

## **INTRODUÇÃO**

As alterações vasculares estão intimamente relacionadas a distúrbios da fisiologia natural do corpo, podendo culminar com a ocorrência de processos hemorrágicos ou de obstrução vascular, devido à formação de trombos. A ocorrência de trombos resulta de um estado de hipercoagulabilidade, devido a fatores adquiridos, genéticos ou a interação entre ambos. Assim anormalidades genéticas, em associação com fatores adquiridos, que comprometam a produção, atividade, biodisponibilidade ou o metabolismo de fatores específicos podem alterar o balanço fisiológico e predispor a eventos tromboembólicos e aterotrombóticos precoces. Tais interações podem levar à obstrução vascular arterial manifestando-se como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e periféricas. Tais manifestações se agravam devido à progressão de lesões, processos inflamatórios e ativação da coagulação sanguínea. Dentre os fatores de risco adquiridos mais frequentes para trombose arterial destacam-se o tabagismo, as dislipidemias, a obesidade, o diabetes mellitus e a hipertensão. Dentre os fatores genéticos, o fator V Leiden (FVL) e as mutações nos genes da protrombina e da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) têm sido bem estudados.

Vários outros marcadores têm sido relacionados aos eventos trombóticos, dentre estes, os polimorfismos nos genes da Apolipoproteína E (ApoE), inibidor de ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e polimorfismos nos genes do sistema ABO. Alterações no perfil lipídico e de apolipoproteínas têm sido associados às variantes da ApoE, devido a interações dos alelos  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  e  $\epsilon_4$ . Alterações relevantes também têm sido atribuídas ao polimorfismo 4G5G e G844A na região promotora do gene do PAI-1.

No Brasil alguns estudos têm avaliado essas alterações genéticas em relação à trombose, principalmente o FVL, MTHFR e a mutação no gene da protrombina, e são mais escassos os relatos sobre ApoE, PAI-1 e sistema sanguíneo ABO. A maioria destes estudos associa tais alterações à trombose venosa, mas falham muitas vezes, em demonstrar associação com eventos trombóticos arteriais.

Atualmente, a investigação laboratorial das alterações que levam a um estado de hipercoagulabilidade tornou-se um instrumento importante para avaliação de pacientes com eventos trombóticos, permitindo a adoção de uma melhor conduta terapêutica e uma melhor qualidade de vida dos pacientes. A escassez de estudos conduzidos na população brasileira avaliando e associando a relação entre a ocorrência de trombose arterial e a presença de fatores genéticos, principalmente em indivíduos jovens, motivou a realização do presente estudo. Foi conduzida a análise dos fatores genéticos predisponentes à trombose arterial, em um grupo significativo de pacientes que foram encaminhados ao Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com diagnóstico confirmado

de acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial periférica (DAP), na tentativa de se obter novos conhecimentos e bases científicas que possam contribuir para um maior entendimento da associação dos fatores predisponentes à trombose em nosso meio.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

## **1.1 - Hemostasia**

A hemostasia é o processo pelo qual o organismo evita a perda sanguínea ou formação de trombos devido a uma lesão vascular. O equilíbrio natural entre os sistemas pro e anticoagulantes garantem o êxito da hemostasia e distúrbios nesse equilíbrio, devido a fatores genéticos ou adquiridos, podem resultar em hemorragias ou formação de trombos (DAHLBACK, 2000).

### **1.1.1 - Endotélio vascular**

A integridade do endotélio vascular é essencial para garantir a fluidez do sangue, prevenindo a ocorrência de hemorragias e/ou trombozes (HANDIN et al. 1995). O endotélio vascular é constituído por uma monocamada de células que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e que está em íntimo contato com o sangue. A região justaposta ao endotélio, denominada subendotélio é constituída por uma matriz extracelular composta por uma série de proteínas sintetizadas pelas células endoteliais que funcionam como proteínas adesivas, como o colágeno, laminina, fibronectina, fator de von Willebrand (Fvw) e trombospondina. As células endoteliais intactas apresentam uma superfície antitrombótica, que inibe a função plaquetária e a coagulação do sangue. Entretanto, quando estas células são lesadas ou expostas a fatores químicos específicos, passam a expressar propriedades trombogênicas. O endotélio vascular normal desempenha papel crítico na regulação do tônus vascular pela liberação de vasodilatadores como óxido nítrico (NO) e prostaciclina e vasoconstritores como a endotelina. O endotélio vascular participa efetivamente da manutenção do balanço entre a trombose e a trombólise pela liberação de substâncias antitrombóticas (NO, proteína C e sulfato de heparan), substâncias protrombóticas (fator tecidual e endotelina), substância profibrinolítica (ativador do plasminogênio tecidual, tPA) e substância antifibrinolítica (inibidor do ativador de plasminogênio 1, PAI1) (MORELLI, 2005).

A disfunção endotelial associada à aterosclerose e à presença de fatores de risco para aterosclerose aumenta o potencial para a vasoconstrição, expressão de moléculas de adesão que recrutam monócitos e outras células inflamatórias na parede arterial, resultando na promoção de um estado protrombótico e antifibrinolítico (HANDIN et al., 1995).

### 1.1.2 - Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos e não possuem núcleo. Sob circunstâncias normais, as plaquetas não aderem ao endotélio, porém, após lesão vascular, são capazes de responder rapidamente às propriedades trombogênicas das células endoteliais e aderirem à superfície lesada, em um processo mediado pela glicoproteína Ib (GpIb) que, por ação do FvW liga-se ao colágeno subendotelial. Há uma alteração conformacional das plaquetas levando à interação plaqueta-plaqueta mediada pela molécula de fibrinogênio e pelas glicoproteínas IIb/IIIa (GpIIb/IIIa), com conseqüente liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários e aumento da concentração plasmática de substâncias protrombóticas (HANDIN et al.,1995). A ativação plaquetária é modulada por agonistas que, ao se ligarem a seus receptores, desencadeiam a liberação de constituintes dos grânulos plaquetários e a síntese de novos agonistas, dentre eles o colágeno, adenosina difosfato (ADP), tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), trombina, epinefrina, serotonina, vasopressina e o fator de ativação plaquetária (PAF), amplificando o fenômeno de ativação plaquetária (MORELLI, 2005).

### 1.1.3 - Proteínas da Coagulação

O processo da coagulação sanguínea envolve uma série de proteases plasmáticas que circulam na forma inativa na corrente sanguínea, sendo quase todas sintetizadas no fígado. Após a ativação, em conseqüência da exposição do tecido vascular a um fator desencadeante, ocorre uma reação em cascata culminando com a formação de um coágulo estável de fibrina. Didaticamente, a coagulação sanguínea é dividida em duas vias, denominadas via intrínseca e via extrínseca.

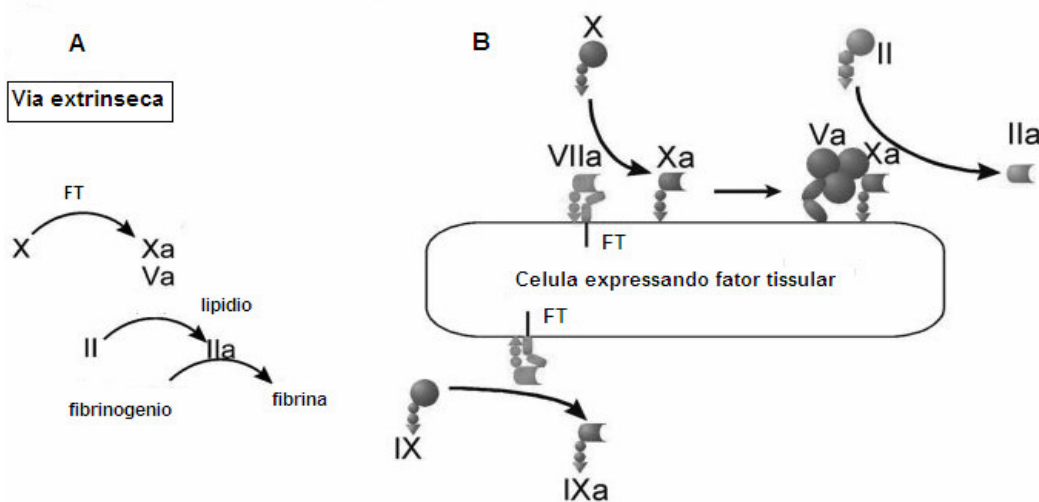
A via intrínseca, ou de contato, inicia-se com a ativação do fator XII (FXII), na presença de pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular (CAPM), após lesão vascular e exposição de colágeno subendotelial. O fator XIIa (FXIIa) ativa o fator XI (FXI), que por sua vez, ativa o fator IX (FIX). O fator IXa (FIXa), na presença do fator VIII (FVIII) e de cálcio, ativa o fator X (FX) desencadeando a geração de trombina ( na presença de fator Va e íons cálcio) e a formação de fibrina (HANDIN et al., 1995, SCAZZIOTA & ALTMAN, 1996). A via extrínseca inicia-se quando há liberação de fator tecidual (FT) pelas células de diversos tecidos, inclusive as células endoteliais. Isto pode ocorrer devido à lesão, exposição a produtos químicos, ação de citocinas ou em conseqüência a processos inflamatórios. O FT liga-se a uma serino protease, o fator VII, presente na circulação formando o complexo FT- FVII, que na presença de cálcio, ativa os

