

LUCIANA MOREIRA LIMA

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMOSTÁTICOS
E MOLECULARES EM INDIVÍDUOS
SUBMETIDOS À ANGIOGRAFIA CORONARIANA**

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2008**

LUCIANA MOREIRA LIMA

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMOSTÁTICOS
E MOLECULARES EM INDIVÍDUOS
SUBMETIDOS À ANGIOGRAFIA CORONARIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2008**

L732p

Lima, Luciana Moreira.

Parâmetros bioquímicos, hemostáticos e moleculares em indivíduos submetidos à angiografia coronariana / Luciana Moreira Lima. – 2008.

171 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Angiocardiografia – Teses. 2. Artérias coronárias – Radiografia – Teses. 3. Bioquímica – Teses. 4. Coronariopatias – Teses. 5. Circulação – doenças – Teses. 6. Hemostase – Teses. I. Título. II. Sousa, Marinez de Oliveira. III. Carvalho, Maria das Graças. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 616.123

Instituições Participantes

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG
Hospital Socor de Belo Horizonte

Apoio Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS que, com sua presença, me mostrou o caminho a seguir e percorreu comigo, sendo a luz que iluminava e guiava, a força que me erguia e sustentava, fazendo assim dos obstáculos um incentivo e das dificuldades a força para que este sonho se tornasse realidade.

AOS MEUS PAIS Wolney Vieira Lima e Maria Helena Moreira Lima. Vocês são os responsáveis pela minha educação desde o início. Foram os meus primeiros mestres: os professores do certo e do errado, do aprender a caminhar, da lição de amor e dignidade ao longo da vida. Mas saibam que não há ciência, não há graduação, mestrado ou doutorado que possa ensinar os valores e princípios que vocês me deixaram como herança.

À MINHA FILHA Isabella Lima Leite de Freitas. Não me dei conta, de imediato, do privilégio que me foi dado quando você nasceu. Agradeço por você estar comigo em todos os momentos, e fazer com que eu não desista. Agradeço pelo sorriso diário, pelo carinho e por cada brincadeira, tão importante para o meu descanso. Obrigada por ter estado ao meu lado nos momentos difíceis e nas horas que demonstrei total alegria com a vida acadêmica. Obrigada por continuar sendo o meu maior incentivo para trilhar este caminho e para seguir em frente, firme e confiante, no intuito de me tornar um bom exemplo.

ÀS MINHAS DUAS ORIENTADORAS Marinez de Oliveira Sousa e Maria das Graças Carvalho. Obrigada por fazerem do aprendizado não um trabalho, mas um contentamento. Por me ajudarem a descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez melhor. Obrigada por afastarem o medo das coisas que pudesse não compreender; levando-me, por fim, a compreendê-las... Por resolverem o que eu achava complicado... Por serem pessoas dignas de minha total confiança e a quem posso recorrer quando os caminhos se mostrarem difíceis... Obrigada por me convencerem de que, na ciência e na vida, podemos melhorar a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Aos médicos Dr. José Carlos Faria Garcia, Dr. Cirilo Pereira Fonseca Neto, Dr. Jamil Abdala Saad, do departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor, pela triagem dos pacientes e pelas sugestões e contribuições inestimáveis para a qualidade desta pesquisa.

A todos os funcionários do departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor, que me receberam de portas abertas e muito contribuíram durante a etapa de triagem dos indivíduos avaliados neste estudo.

Ao amigo Dr. José Ronaldo Cardoso, que não mediu esforços para me ajudar em várias etapas deste trabalho, abrindo as portas do Laboratel para a realização dos testes bioquímicos. Obrigada pela valiosa contribuição em minha vida profissional.

Aos Professores Dra. Jane Maciel Almeida Baptista, Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse e Dr. Carlos Faria Santos Amaral pela análise crítica resultante em valiosa contribuição para a finalização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, que me acolheu no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo apoio e pela convivência.

Ao Prof. Dr. Bashir A. Lwaleed, do Southampton University Hospitals NHS Trust (United Kingdom), por ter disponibilizado os conjuntos diagnósticos necessários para as dosagens do fator tissular e do inibidor da via do fator tissular, e pela valiosa contribuição na interpretação dos resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Amintas Fabiano S. Figueiredo, pela convivência e pelo trabalho de consultoria realizado em algumas etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho, por ter disponibilizado prontamente o equipamento Spectra Max-340 do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, para as leituras dos testes imunoenzimáticos.

Aos amigos da Pós-Graduação Adriano Basques Fernandes, Anna Letícia Soares e Cláudia Natália Ferreira, pelas horas de aprendizado conjunto e pela permanente troca de materiais e informações.

Ao amigo Adriano de Paula Sabino, pelo valioso auxílio nas técnicas utilizadas no Laboratório de Biologia Molecular.

Às funcionárias Eunice da Piedade e Geralda de Fátima Guerra Lages, pela amizade e respeito adquiridos durante todo este convívio e pela constante colaboração.

Ao professor Dr. Valbert Nascimento Cardoso por ter disponibilizado prontamente o freezer a -80° para estocagem das amostras de soro e plasma.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelos ensinamentos, colaboração e incentivo em benefício do meu crescimento intelectual.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG, especialmente aos professores Dr. Tasso Moraes e Santos e Dr. Márcio de Matos Coelho pelo apoio recebido.

Aos pacientes participantes da pesquisa que foram de uma atitude magnífica ao contribuírem com uma participação efetiva e preciosa para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos e cunhadas Leonardo, Ulisses, Cristiano, Adriana e Fabiana, meus fiéis amigos, pela compreensão, incentivo e presença constante durante esta caminhada; e pela dedicação inestimável aos meus pais e sobrinhos, trazendo tranquilidade para minha vida pessoal.

Ao Alberto Luciano de Moraes Gallo, grande amor, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis, pelo grande incentivo na realização dos meus sonhos, e pela convivência e companheirismo.

À família Gallo, que tive o prazer de conhecer e conviver durante algumas etapas deste trabalho.

À Eliane Nazaret de Souza e Silva, pela contribuição valiosa nos cuidados com a Isabella durante todas as etapas deste trabalho, trazendo tranquilidade e conforto para minha vida pessoal.

Aos amigos Magna Cristina de Paiva e Ismael Maximiano de Freitas Leite, pela inestimável contribuição nos cuidados com a Isabella durante as várias etapas de realização deste estudo e pela amizade.

À Profa. Dra. Ângela Maria Quintão Lana, da Escola de Veterinária da UFMG, pelo valioso auxílio na análise estatística.

À bibliotecária Maria Lúcia de Lacerda Faria, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

À Profa. Marieta Zonichenn pela revisão ortográfica dos textos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 ATEROSCLEROSE E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	5
2.2 LIPOPROTEÍNA(a).....	9
2.3 APOLIPOPROTEÍNAS A-I E B.....	12
2.4 METABOLISMO LIPÍDICO E APOLIPOPROTEÍNA E.....	16
2.5 FOSFOLIPASE A2 E PROTEÍNA C REATIVA ULTRA-SENSÍVEL.....	23
2.6 HOMOCISTEÍNA E MUTAÇÃO NA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE.....	25
2.7 HEMOSTASIA E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	27
2.8 FATOR TISSULAR E INIBIDOR DA VIA DO FATOR TISSULAR.....	33
2.9 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1 E POLIMORFISMO (-675 4G/5G).....	34
2.10 ANGIOGRAFIA CORONARIANA E GRAVIDADE DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	35
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 CASUÍSTICA.....	41
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO.....	43
4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	44
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45

4.5	MÉTODOS.....	46
4.5.1	Fatores de risco.....	46
4.5.2	Etnia.....	46
4.5.3	Angiografia coronariana.....	47
4.5.4	Parâmetros bioquímicos.....	48
4.5.5	Parâmetros hemostáticos.....	58
4.5.6	Análises genéticas.....	61
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5	RESULTADOS.....	67
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AOS FATORES DE RISCO.....	68
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AO USO DE MEDICAMENTOS.....	70
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO À ETNIA.....	71
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO ATEROMATOSE GRAVE.....	72
5.5	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMOSTÁTICOS.....	73
5.6	ANÁLISES GENÉTICAS.....	83
5.7	CORRELAÇÕES.....	86
5.8	ANÁLISE MULTIVARIADA.....	89
6	DISCUSSÃO.....	90
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	91
6.2	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E APOLIPOPROTEÍNAS.....	94
6.3	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E LIPOPROTEÍNA(a).....	97
6.4	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, ANTICORPOS Anti-LDL OXIDADA, FOSFOLIPASE A2 E PROTEÍNA C REATIVA ULTRA-SENSÍVEL.....	99
6.5	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, HOMOCISTEÍNA E MUTAÇÃO NA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE.....	104
6.6	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, FATOR TISSULAR E INIBIDOR DA VIA DO FATOR TISSULAR.....	109
6.7	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, INIBIDOR DO ATIVADOR DO	

	PLASMINOGÊNIO TIPO 1 E POLIMORFISMO (-675 4G/5G).....	112
6.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
7	CONCLUSÕES.....	118
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
	ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DO HOSPITAL SOCOR.....	147
	ANEXO 2 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DA UFMG.....	149
	ANEXO 3 – PUBLICAÇÕES DERIVADAS DA TESE.....	151
	ANEXO 4 – TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS DERIVADOS DA TESE.....	160
	ANEXO 5 – PREMIAÇÃO.....	162
	APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	164
	APÊNDICE 2 – FICHA CLÍNICA.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Risco de IAM com relação ao aumento dos valores do índice apoB/apoA-I.....	16
Tabela 2 -	Caracterização dos grupos estudados.....	43
Tabela 3 -	Número de indivíduos excluídos e critérios de exclusão aplicados.....	44
Tabela 4 -	Perfil de bandas no gel para a identificação dos alelos do gene da apo E.....	62
Tabela 5 -	Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco, parâmetros lipídicos e presença de síndrome coronariana aguda (SCA).....	69
Tabela 6 -	Caracterização dos grupos quanto ao uso de medicamentos.....	70
Tabela 7 -	Medicamentos agrupados.....	71
Tabela 8 -	Caracterização dos grupos quanto à etnia.....	72
Tabela 9 -	Caracterização do grupo ateromatose grave quanto ao número de artérias afetadas pela estenose coronariana.....	73
Tabela 10 -	Parâmetros bioquímicos e hemostáticos para os grupos estudados.....	74
Tabela 11 -	Resultados obtidos para os parâmetros lipoproteína(a) e proteína C reativa ultrasensível para os grupos estudados.....	75
Tabela 12 -	Dados referentes à dosagem de homocisteína para os grupos estudados.....	82
Tabela 13 -	Dados referentes às dosagens de fator tissular e inibidor da via do fator tissular para os grupos estudados.....	83
Tabela 14 -	Mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase.....	84
Tabela 15 -	Polimorfismo (-675 4G/5G) no gene do PAI-1.....	84
Tabela 16 -	Identificação dos genótipos da apolipoproteína E.....	85
Tabela 17 -	Frequência dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ nos grupos estudados.....	85
Tabela 18 -	Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos e hemostáticos estudados.....	87
Tabela 19 -	Correlação de Spearman entre a presença de ateromatose grave e os parâmetros estudados.....	88
Tabela 20 -	Correlação de Spearman entre a presença do polimorfismo (-675 4G/5G) e os níveis plasmáticos do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1.....	89
Tabela 21 -	Modelo final obtido com a regressão logística múltipla.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do conjunto de reações envolvidas na coagulação do sangue.....	30
Figura 2 -	Padrões de RFLP para apo E.....	62
Figura 3 -	Distribuição dos valores do índice apoB/apoA-I.....	76
Figura 4 -	Distribuição dos valores de lipoproteína(a).....	77
Figura 5 -	Distribuição dos valores de anticorpos anti-LDLoxidada.....	78
Figura 6 -	Distribuição dos valores de fosfolipase A2.....	79
Figura 7 -	Distribuição dos valores de proteína C reativa ultra-sensível.....	80
Figura 8 -	Distribuição dos valores do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA-I	Transportador de membrana ligado à adenosina trifosfato
ACAT	Acil-Coenzima A-colesterol aciltransferase
AG	Ateromatose grave
AG-1	Ateromatose grave com uma artéria apresentando estenose
AG-2	Ateromatose grave com duas artérias apresentando estenose
AG-3	Ateromatose grave com três ou mais artérias apresentando estenose
AHA	American Heart Association
ALM	Ateromatose leve/moderada
AnN	Angiograficamente normal
ANOVA	Análise de variância
Anti-LDLox	Anticorpos anti-lipoproteína de baixa densidade oxidada
Apo(a)	Apolipoproteína(a)
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Apo B	Apolipoproteína B
Apo C	Apolipoproteína C
Apo E	Apolipoproteína E
AT	Antitrombina
ATP	Adenosina trifosfato
B/E	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
CE	Colesterol esterificado
CL	Colesterol livre
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DCV	Doença cardiovascular
D-Di	Dímero D
DTNB	Ácido dinitrobenzóico
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético

ELFA	Ensaio imunoenzimático fluorescente
ELISA	Ensaio imunoenzimático
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
FPA	Fibrinopeptídeo A
F1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
HCT	Homocisteína total
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLc	Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade
HMWK	Cinogênio de alto peso molecular
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IDLc	Colesterol presente na lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corporal
KDa	Kilodaltons
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLc	Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LHTG	Lipase triglicéride hepática
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LRP	Proteína de ligação ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/L	Miligrama por litro
MTHFR	Metileno-tetra-hidrofolato redutase
mU/mL	Miliunidade por mililitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
nmol/L	Nanomol por litro
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PC	Proteína C
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PCRus	Proteína C reativa ultra-sensível
PDF	Produto de degradação da fibrina
PGI ₂	Prostaciclina
PS	Proteína S
PTCA	Angioplastia transluminal coronária percutânea
QM	Quilomícrons
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SCA	Síndrome coronariana aguda
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
sPLA2	Fosfolipase A2
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TF	Fator tissular
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TF-FVIIa	Complexo fator tissular-fator VII ativado
TG	Triglicérides
TM	Trombomodulina
t-PA	Ativador do plasminogênio tipo tecidual
u-PA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
U/mL	Unidades por mililitro
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDLc	Colesterol presente na lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	World Health Organization

RESUMO

A doença arterial coronariana (DAC) apresenta origem multifatorial, compreendendo vários processos bioquímicos envolvidos na formação e na progressão da placa de ateroma. Alterações do metabolismo lipídico, do endotélio vascular, da coagulação sangüínea ou da fibrinólise, bem como a resposta inflamatória da aterosclerose, podem ser os responsáveis diretos ou apenas estar associados à doença. O presente estudo teve como objetivo investigar as correlações entre as possíveis alterações dos perfis bioquímico e hemostático, bem como a presença de alguns polimorfismos genéticos e a gravidade da DAC em indivíduos submetidos à angiografia coronariana. Níveis plasmáticos de colesterol total, HDLc, LDLc, triglicérides, lipoproteína(a), apolipoproteínas A-I, B e E, homocisteína, anti-LDL oxidada, proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), fosfolipase A2, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator tissular (TF), inibidor da via do fator tissular (TFPI), bem como a identificação dos alelos do gene da apolipoproteína E, da mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e do polimorfismo (-675 4G/5G) no gene do PAI-1 foram determinados em amostras de sangue de 35 indivíduos angiograficamente normais (AnN), 31 indivíduos apresentando ateromatose leve/moderada (ALM) e 57 indivíduos apresentando ateromatose grave (AG). A análise univariada demonstrou que os níveis plasmáticos dos parâmetros lipoproteína(a), homocisteína, TF, anti-LDL oxidada, fosfolipase A2, PCRus e PAI-1 foram significativamente mais elevados no grupo AG quando comparado com o grupo AnN ($p < 0,05$). Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas. Na análise multivariada, apenas os parâmetros lipoproteína(a), fosfolipase A2 e PAI-1 foram associados de forma independente com a gravidade da DAC, considerando-se também os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento da doença. Foram observadas correlações significativas entre vários parâmetros estudados, inclusive entre a presença do genótipo 4G/4G e o aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1. A frequência dos alelos da apolipoproteína E e da mutação C677T na enzima MTHFR foi similar à observada em estudos prévios. Os dados obtidos com o presente estudo refletiram o caráter multifatorial da DAC nos indivíduos estudados, com o envolvimento de parâmetros bioquímicos, inflamatórios e hemostáticos no agravamento do processo aterosclerótico. Dentre todos os parâmetros avaliados, a lipoproteína(a), a fosfolipase A2 e o PAI-1 podem constituir importantes ferramentas adicionais com potencial valor para se inferir sobre a gravidade da DAC, considerando a sua associação independente com o agravamento da doença, demonstrado pela regressão logística múltipla.

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) has a multifactorial origin, including several biochemical processes involved in the formation and progression of the atheroma plaque. Alterations in lipid metabolism, vascular endothelium, blood clotting or fibrinolysis, and the inflammatory response resulting from atherosclerosis may be directly responsible or just be associated with the disease. This study aimed to investigate the correlation between possible changes in the biochemical and hemostatic profiles and the presence of some genetic polymorphisms and the severity of CAD in subjects undergoing coronary angiography. Plasma levels of total cholesterol, HDLc, LDLc, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins AI, B and E, homocysteine, anti-oxidized LDL, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), phospholipase A2, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), tissue factor (TF), and tissue factor pathway inhibitor (TFPI), as well as the identification of the alleles of the gene apolipoprotein E, the C677T mutation in the gene of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and (-675 4G/5G) polymorphism in the gene of PAI-1 were determined in blood samples from 35 angiographically normal subjects (AnN), 31 subjects presenting mild/moderate atheromatosis (ALM) and 57 showing severe atheromatosis (AG). A univariate analysis showed that plasma levels of the parameters lipoprotein(a), homocysteine, TF, anti-oxidized LDL, phospholipase A2, hs-CRP and PAI-1 were significantly higher in group AG than in the AnN group ($p < 0.05$). No significant differences were observed for the other parameters. In the multivariate analysis, only the lipoprotein(a), phospholipase A2 and PAI-1 parameters were independently associated with the severity of the CAD, also considering the classic risk factors for the development of the disease. There were significant correlations between various parameters, including the presence of the 4G/4G genotype and increased plasma levels of PAI-1. The frequency of apolipoprotein E alleles and the C677T mutation in the MTHFR enzyme was similar to that observed in previous studies. The data obtained from this study reflected the multifactorial nature of CAD in the subjects studied, with the involvement of biochemical parameters and inflammatory and hemostatic worsening of the atherosclerotic process. Among all parameters evaluated, lipoprotein(a), phospholipase A2 and PAI-1 may be important additional tools with a potential value to be inferred about the severity of the CAD, considering their independent association with the intensification of the disease, as demonstrated by the multiple logistic regression.

1 INTRODUÇÃO

A associação entre alguns parâmetros lipídicos e hemostáticos foi avaliada em indivíduos submetidos à angiografia coronariana em estudo prévio (LIMA, 2005). Nesse estudo, a média dos valores obtidos para lipoproteína(a) - Lp(a) foi estatisticamente diferente comparando-se indivíduos com ausência de ateromatose detectada pelo exame angiográfico (grupo controle) e indivíduos com diferentes graus de ateromatose coronariana. Os dados daquele estudo confirmam o papel da Lp(a) como preditor da gravidade da aterosclerose coronariana, sugerindo que os níveis plasmáticos desta lipoproteína devem ser determinados em pacientes com DAC, especialmente em indivíduos normolipêmicos, uma vez que a Lp(a) apresentou-se como um marcador de predição de gravidade da aterosclerose coronariana, independente de outras variáveis como tabagismo, hipertensão arterial, sedentarismo, história familiar e perfil lipídico em nossa população. Estes resultados estão em concordância com as orientações dos consensos americano e europeu, que classificam a Lp(a) como fator de risco emergente e independente para a doença arterial coronariana (DAC).

Os dados da literatura sobre a associação entre Lp(a) e DAC são inconsistentes entre os estudos e altamente dependentes da população avaliada. Situação similar prevalece na avaliação de outros marcadores laboratoriais envolvidos na patogênese e evolução da aterosclerose coronariana, como é o caso da homocisteína, do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e dos marcadores de processos inflamatórios.

