

Quadro 8 – Perfil eletroforético dos fragmentos dos genes analisados.

Gene						
	ApoE	PT	MTHFR	FVL	PAI 4G5G	PAI G844A
Fragmento (pb)	270	375	198	241	260	510
Endonuclease/PCR	<i>HhaI (CfoI)</i>	<i>Hind III</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hind III</i>	alelo específica	<i>XhoI</i>
Perfil eletroforético (pb)	91 e 83 (74) - $\epsilon 2\epsilon 2$	345,322 - HT	198,175 - HT	241,209- HT	260, 139	510, 314,146 - HT
	91, 48 e 35 - $\epsilon 3\epsilon 3$	322 - HM	198 - HM	209 - HM		510 - HM
	72, 48, 35 e 29 - $\epsilon 4\epsilon 4$					
	91, 83 (74), 48 e 35 - $\epsilon 2\epsilon 3$					
	91, 83 (74), 72, 48, 35 e 29 - $\epsilon 2\epsilon 4$					
	91, 72, 48, 35 e 29 - $\epsilon 3 \epsilon 4$					

ApoE - apolipoproteína E; PT - protrombina; MTHFR - metilenotetrahidrofolato redutase; FVL- fator V Leiden; HT – heterozigoto; HM - homozigoto

Quadro 9 - Perfil eletroforético dos fragmentos para os polimorfismos do sistema ABO

PERFIL	309	252	223	204	164	150	137	119	96	87
A1A1	309	252		204				119	96	
A1A2	309	252		204		150		119	96	
A1O1	309	252		204	164			119	96	87
A1O2	309	252		204			137		96	
A2A2	309	252		204		150			96	
A2O1	309	252		204	164	150		119	96	87
A2O2	309	252		204		150	137	119	96	
A1B	309	252	223	204			137	119	96	
A2B	309	252	223	204		150	137	119	96	
BB	309	252	223				137	119		
BO1	309	252	223	204	164		137	119	96	87
BO2	309	252	223	204			137	119		
O1O1	309			204	164			119	96	87
O1O2	309	252		204	164		137	119	96	87
O2O2	309	252		204			137	119		

Em todas as análises genéticas foram incluídos amostras de DNAs extraídos de indivíduos sabidamente portadores das mutações, como controle de atividade das endonucleases de restrição.

### 3.4.2.2 - Eletroforese

Os fragmentos resultantes de digestão enzimática e PCR alelo-específica, foram detectados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% (FVL, PAI 4G/5G, G844A), a 8% (G20210A, ABO) e 12% (Apo E). Cada gel foi preparado com 10mL de solução de poliacrilamida, 86µL de persulfato de amônio (APS) e 10µL de TEMED. A solução foi então vertida em um molde de placas de vidro e um pente de plástico foi adicionado para que as canaletas fossem formadas durante a polimerização do gel.

Depois de aproximadamente 20 minutos, o pente foi retirado e a cuba de eletroforese montada. Em cada canaleta do gel, foram aplicados 5µL de uma mistura preparada com 5µL do produto da digestão enzimática e 5µL de tampão de corrida da amostra, diluído 2X. Além disso, em uma canaleta foi aplicado 5µL de padrão de peso molecular de 100pb.

Cada eletroforese foi realizada utilizando-se fonte de corrente elétrica (*EC - Apparatus Corporation*), em conjunto com cubas pequenas *OLW*. O tempo da corrida eletroforética variou de 40 minutos às 2h 30min, com a voltagem variando de 75 a 110V, utilizando-se TBE 1X como tampão de eletroforese.

Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao procedimento de coloração. Os géis foram primeiramente imersos em solução fixadora por 15 minutos, recebendo logo após, solução de nitrato de prata, e incubados por mais 10 minutos. Finalmente os géis

foram submetidos à solução reveladora, onde permaneceram imersos para que os fragmentos corados pela prata pudessem ser revelados e, portanto, visualizados.

Por fim, o gel foi novamente submerso na solução fixadora, e logo após, foi fixado em uma placa de vidro e fotografado. Os protocolos para a preparação dos reagentes utilizados durante a eletroforese encontram-se descritos no apêndice 4.