zimogênios, fatores IX e X. Quantidades reduzidas de fator Xa gera concentrações picomolares de trombina, capaz de ativar parcialmente as plaquetas e clivar os co-fatores V e VIII, gerando os fatores Va e VIIIa, respectivamente. O fator VIIIa forma um complexo com o fator IXa na superfície de membrana das plaquetas, células endoteliais e outras células e, dessa forma, ativa o fator X com eficiência 50 a 100 vezes maior que o complexo fator VIIIa-FT. O fator Xa forma com o fator Va o complexo protrombinase numa superfície de membrana, ativando primariamente a protrombina em trombina. A trombina gerada promove a amplificação de sua liberação através da ativação do fator XI, e completa a ativação das plaquetas e dos fatores V e VIII. Além disso, promove a quebra do fibrinogênio em monômeros de fibrina e a ativação do fator XIII (BUTENAS et al., 2002).

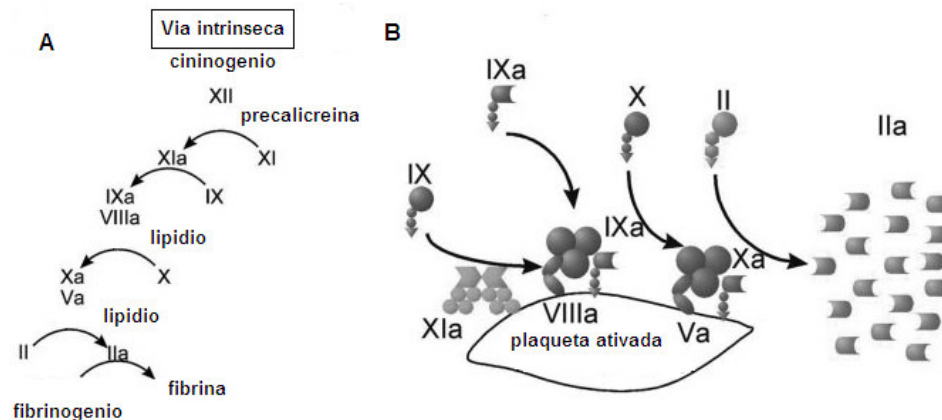
Trabalhos recentes baseados em modelos celulares propõem que a hemostasia ocorre em passos distintos, mas relacionados: iniciação, amplificação e propagação. Este processo requer a participação de dois tipos celulares – Células expressando FT e plaquetas. A fase de iniciação localiza-se nas células que expressam FT. O complexo FT-FVIIa ativa pequenas quantidades de FIX e FX. O FXa associa-se ao FVa na superfície destas células e este FX é protegido da ação de inibidores plasmáticos (inibidor da via do fator tissular-TFPI e a antitrombina-AT). Entretanto, o FIXa pode mover-se para fase fluida, aproximando-se das plaquetas ou outras superfícies celulares, pois não é inibido pelo TFPI e muito lentamente pela antitrombina (MONROE & HOFFMAN, 2006).

A pequena quantidade de trombina gerada nas células expressando FT tem várias funções. A principal é a ativação das plaquetas, além da ativação dos co-fatores V e VIII e fator FXI na superfície plaquetária, caracterizando a fase de amplificação.

A fase de propagação ocorre nas plaquetas ativadas, onde o FIXa durante a iniciação liga-se ao FVIIIa na superfície plaquetária. Ativação adicional de FIX ocorre pela ligação de FXIa às plaquetas. Uma vez que o FXa não pode mover-se efetivamente das células expressando FT para a plaqueta, este deve ser mobilizado diretamente na superfície plaquetária pelo complexo FIXa – FVIIIa. O FXa rapidamente associa-se com o FVa na superfície plaquetária e produz uma explosão na geração de trombina, o suficiente para agir sobre o fibrinogênio. A plaqueta é provavelmente o único local na qual a propagação da coagulação pode ocorrer efetivamente. A superfície plaquetária é especializada para coordenar a ligação do complexos tenase (FIXa – FVIIIa) e protrombinase (FXa – Va). Em adição, várias plaquetas podem ser recrutadas para o sítio de lesão vascular para fornecer superfície suficiente para geração de trombina em larga escala (MONROE & HOFFMAN, 2006).



**Figura 1** – A via extrínseca ocorre em células expressando fator tissular (FT). A – Deficiência destas proteínas prolongam o tempo de protrombina. B – O fator VIIa ligado ao FT ativa ambos os fatores X e IX. O FXa liga-se ao fator Va na células e converte uma pequena quantidade de protrombina em trombina. Adaptado de MONROE & HOFFMAN, 2006.



**Figura 2** – A via intrínseca ocorre nas plaquetas ativadas. A – As proteínas da via intrínseca clássica são mostrados por uma seqüência de ativação pelo cininogênio de alto peso molecular e precalicreína. Deficiência de qualquer um destes fatores prolonga o tempo de tromboplastina parcial ativada. Entretanto, a deficiência de cininogênio, precalicreína ou fator XII não está associada a tendência a hemorragias em humanos. B – Na superfície das plaquetas ativadas, o fator IXa formado nas células expressando fator tissular pode incorpora-se ao complexo tenase. Fator IXa adicional é formado pelo fator XIa ligado à plaqueta. O fator Xa formado na superfície plaquetária é incorporado ao complexo protrombinase, levando à explosão na geração de trombina. Uma vez que o fator XI é ativado na superfície plaquetária pela trombina, precalicreína, cininogênio e fator XII não são requeridos para a geração de trombina neste modelo. Adaptado de MONROE & HOFFMAN, 2006.



#### 1.1.4 - Regulação da coagulação

Durante a ativação do sistema de coagulação do sangue, diversas serinoproteases com alta capacidade pró-coagulante são seqüencialmente produzidas, culminando com a formação de um coágulo estável de fibrina. A atividade dessas proteases é regulada por um conjunto de proteínas conhecidas como anticoagulantes naturais ou inibidores fisiológicos da coagulação, cujos principais representantes são a antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S (PS) (FRANCO, 2005). Assim, alterações ou deficiências desses inibidores levam a fenômenos trombóticos. A AT parece ser a proteína mais importante, neutralizando efetivamente todas as serino proteases produzidas durante a coagulação. É o inibidor primário da trombina e também exerce efeito inibitório sobre diversas outras enzimas da coagulação, incluindo os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa, além de acelerar a dissociação do complexo fator VIIa/FT e impedir sua re-associação. A AT requer heparina para sua efetiva atividade anticoagulante (FRANCO, 2005, RODAK, 2002).

A proteína C é uma glicoproteína dependente da vitamina K, sintetizada pelo fígado, que consiste de uma cadeia leve de 155 aminoácidos acoplada a uma cadeia pesada de 304 aminoácidos por ligação dissulfídica. A PC é ativada pela trombina na superfície da célula endotelial, após sua ligação à trombosmodulina (TM). Esse processo é estimulado aproximadamente 20 vezes pelo receptor endotelial da proteína C (EPCR), que é expresso predominantemente na superfície endotelial de grandes veias e artérias. A TM é uma proteína de membrana, que é expressa em toda a vasculatura, com uma possível exceção, o cérebro. Uma vez ativada, a PC cliva e inativa os fatores Va e VIIIa em uma reação acelerada pelo seu co-fator, a PS. Em adição, a PC ativada pode estimular, via EPCR, receptores ativados por proteases ou outros receptores ainda não identificados para a modulação da função celular, resultando na atenuação de processos inflamatórios, apoptóticos e fenótipos pro-coagulantes (AIRD, 2004).

