

## **DISCUSSÃO**

Sabe-se que as freqüências dos fatores genéticos e sua associação com o risco para o desenvolvimento de trombose venosa ou arterial apresentam grande variabilidade, de acordo com a origem étnica e com outros aspectos epidemiológicos dos grupos de indivíduos e populações estudadas.

Entre os 201 indivíduos que compuseram o grupo-controle, a presença da mutação C677T no gene da MTHFR em heterozigose foi observada em 71 (41,5%) e em homozigose em 17 (9,9%) indivíduos. As mutações G20210A, no gene da protrombina, e G1691A (FVL) foram observadas em heterozigose, isoladamente, em apenas um indivíduo (0,6%). Variações nas freqüências destas mutações têm sido relatadas em diferentes estudos conduzidos na população brasileira. Arruda et al. (1995) observaram uma freqüência de 2% para a mutação do FVL e 0,7% para a mutação no gene da protrombina. Voetsch et al. (2000) verificaram uma variação nas freqüências destas mutações de acordo com a origem étnica dos indivíduos. Em 119 indivíduos do grupo-controle, descendentes de caucasianos, esses autores verificaram uma freqüência de 5,8% para o FVL e 2,5% para a mutação no gene da protrombina. A mutação no gene da MTHFR apresentou uma freqüência de 47,8% em heterozigose e de 11,8% em homozigose. Em descendentes de africanos, foram encontradas freqüências de 0,9% para o FVL, 1,9% para a protrombina, 1,9% para MTHFR em homozigose e 40,6% em heterozigose.

Cumprе ressaltar que no presente estudo, os pacientes ou os indivíduos do grupo-controle não foram avaliados de acordo com a origem étnica. Os pacientes foram, em sua maioria, oriundos de uma mesma região geográfica (Região Central do Estado de Minas Gerais). Assim, optou-se por selecionar para compor o grupo controle indivíduos provenientes dessa mesma região geográfica, aplicando-se para essa seleção os critérios de inclusão e exclusão descritos na seção de material e métodos. Tal conduta justifica-se pelo fato que, em nosso meio, torna-se difícil e imprecisa a categorização dos pacientes em relação à origem étnica, uma vez que os brasileiros formam uma das populações mais heterogêneas do mundo, como resultado de cinco séculos de cruzamentos interraciais entre pessoas de três continentes: colonizadores europeus, principalmente portugueses, escravos africanos e ameríndios nativos. Parra et al. (2003), avaliando a ascendência africana na população brasileira empregando marcadores alelo-específicos, encontraram freqüências similares desses marcadores, especialmente no Estado de Minas Gerais, em brasileiros com características morfológicas comumente usadas para definir indivíduos de origem européia, africana ou ameríndia, tais como cor da pele, tipo de cabelo, etc. Estes dados mostram claramente a dificuldade de se comparar, em

indivíduos da população brasileira, caracteres morfológicos classicamente vinculados às diferenças étnicas, como cor da pele, e que são usados para classificação de indivíduos como brancos, caucasianos, europeus, negros e africanos, em diversos estudos científicos e na literatura médica.

Entre os pacientes deste estudo, a presença da mutação C677T no gene da MTHFR em heterozigose foi observada em 35 (36,1%) indivíduos e em homozigose em oito (8,2%). A mutação G20210A no gene da protrombina foi observada em heterozigose em dois (2,1%) pacientes e a mutação G1691A no FV em cinco (5,2%) pacientes. A frequência do FVL entre os pacientes foi significativa e, quando esses foram separados de acordo com o sítio anatômico de ocorrência do evento trombótico arterial, uma frequência maior foi observada entre os pacientes com AVC (odds ratio 9,05,  $p= 0,01$ ), em relação aos pacientes com DAP (OR 2,07,  $p= 0,48$ ).

A prevalência do FVL em heterozigose varia de 2 a 13%, sendo extremamente raro entre africanos, chineses, japoneses, ameríndios e povos do sul da Ásia (BERTINA, 1997). O FVL tem sido descrito como a alteração genética mais frequentemente associado à trombose venosa em diversas populações com descendência caucasiana, aumentando o risco de ocorrência do evento em 6,6 vezes (SIMIONI et al., 2002), porém sua associação com trombose arterial ainda permanece controversa (ROSENDAL et al., 1997, SABINO et al., 2006).

Em estudo conduzido no Brasil, Voetsch et al. (2000), observaram uma frequência de 4,4% para o FVL. No entanto, não foi detectada associação do FVL e risco para trombose arterial em pacientes de origem caucasiana e africana, com AVC. Dados semelhantes foram relatados por Irani-Hakime et al. (2001), no Líbano, por Juul et al. (2002) ao avaliar pacientes com IAM e AVC, por Madonna et al. (2002) ao avaliar jovens Italianos com evento trombótico arterial, ou por Gupta et al. (2003), ao estudar pacientes com DAC, no norte da Índia, por Donmez et al. (2004), no sul da Turquia e, finalmente, por Almawi et al. (2004), na população Árabe. Por outro lado, Kim et al. (2003), em uma meta-análise de estudos publicados, verificaram que fatores genéticos, inclusive FVL, aumentam o risco para AVC e IAM, principalmente entre pacientes jovens e mulheres.

Como pode ser observado, há controvérsias quanto à importância do FVL no desencadeamento do quadro de trombose arterial. Neste estudo, o FVL foi relacionado à trombose arterial, particularmente ao AVC. A diferença observada entre os resultados deste estudo e aqueles em que não foi detectada diferença significativa em relação à frequência do FVL pode ser, possivelmente, explicada pelas diferenças no delineamento experimental e nas características dos grupos de pacientes avaliados. Um aspecto a ser

ressaltado é que os pacientes analisados neste estudo não foram selecionados com relação ao local de ocorrência do evento trombótico arterial.