### **3.4.3 - Avaliação do perfil lipídico**

#### **3.4.3.1 - Colesterol total (CT)**

A determinação quantitativa do colesterol total foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Randox<sup>®</sup> Cholesterol Chod-pap, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico, como descrito a seguir, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. A enzima colesterol oxidase, em presença de oxigênio, catalisa a oxidação do colesterol livre, produzindo o peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente fenólico (fenol) pelo peróxido de hidrogênio formado, em presença de aminofenazona, produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina), que apresenta um máximo de absorção em 500 nm. A intensidade da cor formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus<sup>®</sup> em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado Soro Controle-P (BIOBRÁS<sup>®</sup> - RANDOX<sup>®</sup> Laboratories, United Kingdon) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: Ótimo < 200mg/dL

Limítrofe 200 – 240mg/dL

Alto > 240mg/dL

#### **3.4.3.2 - Colesterol HDL (HDL<sub>c</sub>)**

A determinação quantitativa do colesterol HDL foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Randox<sup>®</sup> HDL Cholesterol direct, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico direto descrito a seguir, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Os reagentes contêm um homogeneizado de enzimas. O teste combina duas

etapas específicas. Na primeira etapa, colesterol LDL, colesterol VLDL e quilomícrons são degradados pela ação combinada das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, enquanto o colesterol HDL não é afetado. O peróxido de hidrogênio formado na primeira etapa é decomposto pela ação da catalase. Na etapa seguinte, o colesterol HDL transforma-se em colesteno e peróxido de hidrogênio pelas mesmas enzimas acima citadas, na presença de surfactantes específicos para colesterol HDL. O peróxido de hidrogênio formado reage com um cromógeno, N-(2-hidroxi-3-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina), sob ação catalítica da peroxidase. A absorvância do cromógeno quinona produzido é diretamente proporcional à concentração de colesterol HDL na amostra, quando medida a 600 nm.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus<sup>®</sup> em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado Soro Controle-P (Biobrás<sup>®</sup> - Randox<sup>®</sup> Laboratories, United Kingdom) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: Alto > 60mg/dL

Baixo < 40mg/dL

#### **3.4.3.3 - Triglicérides (TG)**

A determinação quantitativa de triglicérides foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Randox<sup>®</sup> Triglycerides gpo-pap, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico descrito a seguir, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O glicerol liberado na hidrólise dos triglicéridos, catalisada pela lipoproteína lipase é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento que ocorre entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e p-clorofenol é catalisada pela peroxidase produzindo a quinonimina que tem máximo de absorvância em 500nm. A intensidade da cor róseo-avermelhada formada é diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus<sup>®</sup> em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado Soro Controle-P (BIOBRÁS<sup>®</sup> - RANDOX<sup>®</sup> Laboratories, United Kingdom) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: Ótimo < 150mg/dL

Limítrofe 150 – 200mg/dL

Alto 201 – 499mg/dL

Muito alto > 500mg/dL

#### **3.4.3.4 - Colesterol LDL estimado pela equação de Friedewald (LDL<sub>C</sub> f)**

A determinação do LDL<sub>C</sub> foi estimada utilizando um procedimento simplificado descrito por Friedewald et al. (1972). Neste método, os níveis de colesterol total, triglicérides e colesterol HDL são determinados como previamente descrito. Visto que a maioria dos triglicérides plasmáticos são carreados pelas partículas de VLDL, o VLDL<sub>C</sub> é estimado a partir do coeficiente de triglicérides e colesterol na VLDL. Quando as concentrações são expressas em mg/dL, o VLDL<sub>C</sub> é estimado como triglicérides plasmático dividido por cinco, considerando-se que, essencialmente, todos os triglicérides plasmáticos são carreados pela VLDL e que o coeficiente triglicérides/colesterol é invariável. O LDL<sub>C</sub> f foi estimado usando a seguinte equação:  $LDL_C f = \text{colesterol total} - [\text{HDL}_C + (\text{triglicérides}/5)]$ .

Esta equação não é apropriada para ser usada com amostras nas quais as concentrações de triglicérides excedem a 400mg/dL.

