,26 para o alelo G na população francesa e na população do norte da Irlanda. Henry *et al*. (2001) reportam frequências de 0,70 para o alelo C e 0,30 para o alelo G. Estas frequências também foram encontradas por Tássies *et al*. (2009) (C/G: 0,72/0,28). Estas diferenças podem ser explicadas por diferenças populacionais ou pelo tipo de metodologia utilizada para genotipagem deste polimorfismo.

Os resultados obtidos, tomados em conjunto, sugerem que o efeito dos polimorfismos Thr325Ile e Ala147Thr sobre a proteína TAFI pode ser regulado por fatores sexo-dependentes e que estão associados à dislipidemia apenas entre indivíduos do sexo masculino. O conhecimento exato deste mecanismo demanda maior investigação de fatores hormonais que possam interagir com as diferentes formas da proteína ou de outros genes expressos no sexo masculino que possam controlar ou que estejam associados ao gene *TAFI*.

Ao analisar as frequências encontradas para os possíveis haplótipos, não foi observada nenhuma diferença significativa com relação à frequência haplotípica, quando comparados os grupos de dislipidêmicos e normolipêmicos. Esses resultados demonstram que os polimorfismos estão associados ao aumento de TAFI na dislipidemia de forma independente. Embora nenhum trabalho tenha investigado este conjunto de polimorfismos num mesmo haplótipo e neste tipo de população, de Bruijne *et al*, (2009) observaram uma tendência à diminuição do risco de trombose arterial nos carreadores do haplótipo G-Ala-Ile e A-Ala-Ile quando investigados os polimorfismos -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile. Já Tregouet *et al*, (2009) demonstraram que o haplótipo CThrA (formado pelos polimorfismos C-2599G,

Thr328Ile e T+1583A) foi associado ao aumento dos níveis de TAFI em pacientes alemães com doença arterial coronariana.

#### **6.2.2.2 Efeito dos polimorfismos do gene *TAFI* em seus níveis plasmáticos**

Para o polimorfismo Thr325Ile, os valores de TAFI plasmático são menores, quando na presença do genótipo TT ao avaliar apenas o grupo dislipidêmico e com a avaliação conjunta do grupo caso e controle, quando comparado aos genótipos TC e CC. Quando os grupos são separados por sexo, observa-se que essa tendência de diminuição de TAFI é mantida para ambos os sexos, sendo mais pronunciada nas mulheres. Os níveis de TAFI, na presença do alelo T, são menores quando comparados aos outros genótipos, como relatados por Martini *et al.* (2006), em pacientes com a primeira TVP, e por Tássies *et al.* (2009), em pacientes com SCA e IM, sendo que os últimos encontraram um valor de TAFI de 9,98 µg/mL para o genótipo TT, contra 10,72 µg/mL para o TC e 11,58 µg/mL para o CC.

As medianas dos níveis de TAFI para o polimorfismo Ala147Thr, quando o genótipo GG está presente, foram menores em relação às outras medianas para os outros genótipos, tanto no grupo dos dislipidêmicos, quanto ao grupo com todos os participantes. Quando os grupos foram separados por sexo, também se observaram menores níveis de TAFI para o genótipo GG nos dislipidêmicos para ambos os sexos, sendo menores nas mulheres. Essa diminuição dos níveis de TAFI no genótipo AA é também relatada por Martini *et al.* (2006) e Tássies *et al.* (2009).

Ao avaliar o polimorfismo +1542C/G, observaram-se menores níveis de TAFI para o genótipo CC entre os grupos dislipidêmicos e o grupo com todos os participantes. Quando os grupos foram divididos por sexo, esse valor se manteve para os dois sexos. Estudos reportam menores níveis de TAFI quando o alelo G está presente (Henry *et al.* 2001; Boffa & Koschinsky, 2007) ao contrário do que foi demonstrado neste estudo. Tássies *et al.* (2009) encontraram valores de TAFI de 9,91 µg/mL para o genótipo GG, 10,70 µg/mL para CG e 11,51 µg/mL para CC. Estes resultados contraditórios podem ocorrer em função de interação com outros polimorfismos que são

característicos em algumas populações específicas e delineamento experimental.

É importante ressaltar que Heylen *et al.* (2011) reportaram em seu trabalho que os diferentes ensaios utilizados para a medição dos níveis de TAFI podem sofrer influência do genótipo 325Ile do polimorfismo Thr325Ile. O conjunto diagnóstico utilizado para a determinação dos níveis de TAFI plasmáticos no presente trabalho possui reatividade dependente de genótipo. Estes autores demonstraram que esta diminuição do TAFI em relação aos outros genótipos chega a 24,4%. No entanto, os mesmos autores, ao analisar diferentes kits comerciais dependentes de genótipo e outros livres da interferência do alelo T do polimorfismo Thr325Ile, demonstraram que a forte correlação inversa entre os níveis de TAFI e o genótipo TT é verdadeira, independentemente do kit utilizado, sendo que os indivíduos com genótipo TT possuem níveis de TAFI cerca de 11,9% menores em relação ao genótipo CC (Heylen *et al.*, 2011).

### **6.3 Inibidor do Ativador do Plasminigênio Tipo 1**

#### **6.3.1 Determinações plasmáticas**

Os dados encontrados referentes aos níveis plasmáticos de PAI-1, quando os grupos foram analisados em conjunto e quando foram separados por sexo, não apresentaram diferença significativa, o que sugere que níveis aumentados de PAI-1 não estão associados à dislipidemia. No entanto, cumpre ressaltar que as medianas encontradas para PAI-1 nos dislipidêmicos do sexo masculino e nos normolipêmicos de ambos os sexos estão acima dos valores de referência recomendados. Juhan Vague *et al.* (2000), ao avaliar indivíduos em prevenção primária para DVC, observaram níveis mais elevados de PAI-1 e acima dos valores de referência nos homens, em comparação com o grupo do sexo feminino.