Outro inibidor natural, o TFPI, tem como principal alvo o fator Xa e o complexo fator VIIa-FT-Xa. Este é ativado quando o fator Xa reage com o complexo fator VIIa/FT. Essa ativação leva à inibição do fator VIIa. Células endoteliais normais não apresentam níveis detectáveis de FT. A elevação de FT é relatada em placas ateroscleróticas, provavelmente refletindo a secreção pelas células musculares lisas, monócitos/macrófagos e células endoteliais. Na corrente sanguínea, o TFPI existe na forma livre e também associado a lipoproteínas, sendo secretado por células endoteliais, plaquetas e monócitos. Em condições patológicas, o complexo TFPI-fator Xa e/ou fator VIIa está presente na circulação e é metabolizado principalmente no fígado. Entretanto,

outras células podem incorporar o TFPI. O TFPI atua na regulação permanente da expressão do FT na superfície celular em monócitos e fibroblastos. Devido à ativação do TFPI, o complexo fator VIIa-FT tem vida curta (KATO, 2002).

O último estágio do processo da coagulação sanguínea consiste na fibrinoformação, que se inicia após a polimerização de fibrina. A clivagem do fibrinogênio, mediada pela trombina, em fibrinopeptídeos leva à geração de monômeros de fibrina. Esses polimerizam espontaneamente em fibras de fibrina, o principal constituinte do coágulo. Os monômeros de fibrina tornam-se covalentemente ligados por ação do fator XIIIa, (ativado pela trombina). Além da ativação da fibrinólise, a trombina atua como um ativador potente da agregação plaquetária, ligando e clivando receptores ativados por proteases transmembrana, ativando dessa forma, os receptores das glicoproteínas IIb/IIIa na superfície plaquetária. O fibrinogênio contém sítios de ligação para receptores de glicoproteínas IIb/IIIa presentes na membrana das plaquetas, e por ser uma molécula dimérica, permite a adesão entre as plaquetas ativadas. Após a formação do coágulo estável de fibrina a atividade da trombina é abolida. Isso ocorre pela incorporação da trombina ao coágulo de fibrina e por sua ligação a inibidores como antitrombina, co-fator II da heparina, alfa2-macroglobulina ou inibidor da proteína C (FURLAN, 2002)

O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina é composto por diversas proteínas que regulam a geração de plasmina (produzida a partir do plasminogênio), que degrada a fibrina e ativa metaloproteinases de matriz extracelular. O sistema é ativado por serinoproteases como o tPA e ativador de plasminogênio tipo uroquinase. O tPA é secretado pelas células endoteliais e circula ligado a inibidores como o PAI-1, sendo esse secretado também pelas células endoteliais. Então, quando ocorre um trauma, a secreção de tPA excede a de PAI-1 para que ocorra a fibrinólise. Outra forma de inibição da fibrinólise é mediada pela alfa2-antiplasmina, que é uma proteína plasmática, que de modo rápido e irreversível, liga-se a plasmina livre. Um outro inibidor é o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) que inibe a fibrinólise por remover resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo. Após a degradação da fibrina, vários fragmentos são gerados, X,Y,D,E e D-Dímero (D-D). Vários desses fragmentos atuam sobre a hemostasia prevenindo agregação plaquetária e impedindo a polimerização de fibrina (RODAK, 2002).

### **1.1.5 - Eventos trombóticos arteriais e obstrução vascular**

A trombose arterial é uma desordem multifatorial, que resulta de anormalidades no sistema de coagulação, ativação de plaquetas e do endotélio vascular. O trombo consiste na formação inadequada de agregados de plaquetas e/ou coágulos de fibrina

que obstruem os vasos podendo levar à isquemia e necrose. O termo trombofilia define a predisposição à trombose devido a fatores genéticos e/ou adquiridos (RODAK, 2002).

#### **1.1.5.1 - Ocorrência de eventos trombóticos arteriais e suas manifestações**

A trombose arterial e suas manifestações clínicas representam a principal causa de morte em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. A patogênese da doença trombótica é complexa e envolve múltiplos fatores genéticos e adquiridos, relacionados à aterosclerose e trombose, bem como suas interações. Classicamente, a trombose aguda, no sítio de uma placa aterosclerótica rompida, rica em lípidos, consiste em um evento precipitante resultante da transição de uma doença aterosclerótica estável e subclínica, para um infarto agudo do miocárdio (IAM), AVC ou oclusão arterial periférica (ROSS, 1999).

A formação do trombo arterial está relacionada à progressão de lesões complexas, onde a combinação de remodelamento vascular, erosão da superfície vascular ou ruptura de placas ativam o sistema da coagulação (ROSS, 1999; LIBBY & SIMON, 2001). As plaquetas ativadas, juntamente com monócitos e macrófagos bloqueiam o endotélio impedindo a liberação normal de substâncias antitrombóticas, como o óxido nítrico e o expõem a substâncias protrombóticas, como fator tecidual. Pequenas placas se rompem obstruindo as artérias e liberando substâncias trombóticas. As plaquetas ativadas também formam um tampão arterial com um mínimo de fibrina, chamado “trombo branco”, que causa morte em torno do tecido (FRANCO, 2005). Anormalidades genéticas, que comprometam a produção, atividade, biodisponibilidade ou o metabolismo de fatores específicos podem alterar o balanço fisiológico e predispor aos eventos tromboembólicos e aterotrombóticos prematuros.

#### **1.1.5.2 - Eventos trombóticos arteriais e aterosclerose**

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica resultante de lesão vascular, deposição lipídica, ativação e proliferação de macrófagos, células musculares lisas e plaquetas. Durante a fase inicial da aterosclerose, a trombose é infreqüente. Contudo, com a evolução do processo, a formação de fissuras ou a ulceração da placa aterosclerótica expõe substâncias altamente trombogênicas. Isso ocorre nas placas com uma fina camada fibrosa e com uma grande quantidade lipídica, e naquelas com uma grande concentração de fator tissular. Segue-se então a adesão de plaquetas e o rápido

crescimento do trombo, alterando desfavoravelmente o fluxo sanguíneo (FRANCO, 2005).

A aterosclerose, como uma doença multifatorial, é consequência de muitos anos de exposição às influências aterogênicas, que levam às lesões vasculares prematuras. Sob a influência de fatores relacionados à idade e sexo, estas lesões avançam e este processo é acelerado por determinantes genéticos, como Fator V Leiden, e adquiridos, incluindo tabagismo e dieta (LUSIS, 2000, LUSHER et al., 2003). Na maioria dos pacientes, complicações aterotrombóticas desenvolvem-se a partir de aterosclerose em uma ou mais artérias coronarianas, cerebrovasculares ou periféricas (ROSS, 1999; LIBBY, 1998). O IAM e o AVC podem consistir na primeira manifestação da aterosclerose. Possíveis causas da disfunção endotelial que levam a aterosclerose incluem dislipidemias, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, alterações genéticas, hiperhomocisteinemia, estados de hipercoagulabilidade e combinação desses fatores (TOUSOULIS et al., 2003). A influência dos diferentes fatores sobre a aterosclerose não é uniforme, de forma que a dislipidemia favorece preferencialmente a evolução de cardiopatia isquêmica, a hipertensão, as enfermidades cerebrovasculares. Já o tabagismo e diabetes mellitus, a arteriopatia periférica (ESC, 2003).

### **1.1.5.3 - Influência de lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas na patogênese dos eventos trombóticos arteriais**

Estudos prévios têm demonstrado que níveis plasmáticos elevados de triglicérides constituem um fator de risco independente para DAC e sua elevação está sendo reconhecida como um marcador entre condições clínicas e metabólicas associadas com risco aumentado de aterosclerose (CHANU, 1999; DAVIGNON & COHN, 1996; OOI & OOI, 1998).

A interação lípidos-proteínas dá origem a complexos moleculares de grande importância metabólica, as lipoproteínas, que são complexos macromoleculares de conformação esférica, com os ésteres de colesterol e os triglicérides inseridos na porção central, enquanto o colesterol livre, os fosfolípidos e as proteínas estão dispostos na porção periférica. As lipoproteínas têm como finalidade primordial transportar e distribuir os componentes lipídicos para as células periféricas (GIANNINI, 1998).