Outro aspecto importante a ser considerado é que os pacientes avaliados neste estudo são pacientes muitos jovens. Sabemos que pessoas com idade acima de 40 anos possuem um risco maior de desenvolver processos vaso-oclusivos do que pessoas mais jovens, pois a idade é um importante fator de risco para a ocorrência destes eventos, já que o organismo passa por várias alterações, incluindo alterações do sistema hemostático. Essas alterações são frequentemente associadas aos hábitos de vida que são adquiridos e variam de indivíduo para indivíduo. Dessa forma, há uma grande variação na incidência de trombose de acordo com a faixa etária e com a população estudada, bem como em relação à recorrência do evento trombótico (NORDSTROM et al., 1992; KNIFFIN et al., 1994; HANSSON et al., 1997).

Outro fator que também pode explicar as freqüências aumentadas para do FVL, constitui-se no fato desses pacientes serem encaminhados para acompanhamento em um centro especializado em Hematologia para investigação mais detalhada dos fatores de risco, uma vez que são pacientes jovens e que não apresentaram, na maioria dos casos, os fatores de riscos adquiridos mais comumente associados à trombose arterial tais como hipertensão e tabagismo. Sabe-se que estenose de carótida e cardioembolismo são também importantes fatores de risco para AVC, e ainda a ocorrência de forâmen ovale patente (FOP), tem sido associado à ocorrência de AVC e é mais prevalente em pacientes jovens com AVC criptogênico do que o AVC na população em geral (FALK, 1991; MEAD & O'NEILL, 1999; FERRO, 2003). Entretanto, somente dois pacientes apresentaram oclusão de carótida e nenhum dos pacientes com AVC apresentou evidência de cardioembolismo, após a avaliação por duplex scan e avaliação eco-transtorácica. A ocorrência de trombose de caráter espontâneo ou recorrente em indivíduos jovens requerer especial atenção, a fim de que sejam detectadas alterações que mereçam tratamento adequado (LOURENÇO, 2003). Assim, esses pacientes constituíram um grupo com características distintas daqueles que são, em geral, incluídos em outros estudos e que apresentam maior incidência de fatores de risco adquiridos e idade mais avançada.

Treze pacientes com idade variando de 8 a 15 anos foram incluídos nesse estudo por apresentarem quadro de trombose arterial, sendo que oito apresentaram como manifestação o AVC. Essa observação se torna relevante à medida que essas crianças não estão, em geral, expostas aos principais fatores de riscos adquiridos associados à trombose arterial, tais como tabagismo, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, dentre outros. Doenças tromboembólicas em crianças possuem uma prevalência

menor em relação aos adultos, sendo, na maioria das vezes, causadas por cateteres intravasculares, doença auto-imune, câncer, doenças congênitas do coração e imobilização (KURNIK et al., 2003). Em crianças, além da presença de vasos sanguíneos de pequeno calibre e da utilização de cateteres, o risco aumenta quando essas possuem níveis reduzidos de AT, proteína C e proteína S (SCHMIDT et al., 1995, MASSICOTTE et al., 1998). Kurnik et al. (2003), avaliando recém nascidos na Alemanha com quadro de AVC, verificaram que recorrência de tromboembolismo sintomático não é comum em crianças, porém o risco de um evento secundário está aumentado quando doenças de base (má formação cardíaca, imobilização, mastoidite) e fatores de risco protrombóticos (deficiências de proteínas C e S, de antitrombina, FVL e mutação no gene da protrombina) estão presentes. Entretanto, nem todas as crianças com estes fatores de risco desenvolvem trombose e, por outro lado, crianças que não apresentam tais condições de risco também podem desenvolver quadro de trombose (KOSCH et al., 2000). Há então, necessidade de estar atento para outros fatores de risco genéticos que podem, nestes casos, desempenhar um importante papel.

Entre as treze crianças, após a realização de testes moleculares, não foi detectada presença de FVL ou da mutação no gene da protrombina e, apenas cinco pacientes apresentaram mutação no gene da MTHFR. Uma vez que a distribuição da mutação no gene da MTHFR entre controles e pacientes deste estudo foi semelhante, é possível que a presença de outros fatores de riscos adquiridos tenha contribuído para a ocorrência do evento trombótico. Não se podem descartar ainda as deficiências de AT, proteína C e proteína S, as quais não foram investigadas no presente estudo.

A mutação no gene da protrombina constitui uma alteração genética comum associada à TEV. É encontrada em 4,6 a 8% dos pacientes com um primeiro episódio de trombose venosa profunda em contraste com 1 a 3% em controles saudáveis (CUMMING et al., 1997). Embora vários estudos descrevam a importância da mutação no gene da protrombina como fator de risco para trombose venosa, os dados a respeito de seu papel na trombose arterial ainda geram controvérsias.

Rosendaal et al. (1998) investigando a distribuição geográfica da mutação no gene da protrombina, encontraram entre 5527 indivíduos avaliados, 111 heterozigotos para a mutação, com uma prevalência que variou de 0,7 a 4,0% entre os centros participantes do estudo (incluindo o Brasil). No sul da Europa, a prevalência foi de 3%, aproximadamente duas vezes maior do que na região norte (1,7%). A mutação foi raramente detectada entre descendentes de asiáticos e africanos.

No Brasil, Arruda et al. (1997), estudando pacientes portadores de trombose venosa e arterial, encontraram uma incidência de 4,3% do alelo G20210A em pacientes

com trombose venosa e de 0,7% no grupo-controle. Entre os pacientes com trombose arterial, sem fatores de risco associados, como hiperlipoproteinemia, hipertensão e diabetes, houve uma incidência de 5,7% da mutação, a qual foi significativa, quando comparada à frequência observada nos indivíduos controles. Foi encontrada ainda uma incidência de 2% em indivíduos descendentes de africanos.

Voetsch et al. (2000) avaliaram pacientes jovens de origem caucasiana e africana com AVC e trombose venosa cerebral (TVC). Nos descendentes caucasianos com AVC não foi observada variação significativa em relação à mutação no gene da protrombina. Nos pacientes com trombose venosa cerebral, de origem caucasiana, 20% (2 em 10) apresentaram mutação no gene da protrombina, sendo que essa não foi detectada em nenhum descendente de africano.

Ferraresi et al. (1998) não encontraram evidências significativas que apontassem a mutação no gene da protrombina como um fator de risco para trombose arterial, porém encontrou uma incidência de 16% entre os pacientes com trombose venosa, mostrando sua importância como fator de risco para ocorrência desse tipo de evento. Reuner et al. (1998) encontraram dados similares em pacientes alemães com AVC.