Puccetti *et al.* (2002), ao avaliarem pacientes dislipidêmicos, encontrou atividade aumentada de PAI-1 no grupo de pacientes com hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, quando comparado com a atividade de PAI-1 nos controles. No entanto, a atividade desta proteína não foi avaliada no presente

estudo, o que dificulta a comparação dos resultados. Já Karásek *et al*, (2011), em seu estudo com dislipidêmicos assintomáticos, encontraram níveis elevados de PAI-1 em indivíduos com altos níveis de TG. de Paula Sabino *et al*, (2011), em pacientes com diagnóstico de AVC isquêmico, demonstraram que os valores de PAI-1 estão aumentados nos pacientes quando comparados aos dos indivíduos do grupo controle. Lima *et al*, (2011), ao avaliarem pacientes com diferentes graus de aterosclerose, observaram que os níveis de PAI-1 estão bastante elevados no grupo de pacientes com aterosclerose grave, em comparação com aqueles que a apresentam na forma moderada e leve ou com o grupo controle. Esta diferença de resultados, quando comparados ao do presente estudo, poderia ser explicada pelo fato de que nenhum indivíduo relatou histórico de AVC e o grau do ateroma não foi avaliado, dificultando a sobreposição dos achados.

Ao avaliar as correlações dos níveis de PAI-1 plasmáticos com as demais variáveis analisadas no presente estudo, apenas foram significativas as correlações entre o PAI-1 e as variáveis IMC, TG, VLDL, PCR e os fatores de risco sedentarismo e etilismo. Os níveis de PAI-1 se correlacionaram negativamente com a concentração de HDL-C. Embora não tendo mostrado associação com a dislipidemia, estas correlações encontradas sugerem ser o PAI-1 um marcador importante para avaliação de risco cardiovascular, principalmente em indivíduos obesos e etilistas. Estes resultados estão de acordo com outras reportadas pela literatura. Juhan Vague *et al*, (2000) encontraram correlações semelhantes entre os níveis de PAI-1 e as variáveis IMC, pressão sistólica e diastólica, HDL-C, TG, consumo de álcool e com a medida da espessura média da camada íntima da artéria (Juhan Vague *et al*, 2000). Karásek *et al*, (2011) reportaram correlações entre os níveis de PAI-1 e TG, HDL-C, fração não-HDL, IMC, pressão sistólica e diastólica.

A comparação das medianas de PAI-1 entre o grupo das mulheres em relação ao uso de anticoncepcional oral, TRH e menopausa, não apresentou diferença significativa. Comparações semelhantes foram descritas por Juhan Vague *et al*, (2000) ao reportarem menores níveis de PAI-1 para mulheres que não estavam recebendo substituição hormonal e por Meijers *et al*, (2000), que encontrou uma redução de 20 a 50% dos níveis de PAI-1 em mulheres em uso

dos contraceptivos levonorgestrel e desogestrel. O fato de poucas mulheres no presente estudo fazerem o uso destes medicamentos, bem como não ter sido avaliado o tipo de princípio ativo, podem explicar a diferença entre os resultados obtidos e aqueles relatados em outros estudos.

### **6.3.2 Polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1***

#### **6.3.2.1 Distribuição das frequências dos alelos e genótipos do gene *PAI-1***

As frequências genóticas e alélicas do polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1* não diferiram nos grupos estudados, tendo uma distribuição quase homogênea dos alelos 4G, com frequência de 0,46 no grupo dislipidêmico, e 5G, que apresentou frequência de 0,54 nos pacientes. Estas frequências são semelhantes às relatadas por Ringelstein *et al*, (2012), que encontrou uma frequência para o alelo 4G de 0,45. Isto sugere que este polimorfismo não está associado à dislipidemia.

#### **6.3.2.2 Efeito do polimorfismo 4G/5G do gene *PAI-1* em seus níveis plasmáticos**

No presente trabalho, o polimorfismo 4G/5G não exerceu efeito significativo nos níveis de PAI-1, já que as medianas de PAI-1 não diferiram significativamente em relação aos três genótipos possíveis, apesar de estas se apresentarem um pouco elevadas na presença do genótipo 4G4G e do alelo 4G, principalmente entre os homens. Estes resultados contradizem os dados relatados em outros estudos, provavelmente em função do limitado grupo amostral, em especial para os indivíduos homocigotos dislipidêmicos. Al-Hamodi *et al*, (2012) descreveram que a atividade e os níveis de PAI-1 estão aumentados na presença do genótipo 4G4G, quando comparado aos genótipos 4G5G e 5G5G. Estes autores relatam ainda que maiores níveis de TG estão relacionados com o genótipo 4G4G. Sabe-se que o alelo 5G contém um sítio de ligação para uma proteína ligante de DNA que atua como repressor da transcrição, diminuindo a ligação de seu ativador da transcrição e levando a maiores níveis e uma maior atividade de PAI-1 para os alelos 4G (Al-Hamodi *et al*, 2012). Além disso, o VLDL-C pode competir com esse fator repressor,

explicando as diferenças na atividade transcricional basal e levando a um aumento dos níveis de PAI-1 (Eriksson *et al.*, 1998).

#### 6.4 Análise Multivariada

A análise multivariada revelou que o sexo é um fator determinante para a classificação dos grupos em normolipêmicos e dislipidêmicos. Para verificar se a ausência do pareamento por sexo entre os grupos poderia levar a este viés ou se, de fato, o sexo é um fator de risco para o distúrbio, as análises foram refeitas classificando-se os indivíduos de acordo com o gênero.

No grupo de mulheres, o único parâmetro que se mostrou independentemente associado à dislipidemia foi o nível aumentado de TAFI. Esta variável também mostrou associação com a doença em indivíduos do sexo masculino, sugerindo ser um fator importante a ser avaliado em pacientes com dislipidemia independentemente do sexo.

No entanto, no sexo masculino, outros fatores merecem destaque. Observou-se que o único polimorfismo do gene *TAFI* associado independentemente à doença é o Ala147Thr, sendo os genótipos AA e GA inversamente associados, quando se consideram os indivíduos GG como referência. Da mesma forma, o aumento do IMC mostrou uma forte associação com a dislipidemia, sendo a obesidade uma manifestação clínica do descontrole no metabolismo lipídico apresentado pelo indivíduo.

Interessante notar que o genótipo 4G5G do gene *PAI-1* também foi associado independentemente ao distúrbio, embora a frequência deste polimorfismo entre os grupos caso/controle não tenha apresentado diferença. Com relação a este ponto, estudos adicionais com um grupo amostral maior devem ser conduzidos a fim de se confirmar esta associação.

O pequeno número de pacientes analisados é uma limitação do presente estudo. No entanto, este é o primeiro relato que indica níveis elevados de TAFI associados à dislipidemia, independentemente de outras doenças. Em particular, este estudo é pioneiro em estudar a associação independente do polimorfismo Ala147Thr com dislipidemia em indivíduos do sexo masculino, o

que indica que este polimorfismo pode ser um marcador de prognóstico para avaliar o risco cardiovascular nesse grupo. Por fim, pesquisas futuras para investigar os níveis de TAFI e a associação de seus polimorfismos com estes níveis são necessárias e mostrarão maior evidência sobre sua importância na dislipidemia.