Quatro classes maiores de lipoproteínas plasmáticas foram descritas (NELSON & COX, 2002): quilomicrons (QM), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), e duas

classes menores, lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína(a) ou Lp(a).

A VLDL é uma lipoproteína de densidade muito baixa, partícula menor que os quilomicrons, rica em triglicérides endógenos e, quando presentes em excesso no plasma, causam turvação. Os triglicérides são de origem endógena, principalmente hepática, e constituem cerca de 50% da partícula. O restante de sua composição são proteínas (apolipoproteínas B, E e C). O tamanho da partícula varia amplamente com a variação concomitante da composição química (CORVILAIN, 1997).

A LDL é uma lipoproteína de baixa densidade que resulta da transformação metabólica das VLDL. A LDL contém cerca de 25% de proteínas, principalmente sob a forma de apolipoproteína B (NELSON & COX, 2002), sendo que a maior parte do colesterol encontra-se esterificada e constitui 50% da partícula. Foram identificadas subfrações de LDL as quais diferem no tamanho e na composição química. A LDL transporta o colesterol do fígado para as células periféricas. O aumento de LDL-colesterol no plasma leva à sua oxidação e posterior captação dessa fração pelos macrófagos. Na parede endotelial, a sobrecarga de colesterol nos macrófagos e nas células musculares resulta na formação de células espumosas, o passo inicial para a formação da placa aterosclerótica.

Estudos recentes mostraram que a LDL oxidada não é encontrada no plasma, mas está presente nas placas ateromatosas em seres humanos (WADDINGTON et al., 2003), podendo ser avaliada laboratorialmente pela detecção de auto-anticorpos para LDL oxidada, um bom marcador da oxidação da LDL (BUI et al., 1996) Após a identificação da LDL como a mais importante lipoproteína aterogênica, o controle de seus níveis plasmáticos passou a ser o principal objetivo da terapêutica das dislipidemias (SBC, 2001).

A HDL é uma lipoproteína de alta densidade, constituída de 50% de proteína, 20% de colesterol, principalmente na forma esterificada, 30% de fosfolípidos e somente traços de triglicérides (BREWER & RADER, 1991). O transporte reverso do colesterol, dos tecidos para o fígado, é feito pela HDL, lipoproteína considerada importante fator anti-aterogênico. A principal apolipoproteína da HDL é a ApoA, com cerca de 65% de ApoA-I e de 10 a 20% de ApoA-II (MARTINEZ, 2003).

Atualmente, já está bem estabelecido que a Lp(a), uma variante genética da LDL, apresenta uma composição lipídica similar à da LDL, quantitativamente em menor concentração, e difere no conteúdo protéico, uma vez que a Lp(a) apresenta a apolipoproteína(a) ou apo(a) ligada à apolipoproteína B por pontes dissulfeto (UTERMANN, 1989; HAJJAR & NACHMAN, 1996; PATI & PATI, 2000; KOSCHINSKY,

2004). A apo(a) é sintetizada no fígado e a ligação com a apoB pode ocorrer tanto no espaço intracelular ou extracelular, dependendo do estado metabólico do indivíduo (SCANU, 1995). A Lp(a) não é produto metabólico de outras lipoproteínas contendo apo B, como a VLDL, sendo portanto sintetizada independentemente das lipoproteínas ricas em triglicérides (KREMPLE et al., 1979). Tal fato justificaria a observação de que a concentração plasmática da mesma não é influenciada pela dieta (BROWN et al., 1991). O metabolismo da Lp(a) não está completamente esclarecido, e os estudos demonstram que as variações de suas concentrações plasmáticas dependem mais da síntese do que do catabolismo desta lipoproteína (KOSCHINSKY, 2004). Os níveis plasmáticos de Lp(a) e a sua massa molecular são muito variáveis entre as pessoas, sendo determinados geneticamente (MARCOVINA et al., 2003). Contudo, certas anormalidades metabólicas podem influenciar nas concentrações circulantes de Lp(a). Estes valores podem ser aumentados como parte de uma resposta de fase aguda, no diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, câncer, menopausa e hipotireoidismo (MILIONIS et al., 2000). O aumento potencial na concentração de Lp(a) circulante como parte de uma resposta de fase aguda é de especial interesse no processo aterosclerótico, que envolve mecanismos inflamatórios, sugerindo que a concentração de Lp(a) poderia ser influenciada pela presença de doença vascular extensiva (MILIONIS et al., 2000).

Os valores de referência para os lípides plasmáticos utilizados atualmente para a população brasileira adulta foram definidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, SBC (2001), e estão representados no quadro 1.

Quadro 1 – Valores de referência dos lípides plasmáticos para indivíduos adultos

LÍPIDES	VALORES (mg/dL)	CATEGORIA
Colesterol Total	Menor que 200	Ótimo
	200-239	Limítrofe
	Maior ou igual a 240	Alto
LDL-colesterol	Menor que 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
HDL- colesterol	Maior ou igual a 190	Muito alto
	Menor que 40	Baixo
Triglicérides	Maior que 60	Alto
	Menor que 150	Ótimo
	150-200	Limítrofe
	201-499	Alto
	Maior ou igual a 500	Muito alto

## **1.2 - Trombose arterial e fatores de risco adquiridos**

### **1.2.1 - Hipertensão**

A prevalência mundial estimada da hipertensão é da ordem de 1 bilhão, sendo estimado que a hipertensão seja responsável por aproximadamente 7,1 milhões de mortes. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a pressão acima de 115 mmHg é responsável por 62% de doenças cerebrovasculares e 49% de doenças isquêmicas do coração, com uma pequena variação de sexo, constituindo um dos principais fatores de risco para morte em todo mundo (WHO, 2002).

Estudos envolvendo mais de 1 milhão de indivíduos têm indicado que a morte por doenças cardíacas ou AVC aumenta progressivamente e linearmente com os valores de pressão sanguínea acima de 115 mmHg (pressão sistólica) e 75 mmHg pressão diastólica (LEWINGTON et al., 2003)

O risco aumenta com a idade entre 40 a 89 anos. Para cada aumento de 20 mmHg na pressão sistólica ou 10 mmHg na pressão diastólica, há uma duplicação na mortalidade por doença cardíaca ou AVC. Valores entre 130 a 139/85 a 89 mmHg estão associados a um aumento superior a duas vezes no risco relativo para doenças cardiovasculares quando comparado com níveis abaixo de 120/80 mmHg (VASAN et al., 2001)

### **1.2.2 - Diabetes Mellitus**

O diabetes mellitus (DM) é um problema de saúde mundial e sua incidência tem aumentado rapidamente na população em geral, com risco bastante elevado de morbimortalidade e redução da sobrevida e da expectativa de vida (GU et al., 1998). O DM é um fator de risco importante relacionado à DAC que se caracteriza por ser mais difusa e progressiva, e tem aumentado consideravelmente nos últimos 10 anos a relação entre os pacientes diabéticos e a ocorrência de DAC (TAKAISHI et al., 2004). Além disso, a associação entre diabetes e fatores como hipertensão, obesidade, dislipidemia e quadro de hipercoagulabilidade contribui para a progressão de DAC (DE FRONZO, 1997)

Goessens et al. (2007) avaliaram a influência de fatores como o diabetes mellitus, além de outros como hipertensão, tabagismo, obesidade, em um grupo de 461 pacientes sintomáticos com doença arterial periférica e a ocorrência de eventos vasculares. Neste estudo prospectivo, AVC e IAM, além de eventos relacionados à doença arterial periférica

como cirurgia vascular, intervenções e amputações e mortalidade, foram documentadas. Fatores como idade, níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy), disfunção renal e história familiar para doenças cardíacas foram relacionados a risco aumentado em poucos eventos vasculares, enquanto houve um aumento considerável na prevalência de hipertensão, DM e obesidade em pacientes que apresentaram algum tipo de alteração vascular.

### **1.2.3 - Tabagismo**

O tabagismo é um dos mais importantes fatores de risco para doenças arteriais, principalmente doença arterial periférica. A associação é relevante para ambos os sexos e ocorre em todas as idades. Aproximadamente 90% de pacientes com doença arterial periférica têm história de tabagismo. A função endotelial, o metabolismo de lipoproteínas, a coagulação sanguínea e a função plaquetária são gravemente afetados pelo cigarro. A vasodilatação dependente do endotélio, que reflete a biodisponibilidade de óxido nítrico é prejudicada em fumantes e pode contribuir para a disfunção endotelial (CELERMAJER et al., 1993, HEITZER et al., 1996). Há também um aumento no risco de DAC, devido a polimorfismos no gene da óxido nítrico sintase endotelial, além de um estresse oxidativo aumentado (WANG et al., 1996).