No presente estudo, porém, apesar do achado de uma frequência maior desta mutação nos pacientes com trombose arterial, essa não se mostrou estatisticamente significativa, sendo que os portadores dessa mutação apresentaram quadro de AVC e, quando estes foram comparados ao grupo controle, foi observado um valor de OR de 8,70. No entanto, o valor de p não foi estatisticamente significativo. Cabe ressaltar que não foram encontrados portadores da mutação entre os pacientes com DAP.

De Stefano et al. (2003), ao investigar a importância da mutação no gene da protrombina como fator de risco para trombose arterial, observaram associação entre a presença da mutação (heterozigose e homozigose) e a ocorrência de AVC. O genótipo heterozigoto foi associado a um risco de 3,8 vezes para isquemia cerebral. Porém ao investigar o possível risco de tromboembolismo venoso secundário, em pacientes jovens e idosos, portadores da mutação no gene da protrombina, foi verificado que a tendência ao evento trombótico associada à mutação no gene da protrombina é mais pronunciada na presença de fatores de risco circunstanciais como uso de contraceptivos orais, gravidez, cirurgia e trauma e em pacientes com idade mais avançada, na qual atua como um fator de risco adicional. Assim, considerando esses aspectos e o fenótipo associado, ou seja, a elevação dos níveis de protrombina, não se deve descartar a hipótese de que a presença da mutação G20210A contribua, principalmente em concomitância com outros fatores circunstanciais, como idade, uso de estrogênio, entre outros para o desencadeamento de eventos trombóticos. Estudos adicionais, em que um maior número

de fatores seja investigado simultaneamente serão úteis no esclarecimento destas questões.

Em relação à mutação no gene da MTHFR, enzima atuante no metabolismo do aminoácido homocisteína, é fato que sua frequência e seu impacto nos níveis plasmáticos de homocisteína variam bastante entre diferentes populações (BELKOVETS et al., 2001, CAPPuccio et al., 2002, GASPAROVIC et al., 2004, SABINO et al., 2007). Arruda et al. (1998) encontraram, em pacientes com trombose arterial, uma frequência de 19% de homozigotos, na ausência de fatores de risco adquiridos como hiperlipoproteinemia, hipertensão e diabetes mellitus. Esta frequência ainda permaneceu alta após exclusão de pacientes com FVL, disfibrinogenemia, deficiências de proteína C, proteína S, antitrombina e fator XII, indicando a mutação C677T como um fator de risco para trombose arterial. Ao contrário, Voetsch et al. (2000) encontraram 14.9% homozigotos em um grupo de 114 pacientes com trombose arterial, de origem caucasiana, porém valor semelhante foi encontrado em indivíduos saudáveis.

No presente estudo, frequências de 36,1% heterozigotos e 8,2 % de homozigotos foram observadas, sendo que estes valores não diferiram significativamente em relação ao grupo-controle. Esses dados indicam que, mesmo em homozigose, esta mutação não contribui para o desenvolvimento de evento trombótico arterial em indivíduos jovens de nossa população.

A elevação moderada nos níveis da homocisteína (hiperhomocisteinemia) tem sido considerada como fator de risco independente para doenças vasculares (UELAND et al., 1993, FROOST et al., 1995). Níveis de Hcy foram avaliados em uma amostra de pacientes desse estudo (n = 21), em uma etapa inicial do estudo, não tendo sido observada relação dos níveis de Hcy com a ocorrência de AVC. Estes dados foram concordantes com avaliações em outros pacientes com eventos arteriais conduzidas em nosso laboratório (MOREIRA, 2008). Apesar de ser observado também níveis elevados de Hcy em alguns pacientes, após ajuste em relação a idade, sexo, colesterol total, diabetes e tabagismo nenhuma diferença foi observada (dados não apresentados), optando-se dessa forma por não realizar avaliação desse parâmetro em todos os pacientes com AVC ou DAP desse estudo.

Em conjunto, estes dados sugerem que é limitada a relevância da investigação isolada da mutação C677T em pacientes com trombose arterial. Talvez essa análise se justifique apenas nos pacientes que apresentam níveis plasmáticos de Hcy aumentados. Cumpre ressaltar, no entanto, que outras mutações nos genes envolvidos no metabolismo da homocisteína ou deficiências vitamínicas podem estar presentes e contribuir para o aumento dos níveis plasmáticos de Hcy.

Entretanto, ainda é controverso se a administração de vitaminas e folatos promovem alterações significativas nos níveis Hcy. Embora grandes estudos tenham mostrado que a suplementação com vitaminas esteja associada com diminuição moderada dos níveis de Hcy, não foi demonstrado efeito significativo na diminuição dos riscos para doenças vasculares, permanecendo controverso se o diagnóstico e tratamento para redução de níveis elevados de Hcy para pacientes com AVC e DAP são benéficos para prevenir a ocorrência destes processos ateroscleróticos (TOOLE et al., 2004, SPENCE et al., 2005).

Recentes estudos têm mostrado que eventos trombóticos venosos e arteriais compartilham fatores de risco comuns, incluindo idade, obesidade, tabagismo, diabetes mellitus, hipertensão arterial, hiperlipidemia e síndrome metabólica, sendo que a natureza dessa associação ainda não está completamente esclarecida. Esta associação tem sido observada principalmente em pacientes com tromboembolismo venoso de origem desconhecida (PRANDONI, 2006; PRANDONI, 2007). Dessa forma, considerando o caráter multifatorial e multigênico de ocorrência de eventos trombóticos, além dos fatores clássicos para trombose (FVL, PT, MTHFR) discutidos acima, foi investigada a possível relação dos polimorfismos no sistema sanguíneo ABO e a ocorrência de AVC e DAP.

A relação entre sistema sanguíneo ABO e ocorrência de trombose venosa tem sido demonstrada em diversos estudos (JICK et al., 1969; WAUTRECH et al., 1998; ROBINSON et al., 1980; SCHLEEF et al., 2004; LARSEN et al., 2005, MORELLI et al., 2005; TIRADO et al., 2005), mas a sua associação com trombose arterial tem sido menos investigada.