## **7 CONCLUSÕES**

- A hipertensão, o aumento do índice de massa corporal e a menopausa são mais frequentes em indivíduos dislipidêmicos. O sexo masculino mostrou-se independentemente associado com a doença.
- Indivíduos dislipidêmicos possuem maiores níveis de TAFI, e este está independentemente associado com a dislipidemia em ambos os sexos.
- Os polimorfismos Thr325Ile e Ala147Thr parecem estar associados à alteração nos níveis de TAFI em indivíduos do sexo masculino com dislipidemia.
- O polimorfismo 4G5G mostrou-se associado independentemente à dislipidemia em indivíduos do sexo masculino, no entanto, os níveis de PAI-1 não mostraram relação com esta alteração.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Akanji AO, Al-Shayji I. The relationships between insulin and plasminogen activator inhibitor 1 levels: assessment in groups of subjects with dyslipidaemia and hypertension. *Clin Chim Acta*. 1998 Jun 8;274(1):41-52.

Al-Hamodi ZH, Saif-Ali R, Ismail IS, Ahmed KA, Muniandy S. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with metabolic syndrome parameters in Malaysian subjects. *J Clin Biochem Nutr*. 2012 May;50(3):184-9.

Araújo F, Yamada AT, Araújo MV, Latorre Mdo R, Mansur AJ. Lipidic profile of individuals without cardiopathy with overweight and obesity. *Arq Bras Cardiol*. 2005 May;84(5):405-9.

Aso Y, Wakabayashi S, Yamamoto R, Matsutomo R, Takebayashi K, Inukai T. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes: synergistic effects of plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes Care*. 2005 Sep;28(9):2211-6.

Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1995 Jun 16;270(24):14477-84.

Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem*. 1996 Jul 12;271(28):16603-8.

Bittner V. Lipoprotein abnormalities related to women's health. *Am J Cardiol*. 2002 Oct 17;90(8A):77i-84i.

Bittner V. Perspectives on dyslipidemia and coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 1;46(9):1628-35.

Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AH, Levi M, Büller HR, Peters RJ. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation*. 2001 Dec 18;104(25):3063-8.

Boffa MB, Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) as a risk factor for atherosclerosis and thrombosis: mechanistic insights from animal models. *Clin Biochem*. 2004 May;37(5):333-43.

Boffa MB, Koschinsky ML. Curiouser and curiouser: Recent advances in measurement of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation, and biological roles. *Clin Biochem*. 2007 Apr;40(7):431-42.

Boffa MB, Maret D, Hamill JD, Bastajian N, Crainich P, Jenny NS, Tang Z, Macy EM, Tracy RP, Franco RF, Nesheim ME, Koschinsky ML. Effect of single nucleotide polymorphisms on expression of the gene encoding thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor: a functional analysis. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):183-9.

Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, Meijers JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res*. 2001 Mar 1;101(5):329-54.

Bouma BN, Meijers JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R procarboxypeptidase U). *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1566–74.

Brandes A, Christofolini DM, Cavalheiro CM, Vilarino FL, André GM, Bianco B, Barbosa CP. Genetic variants in fibrinolytic system-related genes in infertile women with and without endometriosis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Jan;16(1):54-7.

Brasil, Ministério da Saúde - Mortes por doenças crônicas caem 17% no Brasil.

Disponível em:

<[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=11994](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11994)>. Acesso em 14 de Abril de 2012.

Brasil, Ministério da Saúde. DATASUS - Indicadores e Dados Básicos - Brasil - 2011. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2011/matriz.htm>> Acesso em: 16 de Fevereiro de 2013.

Brouwers GJ, Vos HL, Leebeek FW, Bulk S, Schneider M, Boffa M, Koschinsky M, van Tilburg NH, Nesheim ME, Bertina RM, Gómez Garcia EB. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1992-3.

Brouwers GJ, Leebeek FW, Tanck MW, Wouter Jukema J, Kluft C, de Maat MP. Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Thromb Haemost*. 2003 Jul;90(1):92-100.

Brown NJ. Therapeutic potential of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010 Oct;4(5):315-24.

Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Di Renzo M, Cercigani M, Leo A, Auteri A, Puccetti L. Effect of atorvastatin on different fibrinolysis mechanisms in hypercholesterolemic subjects. *Int J Cardiol*. 2004 Jun;95(2-3):269-74.

Callejon DR, Rios DR, Franceschini SA, Tolo MR. Transdermal estradiol and lipid profile: effects on a specific group of Brazilian postmenopausal women. *Arq Bras Cardiol*. 2009 Dec;93(6):571-5, 617-22.

Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*. 2010 Oct;28(5):e72-91.

Choy PC, Siow YL, Mymin D, O K. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):212-24.

Colucci M, Semeraro N. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: at the nexus of fibrinolysis and inflammation. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):314-9..

Cosman F, Baz-Hecht M, Cushman M, Vardy MD, Cruz JD, Nieves JW, Zion M, Lindsay R. Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. *Thromb Res.* 2005;116(1):1-13.

de Alcântara Neto OD, Silva Rde C, Assis AM, Pinto Ede J. Factors associated with dyslipidemia in children and adolescents enrolled in public schools of Salvador, Bahia. *Rev Bras Epidemiol.* 2012 Jun;15(2):335-45.9.

de Bruijne EL, Gils A, Guimarães AH, Dippel DW, Deckers JW, van den Meiracker AH, Poldermans D, Rijken DC, Declerck PJ, de Maat MP, Leebeek FW. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in arterial thrombosis at a young age: the ATTAC study. *J Thromb Haemost.* 2009 Jun;7(6):919-27.

de França E, Alves JG. Dyslipidemia among adolescents and children from Pernambuco. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Dec;87(6):722-7.

de Paula Sabino A, Ribeiro DD, Domingueti CP, Dos Santos MS, Gadelha T, Dusse LM, das Graças Carvalho M, Fernandes AP. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in young patients with ischemic stroke. *Mol Biol Rep.* 2011 Nov;38(8):5355-60.

Diaz JA, Ballard-Lipka NE, Farris DM, Hawley AE, Wroblewski SK, Myers DD, Henke PK, Lawrence DA, Wakefield TW. Impaired fibrinolytic system in ApoE gene-deleted mice with hyperlipidemia augments deep vein thrombosis. *J Vasc Surg.* 2012 Mar;55(3):815-22.

Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, Tyson J, Ginsburg D. Hyperlipidemia promotes thrombosis after injury to atherosclerotic vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jul;20(7):1831-4.

Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jan;18(1):20-6.

Fernandes RA, Christofaro DG, Casonatto J, Codogno JS, Rodrigues EQ, Cardoso ML, Kawaguti SS, Zanesco A. Prevalence of dyslipidemia in individuals physically active during childhood, adolescence and adult age. *Arq Bras Cardiol.* 2011 Oct;97(4):317-23.

Ferreira, CN, Sousa MO, Dusse LM, Das Graças Carvalho. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010;32(5);416-421.

Ferreira, CN. Polimorfismos dos genes apolipoproteínas E e A5 e relação com parâmetros bioquímicos e hemostáticos em dislipidêmicos. 2010. 174 f. (Tese em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

Forti N, Diament J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Nov;87(5):671-9.

Franco RF, Fagundes MG, Meijers JC, Reitsma PH, Lourenço D, Morelli V, Maffei FH, Ferrari IC, Piccinato CE, Silva WA Jr, Zago MA. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica.* 2001 May;86(5):510-7.

Franco, RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, 34:229-237, jul./dez. 2001.

Georgieva AM, Cate HT, Keulen ET, van Oerle R, Govers-Riemslog JW, Hamulyák K, van der Kallen CJ, Van Greevenbroek MM, De Bruin TW. Prothrombotic markers in familial combined hyperlipidemia: evidence of endothelial cell activation and relation to metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2004 Aug;175(2):345-51.

Giroldo, MDL, Alves AS, Baptista F. Doença aterosclerótica: uma patologia multi-fatorial. *Rev de Saúde e Biologia* 2007;2(1).

Giuliano Ide C, Coutinho MS, Freitas SF, Pires MM, Zunino JN, Ribeiro RQ. Serum lipids in school kids and adolescents from Florianópolis, SC, Brazil--Healthy Floripa 2040 study. *Arq Bras Cardiol*. 2005 Aug;85(2):85-91

González FJ, Caturla JM, Fernández M, Carrasco R, Marco P, Sánchez J, Benlloch S. Prognosis value of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor concentration and C1040T polymorphism in acute myocardial infarction treated with fibrinolysis. *Med Intensiva*. 2010 Nov;34(8):513-22.

Guyen GS, Atalar E, Yavuz B, Beyazit Y, Kekilli M, Kilicarslan A, Sahiner L, Oz G, Ozer N, Aksoyek S, Haznedaroglu IC, Sozen T. Simvastatin treatment improves endothelial function and increases fibrinolysis in patients with hypercholesterolemia. *J Natl Med Assoc*. 2006 Apr;98(4):627-30.

Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, Juhan-Vague I. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood* 2001;97:2053-8.

Heylen E, Willemse JL, Hendriks DF. Comparative study of commercially available procarboxypeptidase U (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) assays. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9(7):1407-9.

Hoffman M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16(1/2);17-20.

Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007 Feb;21(1):1-11.

Holanda MM, Filizola RG, Costa MJ, Andrade RV, Silva JA. Plasma lipoprotein(A) levels: a comparison between diabetic and non-diabetic patients with acute ischemic stroke. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004 Jun;62(2A):233-6.

Hugenholtz GC, Meijers JC, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T. TAFI deficiency promotes liver damage in murine models of liver failure through defective down-regulation of hepatic inflammation. *Thromb Haemost.* 2013 May 2;109(5):948-55.

Ineu ML, Manenti E, da Costa JL, Moriguchi E. HDL management: recent advances and perspectives beyond LDL reduction. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Dec;87(6):788-94.

Jardim PC, Gondim Mdo R, Monego ET, Moreira HG, Vitorino PV, Souza WK, Scala LC. High blood pressure and some risk factors in a Brazilian capital. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Apr;88(4):452-7.

Juhan-Vague I, Renucci JF, Grimaux M, Morange PE, Gouvernet J, Gourmelin Y, Alessi MC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Sep;20(9):2156-61.

Juhan-Vague I, Morange PE; PRIME Study Group. Very high TAFI antigen levels are associated with a lower risk of hard coronary events: the PRIME Study. *J Thromb Haemost.* 2003 Oct;1(10):2243-4.

Karásek D, Vaverková H, Halenka M, Slavík L, Novotný D. Endothelial haemostatic markers in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Thromb Res.* 2009;123(3):466-75

Karásek D, Vaverkova H, Halenka M, Jackuliakova D, Frysak Z, Slavik L, Novotny D. Prothrombotic markers in asymptomatic dyslipidemic subjects. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Jan;31(1):27-36.

Koch W, Schrenpf M, Erl A, Mueller JC, Hoppmann P, Schömig A, Kastrati A. 4G/5G polymorphism and haplotypes of SERPINE1 in atherosclerotic diseases of coronary arteries. *Thromb Haemost*. 2010 Jun;103(6):1170-80.

Kolankiewicz K, Giovelli FMH, Bellinaso Mde L. Estudo do perfil lipídico e da prevalência de dislipidemias em adultos. *RBAC* 2008;40(4): 317-320.

Kuller LH; Women's Health Initiative. Hormone replacement therapy and risk of cardiovascular disease: implications of the results of the Women's Health Initiative. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jan 1;23(1):11-6.

Kural A., Omma A, Seval H, Koldaş M, Yiğit N, Omma T. The association of TAFI (Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) with insulin resistance and components of metabolic syndrome in patients with metabolic syndrome. *Turk J Med Sci* 2010; Dec;40(6):857-64.

Ladenvall C, Gils A, Jood K, Blomstrand C, Declerck PJ, Jern C. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation peptide shows association with all major subtypes of ischemic stroke and with TAFI gene variation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Apr;27(4):955-62.

Li YY. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism and coronary artery disease in the Chinese Han population: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(4):e33511.

Lima LM, Carvalho Md, de Paula Sabino A, Sousa MO. Lipoprotein(a) and fibrinolysis inhibition in coronary artery disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2006a;28(1):53-99.

Lima LM, Carvalho Md, Loures-Vale AA, Fernandes AP, Mota AP, Neto CP, Garcia JC, Saad JA, Souza Mde O. Increased serum levels of lipoprotein(a) correlated with the severity of coronary artery disease in patients submitted to angiography. *Arq Bras Cardiol.* 2006b Sep;87(3):260-6.

