

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Freqüência da mutação no gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase -MTHFR - (C677T) entre pacientes e grupo – controle	69
Tabela 2 - Freqüência do fator V Leiden (G1691A) entre pacientes e grupo-controle	69
Tabela 3 - Freqüência da mutação no gene da protrombina (G20210A) entre pacientes e grupo-controle	70
Tabela 4 - Freqüência de polimorfismos no gene da apolipoproteína E (APO E) entre pacientes e grupo-controle	72
Tabela 5- Freqüência do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do inibidor do ativador de plasminogênio tecidual (PAI-1) entre pacientes e grupo-controle	73
Tabela 6 - Freqüência do polimorfismo G844A na região promotora do gene do inibidor do ativador de plasminogênio tecidual tipo 1 (PAI-1) entre pacientes e grupo-controle	74
Tabela 7 - Freqüência da mutação no gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase -MTHFR - (C677T) em pacientes com AVC.	75
Tabela 8 - Freqüência do fator V Leiden (G1691A) em pacientes com AVC	76
Tabela 9 - Freqüência da mutação no gene da protrombina (G20210A) em pacientes com AVC.	76
Tabela 10 - Freqüência de polimorfismos no gene da ApoE em pacientes com AVC e indivíduos do grupo-controle	78
Tabela 11 - Freqüência do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1 entre os pacientes com AVC e indivíduos do grupo-controle	79
Tabela 12 - Freqüência do polimorfismo G844A na região promotora do gene do PAI-1 entre os pacientes com AVC e indivíduos do grupo-controle	80
Tabela 13 - Freqüência da mutação no gene da MTHFR - (C677T) em pacientes com DAP.	80
Tabela 14 - Freqüência do fator V Leiden (G1691A) em pacientes com DAP	81
Tabela 15 - Freqüência de polimorfismos no gene da ApoE em pacientes com DAP e indivíduos do grupo-controle	82
Tabela 16 - Freqüência do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1 entre os pacientes com DAP e indivíduos do grupo-controle	83
Tabela 17 - Freqüência do polimorfismo G844A na região promotora do gene do inibidor do ativador de plasminogênio tecidual (PAI-1) entre os pacientes com DAP e em indivíduos do grupo-controle	84

Tabela 18 – Frequência dos grupos sanguíneos do sistema ABO entre pacientes e controles	85
Tabela 19 – Frequência dos genótipos do sistema ABO entre pacientes com trombose arterial e indivíduos do grupo controle	85
Tabela 20 – Frequência dos alelos A1, A2, B, O1 e O2 entre pacientes e controles	86
Tabela 21 – Frequência dos grupos sanguíneos do sistema ABO entre pacientes com AVC e controles	86
Tabela 22 – Frequência dos genótipos do sistema ABO entre pacientes com AVC e indivíduos controles	87
Tabela 23 – Frequência dos alelos A1, A2, B, O1 e O2, entre pacientes com AVC e controles	87
Tabela 24 – Frequência dos grupos sanguíneos do sistema ABO entre pacientes com DAP e controles	88
Tabela 25 – Frequência dos genótipos do sistema ABO entre pacientes com DAP e indivíduos controles	88
Tabela 26 – Frequência dos alelos A1, A2, B, O1 e O2,. entre pacientes com DAP e controles	89
Tabela 27 – Perfil lipídico convencional para os grupos estudados	89
Tabela 28 – Perfil apolipoprotéico e níveis de PCR para os grupos estudados	90
Tabela 29 – Odds ratio ajustadas para as variáveis estudadas entre os pacientes com AVC.	96
Tabela 30 – Odds ratio ajustadas para as variáveis estudadas entre os pacientes com DAP.	96
Tabela 31 – Níveis plasmáticos de PAI-I em relação ao polimorfismo 4G5G	97
Tabela 32 – Níveis plasmáticos de PAI-1 em relação ao polimorfismo G844A	98
Tabela 33 – Parâmetros bioquímicos e hemostático obtidos para o grupo 1	99
Tabela 34 – Parâmetros bioquímicos e hemostático obtidos para o grupo 2	100
Tabela 35 – Parâmetros bioquímicos e hemostático do grupo 3	101
Tabela 36 – Parâmetros bioquímicos e hemostático: comparação entre grupos	102

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Valores de referência dos lípidos plasmáticos para indivíduos adultos	32
Quadro 2- Oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa das mutações	52
Quadro 3 - Concentrações dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase	53
Quadro 4 - Concentrações dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase para o sistema ABO	53
Quadro 5 – Condições de temperatura das reações de PCR	54
Quadro 6 – Condições das reações de PCR para os polimorfismos de PAI-1	54
Quadro 7 - Condições de temperatura das reações de PCR para o sistema ABO	54
Quadro 8 – Perfil eletroforético dos fragmentos de genes analisados	55
Quadro 9 - Perfil eletroforético dos fragmentos para os polimorfismos do sistema ABO	56
Quadro 10 – Caracterização dos pacientes e indivíduos do grupo-controle em relação ao sexo, média de idade e faixa etária.	64