Grande parte dos efeitos do grupo sanguíneo sobre os níveis plasmáticos de FVIII é mediada pelo FvW, tendo sido identificados nesse fator oligossacarídeos correspondentes aos antígenos do grupo A, B e O, que podem afetar o “clearance” de FvW e do complexo FvW/FVIII. Indivíduos do grupo AB tem altos níveis de FvW, enquanto AA, AO, BB e BO têm níveis intermediários (GIL et al., 1987, SHIMA et al., 1995, SOUTO et al., 2000). Estudos prospectivos avaliando mais de 14.000 indivíduos mostraram associação entre os níveis aumentados de FVIII e FvW e ocorrência de AVC e ainda associação de FvW e mortalidade em pacientes que tinham sofrido previamente AVC (CATTO et al., 1997, FOLSOM et al., 1999). Embora estudos tenham tentado demonstrar a relação entre FvW e FVIII e a trombogênese arterial e se esta associação é grupo sanguíneo dependente, essa associação é difícil de ser comprovada, principalmente devido ao fato que níveis plasmáticos elevados de FVIII e FvW observados na trombose arterial podem refletir o processo inflamatório crônico, como o decorrente da aterosclerose e não estarem, necessariamente, associados ao grupo



sanguíneo (FOLSOM et al., 1993; CATTO et al., 1997). Além disso, os níveis plasmáticos do FVIII, podem sofrer influencia de outros fatores como a presença de polimorfismos nos genes do FvW, e da ADAMTS 13, uma metaloprotease, que cliva grandes multímeros do FvW, que são trombogênicos, prevenindo a agregação plaquetária e, conseqüentemente, afetando a homeostase do FvW e FVIII (DONG et al., 2003, WHITELOCK et al., 2004).

Meade et al. (1994) demonstraram associação de FVIII e doença coronariana isquêmica, mesmo após ajuste para o grupo sanguíneo e Jager et al. (1999) relataram a associação entre níveis elevados de FvW e mortalidade por doença cardiovascular, independente do grupo sanguíneo, em indivíduos diabéticos e não diabéticos. Estes dados mostram que níveis plasmáticos elevados de FVIII e FvW aumentam o risco para trombose arterial, no entanto, a contribuição dos grupos sanguíneos para esse aspecto ainda não está completamente esclarecida. Assim, a avaliação genética dos alelos do sistema ABO pode ser útil para elucidar a participação dos grupos sanguíneos como fatores de risco independentes para doenças trombóticas arteriais, uma vez que o genótipo não é alterado por fatores circunstanciais, como são os níveis plasmáticos de FVIII.

No presente estudo, entre os indivíduos do grupo controle foi observada uma freqüência maior de genótipo e alelo O. O grupo sanguíneo O e o genótipo O1O1 são mais comuns na maioria das populações. Batissoco et al. (2001) determinando as freqüências dos alelos O1 e O2 numa amostra de doadores de sangue do grupo sanguíneo O, em São Paulo, observaram em 82 doadores, 90,24% de indivíduos com genótipo O1O1, 8,53% com O1O2 e 1,22% com O2O2. Novaretti et al., (2000), investigando as freqüências fenotípicas do sistema ABO numa amostra de doadores de São Paulo, observaram uma prevalência de 49,23% para o grupo sanguíneo O, 33,71% para o grupo A, 13,93% para o grupo B e 3,13% para o grupo AB, sendo esses dados semelhantes aos valores observados no grupo-controle do presente estudo e também aos dados da população de Minas Gerais, conforme Fundação Hemominas. Assim, observa-se que o grupo sanguíneo O apresenta uma maior freqüência em nossa população, em comparação com estudos conduzidos na população européia. Ao contrário, o grupo sanguíneo A apresenta maior freqüência em indivíduos europeus (SCHLEEF et al., 2004; MORELLI et al., 2005; TIRADO et al., 2005; HILTUNEN et al., 2007).

Entre os pacientes com trombose arterial, foi observada uma freqüência elevada de grupos não O, sendo significativos os dados em relação ao grupo B (OR = 2,83, IC95 % 1,30 – 6,15, p = 0,006). Diferenças significativas também foram observadas em relação

aos alelos O1 (OR = 0,58, IC 95 % 0,39 – 0,86, p = 0,006), O2 (OR = 3,84, IC 95 % 1,54 – 9,75, p = 0,002) e B (OR = 2,58, IC 95 % 1,38 – 4,84, p = 0,002). No entanto, este mesmo perfil não foi observado quando os pacientes foram analisados isoladamente, sendo a diferença significativa observada apenas para o grupo sanguíneo B (OR 3,42, IC 95% 1,32 – 8,76, p = 0,01), entre os pacientes com DAP. Foram observadas ainda diferenças significativas em relação ao alelo O2 entre os pacientes (OR 4,00, IC 95% 1,65 – 9,82, p < 0,001).

No entanto, levando-se em consideração o padrão de heterogeneidade dos genes O e que o grupo O origina-se pela falta das glicosiltransferases, que convertem a substância H em antígenos A e B, e ainda, que oligossacarídeos semelhantes têm sido identificados no FvW, não podemos afirmar que o alelo O2 esteja associado ao aumento dos níveis de plasmáticos de FvW e FVIII e efeito na ocorrência do evento. Mas, ao contrário, esta observação pode ser justificada pela freqüência elevada entre os pacientes, do genótipo BO2. Quando se avalia a freqüência alélica de O2 somam-se os alelos do genótipo BO2, O1O2 e O2O2, levando a uma freqüência maior deste alelo entre os pacientes. No entanto, entre esses pacientes, a maioria era heterozigota para B e O2 (BO2). Assim, os valores de OR elevados para O2 podem ser atribuídos a um efeito da alta freqüência de heterozigotos BO2 e não de uma associação entre O2 e risco aumentado para trombose arterial.

Ohira et al. (2007) avaliando 492 pacientes com TEV e 1008 indivíduos controles, notaram uma prevalência maior de grupos sanguíneos não O entre pacientes do que nos controles, além de níveis aumentados de FVIII e FvW entre indivíduos do grupo sanguíneo não-O. Os grupos sanguíneos não-O foram apontados como um fator independente associado ao TEV, aumentando o risco para trombose quando associados à presença do polimorfismo FVL.