Valor de referência: Ótimo < 100mg/dL

Desejável 100 – 129mg/dL

Limítrofe 130 – 159mg/dL

Alto 160 – 189mg/dL

Muito alto > 190mg/dL

#### **3.4.3.5 - Apolipoproteína A-I (ApoA-I)**

A determinação quantitativa da ApoA-I foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Biotécnica® Apolipoproteína A-I (ApoA-I) turbidimetria, cujo princípio analítico é o imunoensaio turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O fundamento do teste de imunoensaio baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. No teste de imunoensaio turbidimétrico os antígenos apo A-I presentes na amostra originam uma aglutinação imunológica com os anticorpos anti-ApoA-I presentes no reagente. O grau de aglutinação é proporcional à concentração de ApoA-I na amostra e pode ser medido por turbidimetria. Este processo baseia-se na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em meio líquido. Quando um

anticorpo (ApoA-I) e a amostra (antígeno) são misturados, formam-se imunocomplexos. A diluição adquire turbidez, que é proporcional à quantidade de antígeno. Este método é chamado homogêneo, pois não possui fase sólida.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado o soro controle Apolipoproteínas (Biotécnica® Biotecnologia Avançada) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 110 – 210mg/dL

#### **3.4.3.6- Apolipoproteína B (ApoB)**

A determinação quantitativa da apo B foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Biotécnica® Apolipoproteína B (ApoB) Turbidimetria, cujo princípio analítico é o imunoensaio turbidimétrico, já descrito para ApoA-I, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado o soro controle Apolipoproteínas (Biotécnica® Biotecnologia Avançada) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 60 – 155mg/dL

#### **3.4.3.7 - Proteína C Reativa ultra-sensível (PCR<sub>us</sub>)**

A determinação quantitativa da PCR<sub>us</sub> foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Biotécnica® Proteína C-Reativa Turbidimetria, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante com metodologia para monitoramento em cardiologia. A presença da PCR na amostra causa aglutinação das partículas de látex cobertas com anticorpos anti-PCR. O grau de aglutinação é proporcional à concentração de PCR na amostra e pode ser medido por turbidimetria, como descrito para ApoA-I.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado, utilizando o procedimento técnico recomendado pelo fabricante, aumentando o volume de amostra e padrão para 50µL e usando o calibrador diluído 1:10 com água deionizada. As amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado o soro controle

Serodos<sup>®</sup> (In Vitro<sup>®</sup> Diagnóstica) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 0.1 – 2.5mg/L

O controle de qualidade interno foi realizado para todas as dosagens utilizando-se soros controles comerciais (Labtest<sup>®</sup> e Doles<sup>®</sup>), com dois níveis de concentrações, cobrindo a faixa de valores de decisão clínica, para avaliar a precisão dos ensaios. Todas as dosagens acima mencionadas foram realizadas no equipamento Cobas Miraplus, no Hospital Socor de Belo Horizonte, Minas Gerais.

### **3.4.4 - Avaliação de parâmetro hemostático**

#### **3.4.4.1 - Determinação do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)**

A determinação dos níveis de PAI-1 foi realizada pelo método de ELISA, utilizando-se o uso do conjunto diagnóstico Imubind<sup>®</sup> Plasma PAI-1 Elisa (American Diagnostica<sup>®</sup> Inc. – Estados Unidos), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A técnica baseia-se no uso de anticorpo monoclonal presentes em uma microplaca, direcionados contra o PAI-1. Plasma citratado e amostras controles são adicionados à microplaca e o antígeno PAI-1 presente é capturado pelo anticorpo monoclonal durante um período de incubação. Uma peroxidase conjugada a um anticorpo policlonal contra o PAI-1 é adicionada à placa e este conjugado liga-se às moléculas de PAI-1 capturadas. Todo o material não ligado é lavado e o substrato para a peroxidase, ortofenilenodiamina, é adicionado à placa. A reação peroxidase/substrato fornece uma coloração amarela à solução. A adição de ácido sulfúrico interrompe a reação e a solução adquire uma coloração alaranjada. A absorbância da solução é lida a 490nm. Esta absorbância será diretamente proporcional à concentração de PAI-1 na amostra.

## **4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa “Sigma Stat” versão 2.03. Para os marcadores que apresentaram distribuição normal foi empregado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Tukey e para as situações de comparação de dois grupos foi realizado o teste t de Student. Para aqueles que não apresentarem distribuição normal, foi empregado o método não paramétrico de Mann Whitney para comparação de dois grupos e ANOVA para comparação de mais grupos, sendo realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. Foi considerado significativo valor de  $p < 0,05$ . A

investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi realizada pela correlação de Pearson para variáveis quantitativas e Spearman para variáveis qualitativas.