Esta controvérsia encontrada nos estudos é provavelmente decorrente da influência exercida por diversos fatores genéticos e ambientais. Os fatores que influenciam os níveis plasmáticos de determinados marcadores são diferentes em cada população. Hábitos nutricionais e polimorfismos genéticos, estilo de vida,

diferenças étnicas e geográficas são fatores importantes que afetam as doenças de origem multifatorial, como é o caso da DAC.

Embora a triagem de indivíduos com risco de DAC realizada por dosagens de lípidos e lipoproteínas e medidas tradicionais de fatores de risco seja vantajosa do ponto de vista econômico, as relações observadas entre o maior risco de DAC e a presença de novos marcadores de risco pode apontar para futuras investigações. O alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E, a Lp(a), o índice apoB/apoA-I, a fosfolipase A2 e outros marcadores hemostáticos tais como o fator tissular e o inibidor da via do fator tissular pressagiam a introdução, talvez em um futuro próximo, de análises laboratoriais que possibilitem a determinação rotineira destes marcadores pelos laboratórios clínicos como métodos de triagem para DAC.

Após ampla revisão bibliográfica verificou-se que, até o momento, não foram conduzidos na população brasileira estudos sobre os níveis plasmáticos de fosfolipase A2, apolipoproteína E, fator tissular e inibidor da via do fator tissular em pacientes com DAC. Até mesmo os estudos envolvendo a associação entre a gravidade da DAC e os níveis plasmáticos de Lp(a), LDL oxidada e apolipoproteínas A-I e B são raros. Também não são conhecidos dados sobre a frequência do polimorfismo $-675\ 4G/5G$ na região promotora do gene do PAI-1 e sua correlação com DAC na população brasileira, composta por diferentes etnias.

O conhecimento acumulado ao longo do tempo sobre a associação entre os níveis plasmáticos dos marcadores bioquímicos e hemostáticos e a gravidade da DAC foi obtido por estudos conduzidos fora do nosso meio. Assim, acredita-se que estudos fundamentados dentro da realidade brasileira possam contribuir para a elucidação de algumas destas questões e possam apontar novas perspectivas para

a prevenção, o diagnóstico e a terapêutica, bem como novos caminhos de investigação científica.

Diante das considerações acima, acredita-se ser de grande importância a avaliação de novos marcadores bioquímicos e hemostáticos em diferentes momentos do processo evolutivo da DAC, em nosso meio. O desconhecimento do desempenho dos marcadores citados acima na DAC em nossa população e a necessidade de ampliar os conhecimentos sobre o assunto, vem motivar o presente estudo, conferindo ao mesmo ineditismo e relevância.

O aumento da incidência de doenças coronarianas, com suas conseqüências mórbidas e, freqüentemente, fatais, as controvérsias e lacunas existentes na literatura sobre o assunto e a necessidade constante de avanços no que se refere à introdução de ações preventivas e educativas de controle, além de melhoria nas medidas diagnósticas e terapêuticas, justificam o presente estudo que propõe abordar, dentre outros, os seguintes aspectos:

- qual a real contribuição dos fatores de risco convencionais para DAC em nosso meio?

- qual a contribuição de fatores de risco não convencionais para a DAC em nosso meio?

- qual a relevância dos níveis plasmáticos de marcadores de alterações nos perfis lipídico e hemostático, em relação ao agravamento da DAC?

- qual a relevância de novos marcadores de processo inflamatório, quando comparado à proteína C reativa ultra-sensível, no desenvolvimento da DAC?

- qual a freqüência e contribuição dos polimorfismos genéticos, em relação aos fatores de risco adquiridos no desenvolvimento da DAC?

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ATEROSCLEROSE E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que afeta principalmente a camada íntima das artérias de médio e grande calibre (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC, 2007). Caracteriza-se pelo acúmulo de lípidos e elementos celulares, principalmente macrófagos e células musculares lisas no espaço subendotelial das artérias. A principal hipótese sobre a origem da aterosclerose considera que esta consiste numa resposta inflamatória a diferentes formas de lesão da parede vascular (ROSS, 1999). O caráter crônico do processo inflamatório leva a formação de placas de ateroma, que podem progredir e obstruir as artérias. Até recentemente, o desenvolvimento da aterosclerose era considerado como um processo progressivo e irreversível; entretanto, novas evidências têm demonstrado que o processo de formação de placas ateroscleróticas pode desacelerar, interromper ou mesmo regredir conforme revisado por Ibanez *et al.* (2007).

O acúmulo de lipoproteínas plasmáticas no espaço subendotelial, especialmente lipoproteína de baixa densidade (LDL), parece ser um dos primeiros fenômenos que desencadeiam a proliferação das lesões ateroscleróticas. As partículas de LDL retidas no espaço subendotelial sofrem processos de oxidação e geram produtos com atividade quimiotática para os monócitos circulantes e células musculares lisas da camada média das artérias. Os monócitos são atraídos e se aderem à superfície endotelial, migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos e fagocitam as partículas de LDL oxidadas (LDL_{ox}) presentes neste espaço. A captação das partículas de LDL_{ox} é realizada através de receptores específicos na superfície dos monócitos, denominados receptores

“scavenger”, que não são submetidos a regulação (MOORE & FREEMAN, 2006). Desta forma, os macrófagos continuam a fagocitar as partículas de LDLox tornando-se repletos de lípidos, dando origem às células espumosas, responsáveis pela produção das estrias gordurosas, a lesão inicial do processo aterosclerótico.

A patogênese da aterosclerose envolve vários fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias produzidas pelas células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e linfócitos T, que regulam a resposta inflamatória e a proliferação celular (HANSSON *et al.*, 2006). O resultado da interação destes fatores é uma resposta fibroproliferativa que faz a estria gordurosa evoluir para uma placa aterosclerótica mais complexa. A proliferação das células musculares lisas e o acúmulo de proteínas da matriz extracelular, sintetizadas e secretadas por estas células apresentam um importante papel na evolução da placa aterosclerótica. O tecido conjuntivo sintetizado pelas células musculares lisas forma uma capa fibrosa, que nas lesões avançadas cobre toda a extensão da placa. As síndromes coronarianas agudas (SCA) estão mais relacionadas com a ruptura da placa do que com a progressão gradual da mesma (GARCIA-PALMIERI, 1997). A ruptura ou ulceração da placa aterosclerótica provoca a formação de trombos que podem dar origem a complicações clínicas ou contribuir para o crescimento da placa de forma assintomática. A estabilidade das placas depende da espessura e composição da capa fibrosa, formada fundamentalmente por proteínas da matriz extracelular, que são sintetizadas pelas células musculares lisas (colágeno, elastina e proteoglicanos). A ruptura da capa fibrosa expõe para o fluxo sanguíneo fatores teciduais e colágeno que induzem a agregação plaquetária e a formação de trombos.

As placas de ateroma podem afetar qualquer vaso sanguíneo, mas os principais alvos são as coronárias e os sistemas arteriais, cerebral e periférico. As

placas ateroscleróticas que apresentam grande conteúdo lipídico, capa fibrótica delgada e sinais de inflamação com infiltração de leucócitos sofrem, com frequência, ruptura ou erosão e são classificadas como placas instáveis ou vulneráveis (MOHANTY *et al.*, 2004). As lesões endoteliais favorecem a formação de trombos, que durante as primeiras fases de evolução da placa, quando o tamanho dessa é ainda pequeno, não comprometem a luz arterial e não modificam um quadro de isquemia preexistente. Desta forma, o trombo incorpora-se à placa de ateroma, que cresce sem resultar em graves conseqüências clínicas. Entretanto, se a luz do vaso já se encontra reduzida inicialmente, um trombo pode alterar o equilíbrio e desencadear a isquemia, levando ao evento clínico agudo. Nas coronárias, quando a obstrução que se forma é total e não existe circulação colateral nas proximidades, a conseqüência é a falta de oxigenação e necrose do miocárdio. A trombose coronariana total é responsável por grande parte dos infartos do miocárdio, e a trombose parcial é responsável por um grande número de casos de angina instável.

A doença arterial coronariana (DAC) é considerada um preocupante problema de saúde pública por ser a causa mais comum de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento em todo o mundo (WHO, 2007). Esta doença tem apresentado um declínio razoável da mortalidade em países desenvolvidos, enquanto que elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil é um dos representantes (SBC, 2007). Nos grandes centros urbanos, esta ocorre com maior frequência devido ao estilo e hábitos de vida modernos, como estresse, condições inadequadas de alimentação, tabagismo e sedentarismo (WHO, 2007).

A mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares representa cerca de 30% da mortalidade total, representando a maior causa isolada de morte em todo o

mundo (WHO, 2007). Apesar dos importantes avanços da cardiologia, a DAC e o acidente vascular cerebral (AVC) são responsáveis por mais mortes que todas as demais causas combinadas. Cerca de dezessete milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2005 em todo o mundo, representando 30% do total de mortes. Destas mortes, cerca de sete milhões foram devidas a infarto agudo do miocárdio (IAM) e cerca de seis milhões devidas a AVC. Do total, 80% das mortes ocorreram em países em desenvolvimento (WHO, 2007).

A DAC constitui a causa mais importante de morbidade e mortalidade no Brasil (SBC, 2007) e atinge, principalmente, indivíduos em idade de alta produtividade, gerando perdas econômicas significativas e enorme consumo de recursos do sistema de saúde. A DAC é uma doença multifatorial e a prevenção desta passa pela identificação e controle, não só das dislipidemias, mas do conjunto dos fatores de risco, hereditários e adquiridos, que podem ser responsáveis diretos ou podem estar associados à doença.

A contribuição dos fatores de risco tradicionais para DAC na população em geral, como idade, sexo, *diabetes mellitus*, hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão arterial e histórico familiar, foi definida em estudos realizados na cidade de Framingham (WILSON *et al.*, 1998). Porém, em torno de 35% dos eventos ateroscleróticos ocorrem na ausência dos denominados fatores de risco clássicos (AMERICAN HEART ASSOCIATION - AHA, 2004). Tal fato permite sugerir a possível contribuição de outros fatores de risco responsáveis por eventos vasculares até então desconhecidos.

As Diretrizes do Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol dos Estados Unidos – ATP III (AHA, 2004) reconheceram outros marcadores de risco coronariano. Estes foram classificados como fatores de risco relacionados aos

hábitos de vida (obesidade, sedentarismo e dieta aterogênica), e aos fatores de risco emergentes, incluindo os fatores de natureza lipoprotéica, como a Lp(a) e a LDLox; os fatores metabólicos, como a resistência à insulina e os níveis de homocisteína; os fatores hemostáticos, como os níveis do fator VII, do ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), além dos marcadores de inflamação como a proteína C reativa ultra-sensível (PCRus). A síndrome metabólica tem sido proposta para explicar anormalidades lipídicas, hemostáticas e inflamatórias, predispondo o indivíduo à DAC (JAIN & LAHIRI, 2007).

2.2 LIPOPROTEÍNA(a)

Desde a sua descoberta em 1963 (BERG, 1963) a Lp(a) tem sido alvo de numerosas pesquisas. A Lp(a) apresenta uma composição lipídica similar à da LDL e difere no conteúdo protéico, com a presença da apolipoproteína(a) ou apo(a) ligada à apolipoproteína B (apo B) através de pontes dissulfeto (HAJJAR & NACHMAN, 1996; KOSCHINSKY, 2004; PATI & PATI, 2000; UTERMANN, 1989). A apo(a) é sintetizada no fígado e a ligação com a apo B 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 lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), sendo portanto sintetizada independentemente das lipoproteínas ricas em triglicérides (KREMPLENER *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 os indivíduos, 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 aterosclerose subclínica (MILIONIS *et al.*, 2000). Os níveis plasmáticos de Lp(a) diminuem com a falência hepática e hipertireoidismo.

A apo(a) possui um alto grau de homologia com o plasminogênio, o precursor inativo da plasmina, proteína responsável pela quebra da fibrina produzida no processo de coagulação, devido ao variado número de repetições de seqüência de aminoácidos, homólogos à região do *kringle* 4 do plasminogênio. O número de *kringle* 4 repetido em seqüência na Lp(a) de um indivíduo é geneticamente determinado, variando de 12 a 51 repetições (GRAW & HOBBS, 1994). O gene que codifica a apo(a) apresenta uma seqüência de 37 cópias do domínio (*kringle*) 4 do plasminogênio, um domínio 5 ao qual se segue o domínio da protease, ambos altamente conservados em relação ao plasminogênio (MARTINEZ, 2003). A heterogeneidade observada no peso molecular desta proteína parece estar relacionada à variabilidade do número de repetições do domínio 4. A origem de apo(a) provavelmente se deu por duplicação do gene do plasminogênio, com posteriores deleções dos éxons codificantes da região terminal e dos domínios 1, 2 e

3 (FRANK, 1988). As características estruturais da Lp(a) permitem a sua ligação à fibrina e às proteínas da superfície de células endoteliais e monócitos, bem como a inibição competitiva do ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA), diminuindo a geração da plasmina e a fibrinólise (ANGLÉS-CANO *et al.*, 2001). Estas características conferem à Lp(a) propriedades pró-aterogênicas, estando os níveis elevados desta lipoproteína associados ao risco de DAC (CÂNDIDO *et al.*, 2006), doença cerebrovascular e reestenose de lesões coronarianas (ANGLÉS-CANO *et al.*, 2001; HANCOCK *et al.*, 2003; KOSCHINSKY & MARCOVINA, 2004; PEÑA-DÍAZ *et al.*, 2000). O gene da apo(a) apresenta polimorfismo genético de tamanho, com mais de 30 alelos variando de 300 a 800 KDa, tendo sido sugerido que este polimorfismo possa contribuir para a elevação de Lp(a) em pacientes com DAC (PATI & PATI, 2000). O real fator de risco parece estar associado à sub-população de Lp(a), sendo as isoformas de menor tamanho e maior afinidade pela fibrina, aquelas com maior associação com a DAC (ANGLÉS-CANO *et al.*, 2001; PEÑA-DÍAZ *et al.*, 2000).

Quando McLean *et al.* (1987) determinaram a seqüência de aminoácidos da apo(a) e sugeriram a homologia estrutural entre esta e o plasminogênio, o verdadeiro envolvimento da Lp(a) na fisiopatologia da aterosclerose e trombose foi elucidado pelos pesquisadores. A Lp(a) é uma interação funcional entre o processo de aterosclerose e trombose, uma vez que esta participa do processo de desencadeamento da aterosclerose pela sua semelhança com a partícula de LDL, o que permite o acúmulo de Lp(a) no espaço subendotelial proporcionalmente à sua concentração plasmática (KOSCHINSKY, 2004). A Lp(a) intacta, assim como apo(a) livre e os fragmentos proteolíticos de apo(a) foram identificados nas lesões ateroscleróticas (HOFF *et al.*, 1993). Além disso, a Lp(a) pode competir com o

plasminogênio e, conseqüentemente, inibir a quebra da fibrina, gerando um estado de hipercoagulabilidade, contribuindo com a trombogênese (SCHACHTER, 2000). A semelhança em cerca de 80% dos aminoácidos que compõem a apo(a) com o plasminogênio, fornece suporte à possibilidade da Lp(a) contribuir para a trombogênese, ao competir com sítios de ligação do plasminogênio, e de estabelecer uma associação entre os níveis elevados de Lp(a) com DAC (IMHOF *et al.*, 2003). A Lp(a) está presente em altas concentrações em artérias com aterosclerose quando comparadas com artérias normais, o que contribui para a redução da atividade fibrinolítica na placa aterosclerótica (DURIEZ *et al.*, 1996).

A Lp(a) tem sido descrita como uma variante genética ou marcador genético de alto risco para DAC (REES, 1990). Apresenta uma notável heterogeneidade na massa molecular, com fenótipos variando de 280 a 700 KDa. Diversos fenótipos de apo(a) têm sido descritos com base na sua mobilidade em gel de poliacrilamida. S1, S2, S3 e S4 são formas mais lentas, em diferentes graus. Em um mesmo indivíduo, existe com maior freqüência apenas um fenótipo com visualização de apenas uma banda no gel de eletroforese. Os fenótipos B, S1 e S2 estão associados com altos níveis de Lp(a). Baixos níveis desta lipoproteína são observados em associação com os fenótipos S3 e S4 (REES, 1990).

2.3 APOLIPOPROTEÍNAS A-I e B

As apolipoproteínas são proteínas que estão em associação com lípidos nas partículas de lipoproteínas e desempenham funções importantes no metabolismo lipoprotéico, como transporte destas moléculas hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, ligação aos receptores específicos na superfície celular para direcionar

corretamente os lípidos para os órgãos-alvo e tecidos do organismo, e ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (BEISIEGEL, 1998). A apo A-I é o maior componente da partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL), representando cerca de 45% de sua massa molecular (FRANK & MARCEL, 2000). Atua como cofator para a enzima lecitina colesterol acil transferase, e também como mediador na transferência do colesterol das células para as partículas de HDL, processos importantes para o transporte reverso do colesterol para o fígado (FRANK & MARCEL, 2000). A apo B está presente nos quilomícrons como apo B-48 e nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), e LDL como apo B-100, que é responsável pela ligação da lipoproteína ao seu receptor tecidual específico (PACKARD & SHEPHERD, 1997). A apo B é a principal proteína funcional para o transporte de colesterol para as células periféricas (RIFAI *et al.*, 1999). Cerca de 90% da proteína na LDL é constituída de apo B (WALLDIUS & JUNGNER, 2006).

As partículas de LDL, IDL e VLDL apresentam uma molécula de apo B em sua estrutura (PACKARD & SHEPHERD, 1997) e, desta forma, a concentração plasmática de apo B indica o número total de partículas potencialmente aterogênicas, correlacionando-se com o nível de colesterol não-HDL (WALLDIUS & JUNGNER, 2004). A concentração plasmática de apo A-I é fortemente associada com o HDL-colesterol (HDLc), e a expressão de apo A-I pode ser responsável pela determinação dos níveis plasmáticos de HDLc (WALLDIUS & JUNGNER, 2004). Desta forma, o índice apoB/apoA-I representa o balanço entre as partículas de colesterol potencialmente aterogênicas ricas em apo B e as partículas de colesterol anti-aterogênicas ricas em apo A-I.

As pesquisas envolvendo o valor preditivo das apolipoproteínas A-I e B nas doenças ateroscleróticas surgiram há aproximadamente duas décadas, inicialmente em estudos do tipo caso-controle (AVOGARO *et al.*, 1979; SNIDERMAN *et al.*, 1982; DURINGTON *et al.*, 1986) e, posteriormente, em estudos prospectivos (LAMARCHE *et al.*, 1996; WALLDIUS *et al.*, 2001; TALMUD *et al.*, 2002). Atualmente, os níveis plasmáticos das apolipoproteínas A-I e B têm sido descritos como melhores preditores de doenças ateroscleróticas do que as concentrações de lípides e lipoproteínas (ROETERS VAN LENNEP *et al.*, 2000; WALLDIUS & JUNGNER, 2004), e tem sido sugerido que o índice apoB/apoA-I representa um parâmetro superior para predição de risco cardiovascular do que outros índices lipídicos, como colesterol total/HDLc, LDLc/HDLc e colesterol não-HDL/HDLc (WALLDIUS *et al.*, 2004; SNIDERMAN *et al.*, 2006).

As dosagens das apolipoproteínas apresentam algumas vantagens metodológicas quando comparadas à quantificação do LDL-colesterol (LDLc). Na maioria das vezes, o LDLc é calculado usando-se a equação de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1972), a qual fornece uma estimativa dos valores de LDLc, e depende das dosagens de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e HDLc. Desta forma, a estimativa pode incorporar os possíveis erros analíticos destes três parâmetros utilizados para o cálculo do LDLc (WALLDIUS & JUNGNER, 2004), aumentando assim a probabilidade de erros, com potencial impacto nas decisões clínicas (MARCOVINA & PACKARD, 2006). Esta equação apresenta, ainda, várias limitações e a estimativa do LDLc não pode ser ampliada para amostras apresentando níveis de TG superiores a 400mg/dL, amostras contendo quilomícrons e para pacientes portadores de disbetalipoproteinemia (McNAMARA *et al.*, 1990). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o método homogêneo para a

dosagem de LDLc e a estimativa destes valores pela equação de Friedewald não apresentam resultados semelhantes (YU *et al.*, 1997; ESTEBAN-SALÁN *et al.*, 2000; CORDOVA *et al.*, 2004).