Por meio de genotipagem do sistema ABO, Schleef et al. (2004) associaram indivíduos com genótipos O1O1, O1O2 e A2O1 a um baixo risco de desenvolvimento de trombose, enquanto indivíduos com genótipos A1A1, A1B, A1O1 e BO1 foram associados a um alto risco. Foi observada uma maior freqüência dos alelos O1, O2 e A2 entre controles e dos alelos A1 e B entre os pacientes. Tal associação foi justificada pelos níveis plasmáticos aumentados do FVIII e FvW entre os indivíduos de grupo sanguíneo não-OO. Igualmente, MORELLI et al. (2005), investigando a relação dos genótipos do sistema ABO e a ocorrência de TEV, observaram que todos os genótipos não-OO, com exceção de A2A2, A2O1 e A2O2, estavam associados com um risco elevado para TEV. Além disso, verificaram que portadores dos alelos A1 e B, os quais apresentam, entre todos os alelos, níveis mais elevados de FVIII e FvW, apresentaram um risco duas vezes

maior para ocorrência do primeiro episódio de TEV em comparação com não portadores desses alelos.

Importante ressaltar ainda que, após a avaliação dos dados do presente estudo, por um modelo de regressão logística múltipla, o alelo O1 permaneceu como variável independente das outras variáveis analisadas, com valor significativo de odds ratio ajustada de OR 0,27, IC 95 0,12 – 0,57,  $p < 0,001$ .

Conforme mencionado, o grupo sanguíneo ABO e mais recentemente níveis plasmáticos elevados do fator FvW e FVIII têm sido associados a eventos trombóticos, sendo observado alta frequência de grupo não O em pacientes com trombose venosa e doença coronariana isquêmica. No entanto, uma das limitações dessa análise consistiu no número reduzido de pacientes e na excessiva estratificação dos dados (vários alelos e vários genótipos), o que na prática, diminui o poder do teste estatístico, e certamente contribuiu para que conclusões mais seguras não fossem alcançadas a partir desses resultados. Não obstante, os dados obtidos nesse estudo em relação à genotipagem do sistema ABO corroboram dados prévios da literatura que apontam para uma maior frequência de grupos não O em indivíduos com eventos trombóticos arteriais, sugerindo uma contribuição destes no desencadeamento desses eventos. Estudos que incluam um maior número de indivíduos fazem-se, portanto, necessários para melhor esclarecer a contribuição do sistema ABO na etiologia de eventos trombóticos arteriais em indivíduos da nossa população.

Na tentativa de analisar um grupo maior de pacientes com trombose arterial, foi realizada uma análise do DNA extraído de 58 pacientes provenientes do Estado do Rio de Janeiro, gentilmente cedidos pela Dra. Telma Gadelha e que tinham diagnóstico confirmado de AVC, perfazendo enfim, um total de 155 pacientes. Entre estes 57 pacientes, para os fatores clássicos para trombofilia, dados significativos foram observados apenas para mutação G20210A no gene da protrombina (OR: 21,05; IC 2,44 – 473,62;  $p < 0,001$ ), permanecendo significativo após análise em conjunto com os pacientes deste estudo. Para o FVL foi observado valor de OR: 4,97; IC 0,66 – 43,69;  $p = 0,09$ .

Em relação aos polimorfismos do sistema ABO, dados significativos foram observados em relação ao genótipo A1O1 (OR: 2,63; IC 1,32 – 5,26;  $p < 0,01$ ) e O1O1 (OR: 0,42; IC 0,21 – 0,84;  $p = 0,01$ ). A análise conjunta dos dados apontou menor predisposição em portadores do alelo O1 (OR: 0,61; IC 0,44 – 0,86;  $p < 0,01$ ) e o alelo B como um fator de risco (OR: 2,18; IC 1,24 – 3,86;  $p < 0,01$ ) e também confirmam a suspeita sobre a importância da mutação G20210A no gene da protrombina como um fator de risco (OR: 15,53; IC 1,94 – 335,60;  $p = 0,001$ ) (dados não apresentados). Assim,

foram observadas diferenças importantes na frequência desses fatores de risco entre pacientes de Minas Gerais e do Rio de Janeiro. No entanto, cumpre mencionar que esses dados devem ser analisados com cautela e, por isso, a análise dos fatores de risco desse grupo de pacientes não foi incluída como dados do presente estudo, optando-se por apresentá-los como dados a parte que podem ser observados no apêndice 3.

Para uma análise conjunta dos dados obtidos para os pacientes de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, deveria ser considerado não apenas o sítio de ocorrência do evento, mas o delineamento experimental para composição desses grupos de pacientes, os critérios de seleção adotados, incluindo idade, sexo, o local (tipo de serviço) de atendimento ao paciente. Além disso, e, talvez, principalmente, a seleção de um grupo controle adequado, considerando as diferenças regionais na composição da população de cada Estado. Tornam-se, portanto, necessários outros estudos que incluam um maior número de pacientes e indivíduos controle selecionados de forma adequada. Seria interessante também um estudo comparativo em relação às frequências dos fatores de risco trombofílicos em diferentes regiões do Brasil.

Outros marcadores moleculares avaliados neste estudo foram os polimorfismos nos genes da ApoE e do PAI-1 e sua possível associação com os níveis plasmáticos do colesterol total e frações e com níveis plasmáticos de PAI-1, respectivamente.

A ApoE é uma glicoproteína polimórfica que desempenha um papel crítico na homeostase do colesterol e no catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides. O polimorfismo é resultante da interação entre três alelos comuns ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ ) e seis diferentes genótipos, três homocigóticos ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) e três heterocigóticos ( $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ) (DAVIGNON et al, 1988). Em jovens adultos, o alelo  $\epsilon 4$  tem sido associado a fatores adquiridos como tabagismo, atuando sinergicamente e aumentando a predisposição dos indivíduos para o desenvolvimento de eventos cerebrais isquêmicos (PEZZINI et al., 2004, PEZZINI et al., 2005). Está ainda relacionado à aterosclerose e hemorragia intracerebral (KOKUBO et al., 2000).