Os dados de frequência de mutações/polimorfismos foram analisados usando-se o programa Epi Info versão 6.04 (DEAN et al., 1997). Foram calculados valores de *odds ratio*, com intervalo de 95% de confiança. Os níveis de significância foram verificados pelo teste qui-quadrado. Para os dados nos quais as frequências esperadas foram menores que 5% foi utilizado o teste exato de Fisher.



## **RESULTADOS**

### 5.1 - Caracterização dos pacientes e grupo-controle incluídos no estudo

De acordo com o local de ocorrência do evento trombótico arterial, os 97 pacientes incluídos no estudo foram distribuídos em dois grupos: pacientes com AVC (n = 48) e pacientes com DAP (n = 49).

No quadro 10 são apresentados dados demográficos referentes aos pacientes com AVC e DAP e indivíduos do grupo-controle.

Quadro 10 – Caracterização dos pacientes e indivíduos do grupo-controle em relação ao sexo, média de idade e faixa etária.

Grupos	n	Homens	Mulheres	Idade*(anos)	Faixa etária (anos)
AVC	48	22 (45,8%)	26 (54,2%)	36	8 – 63
DAP	49	20 (40,8%)	29 (59,2%)	36	10 - 58
Controles	201	69 (34,3%)	132 (65,7%)	32,5	9 - 60
Total	298	111 (37,2%)	187 (62,8%)	34	8 - 63

\*Mediana

A média de idade dos pacientes avaliados não variou significativamente, comparando-se com o grupo-controle. A ocorrência precoce do evento trombótico foi uma característica marcante observada entre os pacientes, incluindo crianças com idade entre oito e quinze anos de idade (n= 13).

Em relação ao sítio anatômico de ocorrência do evento trombótico, dentre os pacientes com DAP, os locais mais acometidos foram: membro inferior esquerdo (26,6%), membro inferior direito (22,4%) e oclusão de retina (22,4%). Outros sítios observados foram: membro superior esquerdo (8,2%), membro superior direito (6,1%), oclusão de artéria carótida (6,1%), isquemia mesentérica (4,1%) e ambos os membros inferiores afetados (4,1%).

### 5.2 – Presença de fatores de risco adquiridos entre os pacientes com trombose arterial

Os fatores de risco adquiridos mais freqüentes entre os pacientes foram tabagismo (15%) e hipertensão arterial (8%). Foram observados ainda, entre os pacientes, mas em menor freqüência, fatores de risco como diabetes, cirurgia, neoplasia, gravidez, uso de estrógeno e imobilização prolongada. Cabe ressaltar que 22 (22,7%) pacientes já haviam apresentado pelo menos um evento previamente e 24 (24,7%) apresentavam história familiar de trombose.

### 5.3 - Presença de fatores de risco genéticos entre os pacientes em estudo

As figuras 3, 4 e 5 ilustram os resultados obtidos para identificação do FVL e das mutações no gene da MTHFR e da protrombina, respectivamente, utilizando-se a técnica de PCR-RFLP.

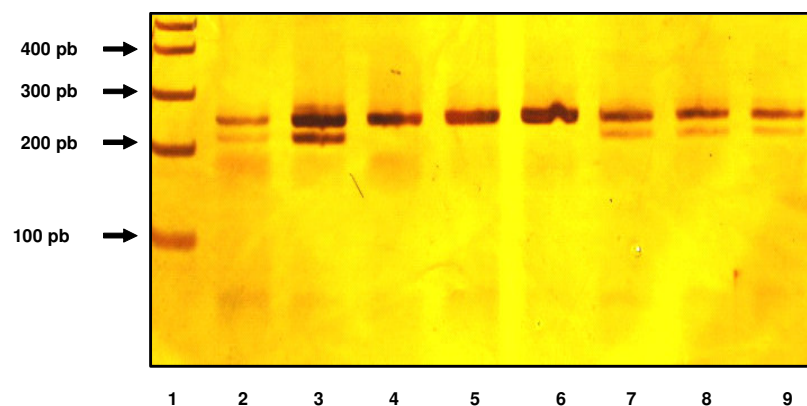


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição *Hind III* para identificação do fator V Leiden. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 2, DNA de indivíduo heterozigoto para a mutação (controle); nas canaletas 3, 7, 8 e 9 DNA de indivíduos portadores da mutação em heterozigose; nas canaletas 4, 5 e 6, DNAs de indivíduos não portadores da mutação