Por outro lado, as apolipoproteínas podem ser medidas diretamente no plasma, por métodos exatos e precisos, padronizados internacionalmente (MARCOVINA *et al.*, 1993; MARCOVINA *et al.*, 1994), utilizando-se material de referência comum para apo A-I e apo B, o qual não está disponível para as medidas de HDLc e LDLc, e sem a interferência significativa de níveis elevados de TG (MARCOVINA & PACKARD, 2006). Os níveis plasmáticos das apolipoproteínas sofrem pouca influência de variáveis biológicas, enquanto que os lípidos apresentam flutuação dos níveis plasmáticos em resposta aos vários estímulos do controle metabólico (RIFAI *et al.*, 1999). Desta forma, as variáveis pré-analíticas exercem menor influência nas dosagens das apolipoproteínas A-I e B, que podem ser quantificadas inclusive sem a necessidade de jejum prévio do paciente (WALLDIUS *et al.*, 2001; TALMUD *et al.*, 2002; DURINGTON, 2002).

No Brasil, os custos operacionais relacionados às determinações das apolipoproteínas foram reduzidos consideravelmente nos últimos anos, com a introdução no mercado brasileiro de conjuntos de reagentes nacionais com padronização internacional. Este fato propiciou a realização das determinações das apolipoproteínas A-I e B por um maior número de laboratórios clínicos, por um custo mais acessível aos pacientes e com cobertura destes pela maioria dos convênios de saúde do país.

O valor preditivo das apolipoproteínas A-I e B para DAC está bem estabelecido e documentado na literatura. Níveis elevados de apo B, diminuição dos níveis de apo A-I e aumento do índice apoB/apoA-I têm sido consistentemente

associados ao risco de DAC (LAMARCHE *et al.*, 1996; BOLIVAR *et al.*, 2000; WALLDIUS & JUNGNER, 2004; CHAN & WATTS, 2006; ZAMBON *et al.*, 2006). Walldius *et al.* (2004) sugeriu pontos de corte para o índice apoB/apoA-I de 0,9 e 0,8 para homens e mulheres, respectivamente, demonstrando que valores superiores a estes representariam risco aumentado para doenças cardiovasculares. Estes valores têm sido confirmados por outras pesquisas (WALLENFELDT *et al.*, 2004; THOMPSON & DANESH, 2006) e os resultados dos estudos AMORIS (WALLDIUS & JUNGNER, 2006) e INTERHEART (YUSUF *et al.*, 2004) estabeleceram faixas de risco para IAM, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Risco de IAM com relação ao aumento dos valores do índice apoB/apoA-I

	Baixo Risco	Risco Moderado	Alto Risco
Homens	0,40 – 0,69	0,70 – 0,89	0,90 – 1,10
Mulheres	0,30 – 0,59	0,60 – 0,79	0,80 – 1,00

2.4 METABOLISMO LIPÍDICO E APOLIPOPROTEÍNA E

O metabolismo das lipoproteínas pode ser dividido em três partes distintas, mas que estão inter-relacionadas. A primeira parte, denominada metabolismo exógeno, se relaciona ao transporte dos lípidos derivados da dieta, com a formação de quilomícrons no intestino, até o fígado. A segunda parte se relaciona ao metabolismo endógeno, que envolve o transporte dos lípidos sintetizados pelo fígado e incorporados nas partículas de VLDL e LDL, até os tecidos periféricos. A

terceira parte envolve o transporte reverso do colesterol, no qual o HDL transporta o colesterol dos tecidos periféricos de volta para o fígado para excreção (BEISIEGEL, 1998). Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides são resultantes do equilíbrio dinâmico entre os aspectos anabólicos e catabólicos do metabolismo das lipoproteínas. Os mecanismos pelos quais os lípidos são utilizados, transportados e removidos pelo organismo são bastante complexos: muitos receptores específicos, proteínas transportadoras, enzimas e vias de transporte estão envolvidos e desempenham papéis importantes neste processo.

No metabolismo exógeno, as gorduras provenientes da dieta são emulsificadas por sais biliares no lúmen intestinal e são hidrolisadas por lipases. O hidrolisado lipídico é então absorvido pelos enterócitos na forma de colesterol livre, ácidos graxos e monoacilglicerol na forma de micelas. No retículo endoplasmático das células entéricas, ocorre a reesterificação dos lípidos, que são incorporados aos quilomícrons. Estas partículas são então secretadas nos vasos linfáticos, alcançam a circulação ducto-torácica, onde recebem apolipoproteínas adicionais (apo C e apo E) provenientes das lipoproteínas HDL. Ao adquirir apo C-II, os quilomícrons interagem com a lipase lipoprotéica, que gradativamente reduz o teor de triglicérides dessas partículas, originando assim os quilomícrons remanescentes, contendo alto teor de colesterol e apo E. Essas partículas remanescentes são então captadas por receptores hepáticos específicos, denominados LRP (*LDL receptor-related protein*) ou proteína de ligação ao receptor de LDL (HERZ *et al.*, 1988), com a participação da apo E. No interior das células, os quilomícrons são fragmentados e parte do material lipídico é aproveitado, sendo o excedente reorganizado em outro tipo de lipoproteína, juntamente com a parte sintetizada pelo fígado (MARTINEZ, 2003).

O colesterol e os triglicérides endógenos, sintetizados no fígado, são incorporados à lipoproteína VLDL, que é metabolizada na circulação, a partir de processos análogos ao catabolismo de quilomícrons, mediado pela lipase lipoprotéica na presença de apo C-II, produzindo partículas remanescentes de VLDL ou lipoproteína de densidade intermediária (IDL), contendo éster de colesterol e apo E. Cerca de 50% do VLDL é convertido, no plasma, a IDL, a qual segue dois caminhos: primeiro, pode ser removida pelo fígado num processo dependente da apo E para ligação com o receptor LRP e da apo B para ligação com o receptor B/E, descrito por Brown & Goldstein (1986), como “receptor de LDL”; segundo, a IDL no plasma pode ser hidrolisada pela enzima lipase-triglicéride hepática (LHTG) para formar a LDL.

As partículas de LDL, que transportam o colesterol do fígado até os tecidos periféricos, são capazes de interagir, através de ligações mediadas pela apo B, com receptores de LDL de alta afinidade, localizados na superfície celular (GOLDSTEIN & BROWN, 1984). Após a ligação com o receptor, a LDL sofre endocitose e a vesícula endocítica se funde a lisossomas, ocorrendo a degradação da lipoproteína, com liberação do colesterol livre, que pode tanto ser armazenado na forma de gotículas lipídicas citoplasmáticas quanto seguir na direção de outras vias metabólicas. O receptor é reciclado e retorna à superfície celular. O número e função dos receptores controlam os níveis de LDL na circulação, uma vez que a síntese intracelular de colesterol e dos receptores de LDL varia na razão inversa da captação do colesterol plasmático.

As partículas de HDL sintetizadas no fígado e intestino são as lipoproteínas responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, processo pelo qual o colesterol excedente é removido dos tecidos periféricos e transportado até o fígado. O efluxo

do colesterol envolve interações específicas de proteínas-receptores, envolvendo ativação das vias de sinalização celular. Este efluxo se processa por duas vias principais: a primeira ocorre pela interação dos componentes lipídicos das partículas de HDL, principalmente fosfolípidos, com a superfície celular favorecendo a difusão de colesterol através do receptor SR-BI (*scavenger receptor for high density lipoprotein*), que facilita a transferência de colesterol livre da membrana plasmática para a partícula aceptora (ACTON *et al.*, 1996); a segunda via de efluxo de colesterol celular é determinada pela interação de apo A-I livre ou associada às partículas de HDL, com o transportador ABCA-I (*ATP-binding cassette transporter 1*), um transportador de membrana que se liga ao ATP e utiliza a energia liberada por sua hidrólise para o transporte de substâncias (CHIMINI *et al.*, 1999). Assim, o transporte reverso do colesterol dos tecidos para o fígado através da HDL ocorre diretamente pela sua captura hepática, por meio de receptores específicos, ou indiretamente, pela transferência de seu conteúdo de ésteres de colesterol a outras lipoproteínas também posteriormente captadas pelo fígado. O colesterol, ao chegar ao fígado, pode ser reutilizado interagindo com outras vias metabólicas, produzir ácidos biliares que são excretados na bile ou são reabsorvidos, em cerca de dois terços, pelo ciclo enterohepático (MARTINEZ, 2003).

A importância da HDL no transporte reverso do colesterol pode constituir a base da proteção atribuída a esta lipoproteína como um fator de risco inverso para DAC, sendo que um dos fatores responsáveis pelo efluxo do colesterol da célula para o sangue é a disponibilidade de HDL. Assim, esta via de transporte evita o acúmulo de colesterol nas células, contribuindo dessa forma para a prevenção da aterosclerose.

Aproximadamente 80% do colesterol necessário ao organismo é sintetizado endogenamente. Assim, a influência da dieta alimentar sobre os níveis plasmáticos de colesterol não é tão importante quanto o metabolismo celular, que é determinado primariamente pela constituição genética individual. A contribuição da genética na determinação da variabilidade dos níveis de lípidos plasmáticos é estimada em mais de 60%, numa herança que mescla a ação de poligenes e fatores ambientais (MARTINEZ, 2003).

Dada a grande proporção da contribuição genética para o perfil lipídico individual, a identificação dos genes envolvidos na determinação dos diferentes fenótipos e dos passos metabólicos envolvidos é particularmente importante. Essa identificação possibilitaria um melhor entendimento dos meios pelos quais as variações genéticas determinam objetivos clínicos e, permitiria, ainda, a identificação, num dado indivíduo ou em seus parentes, de uma combinação genética relacionada a um maior ou menor risco de desenvolvimento de DAC (MARTINEZ, 2003).

As anomalias relacionadas ao metabolismo lipídico podem ser coletivamente classificadas como dislipidemias, e classificadas em quantitativas ou qualitativas e primárias ou secundárias, de acordo com a sua etiologia (SBC, 2001). O aumento de algum componente envolvido no metabolismo lipídico caracteriza as hiperlipoproteinemias; a diminuição caracteriza as hipolipoproteinemias.

As dislipidemias primárias são decorrentes de causas genéticas, e dizem respeito a desordens especificamente relacionadas ao aumento da concentração ou a alterações estruturais de componentes da via metabólica do colesterol e de outros lípidos plasmáticos. Algumas delas só se manifestam devido à inadequação da dieta e/ou ao sedentarismo. As dislipidemias secundárias, por sua vez, ocorrem devido à

influência de medicamentos (diuréticos, beta-bloqueadores, corticosteróides, estrógenos, etc), de doenças (*diabetes mellitus*, hipotireoidismo, síndrome nefrótica, hepatopatias colestásicas crônicas, obesidade, etc) e/ou de hábitos inadequados de vida (dieta inadequada, tabagismo e etilismo) sobre o metabolismo lipídico (SBC, 2001).

A disbetalipoproteinemia é um dos distúrbios do metabolismo do colesterol com condicionamento genético bem definido. Resulta de polimorfismos do gene que codifica a apo E (MARTINEZ, 2003). Esta apolipoproteína participa no metabolismo lipídico, exercendo papel importante na remoção de partículas remanescentes pelo fígado (BARONI *et al.*, 2003). A característica bioquímica desta doença é o aumento dos níveis plasmáticos de duas populações de partículas – os quilomícrons remanescentes e partículas de IDL (BURTZ & ASHWOOD, 1998). A aterosclerose é freqüente, com cerca de 50% dos indivíduos afetados desenvolvendo DAC (MARTINEZ, 2003). O LDLc está normal ou reduzido porque há uma menor conversão de IDLc para LDLc.

A apo E contém 299 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 34 KDa (HATTERS *et al.*, 2006). As três isoformas da proteína são produtos de um mesmo gene, sendo este, portanto, um gene polimórfico. Esse gene está localizado no cromossomo 19, possui 3,7 quilobases, com quatro éxons, tendo uma estrutura semelhante aos genes das outras lipoproteínas. O fígado é a principal fonte da apo E circulante e onde existem as maiores concentrações de RNAm para codificar a apo E (MARTINEZ, 2004). O gene estrutural da apo E apresenta três alelos comuns - ϵ_2 , ϵ_3 e ϵ_4 - que codificam três isoformas - E2, E3 e E4 - da proteína (EICHNER *et al.*, 2002). Desta forma, existem diferentes fenótipos de apo E, resultantes de seis genótipos: três homozigotos ($\epsilon_2\epsilon_2$, $\epsilon_3\epsilon_3$, $\epsilon_4\epsilon_4$) e três heterozigotos ($\epsilon_2\epsilon_3$, $\epsilon_2\epsilon_4$ e

$\epsilon_3\epsilon_4$) (SCHWANKE *et al.*, 2002). O polimorfismo da apo E influencia suas propriedades estruturais e funcionais. As três isoformas comuns, apo E2, apo E3 e apo E4 diferem nas posições 112 e 158. Apo E3, a isoforma mais comum, contém cisteína e arginina, respectivamente, enquanto apo E2 possui duas cisteínas e apo E4 apresenta duas argininas nestas posições (HATTERS *et al.*, 2006).

A isoforma mais comum é a E3, presente em mais de 60% dos indivíduos de todas as populações já estudadas (BARONI *et al.*, 2003). A frequência dos alelos ϵ_2 , ϵ_3 e ϵ_4 tem sido descrita como 8%, 78% e 14%, respectivamente (DAVIGNON, 1988) e as frequências das isoformas variam bastante entre diferentes populações (SCHWANKE *et al.*, 2002). Recentemente, Mendes-Lana *et al.* (2007) demonstraram frequências de 8%, 72% e 20% para os alelos ϵ_2 , ϵ_3 e ϵ_4 num estudo envolvendo 185 indivíduos brasileiros.

Tem sido sugerido que os alelos ϵ_2 e ϵ_4 da apo E possam representar marcadores genéticos para identificação de indivíduos com alto risco para desenvolvimento de DAC (MARTINEZ, 2003; SIEST *et al.*, 1995). Sabe-se que a interação específica entre a apo E e os receptores de LDL é um mecanismo essencial no controle da remoção de partículas ricas em apo E, como o VLDL, os quilomícrons remanescentes e o IDL. Como a isoforma E2 de apo E apresenta baixa afinidade de ligação com os receptores de LDL, menos de 2% da afinidade dos alelos ϵ_3 e ϵ_4 (BARONI *et al.*, 2003), as partículas lipídicas que a expressam são lentamente removidas do plasma, desta forma configurando-se um quadro de hiperlipoproteinemia do tipo III nos indivíduos homocigotos.

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 a VLDL, a IDL e os quilomícrons são removidos muito rapidamente do plasma por um

mecanismo de *feedback* que ativa uma resposta hepática de diminuição de expressão de receptores de LDL, o que resulta no aumento dos níveis plasmáticos de LDLc 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 LDLc e CT em relação a indivíduos $\epsilon_3\epsilon_3$, sendo particularmente susceptíveis ao desenvolvimento precoce de DAC (MARTINEZ, 2003).

2.5 FOSFOLIPASE A2 E PROTEÍNA C REATIVA ULTRA-SENSÍVEL

Recentes pesquisas, estudando os componentes celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose, têm demonstrado que esta é um processo dinâmico e inflamatório. A inflamação tem um papel potencial no início, progressão e desestabilização das placas de ateroma (BATLOUNI, 1997). Assim que os macrófagos se infiltram na parede vascular, elaboram citocinas que modulam a migração, proliferação e função de células inflamatórias (ROSS, 1999). Reações inflamatórias na placa aterosclerótica presentes nas coronárias contribuem para a instabilidade e ruptura desta, representando um papel importante na patogênese de eventos aterotrombóticos agudos fatais ou não (KOENIG *et al.*, 1999). Alguns marcadores de inflamação sistêmica podem indicar a gravidade do processo inflamatório, e seus níveis atualmente têm sido associados com DAC (LUC *et al.*, 2003; RIDKER *et al.*, 2007; PACKARD & LIBBY, 2008).

A fosfolipase A2 (sPLA2) e a proteína C reativa são proteínas de fase aguda, consideradas marcadores de inflamação vascular cujos níveis elevados refletem disfunção endotelial. Já está estabelecido pela literatura que a PCRus representa

um marcador plasmático de risco para DAC. Níveis plasmáticos de PCRus acima de 3mg/L são considerados agravantes de risco cardiovascular (SBC, 2007). Apenas recentemente, as evidências estão se acumulando a respeito de que a proteína C reativa também pode exercer um papel ativo na aterogênese (DANENBERG *et al.*, 2003; ZWAKA *et al.*, 2001; BISOENDIAL *et al.*, 2005). Por outro lado, existem substanciais evidências que suportam o valor causal da sPLA2 na aterogênese (SUDHIR, 2005).

A sPLA2 compreende uma família de enzimas que pode hidrolisar os fosfolípidos constituintes das membranas celulares e das lipoproteínas (HURT-CAMEJO *et al.*, 2001). Estas enzimas apresentam ainda um papel crucial na geração de metabólitos do ácido araquidônico e eicosanóides, poderosos mediadores pró-inflamatórios. São enzimas extracelulares com alto conteúdo de pontes dissulfeto, baixa massa molecular (14 KDa) e necessitam de íons cálcio para exercer a catálise.

A retenção das partículas de LDL na parede arterial e subsequente modificação e oxidação das mesmas pode ser o evento inicial que deflagra o início da resposta inflamatória durante a formação das placas de ateroma. A sPLA2 tem sido associada à aterogênese porque pode modificar a estrutura da partícula de LDL, aumentando a afinidade dessa partícula por proteínas da matriz extracelular, resultando no aumento da retenção das partículas de LDL na parede arterial e consequente oxidação, que é um marco inicial para a progressão da lesão aterosclerótica (BOEKHOLDT *et al.*, 2005).

Apenas em 2003 a agência americana de controle de alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration* - FDA) aprovou o método de dosagem da sPLA2 para avaliação do risco cardíaco. As pesquisas envolvendo a associação

dos níveis plasmáticos de sPLA2 e DAC são recentes e têm demonstrado que os níveis plasmáticos desta enzima são mais elevados nos pacientes com diagnóstico de DAC quando comparados com indivíduos hígidos (LIU *et al.*, 2003). Além disso, os níveis elevados da sPLA2 indicam uma maior suscetibilidade do organismo ao desenvolvimento de DAC, mesmo entre os indivíduos que não apresentam hipercolesterolemia (BALLANTYNE *et al.*, 2004).

2.6 HOMOCISTEÍNA E MUTAÇÃO NA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE

A homocisteína é um aminoácido produzido durante o metabolismo da metionina, atualmente considerada como um fator de risco independente para o desenvolvimento da aterosclerose, sabendo-se que níveis elevados de homocisteína possuem uma ação tóxica ao endotélio vascular. A elevação da homocisteína no sangue possui causas multifatoriais, entre estas a ingestão elevada de metionina, redução do metabolismo, alterações genéticas ou deficiência de enzimas (cistationina β sintetase ou metilenotetrahidrofolato redutase - MTHFR) ou de vitaminas (B₁₂, B₆ e ácido fólico) importantes no processo de metabolização da homocisteína, as quais podem promover o acúmulo desta e a injúria do endotélio vascular (WARREN, 1999), desencadeando o processo de instalação das lesões ateroscleróticas.

A troca de uma citosina por uma timina na posição 677 do gene que codifica a enzima MTHFR resulta na mutação C677T, que provoca a substituição de uma alanina por uma valina na proteína. As alterações genéticas interferem nas atividades enzimáticas das vias metabólicas da homocisteína (GIRELLI *et al.*, 2003).