Lima LM, Carvalho Md, Fonseca Neto CP, Garcia JC, Sousa MO. PAI-1 4G/5G polymorphism and plasma levels association in patients with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol.* 2011 Dec;97(6):462-389.

Malyszko J, Malyszko JS, Hryszko T, Mysliwiec M. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in kidney transplant recipient with dyslipidemia. *Transplant Proc.* 2003 Sep;35(6):2219-21.

Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders. *J Cell Mol Med.* 2012;16(9):1978-90.

Mao SS, Cooper CM, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ. Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B: modulation by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1999; 274:35046-35052.

Martinez, TLR. Manual de condutas clínicas em dislipidemias. Rio de Janeiro: Medline, 2003. 392p.

Martinez, TLR. Dislipidemias: da teoria a pratica. São Paulo: Atheneu, 2004. 416p.

Martini CH, Brandts A, de Bruijne EL, van Hylckama Vlieg A, Leebeek FW, Lisman T, Rosendaal FR. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. *Br J Haematol.* 2006 Jul;134(1):92-4.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics (Sao Paulo).* 2007 Feb;62(1):77-86.

Meijers JC, Middeldorp S, Tekelenburg W, van den Ende AE, Tans G, Prins MH, Rosing J, Büller HR, Bouma BN. Increased fibrinolytic activity during use of oral contraceptives is counteracted by an enhanced factor XI-independent down regulation of fibrinolysis: a randomized cross-over study of two low-dose oral contraceptives. *Thromb Haemost*. 2000 Jul;84(1):9-14.

Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR, Lisman T. Low thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activity levels are associated with an increased risk of a first myocardial infarction in men. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):811-8.

Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, le Cessie S, Doggen CJ, Rosendaal FR. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):113-21.

Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P, Cambien F, Tiret L, Juhan-Vague I on behalf of the PRIME study group. TAFI gene haplotypes, TAFI plasma levels and future risk of coronary heart disease: the PRIME Study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1503–10.

Morange PE, Saut N, Alessi MC, Yudkin JS, Margaglione M, Di Minno G, Hamsten A, Humphries SE, Tregouet DA, Juhan-Vague I. Association of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs with myocardial infarction, plasma PAI-1, and metabolic parameters: the HIFMECH study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Oct;27(10):2250-7.

Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Nov;26(11):2445-53

National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001 May 16;285(19):2486-97.

Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. Chest. 2003 Sep;124(3 Suppl):33S-9S

Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, Ginsberg H, Amarencu P, Catapano A, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Tybjærg-Hansen A; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. Eur Heart J. 2010 Dec;31(23):2844-53.

Palomo I, Alarcón M, Moore-Carrasco R, Argilés JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review). Int J Mol Med. 2006 Nov;18(5):969-74.

Passarelli M, Nakandakare ER, Quintão ECR. Dislipidemias. In: Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB, editors. Endocrinologia. São Paulo: Atheneu; 2007. p1031-51.

Post MS, Hendriks DF, Van Der Mooren MJ, Van Baal WM, Leurs JR, Emeis JJ, Kenemans P, Stehouwer CD. Oral oestradiol/trimegestone replacement reduces procarboxypeptidase U (TAFI): a randomized, placebo- controlled, 12-week study in early postmenopausal women. J Intern Med. 2002 Mar;251(3):245-51.

Prado ES, Dantas EH. Effects of aerobic and of strength physical exercises on HDL and LDL lipoproteins and lipoprotein(a). Arq Bras Cardiol. 2002 Oct;79(4):429-33.

Puccetti L, Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Auteri A. Dyslipidemias and fibrinolysis. Ital Heart J. 2002 Oct;3(10):579-86.

Rezende FA, Rosado LE, Ribeiro Rde C, Vidigal Fde C, Vasques AC, Bonard IS, de Carvalho CR. Body mass index and waist circumference: association with cardiovascular risk factors. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Dec;87(6):728-34.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002 Nov 14;347(20):1557-65.

Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009;7(1):4–13.

Ringelstein M, Jung A, Berger K, Stoll M, Madlener K, Klötzsch C, Schlachetzki F, Stolz E. Promotor polymorphisms of plasminogen activator inhibitor-1 and other thrombophilic genotypes in cerebral venous thrombosis: a case-control study in adults. *J Neurol.* 2012 Nov;259(11):2287-92.

Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning – A Laboratory Manual.* 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santamaría A, Oliver A, Borrell M, Mateo J, Belvis R, Martí-Fábregas J, Ortín R, Tirado I, Souto JC, Fontcuberta J. Risk of ischemic stroke associated with functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor plasma levels. *Stroke.* 2003 Oct;34(10):2387-91.

Santamaría A, Borrell M, Oliver A, Ortín R, Forner R, Coll I, Mateo J, Souto JC, Fontcuberta J. Association of functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) with conventional cardiovascular risk factors and its correlation with other hemostatic factors in a Spanish population. *Am J Hematol.* 2004 Aug;76(4):348-52.

Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem.* 2002 Jan 11;277(2):1021-30..

Silva D, Pais de Lacerda A. High-sensitivity C-reactive protein as a biomarker of risk in coronary artery disease. *Rev Port Cardiol.* 2012 Nov;31(11):733-45.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Apr;88 Suppl 1:2-19.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001 Apr;68(4):978-89.

Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003 Nov;73(5):1162-9.

Suk Danik J, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein(a), measured with an assay independent of apolipoprotein(a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA.* 2006 Sep 20;296(11):1363-70.

Talayero BG, Sacks FM, 2011. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 13(6):544-52.

Tàssies D, Roqué M, Monteagudo J, Martorell T, Sionis A, Arzamendi D, Heras M, Reverter JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms as markers of the type of acute coronary syndrome. *Thromb Res.* 2009 Nov;124(5):614-8.

Tregouet DA, Schnabel R, Alessi MC, Godefroy T, Declerck PJ, Nicaud V, Munzel T, Bickel C, Rupprecht HJ, Lubos E, Zeller T, Juhan-Vague I, Blankenberg S, Tiret L, Morange PE; AtheroGene Investigators. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *J Thromb Haemost.* 2009 Jan;7(1):49-57.

Van De Craen B, Declerck PJ, Gils A. The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thromb Res.* 2012 Oct;130(4):576-85.

Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit.* 2001 Sep-Oct;7(5):1075-85.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.

Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(5):470-9.

Zhao L, Morser J, Bajzar L, Nesheim M, Nagashima M. Identification and characterization of two thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor isoforms. *Thromb Haemost.* 1998 Dec;80(6):949-55.