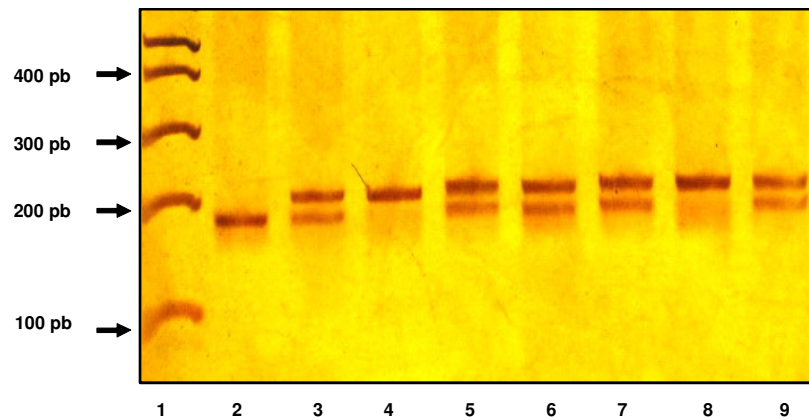


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição *Hinf I* para identificação da mutação no gene da enzima MTHFR (C677T). Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 2, DNA de indivíduo homocigoto para a mutação (controle); na canaleta 3, DNA de indivíduo heterocigoto para a mutação (controle); nas canaletas 4 e 8, DNA de indivíduos não portadores da mutação; nas canaletas, 5,6,7 e 9 DNA de indivíduos portadores da mutação em heterocigose.

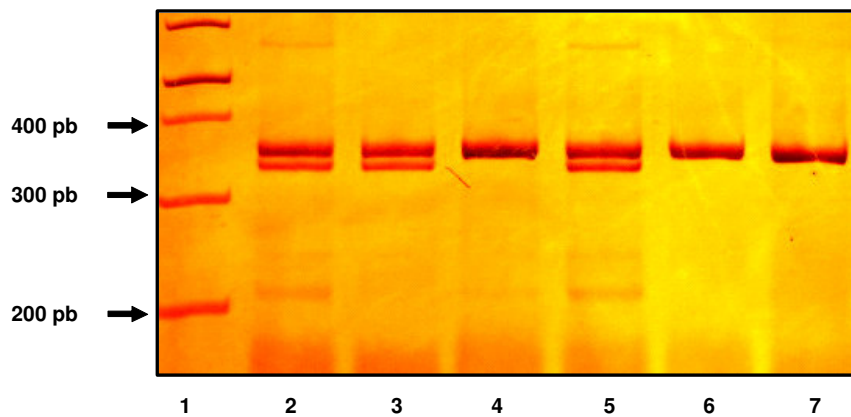


Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição *Hind III* para identificação da mutação no gene da protrombina. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 2, DNA de indivíduo heterocigoto para a mutação (controle); nas canaletas 4, 6 e 7, DNAs de indivíduos não portadores da mutação; nas canaletas 3 e 5, DNAs de indivíduos portadores da mutação em heterocigose.

As figuras 6, 7, 8 e 9 ilustram os resultados obtidos para identificação dos polimorfismos no gene da ApoE, PAI -1 e ABO respectivamente, utilizando-se as técnicas de PCR-RFLP e PCR alelo específica.

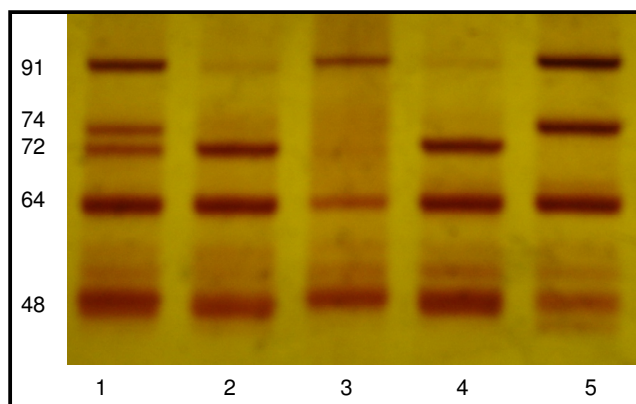


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição *HhaI* (*CfoI*) para identificação do polimorfismo no gene da apolipoproteína E. Na canaleta 1, perfil  $\epsilon_2\epsilon_4$ ; nas canaletas 2 e 4,  $\epsilon_4\epsilon_4$ ; na canaleta 3,  $\epsilon_3\epsilon_3$ ; na canaleta 5,  $\epsilon_2\epsilon_3$ .