Indivíduos homozigotos para esta mutação podem apresentar o dobro dos níveis plasmáticos de homocisteína quando comparados com indivíduos não portadores (FROSST *et al.*, 1995). A prevalência desta mutação tem sido descrita como 5% na população em geral, cerca de 17% em pacientes com DAC e 28% em pacientes com doença vascular prematura que apresentam hiperhomocisteinemia (BOUSHEY *et al.*, 1995).

Alguns pesquisadores (MURPHY-CHUTORIAN & ALDERMAN, 1994; NEHLER *et al.*, 1997; NYGÅRD *et al.*, 1997) determinaram a homocisteína plasmática em pacientes com doença vascular periférica, doença cerebrovascular e DAC. Foi constatado que a concentração desta era significativamente mais elevada que a encontrada em indivíduos hígidos, e assim, passaram a considerar a hiperhomocisteinemia como fator de risco para estas condições clínicas. Investigações sobre diferentes fatores, além da homocisteína, revelaram que a sua concentração plasmática pode ser considerada fator de risco independente para a doença aterosclerótica. Deve ser ressaltado que os valores da homocisteinemia parecem ter também grande importância como preditores de mortalidade em pacientes com DAC, além de mostrar relação com a intensidade do processo aterosclerótico (FALK *et al.*, 2001; GUILLAND *et al.*, 2003; LAWRENCE DE KONING *et al.*, 2003). Entretanto, a falta de associação entre os níveis plasmáticos de homocisteína e DAC foi demonstrada por alguns autores (FOLSON *et al.*, 1998; NIKFARDJAM *et al.*, 2001). Algumas razões podem explicar os resultados controversos das pesquisas envolvendo a concentração de homocisteína e DAC: os fatores que afetam os níveis plasmáticos deste aminoácido são diferentes em cada população. Fatores como hábitos nutricionais, fatores genéticos, estilo de vida e raça podem afetar a concentração da homocisteína circulante (NEHLER *et al.*, 1997).

2.7 HEMOSTASIA E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A hemostasia envolve a ação coordenada do endotélio vascular, das plaquetas, das proteínas da coagulação, do sistema fibrinolítico e dos anticoagulantes naturais na manutenção da fluidez do sangue, prevenindo a ocorrência de eventos hemorrágicos e trombóticos (ZAGO *et al.*, 2001).

O endotélio vascular está recoberto por uma única camada de células endoteliais justapostas que estão em contato direto com o sangue circulante (MARTINEZ, 2003). Estas separam o sangue da matriz subendotelial, onde se encontram proteínas adesivas importantes para a ativação da coagulação, tais como o colágeno, o fator de von Willebrand e a fibronectina. As células endoteliais têm múltiplas funções que, no seu conjunto, protegem a ativação da coagulação e a formação de trombos. Várias substâncias derivadas do endotélio já foram descritas e apresentam importantes funções na hemostasia. Dentre estas se podem citar: sulfato de heparan, trombomodulina (TM), proteína S, inibidor da via do fator tissular (TFPI), receptor endotelial de proteína C (EPCR), prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e fator von Willebrand (VAN RINSBERG, 2001).

O papel da hemostasia na fase inicial da aterogênese está relacionado principalmente à ativação das plaquetas (SHIN *et al.*, 2003). A descontinuidade do endotélio ou a modificação das características normais da célula endotelial provoca a adesão das plaquetas às estruturas subendoteliais e deflagra o processo de ativação plaquetária, resultando na sua agregação e na liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários. Esses grânulos contêm potentes agentes agregantes que

recrutam mais plaquetas para junto do local onde ocorreu a lesão endotelial (GARCIA-PALMIERI, 1997).

A coagulação do sangue é um processo que leva à formação de um trombo em resposta a uma lesão vascular, impedindo a hemorragia. O trombo é composto por plaquetas ativadas que se agregam e por uma malha de fibrina, formada pela ativação dos fatores da coagulação culminando com a ação da trombina sobre o fibrinogênio. A coagulação sangüínea envolve um sistema biológico de amplificação no qual poucas substâncias de iniciação ativam sequencialmente por proteólise a cascata de proteínas da coagulação, culminando na geração de trombina, que converte o fibrinogênio solúvel do plasma em fibrina (COLMAN, 2001). A coagulação inicia-se pelo fator tissular (TF) encontrado na superfície do tecido perivascular, que se liga ao fator VII (FVII) circulante, levando à ativação deste. O complexo TF-FVIIa ativa os fatores IX e X. A ativação do fator X gera pequenas quantidades de trombina que amplifica o processo de coagulação ativando os fatores V e VIII (Figura 1). Essa via de amplificação envolvendo os fatores VIII e IX assume o papel predominante (COLMAN, 2001), consolidando a produção de fator X ativado. A trombina, principal enzima ativa do processo da coagulação, possui múltiplas funções. É capaz de ativar o fator XI que aumenta a produção de fator IX ativado, coagula o fibrinogênio, ativa o fator XIII e é um potente agente agregante plaquetário. Além de produzir um *feed-back* positivo ativando os co-fatores V e VIII e acelerando sua própria formação, a trombina liga-se à trombosmodulina da membrana da célula endotelial, formando um complexo capaz de ativar a proteína C a qual proteolisa os co-fatores V e VIII, constituindo um *feed-back* negativo (DAHLBÄCK, 2000).

A formação da trombina decorre de uma seqüência de reações chamada cascata da coagulação (MACFARLANE *et al.*, 1964), que pode ser descrita por duas vias distintas. A via extrínseca inicia-se com a formação do complexo TF-FVIIa e a via intrínseca inicia-se pela ativação dos fatores da fase de contato, envolvendo fator XI, pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e fator IX. A ativação inicia-se pelo contato do fator XI e HMWK com o colágeno exposto após a lesão do endotélio, e termina com a ativação do fator IX, o que acarreta a ativação seqüencial dos fatores X e II. Esta divisão permanece para a compreensão da formação do coágulo *in vitro*. Entretanto, *in vivo* os eventos não são distintos, pois as vias se inter-relacionam, o que garante a efetividade do processo (FRANCO, 2001).

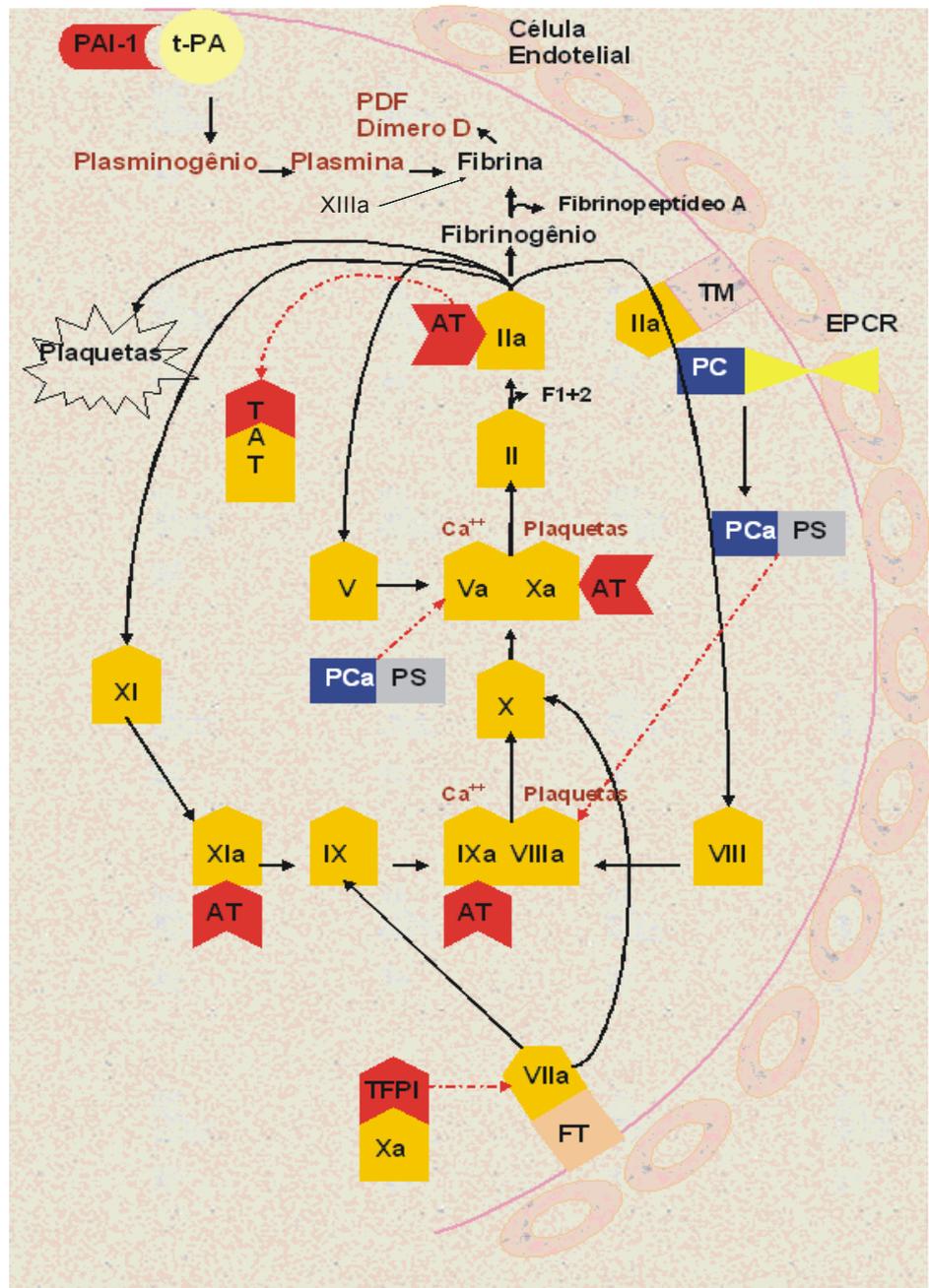


Figura 1 – Representação esquemática do conjunto de reações envolvidas na coagulação do sangue (FERNANDES, 2007). Em tal esquema, fica enfatizado o conceito de que não há distinção clara entre os sistemas intrínseco e extrínseco, que atuam de modo altamente interativo *in vivo* (FRANCO, 2001). FT = fator tissular; II, V, VII, VIII, IX, X, XI e XIII = fatores da coagulação; a = ativado; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; t-PA = ativador do plasminogênio tipo tecidual; PDF = produtos de degradação da fibrina; TM = trombomodulina; PC = proteína C; PS = proteína S; AT = antitrombina; TAT = trombina-antitrombina; Ca⁺⁺ = íons cálcio; EPCR = receptor endotelial de proteína C; TFPI = inibidor da via do fator tissular; F1+2 = fragmento 1+2 da protrombina.

O principal substrato da trombina é o fibrinogênio, uma molécula composta por três pares de cadeias peptídicas. A trombina retira dois pequenos peptídeos, inicialmente da cadeia alfa e depois da cadeia beta: os fibrinopeptídeos A e B, respectivamente. A molécula do fibrinogênio é então transformada em monômero de fibrina, que se polimeriza para formar a rede de fibrina. O fator XIII, ativado pela própria trombina, estabiliza as ligações entre os monômeros de fibrina, tornando o coágulo estável (JUHAN-VAGUE & HANS, 2003).

O equilíbrio da hemostasia também depende dos inibidores fisiológicos da coagulação. O primeiro inibidor a agir é o TFPI, presente no plasma e nas plaquetas, acumulando-se no local da lesão pela ativação das plaquetas (LWALEED & BASS, 2006). Este forma um complexo quaternário com os fatores X e VII ativados e o TF, na presença de íons cálcio e, desta forma, suprime a atividade de amplificação das reações enzimáticas. Há inativação direta da trombina pela antitrombina ligada ao heparan sulfato presente na membrana da célula endotelial, aumentando seu efeito inibidor sobre a trombina (LORENZI, 2003). A proteína C, quando ligada ao seu receptor no endotélio (EPCR), é ativada após a ligação da trombina à trombomodulina presente na membrana da célula endotelial. A proteína C ativada inativa os fatores V e VIII ativados, limitando a formação de trombina. A ativação desse sistema se faz na presença de um co-fator, a proteína S, que também é secretada pela célula endotelial. A proteína C ativada também consome o PAI-1, aumentando a atividade fibrinolítica (DAHLBÄCK, 2000).

A fibrinólise é uma resposta hemostática normal à lesão vascular e consiste no mecanismo de dissolução enzimática do coágulo de fibrina que se forma no local da lesão do endotélio vascular. A dissolução da fibrina se faz ao mesmo tempo em que o endotélio vascular se recompõe (JUHAN-VAGUE & HANS, 2003). O sistema

fibrinolítico também é regulado pelas células endoteliais, que secretam os ativadores do plasminogênio tipo t-PA (ativador tissular) e tipo u-PA (uroquinase). O t-PA transforma o plasminogênio, uma proenzima circulante, em plasmina, a qual promove a dissolução do trombo. As células endoteliais também participam da fibrinólise expressando os receptores para o plasminogênio em sua superfície, sendo responsável pela geração localizada de plasmina, através da ação do t-PA ao nível da membrana celular (RUSCHITZKA *et al.*, 1997). O próprio endotélio controla a síntese desses ativadores por meio da síntese de inibidores específicos do sistema fibrinolítico, entre estes o PAI-1 (LORENZI, 2003).

A participação dos mecanismos da hemostasia na gênese das placas de ateroma é bem conhecida. Muitas variáveis relacionadas à coagulação estão implicadas no processo de formação da placa de ateroma, através da deposição de fibrina e da ativação de plaquetas. A presença de fibrina no ateroma decorre dos efeitos graduais da ativação da coagulação, das plaquetas e redução da fibrinólise, durante a formação da placa aterosclerótica (SMITH, 1996).

O conhecimento da fisiologia da coagulação possibilita melhor compreensão dos possíveis mecanismos pelos quais a hemostasia pode influenciar na formação da placa de ateroma. Uma vez estabelecida a lesão aterosclerótica, plaquetas, fatores da coagulação e da fibrinólise atuam para produzir o trombo, que obstrui a artéria e interrompe o fluxo sanguíneo, causando morte tecidual e graves conseqüências (SHIN *et al.*, 2003).

2.8 FATOR TISSULAR E INIBIDOR DA VIA DO FATOR TISSULAR

A formação do trombo numa placa aterosclerótica rompida inicia-se quando o fator VII ativado (FVIIa) plasmático entra em contato com o fator tissular (TF) nos sítios de injúria das células endoteliais, e resulta na formação do complexo TF-FVIIa. Esse ativa os fatores IX e X, levando à geração de trombina com consequente formação do coágulo de fibrina (SPRONK *et al.*, 2004). As células endoteliais íntegras não expressam níveis detectáveis de TF, entretanto, a expressão do TF endotelial tem sido relatada durante casos de septicemia, tumor vascular e nas células endoteliais que cobrem as placas ateroscleróticas (CRAWLEY *et al.*, 2000). Da mesma forma, o TF proveniente de macrófagos e células espumosas ativados tem sido detectado na matriz extracelular e no centro necrótico de placas ateroscleróticas avançadas, sugerindo que o TF contribui para o estado hipertrombótico da aterosclerose humana. As placas ateroscleróticas ricas em macrófagos apresentam grande risco de ruptura, podendo causar trombose devido a expressão elevada de TF pelas células espumosas (CAPLICE *et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 2006).

A ruptura da placa aterosclerótica com subsequente formação do trombo oclusivo representa a causa central da síndrome coronariana aguda (SCA) (MALY *et al.*, 2003) e o aumento dos níveis plasmáticos de TF tem sido demonstrado na angina instável (OTT, 2003) e no IAM (GOMEZ *et al.*, 2005), correlacionando-se com a presença de extensas áreas ricas em macrófagos e células musculares lisas.

O TFPI exerce um papel importante no controle da trombogênese, uma vez que representa o único inibidor descrito da via dependente de TF na coagulação sangüínea (GOMEZ *et al.*, 2005). *In vivo*, aproximadamente 80% do TFPI plasmático

circula ligado às lipoproteínas plasmáticas (GIRARD *et al.*, 1989) e cerca de 5 a 10% circula livre no plasma (LINDAHL *et al.*, 1994). Níveis significativamente elevados de TFPI têm sido demonstrados em pacientes com doença cardíaca isquêmica quando comparados a indivíduos hígidos, e uma correlação positiva entre níveis plasmáticos de TF e TFPI tem sido observada nesses pacientes (LWALEED & BASS, 2006). Entretanto, a associação entre o grau de aterosclerose coronariana e os níveis plasmáticos de TF e TFPI ainda não está definida na literatura.

2.9 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1 E POLIMORFISMO (-675 4G/5G)

O principal inibidor da fibrinólise é o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), que é o inibidor primário do ativador fisiológico do plasminogênio (t-PA). O aumento dos níveis plasmáticos do PAI-1 foi relatado em indivíduos sobreviventes de IAM quando comparados com a população em geral, e este aumento correlacionou-se com a recorrência do infarto (HAMSTEN *et al.*, 1987). É de grande interesse conhecer o comportamento desse marcador em doenças que antecedem a ocorrência do IAM, o qual poderia contribuir para a adoção de medidas profiláticas.

A inserção ou deleção de um nucleotídeo na região promotora do gene do PAI-1 (-675 4G/5G) foi identificada a 675 pares de base antes do início da transcrição. O polimorfismo 4G/5G tem sido relatado em pacientes com IAM (NAUCK *et al.*, 1999). Os indivíduos homocigotos para a deleção (4G/4G) apresentam níveis plasmáticos elevados de PAI-1, e os portadores da adição (5G/5G), níveis reduzidos, enquanto indivíduos heterocigotos (4G/5G) possuem níveis intermediários (MANSFIELD *et al.*, 1995).

Os níveis plasmáticos do PAI-1 podem ser influenciados pela idade, sexo, obesidade, hipertensão arterial, tabagismo, hipercolesterolemia, além de polimorfismos genéticos, entre estes o polimorfismo (-675 4G/5G) (VISANJI *et al.*, 2000). O aumento dos níveis plasmáticos do PAI-1 pode comprometer o sistema fibrinolítico e favorecer a permanência do coágulo de fibrina. Portanto, a genotipagem deste polimorfismo poderia ser relevante para se avaliar o desempenho do sistema fibrinolítico em pacientes com diagnóstico estabelecido de DAC.

2.10 ANGIOGRAFIA CORONARIANA E GRAVIDADE DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A angiografia ou arteriografia coronária é um exame empregado para explorar as artérias coronárias e identificar qualquer área com estreitamento ou bloqueio causado por aterosclerose (ARAI *et al.*, 2001). Embora este método seja considerado padrão para avaliar a gravidade das estenoses coronarianas e para guiar intervenções percutâneas (DI CARLI *et al.*, 1995), o mesmo apresenta algumas limitações. A aterosclerose é uma doença da parede dos vasos, e a angiografia avalia apenas a luz dos mesmos, diagnosticando lesões obstrutivas pela comparação entre segmentos alterados e segmentos supostamente normais (SBC, 2003), que podem exibir o fenômeno de ampliação do vaso na tentativa de acomodar a placa aterosclerótica, conhecido como remodelamento positivo (IBANEZ *et al.*, 2007).

O exame é utilizado para verificar obstrução nas artérias coronárias e pode ser indicado, também, para pacientes com angina instável, dor torácica atípica, estenose

aórtica, insuficiência cardíaca não explicada, arritmias, fibrilação atrial, prolapso da válvula mitral, defeito do septo atrial, espasmo da artéria coronária e outras condições. Conforme o grau de obstrução do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, há um aumento do risco de um evento agudo, principalmente IAM (MADDAHI & GAMBHIR, 1997).