O tabagismo acarreta grande prejuízo na qualidade de vida. Componentes do cigarro, incluindo o monóxido de carbono e a nicotina afetam a função das células endoteliais, aumenta a adesão, a ativação e a agregação plaquetária, causa vasoconstrição, além de favorecer a migração de células musculares lisas e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade nos macrófagos, que são reconhecidos como “*foam cells*”. Estes processos afetam todo o sistema vascular e aumenta o risco de perda de membros, bem como eventos arteriais coronarianos e cerebrovasculares agudos (JEFREY et al., 2004).

### **1.2.4 - Obesidade**

A obesidade consiste em um importante problema de saúde pública, sendo considerado pela organização mundial de saúde como uma epidemia global. A obesidade relaciona-se à hipertensão arterial, desordens cardíacas, osteoartrites, DM tipo 2 e alguns tipos de câncer. A prevalência da obesidade tem aumentado bastante, principalmente na população jovem e tende a continuar por toda a vida (GORTMAKER, et al., 1987, TROIANO et al., 1991).



A importância da obesidade na morbi-mortalidade de pessoas com eventos trombóticos arteriais foi recentemente relatada por Golledge et al. (2007) ao avaliarem a associação entre obesidade e síndrome metabólica com a gravidade e ocorrência de claudicação intermitente. Este estudo sugeriu, que além de fatores de riscos como tabagismo, hipertensão, DM, alteração do perfil lipídico e da proteína C reativa, a avaliação e tratamento da obesidade representa um fator importante nos pacientes com estes eventos vasculares. Além disso, estes autores mostraram ainda que concentrações plasmáticas de adiponectina podem ser um importante guia para avaliar a eficácia de tratamento de pacientes com claudicação intermitente e obesidade.

### **1.3 - Predisposição genética e trombose arterial**

Estados protrombóticos podem ter caráter hereditário, adquirido ou misto quando resultam das interações de fatores ambientais (uso de estrógenos, obesidade, neoplasia, cirurgia, doenças mieloproliferativas, tabagismo, etc.) com fatores genéticos predisponentes (LORENZI et al., 2003). No entanto, a relação entre a maioria dos polimorfismos genéticos e o risco para DAC, AVC e doença vascular periférica (DVP) ainda é controversa. As principais variações genéticas envolvidas na patogênese da trombose arterial, entre os fatores da coagulação são o FVL, mutações no gene da protrombina, do fibrinogênio e do FXIII. Entre os fatores do sistema fibrinolítico, destacam-se o tPA, o PAI-1 e o TAFI. Outros polimorfismos genéticos têm sido relacionados à trombose arterial, como polimorfismos no gene da ApoE e da enzima conversora de angiotensina (ECA).

#### **1.3.1 - Fator V Leiden (FVL)**

O FVL consiste na presença de uma mutação pontual no gene do fator V (localizado no cromossomo 1, região 1q21-q25). Esta corresponde a transição de uma guanina (G) para uma adenina (A) no nucleotídeo 1691, no éxon 10, acarretando a troca de uma arginina (Arg) por uma glutamina (Glu) na posição 506 da proteína (BERTINA et al., 1994). Os indivíduos portadores dessa mutação em homozigose ou heterozigose apresentam resistência à proteína C ativada (rPCa) (BERTINA et al., 1994).

O FVL está presente em diversas populações com descendência caucasiana, sendo que a prevalência na forma heterozigótica varia de 2% a 13% e é extremamente rara entre africanos, chineses, japoneses, ameríndios e povos do sul da Ásia (BERTINA, 1997). A presença da mutação apresenta uma associação positiva com

tromboembolismo venoso (TEV), sendo o risco aumentado em 6,6 vezes (SIMIONI et al., 2002).

Embora o FVL constitua um fator de risco para trombose venosa, sua associação com eventos trombóticos arteriais é controversa (LONGSTRETH et al., 1998, ROSENDAAL et al., 1997). Madonna et al. (2002) avaliaram jovens Italianos com evento trombótico arterial e encontraram uma freqüência de 5,3% para FVL. Esse valor não diferiu significativamente do obtido para indivíduos saudáveis que foi de 6,5%. Gupta et al. (2003), estudaram pacientes com DAC, no norte da Índia e não encontraram nenhum portador da mutação no gene do fator V, concluindo que não há associação entre a mutação e a ocorrência da DAC naquela população.

Em uma avaliação de pacientes com IAM, no sul da Turquia, foi encontrada uma prevalência de 6,3% e 5,2% do FVL em pacientes e no grupo-controle, respectivamente, sugerindo que esse fator não constitui um fator de risco para o desenvolvimento de IAM em pacientes com idade inferior a 55 anos (DONMEZ et al., 2004). Por outro lado, em um estudo envolvendo pacientes com IAM e controles saudáveis na Holanda, foi observado que a presença da mutação do FVL aumenta o risco para esse evento (DOGGEN et al., 1998).

Em um estudo conduzido no Brasil por Voetsch et al. (2000) em um grupo de 167 pacientes com trombose cerebral, 153 com AVC e 14 com trombose venosa cerebral (TVC), sendo 124 de origem caucasiana e 43 de origem africana, não foi verificada variação significativa que apontasse o FVL como fator de risco para AVC ou TVC.

O FVL pode estar associado a outras alterações que predispõem à trombose, incluindo a deficiência de antitrombina, de proteína C e S, a hiperhomocisteinemia e a mutação no gene da protrombina, aumentando o risco para o evento trombótico (KOELEMAN et al., 1994, RIDKER et al., 1997, TOSETTO et al., 1998; MORELLI et al. 2005). A coexistência de fatores de risco trombogênicos em muitos pacientes indica que estes eventos resultam de efeitos combinados de diferentes mecanismos patogênicos (JANSSEN et al., 2000). Godoi et al. (2002), observaram que a presença das mutações de importância em trombofilia isoladamente ou em combinação, por si só, não predispõem obrigatoriamente indivíduos jovens, assintomáticos, a um quadro de hipercoagulabilidade.

### **1.3.2 - Mutação no gene da protrombina**

A mutação 20210A no gene da protrombina consiste na transição de uma guanina (G) para uma adenina (A). Essa posição está localizada no último nucleotídeo da região

3' não traduzida do cDNA, justamente antes do sítio de fixação da cauda poli A do gene que codifica a protrombina humana. Esse gene está localizado no cromossomo 11, na região 11p11-q12, sendo organizado em 14 éxons e 13 íntrons. Essa mutação pode acarretar elevação dos níveis plasmáticos de protrombina da ordem de 30% (hiperprotrombinemia), resultando na formação aumentada de trombina e conseqüente coagulação exacerbada com risco aumentado para trombose venosa (POORT et al., 1996; LORENZI, 2003).

O mecanismo pelo qual níveis elevados de protrombina induzem trombose ainda não está bem esclarecido. A hiperprotrombinemia acentua a geração de trombina, que desempenha um importante papel na regulação da fibrinólise por catalisar a ativação do TAFI. Esse é um precursor plasmático de uma carboxipeptidase B que inibe a formação de plasmina por remover o plasminogênio ligado aos sítios de fibrina parcialmente degradada. Níveis aumentados de TAFI estão associados a risco elevado para trombose (COLCCI et al., 2004).

A mutação no gene da protrombina constitui uma desordem genética comum associada à trombose venosa, sendo encontrada em 4,6 a 8,0% dos pacientes com um primeiro episódio de trombose venosa profunda em contraste com 1 a 3% em controles saudáveis (CUMMING et al., 1997).

De Stefano et al. (2003), ao investigar a importância da mutação no gene da protrombina como fator de risco para tromboembolismo venoso, relataram um risco de 3,4 vezes maior em relação ao grupo controle. Porém, o risco de ocorrência de tromboembolismo venoso secundário, em pacientes jovens e idosos, portadores desta mutação, é mais pronunciado na presença de fatores de risco circunstanciais como uso de contraceptivos orais, gravidez, cirurgia e trauma e em pacientes com idade mais avançada.