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Representação esquemática via extrínseca da coagulação sangüínea	26
Figura 2 - Representação esquemática via intrínseca da coagulação sangüínea	26
Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR seguida de digestão com a endonuclease de restrição <i>Hind III</i> para identificação do fator V Leiden	65
Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após reação de PCR, seguida de digestão com a endonuclease de restrição <i>Hinf I</i> para identificação da mutação no gene da enzima MTHFR (C677T).	66
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR seguida de digestão com a endonuclease de restrição <i>Hind III</i> para identificação da mutação no gene da protrombina.	66
Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição <i>HhaI</i> ( <i>CfoI</i> ) para identificação do polimorfismo no gene da apolipoproteína E	67
Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR seguida de digestão com a endonuclease de restrição <i>Xho I</i> para identificação do polimorfismo G844A no gene do PAI-1.	67
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR alelo específica para identificação do polimorfismo 4G5G no gene do PAI-1	68
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição <i>KpnI</i> e <i>MspI</i> para identificação do polimorfismo nos exons 6 e 7 do sistema ABO.	68
Figura 10 – Distribuição dos valores de colesterol total (CT).	990
Figura 11 – Distribuição dos valores de colesterol HDL (HDL <sub>C</sub> ).	91
Figura 12 – Distribuição dos valores de colesterol LDL estimados pela equação de Friedewald (LDL <sub>C</sub> f).	91
Figura 13 – Distribuição dos valores de triglicérides (TG).	92
Figura 14 – Distribuição dos valores de apolipoproteína A-I (ApoA-I).	92

Figura 15 – Distribuição dos valores de apolipoproteína B (ApoB).	93
Figura 16 – Distribuição dos valores para o índice ApoB/ApoA-I.	93
Figura 17 – Distribuição dos valores de proteína C reativa ultra-sensível (PCR <sub>US</sub> ).	94
Figura 18 – Distribuição dos valores do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-I).	95

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A – Adenina

ADP- adenosina difosfato

AF- ácido fólico

ApoA- apolipoproteína A

ApoB- apolipoproteína B

ApoE- apolipoproteína E

APS- persulfato de amônio

Arg- Arginina

AT- antitrombina

AVC- acidente vascular cerebral

cDNA- ácido desoxirribonucléico complementar

C- citosina

CAPM – cininogênio de alto peso molecular

COEP- comitê de ética em pesquisa

DAC- doença arterial coronariana

DAP- doença arterial periférica

DCVI- doença cerebrovascular isquêmica

D-D- dímero D

DM – diabetes mellitus

DNA- ácido desoxirribonucléico

DNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfato

DVP- doença vascular periférica

ECA- enzima conversora de angiotensina

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

EPCR – receptor endotelial de proteína C

FT – fator tissular

FVL- fator V Leiden  
FvW- fator von Willebrand  
G- guanina  
Glu- glutamina  
Gplb - glicoproteína Ib  
GpIIb/IIIa - glicoproteína IIb/IIIa  
HDL- lipoproteína de alta densidade  
HHcy- hiperhomocisteinemia  
Hcy – homocisteína  
IAM – infarto agudo do miocárdio  
IC - intervalo de confiança  
KDa- quilodaltons  
IDL- lipoproteína de densidade intermediária  
LDL- lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade  
Lp(a)- lipoproteína a  
MTHFR- metilenotetrahidrofolato redutase  
NO- óxido nítrico  
OR- odds ratio ou razão de chances  
PAI-1 inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1  
PAF- fator de ativação plaquetária  
PC- proteína C  
PCR- reação em cadeia da polimerase  
PCR<sub>us</sub> – proteína C reativa ultra-sensível  
PS - proteína S  
PT – protrombina  
QM- quilomicrons  
RMN- ressonância magnética nuclear