Diversos estudos têm relatado associação entre a presença dos alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  e a ocorrência de eventos trombóticos arteriais, bem como variações nas concentrações de lípidos plasmáticos. No entanto, após a caracterização molecular de pacientes e controles, não foi observada nesse estudo diferença significativa na distribuição dos genótipos da ApoE, seja em homocigose ou em heterocigose.

Dados de frequências genótípicas semelhantes às que foram observadas no presente estudo foram descritas por Wiegman et al. (2003) ao avaliar um grupo de 450 crianças com hipercolesterolemia familiar e 2018 indivíduos do grupo controle, não encontrando diferenças significativas entre pacientes e controles para os genótipos

avaliados. Não foi observada também associação entre o alelo  $\epsilon 4$  e níveis plasmáticos do LDL colesterol, HDL colesterol ou triglicérides, sugerindo uma baixa influência dos genótipos da ApoE sobre esses parâmetros.

Cerrato et al. (2005) também relataram a não associação entre os alelos da ApoE, especificamente o alelo  $\epsilon 4$  e AVC ao avaliar um grupo de 302 pacientes italianos, com doenças cerebrovasculares isquêmicas (DCVI). Lin et al. (2004) avaliaram pacientes Taiwaneses, com o mesmo perfil e relataram a não associação entre o alelo  $\epsilon 4$  e DCVI, mas apontaram um papel protetor para o alelo  $\epsilon 2$  e ocorrência destes eventos.

Por outro lado, dados interessantes foram demonstrados por Li et al. (2003) em relação aos alelos da ApoE e fatores de riscos adquiridos, ao avaliar um grupo de pacientes hipertensos. Nestes pacientes foram observadas freqüências elevadas dos genótipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e  $\epsilon 4/\epsilon 4$  em relação ao grupo controle, além de serem observados níveis elevados de colesterol total, LDL colesterol e apolipoproteína B em relação aos portadores do alelo  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 3$ . Foi observado ainda que os portadores do alelo  $\epsilon 4$  apresentavam pressão sistólica mais alta em relação aos pacientes com o genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 3$  e  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Este estudo, e outros relatos da literatura, mostraram uma associação entre os genótipos da ApoE e hipertensão, reforçando a hipótese de que portadores do alelo  $\epsilon 4$  podem ser susceptíveis à hipertensão sistólica e ainda à aterosclerose de carótida.

Considerando os parâmetros bioquímicos avaliados nesse estudo, foram observadas diferenças significativas entre os pacientes com AVC ou DAP nos níveis de colesterol total, HDLc, LDLc, triglicérides, ApoA-I, ApoB, incluindo o índice ApoB/ApoA-I e PCR, em relação ao grupo controle. Entretanto, embora os níveis plasmáticos destes parâmetros bioquímicos estivessem aumentados em relação ao grupo controle, não houve associação entre as alterações desses parâmetros e os alelos da ApoE, mostrando que, no presente estudo, não houve influência do genótipo da ApoE a alterações de perfil lipídico e apolipoprotéico.

Na tentativa de eliminar os possíveis fatores de confusão, foi realizada uma análise por regressão logística múltipla. Após esse ajuste, considerando variáveis como sexo, idade tabagismo e hipertensão, somente HDLc, PCR, ApoA-I, ApoB e o índice ApoB/ApoA-I permaneceram com diferenças significativas para AVC e DAP. De forma similar, uma relação direta entre valores elevados do índice ApoB/ApoA-I e o risco de AVC entre pacientes do estudo AMORIS foi relatado por Walldius et al. (2006). Bathia et al. (2006) não observaram associação entre CT, LDLc, HDLc e AVC, mas relataram a importância de ApoB e o índice ApoB/ApoA-I como valor preditivo de AVC em pacientes com evento isquêmico. Os resultados obtidos sugerem que a presença de um desequilíbrio entre partículas potencialmente aterogênicas e anti-aterogênicas está

independentemente associado ao desenvolvimento de doenças aterotrombóticas em pacientes jovens com AVC e DAP e que o índice ApoB/ApoA-I representa um marcador importante destas alterações.

Cumprir mencionar que, embora tenham sido observados valores mais elevados entre pacientes do que nos indivíduos do grupo controle, os valores obtidos para o índice ApoB/ApoA-I estavam abaixo do ponto de corte proposto para homens (0.9) e mulheres (0.8), para risco de IAM, respectivamente (WALLDIUS et al., 2004). Cumprir ressaltar que nenhum dos pacientes estava sob tratamento com estatinas. Este achado pode ser atribuído ao pequeno número de indivíduos analisados, bem como aos critérios de inclusão e exclusão aplicados e ainda as características dos grupos estudados, já que pacientes e controles eram jovens e sabe-se que os valores de ApoA-I variam com o sexo e, para mulheres, gradativamente aumentam até 60 anos de idade, enquanto os valores de ApoB variam significativamente ao longo dos anos em ambos os sexos (RITCHIE et al., 2006).

Entre os pacientes com DAP, o sítio de ocorrência do evento foi heterogêneo, o que pode representar uma limitação deste estudo. Entretanto, poucos estudos tem investigado a associação entre aumento do índice ApoB/ApoA-I, oclusão de retina e DAP em membros inferiores e superiores. Powell et al. (1997) relataram que níveis aumentados de ApoB foram significativamente e independentemente associados a DAP. Da mesma forma, as alterações no metabolismo de lipoproteínas têm sido associadas à oclusão de retina (STOJAKOVIC et al., 2007).

Relatos da literatura têm associado níveis aumentados de PAI-1 com ocorrência de doença arterial coronariana, resistência à insulina, dislipidemia em adultos, bem como doenças cerebrovasculares (SONG et al. 2000). Neste estudo, foram avaliados os níveis plasmáticos do PAI-1, bem como a influência dos polimorfismos 4G/5G e G844A na região promotora do gene. Níveis aumentados de PAI-1 foram observados nos pacientes com AVC e DAP em relação ao grupo controle, todavia não foi observada associação entre o aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 e a presença do polimorfismo 4G5G.