Arruda et al. (1997), estudando pacientes portadores de trombose venosa e arterial, encontraram uma incidência de 4,3% do alelo 20210A em pacientes com trombose venosa, quando comparado a 0,7% nos controles. Houve também, uma alta prevalência do alelo mutante entre os pacientes com trombose arterial, sem fatores de risco adquiridos como hiperlipoproteinemia, hipertensão e diabetes, sendo a incidência de 5,7%, quando comparados aos controles. Foi encontrada ainda uma incidência de 2% em indivíduos descendentes de africanos, sendo esta mutação rara entre descendentes de índios. Ferrarese et al. (1998), estudando pacientes que sofreram trombose venosa e arterial, não encontraram evidências significativas que apontassem a mutação no gene da protrombina como um fator de risco para trombose arterial. No entanto, foi encontrada uma incidência de 16% entre os pacientes com trombose venosa, mostrando sua

importância como fator de risco para ocorrência desse tipo de evento. Kapur et al. (1997) encontraram uma prevalência de 19% em pacientes com trombose venosa, mas não observou incidência elevada em pacientes com trombose arterial.

Russo et al. (2001) avaliando portadores de DAC, relataram uma incidência da mutação em heterozigose de 5,3% entre os pacientes e de 3,1% entre os indivíduos controles, confirmando que a mutação G20210A não influencia a ocorrência da DAC, apesar do aumento na atividade de protrombina.

Outro aspecto importante a ser observado é que a mutação G20210A, em associação com FVL tem sido relatada como fator de risco para trombose venosa em adultos. Entretanto, os dados são limitados sobre a relevância desses fatores, bem como a concomitância com outras deficiências (proteína C e S e antitrombina), em crianças e adolescentes. Segundo Junker et al. (1999), em um estudo sobre trombofilia na infância, realizado na Alemanha, a frequência encontrada para G20210A foi de 4.2%, enquanto que para FVL foi de 31,8%, mostrando que ambas as mutações são importantes fatores de risco para trombose venosa durante a infância e adolescência.

A presença da mutação no gene da protrombina associada a outros fatores trombofílicos foi investigada no Brasil, em pacientes jovens de origem caucasiana e africana e que sofreram AVC e TVC. Entre os pacientes de origem caucasiana, com AVC, não foi detectada variação significativa em relação à frequência da mutação no gene da protrombina, bem como para o FVL e MTHFR. Já entre os descendentes de africanos, 10,3% apresentavam MTHFR em homozigose, valor esse significativo em relação ao grupo-controle. Entre os pacientes de origem caucasiana, com TVC, 20% apresentaram mutação no gene da protrombina, sendo que esta mutação não foi identificada em nenhum descendente de africano. Dentre os pacientes, as mulheres com TVC estavam em uso de contraceptivos orais ou no puerpério (VOESTCH et al., 2000). Com relação à ocorrência de embolismo pulmonar, há evidência de que a mutação no gene da protrombina por ser um fator de risco para trombose venosa é também, para embolia pulmonar, porém não está associada à embolia pulmonar isoladamente (MARGAGLIONE et al., 2000).

Em outro estudo, realizado anteriormente por Ridker et al. (1999), nos Estados Unidos, indivíduos clinicamente saudáveis foram acompanhados por dez anos, entre os quais foi avaliada a presença da mutação no gene da protrombina e ocorrência de trombose venosa e arterial. Em relação à trombose arterial, não foi evidenciado a associação entre o alelo mutante G20210A e risco para IAM ou AVC, sendo que também não foi evidenciada influência de fatores de risco cardiovasculares conhecidos como tabagismo, diabetes, hipertensão dentre outros. Por outro lado, em outro estudo realizado

no Canadá, em pacientes que sofreram IAM, a mutação estava presente em 3,2% dos pacientes e em 1% dos controles. Além disso, foi encontrada uma prevalência de FVL 3,9 vezes maior em relação aos controles, mostrando que a mutação no gene da protrombina é um fator de risco para IAM e que o FVL pode predispor a ocorrência prematura do evento (BUTT et al., 2003).

Burzotta et al. (2004), avaliaram pacientes Italianos, com idade acima de 65 anos, com episódio de síndrome coronariana aguda, em relação à presença da mutação G20210A. Foi relatado que a mutação não aumentou significativamente o risco, porém na ausência dos tradicionais fatores de risco para doenças cardiovasculares, o risco foi elevado, mostrando que a presença da mutação em heterozigose afeta o prognóstico após a primeira síndrome coronariana em pacientes sem fatores de risco adicionais.

Segundo Tirado et al. (2001), em parentes de famílias trombofílicas, a prevalência da mutação no gene da protrombina e FVL é alta, sugerindo que a avaliação para o FVL e mutação no gene da protrombina seria recomendado nestes indivíduos.

### **1.3.3 - Mutação no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)**

A mutação mais freqüente da enzima MTHFR descrita por Kang et al. (1988), resulta na troca de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 677. Essa mutação pontual leva a substituição da valina por alanina na enzima funcional, originando uma variante termolábil, com redução da atividade enzimática (MEDINA et al., 2000). Essa variante foi associada a níveis séricos diminuídos de folato, em dois pacientes, e um aumento de 8 a 15 vezes nos níveis plasmáticos de Hcy. Tanto os níveis de folato, quanto os de Hcy foram corrigidos com suplementação de ácido fólico (AF). A comparação da atividade da enzima em cultura de linfócitos, antes e após aquecimento a 46°C por 5 minutos, mostrou uma redução significativa dessa após o aquecimento. A presença dessa mutação acarreta um defeito na via de remetilação da Hcy e consiste em um dos mais freqüentes causas genéticas de elevação moderada nos níveis da Hcy. Essa elevação foi considerada como fator de risco independente para doenças cardiovasculares (UELAND et al., 1993, FROOST et al., 1995). A freqüência desta mutação e seu impacto nos níveis plasmáticos de Hcy variam bastante dentre as diferentes populações (BELKOVETS et al., 2001, CAPPuccio et al., 2002, GASPAROVIC et al., 2004).

A enzima MTHFR desempenha um papel crítico no metabolismo da Hcy por catalisar a conversão do 5,10 metilenotetrahidrofolato em 5 metiltetrahidrofolato, doador de grupo metil na remetilação da Hcy a metionina, numa via dependente de vitamina B12.

Deficiência grave de MTHFR leva a homocistinúria, um evento raro caracterizado por concentrações elevadas de Hcy no plasma e urina. Concentrações reduzidas da enzima, freqüentemente associadas à forma termolábil podem levar à hiperhomocisteinemia (HHcy), e têm sido relatadas em indivíduos com doença vascular oclusiva (BOERS et al., 1985, CLARK et al., 1991). Estudos anteriores mostraram que o aumento moderado nos níveis plasmáticos de Hcy, medidos em jejum ou 2 a 6 horas após administração de metionina está associado ao aumento de risco para DAC e que elevação na concentração de Hcy está associado à ocorrência de trombose venosa profunda (DEN HEIJER et al., 1996, D'ANGELO et al., 1997).

Vários estudos mostraram uma associação significativa entre a mutação em homozigose e a DAC, doença arterial periférica e trombose venosa. A associação da variação em homozigose com níveis baixos de folato, que predispõe os pacientes a doenças vasculares também foi observada. No que diz respeito à associação da mutação com doenças cerebrovasculares, os resultados ainda são controversos (MADONNA et al., 2002).

Numerosas mutações da MTHFR foram identificadas, sendo que a maior parte delas é rara e somente têm consequência clínica em homozigose, condição em que os pacientes apresentam quadro clínico complexo, caracterizado por deficiências neurológicas variadas, retardo psicomotor, convulsões, doença arterial prematura e tromboembolismo venoso (TEV). Em contraste com a raridade destes efeitos, as mutações 677C-T e 1298 A-G são mais prevalentes (FRANCO, 2005).

Girelli et al. (1998) estudando pacientes com DAC no norte da Itália, e sua associação com a mutação C677T na MTHFR e níveis de Hcy encontraram 15,7% de homozigotos, e 52,5% de heterozigotos. No entanto, a mutação em homozigose não foi considerado um fator de risco para DAC. Um estudo semelhante havia mostrado também que a mutação não representava um fator de risco para doenças cardiovasculares e AVC (SCHMITZ et al., 1996). Por outro lado, Gemmati et al. (1999), estudando a mutação no gene da MTHFR e sua associação com trombose venosa e doença arterial constataram que a mutação em homozigose é um fator de risco para eventos trombóticos venosos e arteriais. Casas et al., (2005), em uma metanálise verificaram um aumento no risco para AVC em indivíduos homozigotos para o alelo T, o que é consistente com a relação causal entre concentrações plasmáticas de Hcy e ocorrência de AVC.