Zlatohlávek L, Zídková K, Vrablík M, Haas T, Prusíková M, Svobodová H, Ceska R. Lipoprotein(a) and its position among other risk factors of atherosclerosis. *Physiol Res.* 2008;57(5):777-83.

**ANEXO 1****Aprovação do comitê de ética – COEP/UFMG**

UFMG

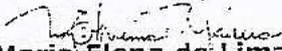
Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 446/04

Interessada: Profa. Dra. Marinez de Oliveira Souza  
Faculdade de Farmácia - UFMG**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 01 de dezembro de 2004, o projeto de pesquisa intitulado « Análise da Frequência de Mutação e Tipificação de Genótipos Clinicamente Relacionados à Hipercolesteromia em Indivíduos em Minas Gerais » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia  
Presidente do COEP/UFMG

**ANEXO 2****Aprovação do comitê de ética – Hospital SOCCOR****SOCOR**  
HOSPITAL GERAL

---

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) - HOSPITAL SOCOR**  
**BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS**

---

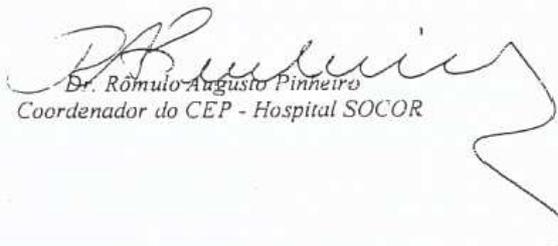
Belo Horizonte, 13 de setembro de 2004.

Prezado Dra. Marinez de Oliveira Sousa  
Pesquisadora Principal

Cordiais saudações.

Comunicamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Socor analisou e aprovou sem restrições, em reunião no dia 13 de setembro, o projeto intitulado "Análise da Frequência de Mutações e Tipificação de Genótipos Clinicamente Relacionados a Hipercolesterolemia em Indivíduos de Minas Gerais.

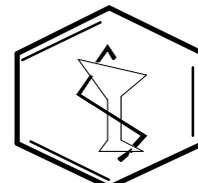
Atenciosamente.



Dr. Rômulo Augusto Pinheiro  
Coordenador do CEP - Hospital SOCOR

**APÊNDICE 1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

**FICHA CLÍNICA**

**Projeto de Pesquisa “AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA E ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO GENÓTIPO DA APOLIPOPROTEÍNA E (Apo E) EM INDIVÍDUOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA NO ESTADO DE MINAS GERAIS”**

**I – IDENTIFICAÇÃO:**

- 1.Nome: \_\_\_\_\_  
 2.Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 3.Endereço: \_\_\_\_\_  
 4.Telefone: \_\_\_\_\_ 5. CEP: \_\_\_\_\_  
 6.Data da entrevista/coleta de sangue: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 7.Jejum: \_\_\_\_\_

**II – DADOS DEMOGRÁFICOS:**

- 1.Sexo: ( ) M ( ) F  
 2.Estado Civil: ( ) solteiro ( ) casado ( ) viúvo ( ) separado ( ) divorciado  
 3.Tabagista: ( ) Não ( ) Sim Quantos cigarros por dia, em média: \_\_\_\_\_  
 4.Ex-tabagista: ( ) Não ( ) Sim Parou a quanto tempo: \_\_\_\_\_  
 5.Etilista: ( ) Não ( ) Sim Qual bebida: \_\_\_\_\_ Quantidade/dia: \_\_\_\_\_  
 6.Ex-etilista: ( ) Não ( ) Sim Parou a quanto tempo: \_\_\_\_\_  
 7.Doenças:  
 ( ) Hipertensão arterial ( ) Insuficiência cardíaca ( ) Arritmia  
 ( ) doença coronariana ( ) Asma, enfisema ( ) Doença renal  
 ( ) Doença hepática ( ) Doença hematológica ( ) Tromboses  
 ( ) Neoplasias ( ) Outras: \_\_\_\_\_

8.Cirurgias prévias: \_\_\_\_\_

9.Atividade física regular? ( ) Não ( ) Sim: Qual modalidade: \_\_\_\_\_  
 Frequência semanal: \_\_\_\_\_ Duração dos exercícios: \_\_\_\_\_

10.Diagnóstico de dislipidemia prévia: ( ) Não ( ) Sim Qual: \_\_\_\_\_ Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_ Medicamento em uso: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_

11 Outros medicamentos em uso e dose: \_\_\_\_\_

12 DUM: \_\_\_\_\_, uso de AOH: \_\_\_\_\_ Menopausa: ( ) Não ( ) Sim - uso de TRH \_\_\_\_\_

**III – HISTÓRIA FAMILIAR:**

- 1.Etnia: ( ) Caucasiano ( ) Mestiço: mulato, pardo ( ) Negro ( ) Índio ( ) Asiático ( ) Outros mestiços: \_\_\_\_\_  
 2.Seu pai tem/tinha alguma doença? ( ) Não ( ) Sim (Qual? \_\_\_\_\_)  
 3.Sua mãe tem/tinha alguma doença? ( ) Não ( ) Sim (Qual? \_\_\_\_\_)  
 4.Algum filho seu tem alguma doença? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não se aplica (Qual? \_\_\_\_\_)  
 5.Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primos, avós, sobrinhos)? ( ) Não ( ) Sim (Qual e membros afetados? \_\_\_\_\_)

**IV- EXAME FÍSICO:**

Peso : \_\_\_\_\_

altura: \_\_\_\_\_

IMC: \_\_\_\_\_

Circunferência abdominal: \_\_\_\_\_

Arco corneano: ( ) Não ( ) Sim

Xantelasmas : ( ) Não ( ) Sim

Xantomas : ( ) Não ( ) Sim - Local: \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

Outras alterações ao exame: \_\_\_\_\_

## Exames ( mais recentes)

EXAMES/ DATA			
Hb			
Ht			
Leucócitos			
Plaquetas			
Glicemia jejum			
TSH			
Uréia /Creatinina			
TGO			
TGP			
CK total			
Na/K			
CT			
HDL			
LDL			
VLDL			
TG			

**Critérios de exclusão : dislipidemias secundárias**

CLÍNICAS	MEDICAMENTOSAS
Diabetes melito	Diuréticos
Hipotireoidismo	Betabloqueadores
Síndrome nefrótica	Anticoncepcionais
Insuficiência renal crônica	Corticóides
Obesidade	Anabolizantes
Etilismo	Estrógenos
Doença hepática parenquimatosa	Progestágenos
Colestase	Isotretinoína
Mieloma múltiplo	Ciclosporina
Lupus eritematoso sistêmico	Antiretrovirais
Doença de estoque do glicogênio	
Lipodistrofia	
Osteogenesis imperfecta	
Hipervitaminose D	