RFLP- polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição

rPCa- resistência à proteína C ativada

rpm- rotações por minuto

T- timina

TAFI- inibidor da fibrinólise ativado pela trombina

TBE – tris-borato -EDTA

TEV- tromboembolismo venoso

TG- triglicérides

TFPI- inibidor da via do fator tissular

TM - trombomodulina

tPA- ativador de plasminogênio tecidual

TXA<sub>2</sub> – tromboxano A<sub>2</sub>

TVC- trombose venosa cerebral

VLDL- lipoproteína de muito baixa densidade



## RESUMO

A trombose arterial (TA) é considerada uma doença multifatorial resultante da interação entre fatores genéticos e adquiridos. Entre os fatores adquiridos, tabagismo, dislipidemias, obesidade e diabetes mellitus são relatados como fatores frequentemente relacionados à TA. Os fatores genéticos não se encontram completamente esclarecidos, mas as mutações nos genes do fator V (FV Leiden - G1691A), da protrombina (G20210A) e da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR - C677T) têm sido relatadas como fatores de risco para TA. O objetivo principal deste estudo foi investigar, a presença destes fatores genéticos, além de polimorfismos nos genes do sistema sanguíneo ABO, do inibidor do ativador plasminogênio tecidual (PAI-1) e a associação com os seus respectivos níveis plasmáticos e apolipoproteína E (ApoE) e a interação destes com os níveis de colesterol total e frações e das apolipoproteínas A-I (Apo A-I) e B (ApoB) e proteína C reativa. Foram avaliados 97 pacientes jovens que apresentaram quadro de acidente vascular cerebral (AVC – 48) e doença arterial periférica (DAP – 49), atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Análise similar foi realizada em 201 indivíduos sem história pregressa de trombose (grupo controle). As mutações/polimorfismos foram investigados por PCR-RFLP ou PCR alelo-específica. *Odds ratio (OR)*, chi-quadrado e teste exato de Fisher foram utilizados para análise estatística dos polimorfismos e ANOVA para as variáveis quantitativas. Análise por regressão logística múltipla foi empregada para ajuste de possíveis fatores de confusão. Foi observada a ocorrência do evento trombótico em indivíduos jovens (média de  $35,51 \pm 14,86$  anos). Entre os fatores de risco adquiridos, o tabagismo e hipertensão foram os mais freqüentes. Entre as mutações e polimorfismos investigados, significância estatística foi observada para FVL (*OR* 5,41; IC 95%: 0,91 a 41,0,  $p = 0,04$ ), alelos O1 (*OR* 0,59; IC 95%: 0,40 a 0,88,  $p = 0,008$ ) e B (*OR* 2,66; IC 95%: 1,44 a 4,89,  $p = 0,001$ ). Foram observadas ainda diferenças significativas para o perfil lipídico e apolipoproteico e proteína C reativa, quando comparados pacientes e controles, e após ajuste por regressão logística múltipla, ApoB, ApoA-I, índice ApoB/ApoA-I, proteína C reativa foram apontados como fatores independentes para a ocorrência do evento, e o alelo O1 foi associada à menor predisposição para ocorrência de AVC e PAD. Os dados deste estudo reforçam o fato de a trombose arterial é uma doença multifatorial, onde atuam fatores concomitantes, sejam genéticos ou adquiridos, envolvendo alterações do sistema hemostático, lípidos e processo inflamatório.

Palavras-chave: Trombose arterial (TA), FV Leiden (FVL), Mutação no gene da protrombina, mutação no gene da MTHFR, polimorfismos nos genes do PAI-1 e ApoE.

## ABSTRACT

Arterial thrombosis (AT) is considered a multifactorial disease, resulting from the interaction of both genetic and acquired risk factors. Among the acquired factors, tabagism, hyperlipidemia, obesity and diabetes mellitus are frequently related to AT. The genetic factors are not completely investigated, but mutations in the genes of factor V (FV Leiden - G1691A), prothrombin (G20210A) and metilenetetrahydrofolate reductase (MTHFR - C677T) have been associated to increased risk to TA. The main objective of this study was to investigate the presence of these mutations as well as polymorphism in PAI-1 and ApoE genes and its interactions with PAI-1 levels and lipids and apolipoprotein profiles, respectively, in a group of 97 patients (48 with arterial isquemic stroke – IS and 49 with peripheral arterial disease - PAD), attending a hematology medical service. Mutations/polymorphisms were also investigated in 201 randomly selected control subjects. *Odds ratio*, chi-square or exact Fisher tests and ANOVA and multiple regression analysis were applied for statistical comparisons. Statistically significant results were detected to FVL (*OR* 5.41; CI 95%: 0.91 a 41.0,  $p = 0.04$ ), alleles O1 (*OR* 0.59; CI 95%: 0.40 a 0.88,  $p= 0.008$ ), O2 (*OR* 4.0; CI 95%: 1.65 a 0.9.82,  $p= <0.001$ ), B (*OR* 2.66; CI 95%: 1.44 a 4.89,  $p= 0.001$ ). Significant data were detected also to lipid and apolipoproteic profile and C-reactive protein, as well as ApoB/ApoA-I ratio, which remained significant, as independent risk factors for TA, after adjustments by multiple regression analysis. The data confirm that arterial disease is a multifactorial process, involving concomitant alterations in hemostatic system, lípids homeostasis and inflammatory responses.

Key words: Arterial thrombosis (AT), FV Leiden (FVL), prothrombin gene mutation, MTHFR gene mutation, ApoE and PAI-1 polymorphisms.