A DAC é detectada sob a forma de irregularidades ou estenoses das paredes internas das artérias. A porcentagem de estenose coronariana superior a 50%, comparada com a área do lúmen de referência, é considerada critério satisfatório para indicação de intervenção cirúrgica ou percutânea (OZAKI *et al.*, 1995), dependendo da localização, da composição e da vulnerabilidade da placa aterosclerótica (IBANEZ *et al.*, 2007). A forma grave da DAC é definida angiograficamente pela presença de estenose, maior ou igual a 70% do diâmetro, de pelo menos um segmento de uma das artérias epicárdicas maiores, ou estenose superior a 50% do diâmetro do tronco da coronária esquerda (SBC, 2004). A angiografia coronariana também é o método mais utilizado para descrever a extensão da DAC, separando os pacientes em uniarterial, biarterial, triarterial ou lesão em tronco da coronária esquerda (SBC, 2004). O tempo de sobrevivência do paciente diminui com o envolvimento de vasos adicionais, com o comprometimento da descendente anterior e com a disfunção ventricular esquerda (SBC, 2004).

Exames não invasivos que fornecem o diagnóstico de DAC, como o teste ergométrico, ecocardiograma, tomografia computadorizada e cintilografia coronariana são também utilizados pelos clínicos. O ultra-som intracoronariano também é um método muito utilizado e permite o estudo da parede vascular normal, além das características da placa aterosclerótica (SBC, 2003; IBANEZ *et al.*, 2007). No entanto, muitos pacientes são submetidos à angiografia, pois é o método mais

acurado para diagnóstico de lesões coronarianas obstrutivas (SBC, 2004). A indicação da angiografia coronariana é determinada pelos médicos levando em consideração aspectos clínicos, sexo do paciente, idade e fatores de risco cardiovasculares, bem como fatores sócio-econômicos (CHEN & REDBERG, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre parâmetros bioquímicos, hemostáticos, polimorfismos genéticos e a gravidade da doença arterial coronariana em indivíduos submetidos à angiografia coronariana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil lipídico e apolipoproteico, incluindo os níveis plasmáticos de lipoproteína(a), anticorpos anti-LDL oxidada, apolipoproteínas A-I, B e E, em indivíduos angiograficamente normais e em pacientes apresentando aterosmatose leve/moderada ou grave.
- Determinar os níveis plasmáticos da proteína C reativa e fosfolipase A2, como marcadores de processo inflamatório; do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, do fator tissular e do inibidor da via do fator tissular como marcadores hemostáticos; e da homocisteína, como marcador de lesão endotelial.
- Determinar o perfil genético individual em relação aos alelos do gene codificador de apolipoproteína E.
- Identificar a presença da mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase.
- Identificar a presença do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1.
- Correlacionar os parâmetros estudados entre si e com a gravidade da doença arterial coronariana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado sob o ponto de vista ético e formal pela Comissão de Ética do Hospital Socor (Anexo 1) e pela Comissão de Ética e Pesquisa da UFMG (Anexo 2), como parte integrante de um projeto maior intitulado “Caracterização bioquímica, hemostática e molecular da doença arterial coronariana”.

Aos indivíduos selecionados, foi feito o esclarecimento dos objetivos da pesquisa e, aqueles que estiveram de acordo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Uma ficha clínica contendo dados importantes para análise dos resultados foi preenchida em todos os casos (Apêndice 2). Foram coletadas amostras de 134 indivíduos submetidos à angiografia coronariana, em um período de 14 meses, entre junho 2004 e setembro de 2005.

Os indivíduos participantes deste estudo foram selecionados no departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor em Belo Horizonte, Minas Gerais, após realizarem a angiografia coronariana. Todos os participantes foram encaminhados ao Hospital Socor pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os indivíduos participantes dos três grupos foram selecionados buscando uma homogeneidade em relação às variáveis sexo, idade, nível sócio-econômico e Índice de Massa Corporal (IMC) (Tabela 2).

4.1 CASUÍSTICA

O presente estudo foi composto por três grupos distintos:

1) Grupo angiograficamente normal (AnN): constituído por 35 pacientes que não apresentaram aterosclerose coronariana detectável pelo exame angiográfico.

2) Grupo com ateromatose leve/moderada (ALM): constituído por 31 pacientes que apresentaram ateromatose coronariana leve ou moderada, conforme os seguintes critérios:

- Ateromatose leve: constituído por 17 pacientes que apresentaram estenose coronariana com comprometimento inferior a 30% do *lúmen* arterial em, pelo menos, uma artéria coronária.
- Ateromatose moderada: constituído por 14 pacientes que apresentaram estenose coronariana com comprometimento entre 30 e 70% do *lúmen* arterial em, pelo menos, uma artéria coronária.

3) Grupo ateromatose grave (AG): constituído por 57 pacientes que apresentaram estenose coronariana com comprometimento superior a 70% do *lúmen* arterial em, pelo menos, uma artéria coronária.

Tabela 2 – Caracterização dos grupos estudados

	AnN	ALM	AG	p
n (M/F)	35 (16/19)	31 (17/14)	57 (31/26)	---
Homens (%)	16 (45,7)	17 (54,8)	31 (54,4)	0,641
Mulheres (%)	19 (54,3)	14 (45,2)	26 (45,6)	0,596
Idade (anos)	59,0 ± 7,5	59,5 ± 9,0	60,5 ± 8,8	0,683
IMC (Kg/m ²)	25,3 ± 4,1	26,8 ± 4,7	25,8 ± 3,5	0,298

Caracterização quanto ao n (tamanho), M (sexo masculino) e de F (sexo feminino), idade e IMC (índice de massa corporal), sendo os valores expressos como frequência absoluta, frequência relativa e como média e desvio-padrão quando apropriado. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados para as variáveis sexo (Qui-quadrado), idade e IMC (ANOVA). AnN = angiograficamente normais; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

4.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Faixa etária adotada para o estudo: 35 a 65 anos.
- Indivíduos de ambos os sexos submetidos à angiografia coronariana no Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor, Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Os critérios de exclusão comuns aos três grupos foram:

- Indivíduos que apresentaram história anterior de Síndrome Coronariana Aguda

(SCA) nos três meses que antecederam à coleta de sangue (infarto agudo do miocárdio ou angina instável).

- Uso de anticoagulantes orais.
- Uso de drogas hipolipemiantes.
- Uso de estrogênios (anticoncepcionais ou reposição hormonal).
- Presença de doenças intercorrentes como distúrbios da coagulação, doenças renais, hepáticas, autoimunes, câncer e insuficiência cardíaca.
- Níveis de triglicérides acima de 400mg/dL.

Foi triado um total de 134 indivíduos para integrar os grupos de estudo. Após a aplicação dos critérios de exclusão foram selecionados 123 participantes. A Tabela 3 apresenta o número de indivíduos excluídos do estudo e os critérios de exclusão aplicados.

Tabela 3 – Número de indivíduos excluídos e critérios de exclusão aplicados

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	n
Síndrome Coronariana Aguda nos últimos 3 meses	3
Uso de estatinas	7
Triglicérides > 400mg/dL	1
Total	11

4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletadas amostras de 25mL de sangue venoso dos participantes (5mL em citrato de sódio, 10mL sem anticoagulante e 5mL em EDTA), após jejum de 12h, em tubos do Sistema Vacutainer[®] (Becton-Dickinson). As amostras biológicas dos participantes que realizaram a angiografia coronariana foram coletadas antes da realização do referido exame. As amostras de sangue obtidas foram rapidamente centrifugadas a 1100g por 15 minutos para separação do plasma e do soro, que foram divididos em várias alíquotas e estocados à -70°C. Foi extraído o DNA das amostras, que ficou armazenado à -20°C até a realização dos testes genéticos.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os parâmetros avaliados neste estudo foram:

- 1) Colesterol total e frações
- 2) Triglicérides
- 3) Apolipoproteína A-I
- 4) Apolipoproteína B
- 5) Apolipoproteína E
- 6) Lipoproteína(a)
- 7) Proteína C reativa ultra-sensível
- 8) LDL oxidada
- 9) Homocisteína total
- 10) Fosfolipase A2
- 11) Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)
- 12) Fator tissular (TF)

- 13) Inibidor do fator tissular (TFPI)
- 14) Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína E
- 15) Mutação C677T no gene da enzima MTHFR
- 16) Polimorfismo (-675 4G/5G) no gene do PAI-1

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Fatores de risco

A presença das variáveis tabagismo, sedentarismo e história familiar para DAC, foi constatada com base nas recomendações das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2001). Foram considerados tabagistas os indivíduos com consumo regular de qualquer quantidade de cigarros, por um período superior a seis meses até o mês anterior ao preenchimento da ficha clínica. Foram considerados sedentários os indivíduos que não praticavam exercícios físicos regularmente, com frequência mínima de 40 minutos pelo menos três vezes por semana. Foi considerada presença de história familiar para DAC indivíduos que apresentaram parentes de primeiro grau com menos de 55 para homens e menos de 65 anos para mulheres com DAC diagnosticada. Foram considerados hipertensos os participantes com diagnóstico prévio de hipertensão arterial que faziam uso regular de medicamentos anti-hipertensivos. Portadores de SCA anterior a três meses da entrevista foram considerados no estudo, incluindo aqueles que apresentaram quadro de IAM ou angina instável.

4.5.2 Etnia

A identificação da raça dos participantes do estudo foi obtida por meio da declaração do próprio indivíduo, segundo as opções constantes no item etnia da ficha clínica adotada para o estudo (Apêndice 2).

4.5.3 Angiografia coronariana

A angiografia coronariana foi o exame empregado para explorar as artérias coronárias por uma série de raios-X, realizado juntamente com a cateterização cardíaca. Antes da realização do exame, o paciente recebeu um sedativo suave. O médico inseriu o cateter por uma pequena incisão na artéria braquial ou diretamente na artéria femural, após desinfecção e aplicação de anestésico no local. O cateter foi, então, cuidadosamente guiado até o coração, sendo que a inserção foi acompanhada por imagens de raios-X, denominadas fluoroscopias. Após este procedimento, injetou-se um contraste iodado (Telebrix[®] ou Hexabrix[®]) para visualizar as artérias coronárias. O coração e as artérias foram filmados enquanto o coração batia. A angiografia coronariana foi realizada por médicos especializados do Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor e os filmes examinados por três cardiologistas experientes. Os laudos foram apresentados conforme critérios adotados pelo Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor, definidos pela redução dos diâmetros intraluminais: até 30% de estenose foi classificada como ateromatose leve; de 30 a 70% de estenose, como ateromatose moderada e, acima de 70% de estenose, como ateromatose grave, em uma ou mais artérias coronárias afetadas. Os indivíduos com ausência de estenose detectável pelo exame

angiográfico foram classificados como indivíduos angiograficamente normais e constituíram o grupo controle.

4.5.4 Parâmetros bioquímicos

a) Colesterol total (CT)

A determinação do CT plasmático foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico RANDOX[®] CHOLESTEROL CHOD-PAP cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

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

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

Valor de referência: Ótimo < 200mg/dL

Limítrofe 200 – 240mg/dL

Alto > 240mg/dL

b) HDL-colesterol (HDLc)

A determinação do HDLc plasmático foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico RANDOX[®] HDL CHOLESTEROL DIRECT cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico de eliminação.

Os reagentes contêm um homogeneizado de enzimas. O teste combinou duas etapas específicas. Na primeira etapa, LDLc, VLDLc e quilomícrons foram degradados pela ação combinada das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, enquanto o HDLc não foi afetado. O peróxido de hidrogênio formado na primeira etapa foi decomposto pela ação da catalase. Na etapa seguinte o HDLc transformou-se em colesteno e peróxido de hidrogênio pelas mesmas enzimas acima citadas, na presença de surfactantes específicos para HDLc. O peróxido de hidrogênio formado reagiu com o cromógeno N-(2-hidroxi-3-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina), sob ação catalítica da peroxidase. A absorvância do cromógeno quinona produzido foi diretamente proporcional à concentração de HDLc na amostra quando medida a 600nm.

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

Valor de referência: Alto > 60mg/dL

Baixo < 40mg/dL

c) LDL-colesterol (LDLc)

A determinação do LDLc plasmático foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico RANDOX[®] LDL CHOLESTEROL DIRECT cujo princípio analítico é o método enzimático de eliminação.

Os reagentes contêm um homogeneizado de enzimas. O teste combinou duas etapas específicas. Na primeira etapa, HDLc, VLDLc e quilomícrons foram degradados pela ação combinada das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, enquanto o LDLc não foi afetado. O peróxido de hidrogênio formado na primeira etapa foi decomposto pela catalase. Na etapa seguinte o LDLc foi quantificado pela transformação em colesteno e peróxido de hidrogênio pelas mesmas enzimas anteriormente citadas, na presença de surfactantes específicos para LDLc. O peróxido de hidrogênio formado reagiu com o cromógeno N-(2-hidroxi-3-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina), sob ação catalítica da peroxidase. A absorbância do cromógeno quinona produzido foi diretamente proporcional à concentração de LDLc na amostra quando medida a 600nm.

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

A determinação do LDLc também foi estimada utilizando um procedimento simplificado descrito por Friedewald *et al.* (1972). Neste método, os níveis de CT, TG e HDLc foram determinados como previamente descrito. Visto que a maior parte dos

TG plasmáticos é carregada pelas partículas de VLDL, o VLDLc foi estimado a partir do coeficiente de TG e CT nas partículas de VLDL. Quando as concentrações são expressas em mg/dL, o VLDLc é estimado como TG plasmático dividido por cinco. Esse método assume que essencialmente todos os TG plasmáticos são transportados pela VLDL e que o coeficiente TG/CT é invariável. O LDLc foi estimado usando a seguinte equação: $LDLc = CT - [HDL + (TG/5)]$. Esta equação não é apropriada para ser usada com amostras nas quais as concentrações de TG excedem a 400 mg/dL.

Valor de referência: Ótimo < 100mg/dL

Desejável 100 – 129mg/dL

Limítrofe 130 – 159mg/dL

Alto 160 – 189mg/dL

Muito alto > 190mg/dL

d) Triglicérides (TG)

A determinação dos níveis plasmáticos de TG foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico RANDOX[®] TRIGLYCERIDES GPO-PAP cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

O glicerol liberado na hidrólise dos TG, catalisada pela lipoproteína lipase foi convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que foi oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da enzima glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento que ocorreu entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e p-clorofenol foi catalisada pela peroxidase produzindo a quinonimina que apresentou um máximo de absorbância em 500nm. A intensidade

da cor rósea-avermelhada formada foi diretamente proporcional à concentração de TG na amostra.

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

Valor de referência: Ótimo < 150mg/dL

Limítrofe 150 – 200mg/dL

Alto > 201 - 499mg/dL

Muito alto > 500mg/dL

e) Apolipoproteína A-I (apo A-I)

A determinação plasmática da apo A-I foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA[®] APOLIPOPROTEÍNA A-I (APO A-I) TURBIDIMETRIA cujo princípio analítico é o imunoensaio turbidimétrico.

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

que é proporcional à quantidade de antígeno. Este método é chamado homogêneo, pois não possui fase sólida.

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

Valor de referência: 110 – 210mg/dL

f) Apolipoproteína B (apo B)

A determinação plasmática da apo B foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA[®] APOLIPOPROTEÍNA B (APO B) TURBIDIMETRIA cujo princípio analítico é o imunoensaio turbidimétrico, já descrito para apo A-I, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

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

Valor de referência: 60 – 155mg/dL

g) Apolipoproteína E (apo E)

A determinação plasmática da apo E foi realizada no soro utilizando o

conjunto diagnóstico CHRONOLAB[®] APOLIPOPROTEIN E TURBIDIMETRY cujo princípio analítico é o imunoenensaio turbidimétrico, já descrito para apo A-I, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado o soro controle CHRONOLAB[®] APOLIPOPROTEIN CONTROL verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 2,7 – 4,5mg/dL

h) Lipoproteína(a) [Lp(a)]

A determinação plasmática da Lp(a) foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA[®] LIPOPROTEÍNA(a) TURBIDIMETRIA, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A Lp(a) na amostra causa aglutinação das partículas de látex cobertas com anticorpos anti-Lp(a). O grau de aglutinação é proporcional à concentração de Lp(a) na amostra e pode ser medido por turbidimetria, como descrito para apo A-I.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema completamente automatizado, as amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado o soro controle Lp(a) Control Turbidimetry (SPINREACT[®] S.A., Sant Esteve de Bas, Spain) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: até 30mg/dL

i) Proteína C Reativa ultra-sensível (PCRus)

A determinação quantitativa da PCRus foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA® PROTEÍNA C-REATIVA TURBIDIMETRIA, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante com metodologia ultra-sensível para monitoramento em cardiologia. A presença da proteína C reativa na amostra causa aglutinação das partículas de látex cobertas com anticorpos anti-proteína C reativa. O grau de aglutinação é proporcional à concentração de proteína C reativa na amostra e pode ser medido por turbidimetria, como descrito para apo A-I.

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

Valor de referência: até 3,0mg/L

j) Anticorpos anti-LDL oxidada (anti-LDLox)

A determinação plasmática do título de anti-LDLox foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico ALPCO™ Diagnostics ANTI OXIDISED LOW

DENSITY LIPOPROTEIN cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O teste de ELISA baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. Os anticorpos presentes na amostra (no caso, anti-LDLox) ligam-se aos antígenos fixados à superfície da placa (LDLox). Em seguida, anticorpos anti-LDLox marcados com a enzima peroxidase ligam-se a outros determinantes antigênicos do complexo antígeno-anticorpo. Os anticorpos que não se ligam são retirados por sucessivas lavagens. Na próxima etapa, o substrato cromógeno (ortofenilenodiamino) é adicionado na presença de peróxido de hidrogênio que reage com a enzima e gera um produto corado. A reação é interrompida com uma solução ácida e a intensidade de cor produzida é diretamente proporcional à concentração do antígeno na amostra. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 450nm, utilizando-se o equipamento Spectra Max-340 (Molecular Devices®).

A curva de calibração foi construída de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o calibrador fornecido, obtendo-se os pontos de 37; 75; 150; 300; 600 e 1200mU/mL e o título de anticorpos anti-LDLox das amostras foi obtida através da equação: $y = 0,6761\ln(x) - 2,5559$ ($R^2 = 0,9842$). Foi utilizado um soro controle fornecido pelo fabricante para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: ainda não estabelecido.

OBS: o fabricante informa que um grupo de 50 indivíduos hígidos apresentaram o valor da mediana de 263mU/mL.

k) Homocisteína total (HCT)

A determinação quantitativa da HCT foi realizada no plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico AXSYM[®] HOMOCISTEÍNA (Abbott[®] Laboratories – Alemanha), cujo princípio analítico é o imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Axsym[®] (Abbott[®] Laboratories – Alemanha) em sistema completamente automatizado.

O teste baseia-se no imunoensaio de fluorescência polarizada. A homocisteína total do plasma é reduzida à forma livre e esta é convertida enzimaticamente em S-adenosil-L-homocisteína (SAH). A SAH e o marcador de fluoresceína competem pelos locais de ligação na molécula do anticorpo monoclonal anti-SAH. A intensidade de fluorescência é inversamente proporcional à quantidade de homocisteína na amostra.

A curva de calibração foi construída utilizando-se os calibradores específicos de 50; 20; 5; 2,5 e 0mmol/L, de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Axsym[®] (Abbott[®] Laboratories – Alemanha) em sistema completamente automatizado e seis plasmas controles foram utilizados para avaliar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 3 a 20 μ mol/L

I) Fosfolipase A2 (sPLA2)

A determinação da atividade da enzima sPLA2 foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 (sPLA-2) ACTIVITY KIT (Assay[®] designs, Inc), cujo princípio analítico é a medida da atividade catalítica da

enzima frente ao substrato específico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

As amostras foram incubadas inicialmente com um substrato específico (hexadecil-fosfocolina) para sPLA2, que foi convertido num produto apresentando o grupo sulfidril. A presença do produto formado foi determinada colorimetricamente, em 405nm, utilizando-se o reagente de Ellman (DTNB), que formou uma substância de coloração amarela com o produto.

A curva de calibração foi construída de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o calibrador fornecido, obtendo-se os pontos de 10; 20; 40; 80 e 160U/mL e a atividade da sPLA2 das amostras foi obtida através da equação: $y = 0,0014x + 0,1442$ ($R^2 = 0,9972$). Foi utilizado um soro controle fornecido pelo fabricante para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: ainda não estabelecido na literatura.