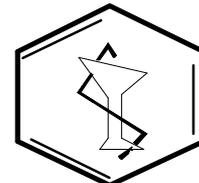
---

Médico responsável  
(carimbo e assinatura)

## APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Projeto de Pesquisa “AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA E ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO GENÓTIPO DA APOLIPOPROTEÍNA E (Apo E) EM INDIVÍDUOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA NO ESTADO DE MINAS GERAIS”

Prezado Sr. (a),

A pesquisa que o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) tem o objetivo de detectar algumas alterações genéticas relacionadas ao aumento do colesterol e triglicérides no sangue. O benefício que você receberá será através da possibilidade de conhecimento da presença de possíveis alterações genéticas e suas implicações, importantes para que o clínico possa planejar melhor o tratamento adequado.

Nesta pesquisa, cada participante deve responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e deve doar uma amostra de sangue, na qual serão realizados vários exames laboratoriais, cujos resultados serão encaminhados para o seu médico.

A coleta de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada em local adequado, por um profissional farmacêutico, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias. Na coleta de 23 mL de sangue será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito do procedimento.

O nome do participante e, também, os resultados dos exames serão mantidos em segredo e privacidade, sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores. Os resultados serão apresentados em reuniões clínicas, nos setores da instituição ligados ao estudo ao final do trabalho e estarão disponíveis inclusive para os participantes. Este projeto visa também publicação dos resultados em revistas especializadas e tese de doutorado.

Não haverá despesas pessoais para o paciente, ficando o ônus (material, recurso humano, despesa com laboratório ) para o patrocinador, também não haverá compensação financeira pela sua participação, nem remuneração financeira do pesquisador, cujo interesse é apenas científico.

Caso você não queira participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento ou na assistência recebida pelo seu médico. Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato, por telefone, com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão relacionados a seguir:

- Profa. Dra Marinez de Oliveira Sousa – Tel: (31) 3499 6896 / 8811 1642.  
Coordenadora do projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Profa. Dra Maria das Graças Carvalho – Tel: (31) 3499 6900  
Professora de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Cláudia Natália Ferreira – Tel: (31) 3441 6903, 8807 6903.  
Bioquímica e aluna de doutorado da Faculdade de Farmácia da UFMG.

- MÉDICO COLABORADOR DO PROJETO DE PESQUISA

#### TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 23 mL de sangue para ser utilizado na pesquisa acima.

Nome completo: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data:

## APÊNDICE 3

### Certificados de apresentação de resumos em congressos

certificamos que

**IZABELA RIBEIRO SANTOS**

participou do

**Salvador 46°**

**Congresso Brasileiro  
de Patologia Clínica  
Medicina Laboratorial**

**Exposição Técnico-Científica**

**4 a 7 de setembro de 2012**

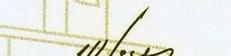
**Centro de Convenções da Bahia**

### **A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial**

na qualidade de autor responsável do tema livre "AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO  
THR325ILE DO GENE TAFI EM INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIA", tendo como  
co-autores "FERREIRA, C. N., CARVALHO, M. D. G., SOUZA, M. O., BORGES, K. B. G.".

  
**José Carlos Lima**

Presidente do 46º Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
**Ulysses Moraes de Oliveira**

Coordenador da Comissão Científica do 46º Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
**Paulo Sérgio Róffé Azevedo**

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /  
Medicina Laboratorial

realização





## ePOSTERS (B)

## ePOSTER AREA

Thursday, July 4, 2013

13:30 - 15:00

### Fibrinolysis and FXIII

Screen 74

Moderator: Dick Rijken (The Netherlands)

- PB 4.74-1 Fibrinolysis wave as a possible cause of rethrombosis**  
 Ansar Zhalyalov, Mikhail Panteleev, Fazoil Ataullakhanov, Alexey Shibeko (Russian Federation)
- PB 4.74-2 Polymorphism thr325ile in thrombin-activable fibrinolysis inhibitor gene in dyslipidemic subjects from Brazil**  
 Izabela Santos, Maria das Graças Carvalho, Marinez Sousa, Cláudia Ferreira, Karina Gomes (Brazil)
- PB 4.74-3 Residual perfusion defects in patients with Pulmonary Embolism and fibrinolytic system**  
 Anna Paola Cellai, Donatella Lami, Caterina Cenci, Rossella Marcucci, Claudia Fiorillo, Matteo Becatti, Lucia Mannini, Daniela Poli, Rosanna Abbate, Domenico Prisco (Italy)
- PB 4.74-4 Molecular basis of 21 severe FXIII deficiency cases: 11 novel mutations detected**  
 Sharda Shanbhag, Kanjaksha Ghosh, Shrimati Shetty (India)
- PB 4.74-5 Mutation analysis in patients with decreased fibrinogen level**  
 Beata Baran, Edyta Odnoczek, Ewa Stefanska-Windyga, Andrzej Mital, Vytautas Ivaskevicius, Johannes Oldenburg, Jerzy Windyga (Poland)
- PB 4.74-6 Role of genotyping in FXIII deficiency**  
 Renée Weerens, Waander van Heerde, Selene Schoormans, Adinda Diekstra, Paul Brons (The Netherlands)

## Review Article

Genetic polymorphisms as a risk factor  
for dyslipidemia in childrenIzabela R. Santos<sup>a,b</sup>, Ana Paula Fernandes<sup>b</sup>, Marinez O. Sousa<sup>b</sup>, Cláudia N. Ferreira<sup>c</sup> and  
Karina B. Gomes<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup>*Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais,  
Belo Horizonte, MG, Brazil*<sup>b</sup>*Department of Clinical and Toxicological Analyses, Pharmacy School, Federal University of Minas Gerais,  
Belo Horizonte, MG, Brazil*<sup>c</sup>*Technical College, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

Received 19 February 2013

Revised 21 April 2013

Accepted 26 April 2013

**Abstract.** Dyslipidemia is an important etiological factor for development of cardiovascular disease, which is the leading cause of deaths in adults. Given the growing global epidemic of dyslipidemia, lipoprotein metabolism disorders have become an important health problem not only in adulthood, but have also emerged as an increasingly risk factor in childhood. Although several genome-wide association studies in multiple large population-based cohorts of adults and meta-analyses have identified susceptibility genes or loci, especially in lipid-related traits, it is of great importance to evaluate genetic predisposition at an early age. Recent findings suggest that the identification of polymorphisms in the metabolism of lipids in childhood may help fight subclinical atherosclerosis and its progression to cardiovascular complications in adulthood. Therefore, the aim of this study was to review genetic polymorphisms as risk factors associated with dyslipidemia in children and adolescents.