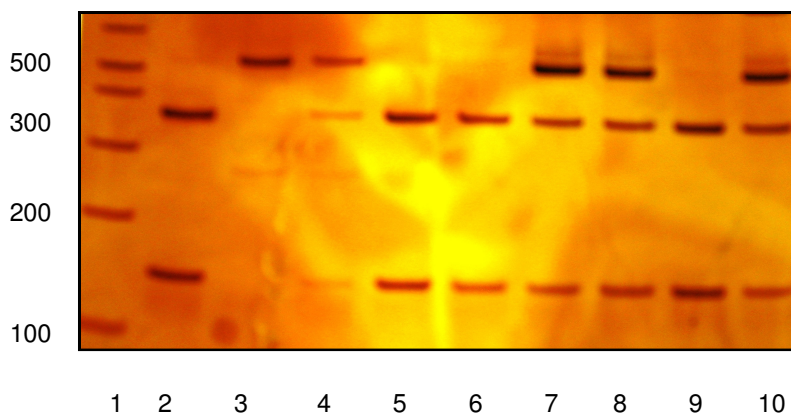


Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição *Xho I* para identificação do polimorfismo G844A no gene do PAI-1. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; nas canaletas 2, 5, 6 e 9 DNAs de indivíduos homocigotos normais; na canaleta 3, DNA de indivíduo homocigoto mutante; nas canaletas 4, 7, 8 e 10, DNA de indivíduos heterocigotos.

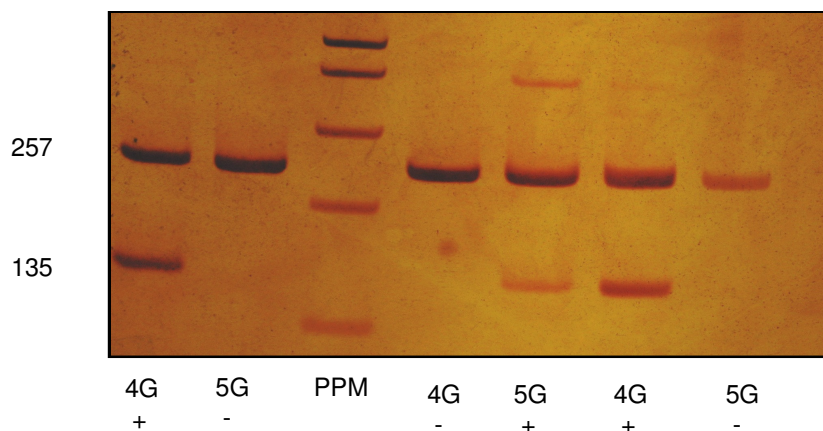


Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR alelo específica para identificação do polimorfismo 4G5G no gene do PAI -1. Seguindo da esquerda para direita: 4G4G, PPM, 5G5G e 4G4G.

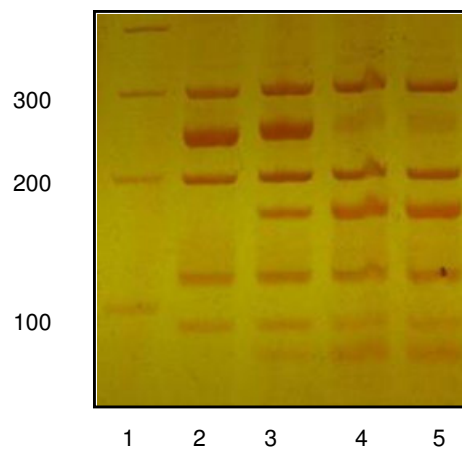


Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP, seguido de digestão com a endonuclease de restrição KpnI e MspI para identificação do polimorfismo nos exons 6 e 7 do sistema ABO. Na canaleta 1, PPM; na canaleta 2 A1A1; na canaleta 3, A1O1; nas canaletas 4 e 5, O1O1.