#### **1.3.4 - Apolipoproteína E (ApoE)**

A ApoE é uma glicoproteína polimórfica, que desempenha um papel crítico na homeostase do colesterol e no catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides. O gene

da ApoE localiza-se no cromossomo 19 e codifica uma proteína de 299 aminoácidos, sendo polimórfico, consistindo de três alelos comuns ( $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  e  $\epsilon_4$ ) e seis diferentes genótipos, três homozigóticos ( $\epsilon_2/\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4/\epsilon_4$ ) e três heterozigóticos ( $\epsilon_2/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_4$ ) (DAVIGNON et al, 1988). A afinidade da ApoE pelos receptores hepáticos LRP depende deste polimorfismo, denominado "polimorfismo *HhaI*" (em referência à enzima de restrição *HhaI*, que cliva sítios específicos na região polimórfica da ApoE), que afeta a proteína tanto na sua estrutura quanto na sua função. (SCHWANKE et al., 2002)

A ocorrência destes genótipos pode explicar variações nos níveis de colesterol total em diferentes populações, como 7,0% em Caucasianos e 2,3% em Japoneses. A isoforma mais comum é a E3, diferindo das outras duas isoformas pela substituição de aminoácidos na posição 112 (cisteína por arginina) para E4 e na posição 158 (cisteína por arginina) para E2 (SIEST et al., 1995, MARTINEZ, 1997; MARGAGLIONE et al., 1998).

Os alelos da ApoE têm sido relacionados ao desenvolvimento precoce de aterosclerose, DAC isquêmica ou doenças cerebrovasculares (MARGAGLIONE et al., 1998). Comparado à isoforma E3, a isoforma E2 tem sido menos associada à VLDL e LDL, sendo mais associada à HDL e, conseqüentemente, sendo catabolisada mais lentamente. A interação específica entre a ApoE com os receptores de LDL é essencial no controle da remoção de partículas ricas em ApoE, como o VLDL, os quilomicrons remanescentes e o IDL. Como a isoforma E2 de ApoE apresenta baixa afinidade de ligação com os receptores de LDL-colesterol, aproximadamente 2% a menos que as isoformas E3 e E4. Dessa forma, as partículas lipídicas que a expressam são lentamente removidas do plasma, configurando um quadro de hiperlipoproteinemia do tipo III (BARONI et al., 2003).

A isoforma E2 tem sido associada à aterosclerose da artéria carótida, a aterotrombose, cardioembolismo e hemorragia intracerebral (KOKUBO et al., 2000). Um papel aterogênico direto dessa glicoproteína tem sido atribuído na ateromatose de membros inferiores, na ausência de dislipidemias. Apesar do mecanismo desta associação ser desconhecido, é provável que seja devido aos efeitos do alelo  $\epsilon_2$  no "clearance" de lipoproteínas ricas em triglicérides, ou seja, conseqüente ao catabolismo mais lento (FIOL et al., 1987, DE ANDRADE et al., 1995).

A isoforma E4, por sua vez, apresenta alta afinidade de ligação com os receptores de LDL, maior até que aquela observada com a isoforma E3. Como o VLDL, o IDL e os quilomicrons são removidos muito rapidamente do plasma: um mecanismo de *feedback* ativa uma resposta hepática de diminuição de expressão de receptores de LDL-colesterol, o que resulta no aumento dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol e configura

um quadro de hiperlipoproteinemia do tipo II (SIEST et al., 1995). Assim, os indivíduos com genótipos  $\epsilon_4/\epsilon_4$  e  $\epsilon_3/\epsilon_4$  apresentam níveis mais altos de LDL-colesterol e colesterol total em relação a indivíduos  $\epsilon_3/\epsilon_3$ , sendo particularmente susceptíveis ao desenvolvimento precoce de doença coronariana. Em jovens adultos, o alelo  $\epsilon_4$  em associação com outros fatores como tabagismo, aumenta a predisposição ao desenvolvimento de eventos cerebrais isquêmicos (PEZZINI et al., 2004, PEZZINI et al., 2005). A isoforma E4 está ainda relacionada à aterotrombose e hemorragia intracerebral (KOKUBO et al., 2000). Entretanto Lin et al. (2004) avaliando pacientes com doença cerebrovascular isquêmica (DCVI) concluíram que o alelo  $\epsilon_4$  não desempenha um papel importante no desenvolvimento deste evento e que o alelo  $\epsilon_2$  exerce um efeito protetor em relação ao desenvolvimento da DCVI.

Um grupo de 185 indivíduos da região de Minas Gerais, cidade de Ouro Preto apresentou uma frequência de 72% para o alelo  $\epsilon_3$ , 20% para o alelo  $\epsilon_4$  e 8% para o alelo  $\epsilon_2$ . Foi observada uma frequência aumentada do alelo  $\epsilon_4$ , bem como frequência diminuída para o alelo  $\epsilon_2$  em indivíduos dislipidêmicos, mas não foi observada diferença significativa em relação aos seis genótipos esperados. Portadores do alelo  $\epsilon_2$  apresentaram níveis diminuídos de LDL e colesterol total, quando comparados aos portadores dos alelos  $\epsilon_3$  e  $\epsilon_4$ . Nestes pacientes, o alelo  $\epsilon_2$  foi associado a um efeito protetor, enquanto o alelo  $\epsilon_4$  associado a um risco aumentado para dislipidemia (MENDES LANA, 2006).

### **1.3.5 - Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI- 1)**

O PAI-1 é uma glicoproteína de 50 KDa que pertence à superfamília das serinoproteases inibidoras. Embora existam controvérsias em relação à influência desse inibidor na DAC, admite-se que a atividade fibrinolítica reduzida, pode estar associada principalmente devido a elevação da atividade do PAI-1. O gene do PAI-1 está localizado no cromossomo 7, posição q21,3-q22. Vários polimorfismos já foram descritos nesse gene, sendo os mais comuns, uma inserção (5G)/deleção (4G) a 675 pb do início da transcrição. Em pacientes com IAM, DM não dependente de insulina e em indivíduos saudáveis, uma atividade plasmática elevada do PAI-1 tem sido encontrada entre os que apresentam o alelo 4G, comparados aos que apresentam o alelo 5G. O alelo 4G tem sido relacionado ainda a níveis de colesterol, especialmente LDL, em pacientes com DAC (SONG et al. 2000)

Os indivíduos homocigotos para a deleção (4G/4G) apresentam níveis plasmáticos de PAI-1 elevados, e os portadores da adição (5G/5G) níveis reduzidos,



enquanto indivíduos heterozigotos (4G/5G) possuem níveis intermediários (MANSFIELD et al., 1995). Por outro lado Van Goor et al., (2005), avaliando pacientes com AVC em relação aos níveis de PAI-1 e o polimorfismo 4G/5G, encontraram 50% e 47% de heterozigotos 4G/5G entre pacientes e controles, respectivamente. Encontraram ainda 27% e 29% de homozigotos 4G/4G entre pacientes e controles, respectivamente. Com estes dados concluíram que tanto o polimorfismo 4G/5G quanto níveis plasmáticos de PAI-1 não são fatores de risco para AVC.

Outro polimorfismo na região promotora do gene do PAI-1 é a substituição de guanina (G) por adenina (A) na posição de 844 pb, antes do início da transcrição (G844A), que também implica na regulação da expressão do gene (HENRY et al., 1998). Morange et al. (2000) estudaram a presença dos polimorfismos -675 4G/5G e G844A em indivíduos portadores da mutação FV Leiden, distribuídos em três grupos: os que sofreram trombose, os assintomáticos e com história familiar, e os assintomáticos e sem história familiar. A frequência do polimorfismo G844A foi estatisticamente diferente entre os três grupos ( $p= 0,048$ ), sendo o alelo A mais freqüente em indivíduos que sofreram trombose venosa (61%) em comparação aos que não sofreram (52%,  $p= 0,015$ ). Para os dois grupos de indivíduos assintomáticos não foi observada diferença. A prevalência do genótipo AA foi maior em pacientes que sofreram trombose (38%) em comparação com indivíduos assintomáticos (21%,  $p= 0,015$ ), com risco relativo de 1,74 (1,3 a 3,8). Entretanto, neste estudo, não foi observada diferença significativa entre os três grupos em relação à presença do polimorfismo 4G/5G, embora o alelo 4G tenha se apresentado mais freqüente no grupo que sofreu trombose.