**Keywords:** Dyslipidemia, childhood, polymorphism, cardiovascular risk

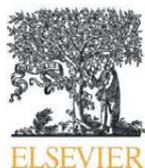
## 1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs), which include myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease, are the first cause of death worldwide [1]. In addition, CVDs are associated with high costs for public health. It is estimated that 195.000 new and silent first myocardial infarctions occur each year. Approximately

every 25 sec, an American will have a coronary event, and approximately every minute, someone will die with coronary complications [2]. The clinical manifestations of these atherosclerotic diseases (AD) occur in adulthood, but the atherosclerosis development starts in early childhood and is progressive during life [3].

The severity and progression of atherosclerosis are related to the presence, number, magnitude and duration of a series of risk factors, which are usually acquired in childhood and tends to persist into adulthood. Knowledge at early age of the prevalent risk factors for AD is, therefore, of extreme importance [4]. Among the modifiable risk factors, the most frequent are hypercholesterolemia, cigarette smoking, hypertension, hypertriglyceridemia,

\*Corresponding author: Karina B. Gomes, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. Zip Code: 31270-901. Tel.: +55 31 3409 6895; Fax: +55 31 3409 6985; E-mail: karinabgb@gmail.com.



## Short Communication

## The polymorphism – 1131T>C in apolipoprotein A5 gene is associated with dyslipidemia in Brazilian subjects

Cláudia N. Ferreira <sup>a</sup>, Maria G. Carvalho <sup>b</sup>, Ana P. Fernandes <sup>b</sup>, Izabela R. Santos <sup>b</sup>, Kathryn F. Rodrigues <sup>b</sup>, Ângela M.Q. Lana <sup>c</sup>, Cristina R. Almeida <sup>d</sup>, Andréia A. Loures-Vale <sup>e</sup>, Karina B. Gomes <sup>b,\*</sup>, Marinez O. Sousa <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Setor de Patologia Clínica, Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Petrobras - Refinaria Gabriel Passos, Betim, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Hospital Socor, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 2 December 2012

Available online 22 December 2012

## Keywords:

Apolipoprotein

Dyslipidemia

Lipid parameters

Polymorphism

## ABSTRACT

**Background:** Polymorphisms in apolipoprotein A5 gene (APOA5) have been associated with higher triglyceride levels in many populations. The aim of the study was to determine the allelic and genotypic distribution of the APOA5 – 1131T>C polymorphism and to identify the association of the genetic variant and the risk for dyslipidemia.

**Methods:** We genotyped 109 dyslipidemic subjects and 107 controls. The total cholesterol, triglycerides and HDL-c were determined enzymatically. Comparison of means among groups was calculated by ANOVA. Significant differences among groups were evaluated by Student–Newman–Keuls test.

**Results:** The minor allele C was more frequent in dyslipidemic subjects than controls ( $p=0.019$ ) and confers an increased individual risk for dyslipidemia (OR = 1.726, CI 95% = 1.095–2.721). The genotype analysis by gender showed that this allele was more frequent in dyslipidemic males ( $p=0.037$ ; OR = 2.050, CI 95% = 1.042–4.023). When participants were analyzed according to genotypes TT and TC/CC, C-carriers presented higher cholesterol and triglycerides levels than TT homozygous ( $p=0.046$  and  $0.049$ , respectively).

**Conclusions:** The allele C confers higher total cholesterol and triglycerides levels in dyslipidemic adults. The APOA5 – 1131T>C polymorphism is associated with dyslipidemia in male subjects.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Dyslipidemia is a major health problem in many countries because of its high prevalence and its causal relationship with serious medical conditions such as coronary artery disease (CAD), hypertension and stroke (Yin et al., 2011). It is well known that dyslipidemia is a complex trait caused by multiple environmental and genetic factors and their interactions (Choy et al., 2004; Yamada et al., 2007). Although dyslipidemia often occurs in patients with cardiovascular disease, the underlying mechanisms remain poorly understood.

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; APOA1, Apolipoprotein A1; APOA4, Apolipoprotein A4; APOA5, Apolipoprotein A5; APOB, Apolipoprotein B; APOC3, Apolipoprotein C3; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CI, confidence interval; COEP-UFMG, Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais; HDLc, High-density lipoprotein cholesterol; LDLc, Low-density lipoprotein cholesterol; Lp(a), Lipoprotein (a); PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism; SD, standard deviation; SNK, Student–Newman–Keuls; TC, Total cholesterol; TG, Triglycerides; VLDL, Very low density lipoproteins.

\* Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 3409 6895; fax: +55 31 3409 6985.

E-mail address: [karinabgb@gmail.com](mailto:karinabgb@gmail.com) (K.B. Gomes).

The recently identified apolipoprotein A5 (APOA5) is the newest member of apolipoproteins that affects plasma lipid homeostasis (Huang et al., 2009; Pennacchio et al., 2001). In 2001, Pennacchio et al. described a putative apolipoprotein in the APOA1/C3/A4 gene cluster on chromosome 11q23 (Kluger et al., 2008; Pennacchio et al., 2001). The gene was located 27 kb distal of the APOA4 gene and encoded for 368-amino-acid protein with significant homology to various apolipoproteins (Pennacchio et al., 2001). In 2002, Van der Vliet et al., using a mouse model with overexpression of APOA5, observed a marked reduction of VLDL (very low density lipoproteins), TG (triglycerides) and lower concentrations of cholesterol in all lipoproteins, resulting in 40% reduction in plasma TC (total cholesterol) concentrations (Van der Vliet et al., 2002). The authors suggested that APOA5 is involved in processes regulating the plasma concentrations of TG and TC. Further studies showed that the protein is produced in the liver, but the biological function of APOA5 is not yet fully defined (Hořinek et al., 2003). The ApoA5 was found predominantly bound to VLDL and HDL (high density lipoproteins) in the plasma (Kluger et al., 2008; Ribalta et al., 2002).

Several groups have investigated the mechanisms underlying effects of APOA5 on TG metabolism (Maász et al., 2008; Matsunaga et al., 2007). The APOA5 can inhibit the hepatic VLDL production, which can