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados os resultados referentes às frequências do FVL e das mutações nos genes protrombina e MTHFR, respectivamente, entre os 97 pacientes e em 201 indivíduos do grupo-controle.

Tabela 1 - Frequência da mutação no gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase - MTHFR - (C677T) entre os pacientes (n= 97) e em indivíduos do grupo – controle (n= 201).

Mutação	Frequência dos genótipos			Frequência alélica	
	Não detectado (CC)	Heterozigoto (CT)	Homozigoto (TT)	C	T
MTHFR - C677T					
Controle (n =201)	95 (47,3%)	85 (42,3%)	21 (10,4%)	0,68	0,32
Pacientes (n = 97)	54 (55,7%)	35 (36,1%)	8 (8,2%)	0,73	0,27
Odds Ratio		0,77	0,77	1,29	0,77
Intervalo de confiança 95%		0,45 – 1,31	0,30 – 1,92	0,87 – 1,93	0,52 – 1,15
Valor de p		0,37	0,69	0,22	0,22

MTHFR – Metileno-tetra-hidrofolato redutase

Tabela 2 - Frequência do fator V Leiden (G1691A) em pacientes (n= 97) e em indivíduos do grupo-controle (n= 201)

Mutação	Frequência dos genótipos		Frequência alélica	
	Não detectado (GG)	Heterozigoto (GA)	G	A
FVL – G1691A				
Controle (n =201)	199 (99,0%)	2 (1,0%)	0,995	0,005
Pacientes (n =97)	92 (94,8%)	5 (5,2%)	0,97	0,03
Odds Ratio		5,41	0,19	5,29
Intervalo de confiança 95%		0,91 – 41,05	0,03 – 1,11	0,90 – 39,71
Valor de p		0,04	0,04	0,04

FVL – Fator V Leiden

Tabela 3 - Frequência da mutação no gene da protrombina (G20210A) em pacientes (n= 97) e em indivíduos do grupo-controle (n= 201).

Mutação	Frequência dos genótipos		Frequência alélica	
	Não detectado (GG)	Heterozigoto (GA)	G	A
PT - G20210A				
Controle (n = 201)	200 (99,5%)	1 (0,5%)	0,997	0,003
Pacientes (n =97)	95 (97,9%)	2 (2,1%)	0,99	0,01
Odds Ratio		4,21	0,24	4,18
Intervalo de confiança 95%		0,30 – 118,78	0,01 – 3,38	0,30 – 117,00
Valor de p		0,25	0,25	0,25

PT - protrombina

De acordo com os dados apresentados nas tabelas 1, 2 e 3, entre os 201 indivíduos do grupo-controle a mutação C677T no gene da MTHFR foi detectada em 106 (52,7%), sendo 85 (42,3%) heterozigotos e 21 (10,4%) homozigotos. Neste mesmo grupo, o fator V Leiden foi detectado em heterozigose em 2 (1,0%) indivíduos e a mutação no gene da protrombina (heterozigose) em 1 (0,5%) indivíduo. Nenhum indivíduo do grupo-controle apresentou fator V Leiden ou mutação no gene da protrombina em homozigose.

Entre os pacientes avaliados, a mutação C677T no gene da MTHFR foi detectada em 43 (44,3%) indivíduos, sendo 35 (36,1%) heterozigotos e 8 (8,2%) homozigotos. Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências detectadas para a mutação C677T em heterozigose ou homozigose entre pacientes e controles (heterozigoto: 36,1% vs. 42,3%,  $p=0,37$  e homozigoto: 8,2% vs. 10,4%,  $p=0,69$ ).

O FVL foi detectado em cinco pacientes, uma frequência significativamente elevada (tabela 2) em relação ao grupo-controle (5,2% vs. 1,0%), correspondendo à *odds ratio* de 5,41 (intervalo de confiança de 95%: 0,91 – 41,05,  $p=0,04$ ).

A mutação no gene da protrombina foi detectada em heterozigose em 2 (2,1%) pacientes (tabela 3). Foi observado um valor *odds ratio* de 4,2 que, no entanto, não foi significativo para o valor de  $p$ , quando comparados pacientes e grupo-controle (2,1% vs. 0,5%,  $p=0,25$ ).



Na tabela 4 estão apresentados os resultados referentes às frequências dos polimorfismos no gene da ApoE em 97 pacientes em estudo, bem como entre 201 indivíduos do grupo-controle.