Ding et al. (2006) em um estudo prospectivo em que foram avaliados 2995 indivíduos, dos quais 177 tiveram IAM e 101 AVC. Relataram a associação do alelo 4G e níveis plasmáticos elevados de PAI-1. No entanto, não evidenciaram a associação dos polimorfismos no gene do PAI-1 e o risco para IAM e AVC. Este estudo confirma dados prévios como o estudo de Jood et al. (2005), no qual foram avaliados 600 pacientes com AVC e 600 indivíduos saudáveis. Neste estudo, foram avaliados tanto o polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1 como o polimorfismo C-T no gene do tPA e suas influências nos níveis plasmáticos de ambas as proteínas. Níveis plasmáticos de PAI-1 e tPA foram independentemente associados ao evento trombótico, mas a presença do alelo 4G (PAI-1) e do alelo T (tPA) não foi associada à ocorrência de AVC. Por outro lado, dados descritos por Wiklund et al. (2005) sugerem que o genótipo do PAI-1 influencia a ocorrência de episódios futuros de AVC e que o conhecimento do genótipo 4G/5G dos indivíduos pode ter um melhor valor preditivo do que a simples avaliação dos níveis

plasmáticos de PAI-1. Além disso, sugeriram que um risco excessivo associado ao alelo 4G pode ser modificado por níveis plasmáticos de triglicérides.

Desta forma, a relação do polimorfismo 4G5G e ocorrência de AVC e DAC ainda é controversa.

### **1.3.6 – Polimorfismos no gene do Sistema Sanguíneo ABO**

Existe atualmente, mais de 250 antígenos eritrocitários que se encontram distribuídos em 29 sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com nomenclatura da Sociedade Internacional de Transfusão (ISBT). Os genes que codificam 28 dos 29 sistemas já foram clonados e seqüenciados (CASTILHO & JUNIOR, 2004). O sistema sanguíneo ABO é composto por uma série de antígenos eritrocitários, sendo estes herdados geneticamente e definidos por seqüências de aminoácidos específicos constituído por uma proteína ou por carboidratos ligados a proteínas ou lipídios (são biossintetizadas por glicosiltransferases específicas codificadas no gene ABO).

Os antígenos ABO não estão restritos apenas à membrana dos eritrócitos, podendo ser encontrados em linfócitos, plaquetas, endotélio capilar venular e arterial, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, secreções e fluidos como saliva, urina e leite (BATISSOCO et al., 2003).

O locus ABO estende-se por uma região de 18-20 kilobases (kb), na posição 9q34.1-9q34.2, consistindo de 7 exons (cujo tamanho varia entre 26-688 pares de base) e 6 introns, sendo a maior parte das enzimas codificadas pelos exons 6 e 7, que constituem 77% do gene ABO. Assim, o gene ABO tem no total 19514 pares de base (pb), contando desde o códon de iniciação até o códon terminal (BATISSOCO et al., 2003; OLSSON et al., 2001; ZAGO & COVAS, 2001). Os principais alelos do gene ABO são A1, B e O, que dão origem aos quatro grupos sanguíneos: A, B, AB e O. Entre esses alelos existe uma grande heterogeneidade genética, incluindo troca de aminoácidos na molécula de glicosiltransferase, o que resulta em diversos subgrupos.

O sistema sanguíneo ABO e mais recentemente níveis plasmáticos elevados do FvW e FVIII têm sido associados a eventos trombóticos, sendo observado uma alta freqüência de grupos sanguíneos não O em pacientes com trombose venosa e doença coronariana isquêmica. Esta interação leva em consideração que a regulação dos níveis plasmáticos do FVIII é dependente da complexação ao FvW, do grupo sanguíneo e de estímulos endoteliais. Os grupos sanguíneos não-O estão associados a níveis plasmáticos mais elevados de FVIII e FvW que o grupo sanguíneo O. Grande parte dos efeitos do grupo sanguíneo sobre os níveis plasmáticos de FVIII é mediada pelo FvW,

tendo sido identificados neste oligossacarídeos correspondentes aos antígenos do grupo A, B e O, que podem afetar o *clearance* de FvW e do complexo FvW/FVIII (KOSTER, et al., 1995; O'DONNELL et al., 1997; VAN HYLCKAMA VLIEG et al., 2000; KRAAIJENHAGEN et al., 2000; TIRADO et al., 2005; MORELLI et al., 2007).

A relação do sistema ABO e trombose venosa tem sido demonstrada em diversos estudos. Morelli et al. (2005) avaliaram o efeito do genótipo do sistema ABO e o risco de trombose venosa profunda em 471 pacientes e 471 controles. No grupo dos pacientes, todos os genótipos não-O (70,9%) exceto homocigotos  $A^2A^2$  ou heterocigotos  $A^2O^1$  /  $A^2O^2$  (7,2%) foram associados a um alto risco de trombose quando comparados com genótipo OO (29,1%). Além disso, entre os pacientes estudados, 92 (19,5%) apresentavam FVL quando comparados com 14 (3,0%) do grupo-controle. O estudo mostrou que a combinação dos genótipos dos grupos sanguíneos não-O e FVL, comparados com genótipos do grupo O sem FVL, aumenta o risco de trombose venosa em 23 vezes.

A associação entre grupo sanguíneo e trombose arterial é difícil de ser comprovada, uma vez que os níveis plasmáticos elevados de FVIII e FvW observados na trombose arterial podem refletir um processo inflamatório crônico, como o decorrente da aterosclerose, e não estarem necessariamente associados ao grupo sanguíneo (FOLSOM et al., 1993; CATTO et al., 1997). O FVIII é uma proteína de fase aguda, portanto é necessário excluir os pacientes com processos inflamatórios agudos em estudos onde se deseja correlacionar o genótipo ABO e eventos trombóticos (O'DONNELL et al., 1997). Mesmo com essa limitação, diversos estudos têm relatado uma associação entre grupo não O e risco de doença arterial tromboembólica, incluindo doença coronariana isquêmica e doença vascular periférica (GARRISON et al., 1976, LONESCU et al., 1979, WHINCUP et al., 1990, MEADE et al., 1994). Poucos estudos têm investigado a associação em doenças cerebrovasculares de origem arterial. Clark et al. (2005) avaliaram em um estudo caso controle, a frequência genotípica do grupo sanguíneo ABO (H), Lewis e Secretor e os fenótipos em pacientes com isquemia cerebral de origem arterial. Observaram uma frequência maior de grupo não O entre os pacientes quando comparados com o grupo-controle, não sendo observado diferenças fenotípicas e genotípicas em relação aos grupos Lewis/Secretor. Embora tenha demonstrado um risco moderado, os autores enfatizam a importância do conhecimento do papel do sistema sanguíneo na ocorrência deste evento, como importante meio para avaliar a ligação entre fatores como FvW, resistência à proteína C ou lípidos e doença vascular.

## **OBJETIVOS**

## **2.1 - Objetivo geral**

Avaliar e correlacionar a prevalência de fatores genéticos e adquiridos com o risco associado à trombose arterial, bem como os níveis plasmáticos de PAI-1, perfil lipídico e apolipoprotéico em um grupo de pacientes que sofreram AVC e/ou DAP, bem como em um grupo de indivíduos (controles) sem história pregressa de trombose.

## **2.2 - Objetivos específicos**

2.2.1- Identificar entre os participantes do estudo, a presença de mutações para o Fator V (G1691A), a mutação C677T no gene da MTHFR e a mutação G20210A no gene da protrombina.

2.2.3 - Detectar a frequência dos polimorfismos -675 4G/5G e G844A na região promotora do gene do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), por metodologia molecular.

2.2.4 - Correlacionar a frequência de polimorfismos (-675 4G/5G e A- 844G) na região promotora do gene do PAI-1 com os níveis plasmáticos de PAI-1.

2.2.5 - Avaliar o perfil lipídico a apolipoprotéico (ApoB e ApoA-I) e os níveis de PCR.

2.2.6 - Detectar a frequência dos polimorfismos no gene da ApoE, por metodologia molecular.

2.2.6 - Correlacionar a frequência dos polimorfismos no gene da ApoE com o perfil lipídico e apolipoproteico.

2.2.7 - Detectar a frequência dos polimorfismos no gene do sistema ABO, por metodologia molecular.