OBS: Estudo desenvolvido em nosso laboratório com 38 indivíduos hígidos apresentou mediana = 18,4U/mL (25% = 13,4; 75% = 31,1).

4.5.5 Parâmetros hemostáticos

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

A determinação do PAI-1 plasmático foi realizada no plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico IMUBIND[®] Plasma PAI-1 ELISA (American Diagnostica[®] Inc. – Estados Unidos), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O teste de ELISA baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. Os antígenos presentes na amostra (no caso, PAI-1) ligam-se aos anticorpos monoclonais específicos fixados à superfície da placa (anticorpos anti-PAI-1). Em seguida, anticorpos anti-PAI-1 marcados com a enzima peroxidase ligam-se a outros determinantes antigênicos. Os anticorpos que não se ligam são retirados por sucessivas lavagens. Na próxima etapa, o substrato cromógeno (ortofenilenodiamino) é adicionado na presença de peróxido de hidrogênio que reage com a enzima e gera um produto corado. A reação é interrompida com uma solução ácida e a intensidade de cor produzida é diretamente proporcional à concentração do antígeno na amostra. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 490nm, utilizando-se o equipamento Spectra Max-340 (Molecular Devices®).

A curva de calibração foi construída de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o calibrador fornecido, obtendo-se os pontos de 50; 25; 12,5 e 0ng/mL. e a concentração de PAI-1 das amostras foi obtida através da equação: $y = 117,76x - 10,066$ ($R^2 = 0,9843$). Foi utilizado um plasma controle fornecido pelo fabricante para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 2 a 47ng/mL

b) Fator Tissular (TF)

A determinação do TF plasmático foi realizada no plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico IMUBIND® TF ELISA (American Diagnostica Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, já descrito para PAI-1, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

A curva de calibração foi construída de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o calibrador fornecido, obtendo-se os pontos de 0; 50; 100; 200; 500 e 1000pg/mL. A leitura a 450nm foi realizada utilizando-se o equipamento Spectra Max-340 (Molecular Devices®) e a concentração de TF das amostras foi obtida através da equação: $y = 0,0021x + 0,2828$ ($R^2 = 0,9919$). Foi utilizado um plasma controle fornecido pelo fabricante para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: ainda não estabelecido na literatura.

OBS: o fabricante informa que estudo preliminar, utilizando 50 plasmas de indivíduos normais, detectou o valor de média de $49,24 \pm 1,67$.

c) Inibidor da via do fator tissular (TFPI)

A determinação do TFPI plasmático foi realizada no plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico IMUBIND® Total TFPI ELISA (American Diagnostica Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, já descrito para PAI-1, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

A curva de calibração foi construída de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o calibrador fornecido, obtendo-se os pontos de 0; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 e 5ng/mL. Todas as amostras foram submetidas a uma diluição prévia 1:40, segundo instruções do fabricante. A leitura a 450nm foi realizada utilizando-se o equipamento Spectra Max-340 (Molecular Devices®) e a concentração de TFPI das amostras foi obtida através da equação: $y = 0,3447x - 0,0189$ ($R^2 = 0,9886$). Foi utilizado um plasma controle fornecido pelo fabricante para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: ainda não estabelecido na literatura.

OBS: Estudo desenvolvido pelo fabricante com 40 indivíduos apresentou média = 89,5ng/mL.

4.5.6 Análises genéticas

As amostras de DNA foram obtidas a partir de 300 μ L de sangue total colhido em EDTA, submetido ao processo de precipitação com acetato de amônio (segundo o protocolo e os reagentes do “Wizard Genomic DNA Purification Kit” – Promega[®]). Nas reações em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados desoxirribonucleotídeos fornecidos pela GIBCO BRL[®], tampão (15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de Triton-100) e Taq polimerase fornecidos pela Phoneutria[®]. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PT100[®] PCR Thermocycler (MJ Reserch, Waltham, USA).

a) Identificação dos alelos do gene de apolipoproteína E (apo E)

A análise do gene da apo E foi realizada pela técnica de PCR, seguida de digestão com enzimas de restrição para análise do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP), utilizando-se os oligonucleotídeos e a metodologia descrita por Tsukamoto *et al.* (1992) conforme descrito abaixo:

Após a extração de DNA total, uma região de 270 pares de bases do gene codificador de apo E foi amplificada, utilizando-se o oligonucleotídeo senso 5' GCA CGG CTG TCC AAG GAG CTG CAG GC 3' e o oligonucleotídeo antisenso 5' GGC GCT CGC GGA TGG CGC TGA GC 3' (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil). O produto de

PCR foi submetido à digestão a 37°C *overnight*, utilizando-se a endonuclease de restrição *Hha* I (Promega®). Esta enzima reconhece oito sítios de clivagem no alelo $\epsilon 2$, nove sítios no alelo $\epsilon 3$ e dez sítios no alelo $\epsilon 4$, de acordo com a Figura 2.

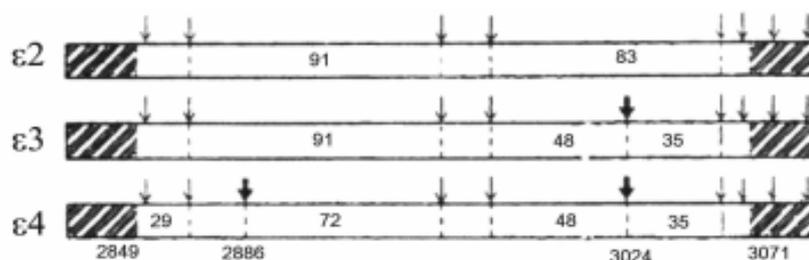


Figura 2: Padrões de RFLP para apo E: as regiões destacadas indicam os *primers*, as setas indicam sítios de clivagem pela *Hha* I e as setas em negrito marcam especificamente os sítios polimórficos de clivagem.

O produto da digestão foi posteriormente visualizado em gel de poliacrilamida, e o perfil das bandas no gel forneceu a base para a identificação do perfil genético, de acordo com a Tabela 4. Amostras de DNA de indivíduos previamente genotipados foram incluídas para controle da atividade enzimática.

Tabela 4 - Perfil de bandas no gel para a identificação dos alelos do gene de apo E

Genótipos - apo E		Fragmentos gerados pela digestão
Homozigotos	$\epsilon 2\epsilon 2$	91 e 83 bp
	$\epsilon 3\epsilon 3$	91 e 48 bp
	$\epsilon 4\epsilon 4$	72, 48, 35 e 29 bp
Heterozigotos	$\epsilon 2\epsilon 3$	91, 83, 48 e 29 bp
	$\epsilon 2\epsilon 4$	91, 83 e 72 bp
	$\epsilon 3\epsilon 4$	91, 72, 48 e 35 bp

b) Mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

A identificação da troca de uma C por uma T na posição 677 do gene da enzima MTHFR foi realizada pela técnica de PCR, seguida de digestão com enzimas de restrição para análise do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) como descrito previamente por Frosst *et al.* (1995). A reação de PCR foi executada utilizando-se os oligonucleotídeos 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' e 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil). O produto de PCR de 198pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hinf* I (Promega[®]). A presença da mutação cria uma seqüência que a enzima *Hinf* I reconhece e leva à quebra do fragmento em duas partes, uma de 175pb e outra de 23pb. Indivíduos heterozigotos para a mutação apresentam três fragmentos (198, 175 e 23pb) e homozigotos possuem os dois fragmentos (175 e 23pb). O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, seguido de coloração pela prata.

O padrão de peso molecular "1Kb Plus" (Gibco BRL[®], São Paulo, Brasil) foi utilizado como referência nas corridas eletroforéticas e amostras de DNA de indivíduos previamente genotipados foram incluídas para controle da atividade enzimática.

c) Polimorfismo (-675 4G/5G) no gene do PAI-1

A análise do gene do PAI-1 foi realizada pela técnica de PCR alelo específica como previamente descrito por Mansfield *et al.* (1995). A reação de PCR foi

executada utilizando-se os oligonucleotídeos 5'-AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT-3' e 5'-TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT TCT AG-3' (PAI-1 4G/5G), 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GA-3' (PAI-1 4G) e 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GG-3' (PAI-1 5G) (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil).

As condições de amplificação para o fragmento do PAI-1 (4G/5G) consistiram em 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, precedida de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido novamente por 20 ciclos com anelamento a 52 °C e finalizado com um passo de 72°C por 5 minutos. O produto de PCR normal consiste em um fragmento de 260 pb enquanto o alelo específico 139 pb que foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, seguido de coloração pela prata.

O padrão de peso molecular "1Kb Plus" (Gibco BRL[®], São Paulo, Brasil) foi utilizado como referência nas corridas eletroforéticas e amostras de DNA de indivíduos previamente genotipados foram incluídas para controle do ensaio.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística inicial foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey, após transformação logarítmica das variáveis que não apresentaram distribuição normal. As variáveis categóricas (fatores de risco, etnia e mutações) foram analisadas pelo Teste Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado. A associação entre as variáveis contínuas foi analisada pelo teste de correlação de Pearson, considerando todos os indivíduos estudados (n=123) nos grupos angiograficamente normal, ateromatose leve/moderada e ateromatose grave. Foi realizado o teste de correlação de Spearman para verificar a

correlação entre a presença de estenose superior a 70% (grupo ateromatose grave) e os níveis plasmáticos dos parâmetros estudados. Não foram incluídas na correlação de Pearson as dosagens de homocisteína, fator tissular e inibidor da via do fator tissular, considerando que estes parâmetros não foram obtidos para todos os participantes do estudo.

O tamanho mínimo da amostra foi definido utilizando-se a fórmula $t_{5\%,g} \times \sqrt{SD^2/n}$ (ARMITAGE & BERRY, 1994) e os coeficientes de variação descritos previamente na literatura, considerando-se, no máximo, 10% de variação em torno da média, para que fossem demonstradas as possíveis diferenças estatísticas com um nível de significância de 5%. Durante a realização do cálculo da amostra, foram utilizados médias e desvios-padrão obtidos em estudos prévios para cada parâmetro estudado.

Posteriormente foram ajustados modelos de regressão logística múltipla, onde a variável resposta foi considerada a presença ou não de estenose coronariana com obstrução superior a 70%. O primeiro modelo foi ajustado utilizando as variáveis sexo, idade, Diabetes mellitus, hipertensão, índice de massa corporal, tabagismo, sedentarismo, história familiar, CT, HDL, TG, LDLc direto, PCRus, Lp(a), PAI-1, anti-LDLox, sPLA2, índice apoB/apoA-I e apo E. Não foram incluídas no primeiro modelo as variáveis apo A-I, apo B, LDL Friedewald e colesterol não-HDL, que poderiam causar problemas de multicolinearidade com as variáveis índice apoB/apoA-I, LDLc direto, CT e HDLc. O segundo modelo foi ajustado utilizando as variáveis sexo, idade, Diabetes mellitus, hipertensão, índice de massa corporal, tabagismo, sedentarismo, história familiar, LDL Friedewald, colesterol não-HDL, TG, PCRus, Lp(a), PAI-1, anti-LDLox, sPLA2, apo A-I, apo B e apo E. Não foram incluídas no segundo modelo as variáveis índice apoB/apoA-I, LDLc direto, CT e HDLc. Todas as

variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$ no primeiro e segundo modelo foram incluídas no terceiro modelo da análise. Esta análise final foi ajustada considerando todas as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,05$.

Os programas Sigma Stat versão 1.0 e Prisma versão 3.0 foram utilizados para realizar as análises e confeccionar os gráficos, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AOS FATORES DE RISCO

Os dados referentes à presença de fatores de risco associados à aterosclerose, parâmetros lipídicos e evento de SCA, ocorrido três meses antes da entrevista e coleta do sangue são apresentados na Tabela 5, como número de indivíduos (n) e porcentagem de determinada variável presente nos componentes dos grupos AnN, ALM e AG. Os dados referentes às variáveis contínuas estão apresentados como média e desvio-padrão para cada grupo estudado.

Tabela 5 - Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco, parâmetros lipídicos e presença de síndrome coronariana aguda (SCA)

	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	----
Tabagismo	6 (17,1%)	8 (25,8%)	23 (40,4%) ^a	0,020 ^a
Hipertensão Arterial	31 (88,6%)	25 (80,6%)	48 (84,2%)	0,524
Sedentarismo	33 (94,3%)	23 (74,2%) ^{a1}	43 (75,4%) ^{a2}	0,023 ^{a1} ; 0,021 ^{a2}
História familiar	14 (40,0%)	18 (58,1%)	29 (50,8%)	0,601
Diabetes mellitus	5 (14,3%)	7 (22,6%)	8 (14,0%)	0,298
Colesterol total (mg/dL)	207 ± 49,3	203 ± 56,6	202 ± 44,4	0,892
HDLc (mg/dL)	44 ± 9,9	44 ± 9,6	42 ± 9,4	0,610
Colesterol não-HDL (mg/dL)	163 ± 48,0	160 ± 54,6	160 ± 42,2	0,943
LDLc Friedewald (mg/dL)	129 ± 45,0	126 ± 46,7	128 ± 39,2	0,941
LDLc direto (mg/dL)	137 ± 45,6	129 ± 42,9	135 ± 41,7	0,771
Triglicérides (mg/dL)	168 ± 73,8	170 ± 82,0	159 ± 66,1	0,812
SCA anterior à entrevista	7 (20,0%)	12 (38,7%)	35 (61,4%) ^a	<0,0001 ^a

Número de participantes (n) e porcentagem da presença do fator de risco e SCA nos grupos estudados. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as variáveis tabagismo, sedentarismo e presença de SCA anterior a três meses da entrevista, representadas pela letra: a. vs AnN (qui-quadrado). As variáveis contínuas não apresentaram diferenças significativas (ANOVA). AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; HDLc = colesterol presente na lipoproteína de alta densidade; LDLc = colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AO USO DE MEDICAMENTOS

Os dados referentes aos medicamentos em uso pelos participantes durante a triagem são apresentados na Tabela 6, como número de indivíduos (n) e porcentagem do uso de determinado medicamento nos componentes dos grupos AnN, ALM e AG. Foram considerados os medicamentos usados com maior frequência, apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 - Caracterização dos grupos quanto ao uso de medicamentos

	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	----
Ácido acetilsalicílico	23 (65,7%)	24 (77,4%)	44 (77,2%)	0,632
β-Bloqueadores	22 (62,8%)	18 (58,0%)	39 (68,4%)	0,551
Bloqueadores do canal de cálcio	12 (34,3%)	8 (25,8%)	24 (42,1%)	0,457
Nitratos	8 (22,8%)	14 (45,2%)	19 (33,3%)	0,245
Diuréticos tiazídicos	18 (51,4%)	21 (67,7%)	41 (71,9%) ^a	0,047 ^a
Inibidores da ECA	21 (60,0%)	20 (64,5%)	46 (80,7%) ^a	0,030 ^a

Número de participantes (n) e porcentagem dos participantes em uso de medicamentos nos grupos estudados. Foram observadas diferenças significativas entre o uso de diuréticos tiazídicos e inibidores da ECA, representadas pela letra: a. vs AnN (qui-quadrado). AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; ECA = enzima conversora da angiotensina.

Tabela 7 – Medicamentos agrupados

Grupo	Medicamento
Ácido acetilsalicílico	Ácido Acetilsalicílico
β -Bloqueadores	Atenolol, Propanolol
Bloqueadores do canal de cálcio	Diltiazem, Nifedipina
Nitratos	Mononitrato de Isosorbida (Isosorbida)
Diuréticos tiazídicos	Hidroclorotiazida (Clorana)
Inibidores da ECA	Captopril (Capoten), Enalapril (Renitec)

ECA = enzima conversora da angiotensina

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO À ETNIA

Os dados referentes à caracterização dos grupos quanto à etnia são apresentados na Tabela 8, como número de indivíduos (n) e porcentagem de determinada raça nos componentes dos grupos AnN, ALM e AG.

Tabela 8 – Caracterização dos grupos quanto à etnia

	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	----
Mestiço	17 (48,6%)	11 (35,5%)	24 (42,1%)	0,661
Caucasiano	10 (28,6%)	8 (25,8%)	20 (35,1%)	0,342
Negro	8 (22,8%)	12 (38,7%)	13 (22,8%)	0,523

Número de participantes (n) e porcentagem dos participantes mestiços, caucasianos e negros nos grupos estudados. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados (qui-quadrado). AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO ATEROMATOSE GRAVE

Os dados referentes à caracterização do grupo ateromatose grave (pacientes que apresentaram estenose superior a 70% na angiografia coronariana) são apresentados na Tabela 9, como número de indivíduos (n) e porcentagem observada para o número de artérias afetadas.

Tabela 9 – Caracterização do grupo ateromatose grave quanto ao número de artérias afetadas pela estenose coronariana

	n	%
Ateromatose grave	57	100%
1 artéria	16	28,1%
2 artérias	13	22,8%
3 ou mais artérias	28	49,1%
Descendente anterior	39	68,4%

Número de participantes (n) e porcentagem dos indivíduos do grupo ateromatose grave de acordo com o número de artérias afetadas pela estenose coronariana.

5.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMOSTÁTICOS

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e hemostáticos obtidos neste estudo encontram-se nas Tabelas 10, 11, 12 e 13. Os dados estão apresentados com os valores das médias e dos desvios-padrão, ou com os valores das medianas, primeiro e terceiro quartis para os grupos AnN, ALM e AG. Os parâmetros homocisteína, fator tissular e inibidor da via do fator tissular não foram determinados em todos os participantes do estudo, devido à limitação de reagentes requeridos.

Tabela 10 – Parâmetros bioquímicos e hemostáticos para os grupos estudados

	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	---
Apo A-I (mg/dL)	136 ± 19,9	134 ± 18,7	138 ± 16,3	0,415
Apo B (mg/dL)	91 ± 23,0	90 ± 25,5	90 ± 21,4	0,954
Apo E (mg/dL)	3,3 ± 1,3	3,7 ± 1,4	3,6 ± 1,3	0,421
ApoB/apoA-I	0,67 ± 0,1	0,68 ± 0,2	0,65 ± 0,1	0,688
Anti-LDLox (mU/mL)	582 ± 291,5	630 ± 299,1	758 ± 314,0 ^a	0,014 ^a
sPLA2 (U/mL)	28,1 ± 19,7	122,0 ± 96,1 ^a	127,8 ± 58,8 ^a	<0,001 ^a
PAI-1 (ng/mL)	37,1 ± 14,8	45,9 ± 19,8	72,9 ± 44,4 ^{a,b}	<0,001 ^a ; 0,004 ^b

AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; Apo = apolipoproteína; Anti-LDLox = anticorpos anti-LDL oxidada; sPLA2 = fosfolipase A2; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1. As diferenças significativas estão representadas pelas letras: a. vs AnN e b. vs ALM (ANOVA seguida de Teste de Tukey).

Tabela 11 – Resultados obtidos para os parâmetros lipoproteína(a) e proteína C reativa ultra-sensível para os grupos estudados

	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	---
Lp(a) (mg/dL)				
Média ± Desvio Padrão	17,9 ± 18,8	39,1 ± 27,2 ^a	52,5 ± 41,2 ^{a,b}	<0,001 ^{a,b}
Mediana	11,4	34,8 ^a	40,6 ^{a,b}	<0,001 ^{a,b}
Primeiro e terceiro quartis	6,9 – 19,6	18,6 – 50,0	24,6 – 71,8	---
PCRus (mg/L)				
Média ± Desvio Padrão	3,6 ± 2,9	9,1 ± 11,3 ^a	10,1 ± 13,2 ^a	0,015 ^a
Mediana	2,5	5,9 ^a	4,4 ^a	0,032 ^a
Primeiro e terceiro quartis	1,4 – 5,6	3,1 – 9,3	2,0 – 12,4	---

AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; Lp(a) = lipoproteína(a); PCRus = proteína C reativa ultra-sensível. As diferenças significativas estão representadas pelas letras: a. vs AnN e b. vs ALM (Kruskal-Wallis seguido de Teste de Tukey).

As Figuras de 3 a 8 ilustram as distribuições dos dados obtidos para os parâmetros bioquímicos e hemostáticos nos grupos AnN, ALM e AG.