É possível que a elevação dos níveis de PAI-1 possa ser causada por um mecanismo basal de inflamação sistêmica, como parte de um processo aterosclerótico, uma vez que foram detectadas diferenças significativas para os marcadores do perfil lipídico e apolipoproteico nesses pacientes. O PAI - 1 tem sido classificado como proteína de fase aguda e sua produção pode ser induzida por IL-1, TNF-  $\alpha$ , sendo estes associados com processo inflamatório e aterotrombose (MEDCALF, 2007).

Considerando as complexas atividades do PAI-1, suas interações e fontes, os níveis aumentados de PAI-1 observados no presente estudo poderiam ser interpretados

como um marcador importante tanto para redução da atividade fibrinolítica quanto da presença de processo inflamatório, e não como um fator de risco para AVC e DAP nestes pacientes jovens.

Foram observados também níveis aumentados de PCR entre os pacientes. Evidências recentes sugerem que a PCR pode ser não só um marcador de processo inflamatório, mas também desempenhar um papel ativo na patogênese da aterosclerose (DEVARAJ et al., 2003; CALABRO et al., 2003). Assim, as alterações nos lípidos e lipoproteínas detectadas entre os pacientes podem estar ligadas ao desenvolvimento de resposta inflamatória, favorecendo a ocorrência de eventos isquêmicos e problemas vasculares (TORRES & RIDKER, 2003; RIDKER et al., 2004). Estudos recentes estenderam estas observações a pacientes com DAP e um papel emergente tem sido associado à PCR na predição de risco secundário para DAP. (VU et al., 2005; HAUGEN et al., 2007; SHANKAR et al., 2007).

Em concordância, os níveis elevados de PCR observados entre os pacientes com AVC e DAP, em conjunto com os dados do perfil lipídico e apolipoprotéico e PAI-1 sugerem a presença entre os pacientes com AVC e DAP de um processo inflamatório. De forma similar, Rizzo et al. (2008) relataram um papel preditivo de níveis elevados de fibrinogênio e baixos níveis de HDLc no desenvolvimento de AVC e DAP, sugerindo um papel sinérgico de baixos níveis de HDLc e inflamação na progressão da doença aterosclerótica de lesões subclínicas para eventos clínicos.

Embora níveis plasmáticos elevados de PAI-1 tenham sido considerados, até recentemente, como um potencial fator de risco para AVC, devido a sua atividade antifibrinolítica, tal associação deve ser analisada com cuidado devido às complexas variações biológicas nos níveis de PAI-1, dependente dos níveis de estrogênio, lípidos e citocinas próinflamatórias (KOHLENER & GRANT, 2000). Estudos em camundongos transgênicos mostram um papel tanto como fator de risco quanto protetor do PAI-1 no desenvolvimento da doença arterial (HEYMANS et al., 1999; EITZMAN et al., 2000; STRICKLAND, 2001; LUTTUN et al., 2002; DE WAARD, 2002). Além disso, o PAI-1 é necessário para a proteção contra o tPA, que causa dano local no tecido nervoso após um AVC isquêmico (STRICKLAND, 2001).

Nenhuma associação significativa foi observada entre os níveis de PAI-1 e os alelos 4G e -844A, entre os pacientes do presente estudo. Sabe-se que a homozigose 4G4G tem sido associada a níveis aumentados de PAI-1, enquanto o genótipo 5G5G associado a níveis diminuídos e a heterozigose a níveis intermediários (DAWSON et al.; 1991, HUMPHRIES et al., 1992, ERIKSSON et al. 1995, MANSFIELD et al., 1995, MCCORMACK et al., 1966). Resultados similares a estes foram observados para G844A

(MORANGE et al, 2000). Embora estes polimorfismos tenham sido estudados extensivamente, ainda existem controvérsias sobre a associação entre o desenvolvimento de AVC e DAP e os possíveis genótipos, principalmente na população brasileira. Ressalta-se que não foram encontrados trabalhos na literatura que relatam a frequência ou a correlação destes polimorfismos com a ocorrência do evento aterotrombótico no Brasil.

Kinik et al. (2005) avaliando um grupo de crianças que tinham como fator de risco adicional a obesidade, não observaram influência do polimorfismo 4G5G no perfil lipídico e níveis de glicose, sugerindo possível efeito de outros fatores como citocinas e hormônios no aumento dos níveis de PAI-1. Dados similares foram relatados por Nowak-Göttl U et al. (2001) sugerindo que o polimorfismo PAI-1 4G5G não consiste em risco maior na etiologia de AVC isquêmico em crianças. Recentemente, Ding et al. (2006) descreveram a ausência de associação entre o alelo 4G e IAM ou AVC, embora houvesse uma associação entre o alelo 4G e os níveis de PAI -1. Por outro lado, Hoekstra et al. (2003) relataram a associação entre a atividade de PAI-1 e AVC, mas o alelo 4G foi associado à baixa predisposição para AVC. Estes achados estão de acordo com outros estudos que observaram relação similar entre o alelo 4G e risco reduzido de AVC (CATTO et al., 1997; HEIJMANS et al., 1999; ROEST et al., 2000; ELBAZ et al., 2001; ENDLER et al., 2000; HINDORFF et al., 2002; PETROVIC et al., 2003).

A regulação diferencial ou funcional do PAI-1 plasmático e tecidual pode explicar os diferentes achados para o polimorfismo 4G5G e os níveis de PAI-1 encontrados neste e em outros estudos. A produção celular local de PAI-1 e tPA e um papel definitivo desse sistema de proteases nos tecidos de animais tem sido demonstrado (NAGAI et al., 1999; CARMELIET 1997). Um processo inflamatório localizado desempenha um papel principal no processo aterosclerótico e na ruptura de placas presentes no tecido cerebral. Tem sido hipotetizado que, em sítios inflamatórios, o aumento de PAI-I está fortemente associado ao alelo 4G e que isto inibe a proteólise, resultando na estabilização da placa e aumento na neutralização de tPA, que é potencialmente neurotóxico (LIBERATORE et al., 2003). Cabe ressaltar que os níveis plasmáticos de PAI-1 podem ser modulados por diversos fatores que atuam em concomitância, sendo que esse impacto modificador não está associado ao perfil genético do indivíduo. Dessa forma, o papel dos níveis de PAI-1 e do polimorfismo 4G5G como fatores de risco para o desenvolvimento de AVC e DAP necessita ser completamente elucidado e requer estudos adicionais.