A Figura 3 apresenta os dados obtidos com a determinação do índice apoB/apoA-I nos grupos estudados e divisão do grupo aterosclerose grave de acordo com o número de artérias comprometidas. Não foi observada diferença significativa entre as médias dos três grupos.

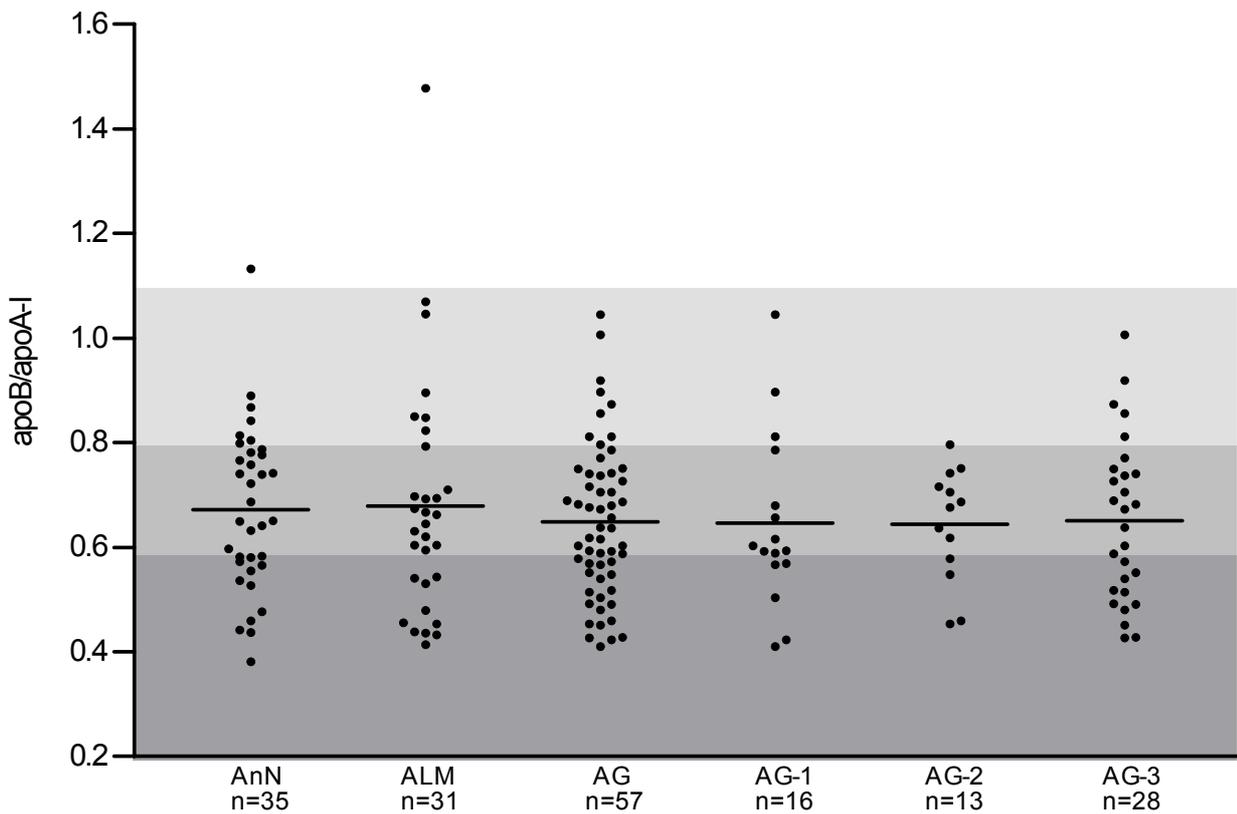


Figura 3 – Distribuição dos valores do índice apoB/apoA-I.

Índice apoB/apoA-I para os grupos angiograficamente normal (AnN), aterosclerose leve/moderada (ALM) e aterosclerose grave com 1 artéria comprometida (AG-1), duas artérias comprometidas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). A área sombreada em cinza escuro corresponde a valores considerados de baixo risco para IAM (até 0,6) para o índice apoB/apoA-I, a área sombreada em cinza intermediário corresponde a valores considerados de risco intermediário (0,6 a 0,8), a área sombreada em cinza claro corresponde a valores considerados de alto risco (0,8 a 1,1).

A Figura 4 apresenta os dados obtidos com a determinação da lipoproteína(a) nos grupos estudados e divisão do grupo ateromatose grave de acordo com o número de artérias comprometidas, expressos em mg/dL. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos AnN e todos os outros grupos estudados ($p < 0,001$). Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos ALM e AG ($p < 0,001$) e entre os grupos ALM e AG com três ou mais artérias afetadas (AG-3) ($p < 0,001$).

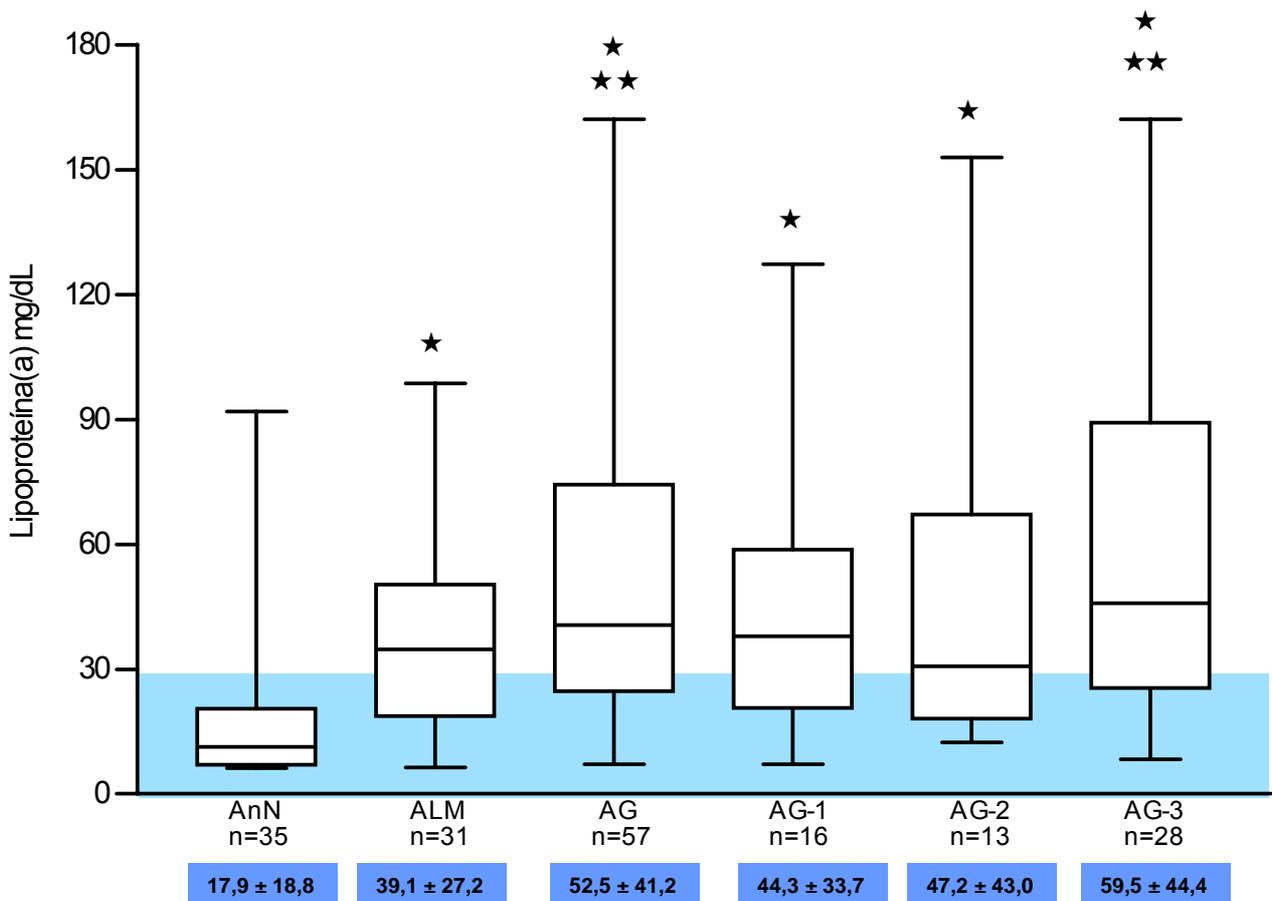


Figura 4 – Distribuição dos valores de lipoproteína(a).

Valores expressos em mg/dL para os grupos angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave com uma (AG-1), duas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). A área sombreada corresponde à faixa de referência (até 30mg/dL), cada box representa a mediana, primeiro e terceiro quartis dos grupos, (★) indica diferença significativa em relação ao grupo angiograficamente normal ($p < 0,001$) e (★★) indica diferença significativa em relação ao grupo ateromatose leve/moderada ($p < 0,001$).

A Figura 5 apresenta os dados obtidos com a determinação do título de anticorpos anti-LDL oxidada nos grupos estudados e divisão do grupo aterosclerose grave de acordo com o número de artérias comprometidas, expressos em mU/mL. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos AnN e AG ($p=0,014$), entre os grupos AnN e AG-3 ($p<0,001$). Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos AG com uma artéria afetada (AG-1) e AG-3 ($p=0,002$).

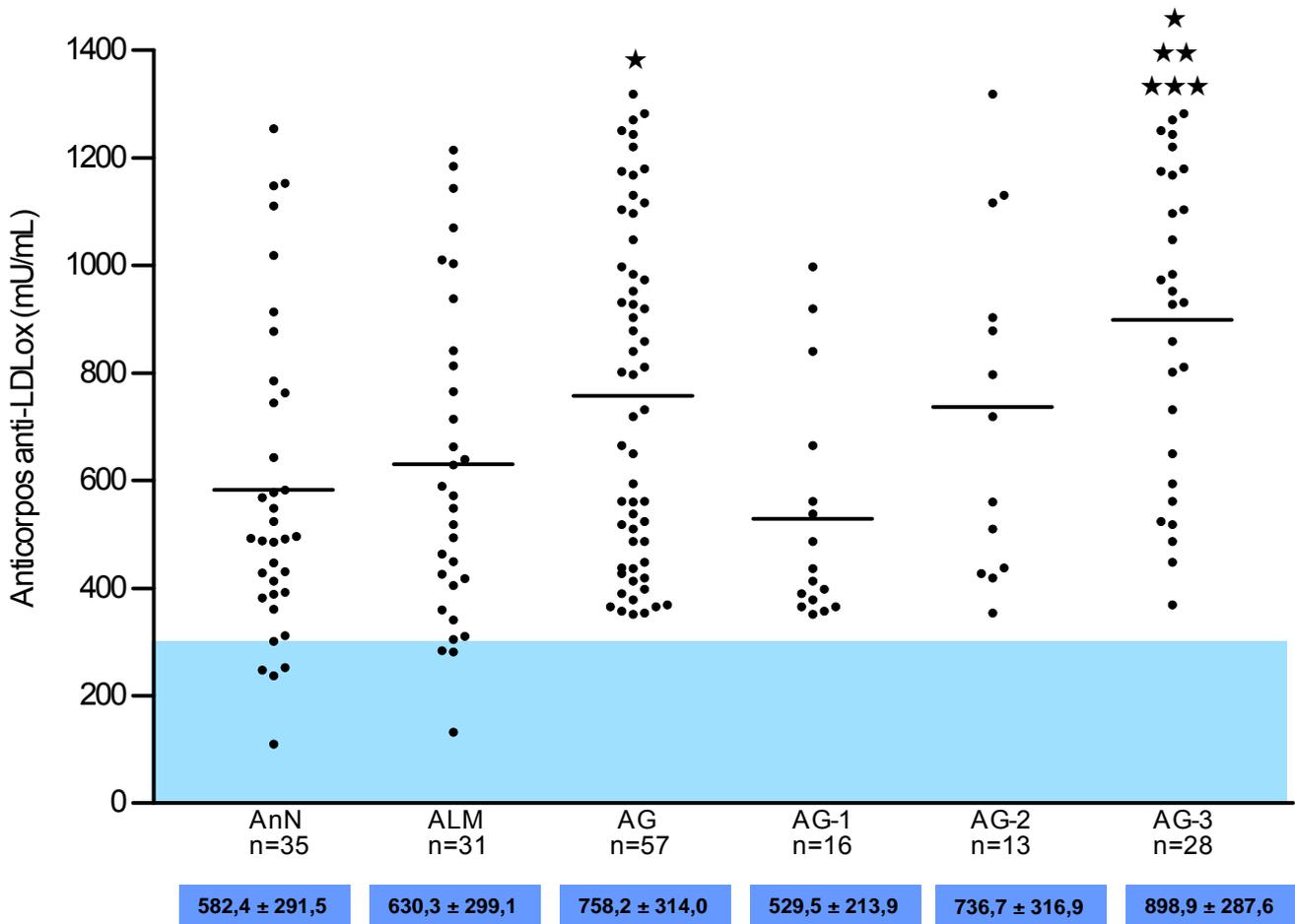


Figura 5 – Distribuição dos valores de anticorpos anti-LDLoxidada.

Valores expressos em mU/mL para os grupos angiograficamente normal (AnN), aterosclerose leve/moderada (ALM) e aterosclerose grave com uma (AG-1), duas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). A área sombreada corresponde à faixa de referência (até 263mU/mL), as linhas horizontais representam as médias dos grupos, (★) indica diferença significativa em relação ao grupo angiograficamente normal ($p<0,001$), (★★) indica diferença significativa em relação ao grupo aterosclerose grave com uma artéria afetada ($p=0,002$) e (★★★) indica diferença significativa em relação ao grupo aterosclerose leve/moderada ($p=0,006$).

A Figura 6 apresenta os dados obtidos com a determinação da fosfolipase A2 nos grupos estudados e divisão do grupo ateromatose grave de acordo com o número de artérias comprometidas, expressos em U/mL. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos AnN e todos os outros grupos estudados ($p < 0,0001$). Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos ALM e AG ($p < 0,001$), entre os grupos AG-1 e AG-3 ($p < 0,001$) e entre os grupos AG com duas artérias afetadas (AG-2) e AG-3 ($p < 0,001$).

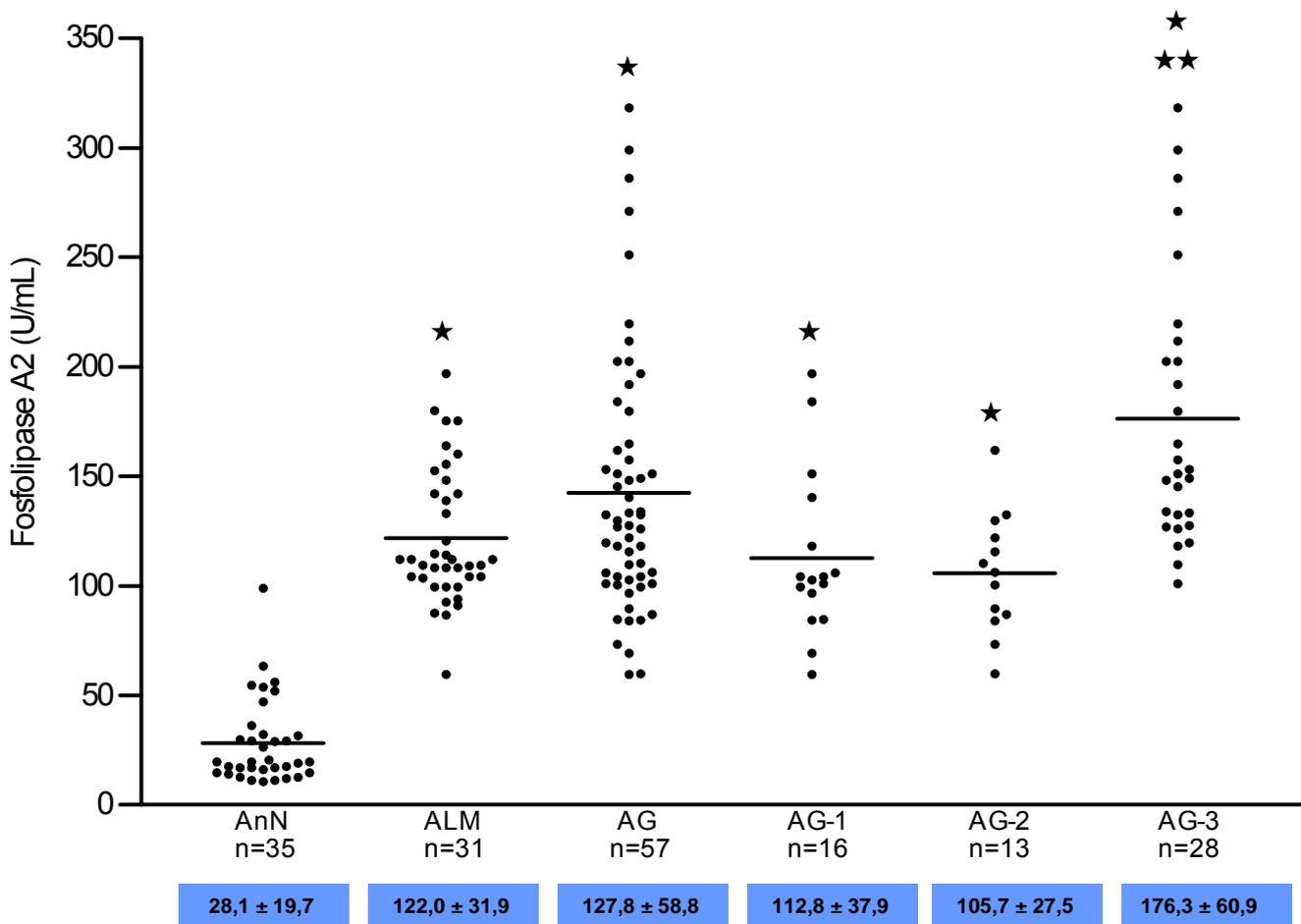


Figura 6 – Distribuição dos valores de fosfolipase A2.

Valores expressos em U/mL para os grupos angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave com uma (AG-1), duas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). As linhas horizontais representam as médias dos grupos, (★) indica diferença significativa em relação ao grupo angiograficamente normal ($p < 0,0001$) e (★★) indica diferença significativa em relação aos grupos ateromatose leve/moderada, ateromatose grave com uma e duas artérias afetadas ($p < 0,001$).

A Figura 7 apresenta os dados obtidos com a determinação da proteína C reativa ultra-sensível nos grupos estudados e divisão do grupo ateromatose grave de acordo com o número de artérias comprometidas, expressos em mg/L. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos AnN e AG ($p=0,032$) e entre os grupos AnN e AG-3 ($p<0,001$).