Nesse estudo, um aspecto que chama a atenção é o fato dos pacientes apresentaram faixa etária abaixo de 35 anos de idade, caracterizando um grupo diferenciado de indivíduos que apresentaram evento trombótico arterial precoce. Chama



atenção também o fato de a maioria dos pacientes não estar sob influência de fatores clássicos para a ocorrência de obstrução vascular, como hipertensão, diabetes mellitus, obesidade e tabagismo, mas que apresentaram alterações significativas relacionadas à deposição de lípidos, inflamação e hipercoagulabilidade. Dessa forma, pode-se considerar que os parâmetros bioquímicos e moleculares avaliados nesse estudo forneceram dados importantes em relação à ocorrência de eventos trombóticos arteriais em indivíduos jovens de nossa população, face ao seu caráter multifatorial.

Atualmente, avaliação clínica de indivíduos com desordens aterotrombóticas requer uma análise individualizada, assim como a avaliação de complexas interações de vários fatores adquiridos e hereditários. O conhecimento da prevalência destes fatores de risco em populações selecionadas auxilia o clínico tanto em relação ao diagnóstico quanto ao prognóstico destas manifestações. O espectro de exames coagulométricos, cromogênicos e moleculares já disponíveis em laboratórios clínicos constitui importante ferramenta para se definir a presença de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos predisponentes à trombofilia e aterosclerose.

Nesse sentido e baseado nos dados obtidos nesse estudo, algumas considerações são relevantes: a avaliação da presença de FVL e da mutação G20210A no gene da protrombina pode auxiliar na identificação de indivíduos em situações de alto risco, especialmente para o desenvolvimento de AVC (HANKEY, 2006; SABINO et al., 2006); ao contrário, a genotipagem dos polimorfismos 4G5G e G844A do PAI-1 para a avaliação do risco de AVC e DAP em pacientes brasileiros jovens, não se justifica, embora os níveis aumentados de PAI -1 sejam um importante marcador dos eventos inflamatórios e ateroscleróticos nestes pacientes; em relação aos genótipos e alelos do sistema ABO, embora estudos adicionais sejam necessários, deve-se estar atento para o maior risco entre pacientes dos grupos sanguíneos não-O. É possível que, no futuro, caso sejam demonstradas diferenças de risco entre os alelos e genótipos, a genotipagem do sistema ABO possa contribuir para a composição de risco de trombose arterial de cada paciente; é importante investigar a presença de um processo inflamatório, refletido principalmente por um aumento de citocinas e proteínas pró - inflamatórias (PCR e PAI-1), além de se atentar às variações entre partículas aterogênicas e antiaterogênicas, cujo papel tem-se mostrado essencial na homeostase do colesterol, além de surgir como fator importante relacionado a processo inflamatório e risco para obstrução vascular (conforme as correlações ApoB, PCR, PAI-1 observadas).

Cabe ressaltar ainda que evidências de grandes estudos sugerem que pacientes com doenças aterotrombóticas podem se beneficiar com o tratamento com estatinas, reduzindo o risco de doenças cerebrovasculares. Há ainda evidências de que as

estatinas reduzem os níveis de PCR, independente da redução de LDLc (ENDRES, 2005, MORA & RIDKER, 2006). No entanto, ainda não está totalmente esclarecido se pacientes jovens com AVC e DAP se beneficiariam do uso de estatinas, sendo necessários estudos adicionais. Importante ressaltar que mudanças no estilo de vida e fatores como dieta e prática de exercícios físicos devem ser enfatizados para minimizar e prevenir a ocorrência destas desordens em jovens.

Além disso, os resultados obtidos no presente trabalho sinalizam para a necessidade de estudos prospectivos, envolvendo um maior número de pacientes e de controles. A investigação dos componentes dos mecanismos da anticoagulação natural, como antitrombina e as proteínas C e S, bem como a presença de anticorpos antifosfolípidos, além da relação entre o grupo sanguíneo ABO e o FvW/FVIII devem ser incluídas, visando o esclarecimento da etiologia em um maior número de casos de trombozes arteriais em nosso meio. Como oportuna complementação, o uso de marcadores de lesão endotelial, de hipercoagulabilidade/fibrinólise poderá fornecer importante informação sobre o efeito dos fatores citados, sobre o sistema hemostático.

Enfim, o presente trabalho abre novas perspectivas para futuros estudos que permitirão um conhecimento maior do papel das mutações e ou polimorfismos no desenvolvimento de trombozes, seja de natureza venosa ou arterial. Os dados obtidos corroboram amplamente o fato de que eventos trombóticos possuem causas multifatoriais, incluindo fatores de risco adquiridos e genéticos.

## **CONCLUSÕES**

- A frequência da mutação C677T foi similar nos grupos de pacientes com trombose arterial em comparação à frequência observada no grupo-controle e, portanto, não se constitui entre os pacientes do estudo um fator de risco para AVC e DAP;
- Foi detectada frequência significativamente elevada do FVL em pacientes com AVC, sugerindo este como um fator de risco importante entre pacientes com características similares aos analisados no presente estudo;
- O desequilíbrio entre as partículas antiaterogênicas ApoA-I e aterogênicas ApoB observados entre os pacientes, indicam a importância destas não somente nas doenças cardiovasculares, mas se estendendo também aos eventos cerebrovasculares e periféricos;
- Não houve associação entre os polimorfismos de PAI -1 e AVC e DAP ou entre os polimorfismos e aumento dos níveis de PAI-1, entre os pacientes avaliados;
- Não houve associação entre os polimorfismos da APOE e alterações no perfil lipídico e a ocorrência de AVC e DAP;
- O aumento nos níveis de PAI-1 e PCR sugerem a influência de um processo inflamatório como fator de risco significativo entre os pacientes do presente estudo;
- A frequência elevada de grupos sanguíneos não O entre os pacientes, sugere o envolvimento destes na patogênese da doença aterotrombótica.