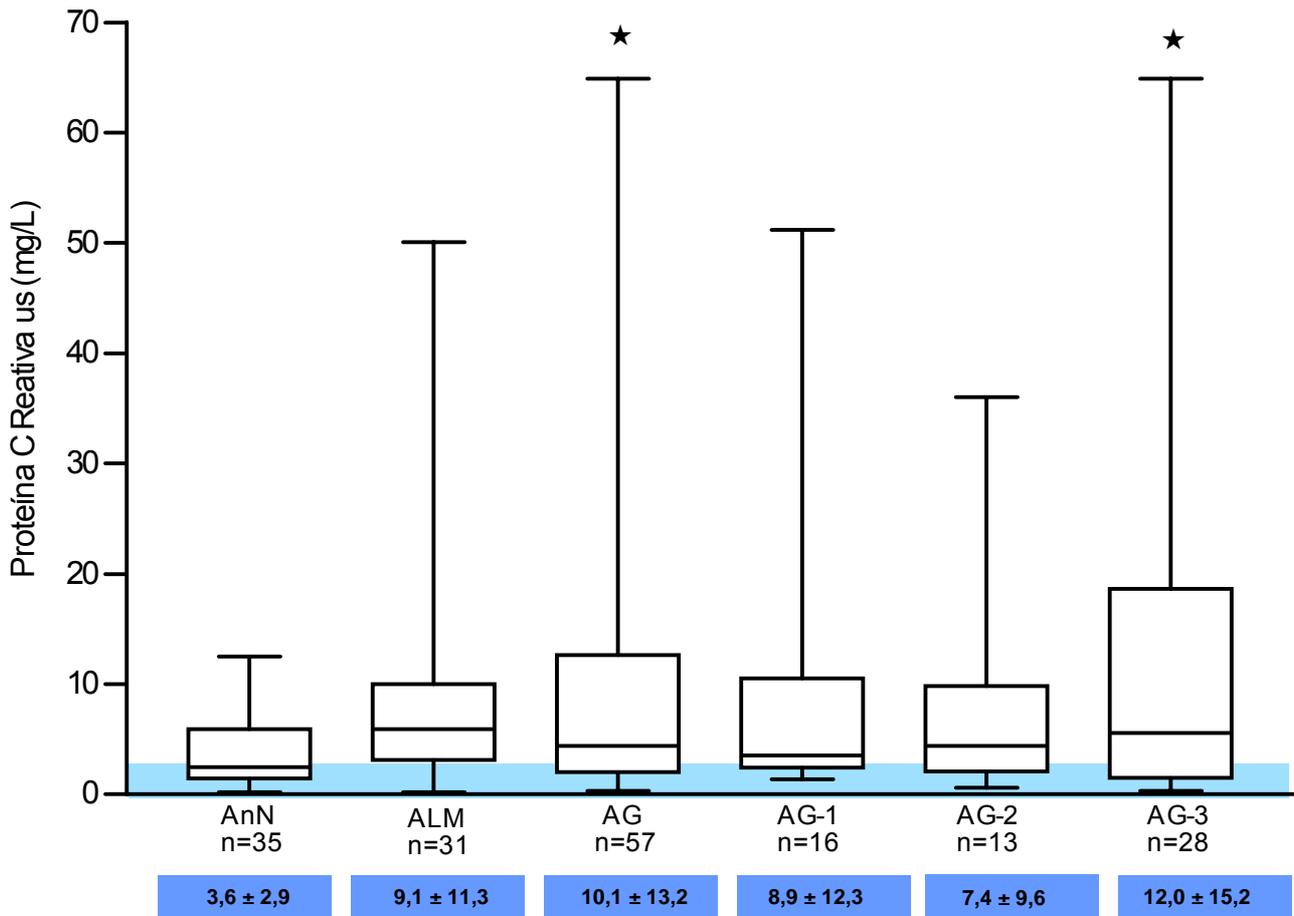


Figura 7 – Distribuição dos valores de proteína C reativa ultra-sensível.

Valores expressos em mg/L para os grupos angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave com uma (AG-1), duas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). A área sombreada corresponde à faixa de referência (até 3,0mg/L), cada box representa a mediana, primeiro e terceiro quartis dos grupos, (★) indica diferença significativa em relação ao grupo angiograficamente normal ($p<0,05$).

A Figura 8 apresenta os dados obtidos com a determinação do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) nos grupos estudados e divisão do grupo ateromatose grave de acordo com o número de artérias comprometidas, expressos em ng/mL. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos AnN e AG ($p < 0,001$), entre os grupos AnN e AG-1 ($p < 0,001$), AG-2 ($p = 0,007$) e AG-3 ($p = 0,010$). Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos ALM e AG ($p = 0,024$) e entre os grupos ALM e AG-1 ($p = 0,004$).

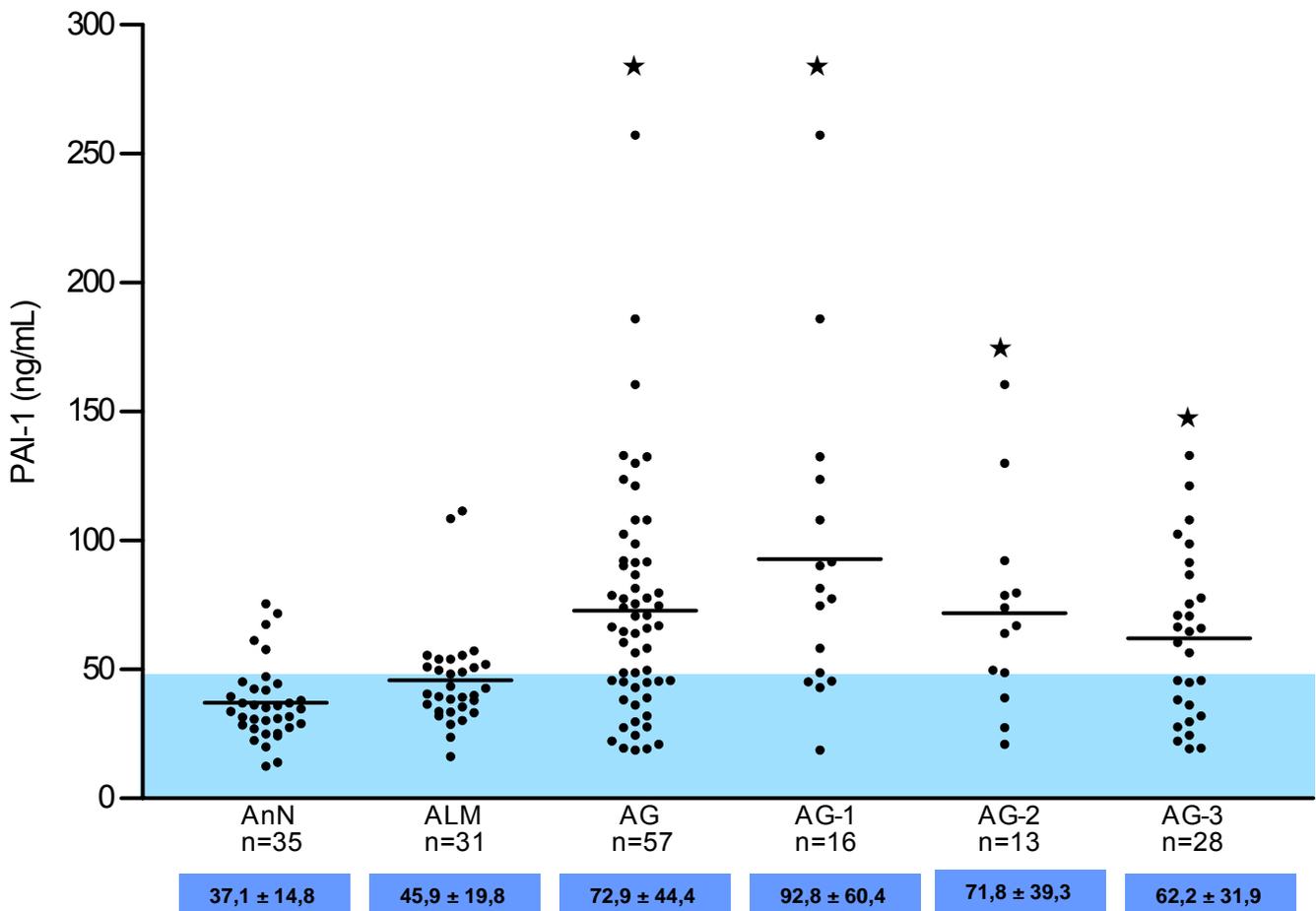


Figura 8 – Distribuição dos valores do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1).

Valores expressos em ng/mL para os grupos angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave com uma (AG-1), duas (AG-2) e três ou mais artérias afetadas (AG-3). A área sombreada corresponde à faixa de referência (até 47ng/mL) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos, (★) indica diferença significativa em relação aos grupos angiograficamente normal ($p < 0,05$) e ateromatose leve/moderada ($p < 0,05$).

As Tabelas 12 e 13 apresentam o número de indivíduos, sexo, idade e índice de massa corporal dos participantes em cujas amostras foram determinados os parâmetros homocisteína, fator tissular e inibidor da via do fator tissular, bem como os resultados obtidos neste estudo para os referidos parâmetros. Os dados estão apresentados com os valores das médias e dos desvios-padrão para os grupos AnN, ALM e AG.

Tabela 12 – Dados referentes à dosagem de homocisteína para os grupos estudados

	AnN	ALM	AG
n (M/F)	20 (10/10)	14 (8/6)	29 (17/12)
Idade (anos)	60,0 ± 7,7	60,8 ± 10,7	60,6 ± 9,6
IMC (Kg/m ²)	24,9 ± 4,3	26,9 ± 3,9	24,5 ± 3,3
HCT (μmol/L)	10,6 ± 3,9	14,2 ± 6,5	17,0 ± 7,4 ^a

n = tamanho; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IMC = índice de massa corporal; AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; HCT = homocisteína total. A diferença significativa observada está representada pela letra: a. vs AnN (ANOVA seguida de Teste de Tukey; p<0,05).

Tabela 13 – Dados referentes às dosagens de fator tissular e inibidor da via do fator tissular para os grupos estudados

	AnN	ALM	AG
n (M/F)	21 (10/11)	18 (10/8)	30 (17/13)
Idade (anos)	59,1 ± 7,8	60,3 ± 9,3	61,0 ± 9,1
IMC (Kg/m ²)	25,2 ± 4,2	27,5 ± 4,9	25,3 ± 3,8
TF (pg/mL)	109 ± 82	173 ± 124	265 ± 198 ^a
TFPI (ng/mL)	51 ± 15	59 ± 16	59 ± 24

n = tamanho; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IMC = índice de massa corporal; AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave; TF = fator tissular; TFPI = inibidor da via do fator tissular. A diferença significativa observada está representada pela letra: a. vs AnN (ANOVA, seguida de Teste de Tukey; p<0,05).

5.6 ANÁLISES GENÉTICAS

Os dados referentes aos resultados das análises moleculares são apresentados nas Tabelas 14, 15, 16 e 17, como número de indivíduos (n) e porcentagem da freqüência da mutação observada nos componentes dos grupos AnN, ALM e AG.

Tabela 14 – Mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase

	AnN	ALM	AG	p
n	20	14	29	---
Heterozigotos	6 (30%)	4 (28,6%)	18 (62,0%)	0,518
Homozigotos	1 (5%)	1 (7,1 %)	2 (6,9%)	0,867
Não detectada	13 (65%)	9 (64,3%)	9 (31,1%)	0,662

Resultados obtidos para a frequência da mutação nos grupos de indivíduos em que foram realizadas as dosagens de homocisteína. Os dados estão representados como o número de participantes e porcentagem de indivíduos que apresentaram a mutação em heterozigose ou homozigose e a ausência da mesma. AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 15 – Polimorfismo (-675 4G/5G) no gene do PAI-1

	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	----
4G/4G	10 (28,6%)	9 (29,0%)	24 (42,1%) ^a	<0,001 ^a
5G/5G	12 (34,3%)	11 (35,5%)	20 (35,1%)	0,463
4G/5G	13 (37,1%)	11 (35,5%)	10 (22,8%) ^a	<0,001 ^a

Resultados obtidos para a frequência da mutação no gene do PAI-1 nos grupos estudados. Os dados estão representados como o número de participantes e porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos 4G/4G, 5G/5G e 4G/5G. AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave. As diferenças significativas observadas estão representadas pela letra: a. vs todos os outros grupos (Qui-quadrado).

Tabela 16 – Identificação dos genótipos da apolipoproteína E

Genótipo	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	----
$\epsilon 3/\epsilon 3$	19 (54,3%)	16 (51,6%)	34 (59,6%)	0,318
$\epsilon 3/\epsilon 4$	9 (25,7%)	8 (25,8%)	12 (21,0%)	0,842
$\epsilon 4/\epsilon 4$	3 (8,6%)	3 (9,7%)	4 (7,0%)	0,378
$\epsilon 2/\epsilon 4$	3 (8,6%)	---	1 (1,8%)	0,876
$\epsilon 2/\epsilon 3$	1 (2,8%)	4 (12,9%)	6 (10,5%)	0,761

Resultados obtidos para a frequência dos genótipos $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ e $\epsilon 2/\epsilon 3$ nos grupos estudados. Os dados estão representados como o número de participantes e porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos em cada grupo estudado. AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 17 – Frequência dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ nos grupos estudados

Frequência Alélica	AnN	ALM	AG	p
n	35	31	57	----
Alelo $\epsilon 2$	0,06	0,06	0,06	0,812
Alelo $\epsilon 3$	0,68	0,71	0,75	0,961
Alelo $\epsilon 4$	0,26	0,23	0,18	0,764

Resultados obtidos para a frequência alélica no gene da apolipoproteína E nos grupos estudados. Os dados estão representados como o número de participantes e porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. AnN = angiograficamente normal; ALM = ateromatose leve/moderada; AG = ateromatose grave. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados.

5.7 CORRELAÇÕES

Os resultados das correlações significativas, obtidas com o teste de Pearson entre os parâmetros bioquímicos e hemostáticos estudados estão apresentados na Tabela 18. Devido ao grande número de correlações observadas, foram apresentadas apenas as superiores a 30%. A Tabela 19 apresenta todos os resultados obtidos com o teste de correlação de Spearman entre a presença de estenose superior a 70% (grupo ateromatose grave) e os parâmetros estudados. A Tabela 20 apresenta as correlações obtidas com o teste de correlação de Spearman entre a presença de polimorfismos e os níveis plasmáticos dos parâmetros estudados. Os dados estão apresentados com os valores do coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman (r) e probabilidade (p).

Tabela 18 – Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos e hemostáticos estudados

Correlação	n	r	p
TF x TFPI	69	0,34	0,004
sPLA2 x anti-LDLox	123	0,81	<0,001
Apo B x CT	123	0,54	<0,0001
Apo B x ApoB/apoA-I	123	0,86	<0,0001
Apo B x TG	123	0,56	<0,0001
Apo B x LDLc Friedewald	123	0,51	<0,0001
ApoB/apoA-I x CT	123	0,54	<0,0001
CT x LDLc Friedewald	123	0,95	<0,0001
CT x LDLc direto	123	0,89	<0,0001
LDLc Friedewald x LDLc direto	123	0,93	<0,0001

r = coeficiente de correlação de Pearson; p = probabilidade; TF = fator tissular; TFPI = inibidor da via do fator tissular; sPLA2 = fosfolipase A2 secretória; anti-LDLox = anticorpos anti LDL oxidada; Apo B = apolipoproteína B; Apo A-I = apolipoproteína A-I; CT = colesterol total; TG = triglicérides; LDLc = colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 19 – Correlação de Spearman entre a presença de ateromatose grave e os parâmetros estudados

Correlação	n	r	p
AG x HDLc	123	-0,17	0,03
AG x ApoB/apoA-I	123	0,18	0,02
AG x Lp(a)	123	0,73	<0,0001
AG x Anti-LDLox	123	0,42	<0,0001
AG x sPLA2	123	0,59	<0,0001
AG x HCT	63	0,42	<0,001
AG x TF	69	0,42	<0,0001
AG x PCRus	123	0,23	0,003
AG x PAI-1	123	0,47	<0,0001

r = coeficiente de correlação de Spearman; p = probabilidade; AG = ateromatose grave; HDLc = colesterol presente na lipoproteína de alta densidade; PCRus = proteína C reativa ultra-sensível; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; TF = fator tissular; Anti-LDLox = anticorpos anti-LDL oxidada; Apo B = apolipoproteína B; Lp(a) = lipoproteína(a); Apo A-I = apolipoproteína A-I; sPLA2 = fosfolipase A2; HCT = homocisteína total.

Tabela 20 – Correlação de Spearman entre a presença do polimorfismo 4G/5G e os níveis plasmáticos do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

Correlação	n	r	p
Genótipo 4G/4G x PAI-1	123	0,28	<0,001
Genótipo 5G/5G x PAI-1	123	0,02	0,451

r = coeficiente de correlação de Spearman; p = probabilidade; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1.

5.8 ANÁLISE MULTIVARIADA

Os resultados obtidos com o modelo final da análise multivariada estão apresentados na Tabela 21. Apenas os parâmetros sPLA2, PAI-1, Lp(a), TG, IMC e colesterol não-HDL apresentaram significância estatística ($p < 0,20$) no primeiro e segundo modelos de análise. No terceiro modelo ajustado (modelo final), apenas os parâmetros sPLA2, PAI-1 e Lp(a) apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 21 – Modelo final obtido com a regressão logística múltipla

Variável	Odds Ratio	Intervalo de Confiança 95%	p
Lp(a)	0,979	0,961 – 0,992	0,004
PAI-1	0,969	0,950 – 0,989	0,002
sPLA2	0,980	0,970 – 0,991	<0,001

Lp(a) = lipoproteína(a); PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; sPLA2 = fosfolipase A2.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS

Este estudo transversal avaliou uma população de risco intermediário a elevado, já que os pacientes selecionados foram encaminhados à angiografia coronariana para avaliação de dor torácica e apresentaram perfil demográfico e fatores de risco associados à DAC conforme mostrado na Tabela 5. Esse critério permitiu maior confiabilidade na comparação entre os grupos. O grupo AG apresentou número significativamente maior de indivíduos tabagistas e que apresentaram SCA anterior a três meses da etapa de coleta das amostras biológicas, quando comparado com o grupo AnN ($p < 0,05$). Os três grupos estudados apresentaram elevada porcentagem de sedentarismo, sendo que o grupo AnN apresentou número significativamente mais elevado de indivíduos sedentários quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$). Tal fato pode ser atribuído, parcialmente, à mudança no estilo de vida recomendada pelos clínicos para pacientes com DAC. Torna-se oportuno enfatizar que 61,4% dos indivíduos do grupo AG apresentaram história anterior de SCA (Tabela 5), o que leva a crer que, provavelmente estão com recomendação de dieta com restrição de colesterol e gorduras saturadas, além de exercícios físicos regulares. Quanto aos demais fatores de risco, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as variáveis hipertensão arterial, história familiar e *Diabetes mellitus*.

Os medicamentos mais utilizados pelos participantes do estudo foram os anti-hipertensivos (Tabela 6), refletindo a alta prevalência de hipertensos nos três grupos estudados. Os indivíduos do grupo AG apresentaram uso significativamente elevado de diuréticos tiazídicos e inibidores da enzima conversora de angiotensina quando comparado com o grupo AnN. Com relação aos outros medicamentos, não foram

observadas diferenças significativas entre os grupos. Em virtude do desenho do estudo, foi observada uma alta porcentagem de indivíduos em uso regular de ácido acetilsalicílico (73,4%), no entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos. A trombose coronariana é um evento crucial na fisiopatologia da DAC, responsável direta pelos eventos agudos fatais ou não. Sem a formação do trombo, a placa de ateroma presente nas coronárias poderia ser causa de morbidade, mas não de mortalidade. O uso de medicamentos que atuam sobre o sistema hemostático, com o propósito de prevenir ou reduzir a incidência de trombose coronariana é de fundamental importância no tratamento de pacientes com DAC, sendo o ácido acetilsalicílico o medicamento mais utilizado (KNIGHT, 2003). Uma possível explicação para o fato do grupo composto por indivíduos angiograficamente normais ter apresentado alta prevalência do uso de ácido acetilsalicílico consiste na presença de dor torácica atípica nos integrantes deste grupo, o que levou o clínico a solicitar a realização da angiografia coronariana para diagnóstico diferencial com outras possíveis patologias, que não a DAC. O uso de ácido acetilsalicílico é indicado mesmo antes da realização da angiografia, para indivíduos que se encontram sob alto risco de eventos cardiovasculares (SBC, 2001), numa tentativa de prevenir o possível trombo coronariano e suas graves conseqüências.

Os três grupos avaliados apresentaram homogeneidade em relação à idade, sexo e IMC (Tabela 2). Os participantes não apresentavam sobrepeso ou obesidade, sugerindo a ausência do componente metabólico nestes indivíduos. A porcentagem de homens e mulheres também não se mostrou significativamente diferente nos grupos avaliados, o mesmo acontecendo com relação à etnia (Tabela 8). Uma análise das Tabelas 5 e 10 permite observar que os três grupos estudados não apresentaram diferenças significativas com relação aos parâmetros dos perfis

lipídico (CT, HDLc, LDLc, colesterol não-HDL e TG) e apolipoprotéico. Os valores das médias destes parâmetros situam-se praticamente na faixa de valores desejáveis e limítrofes para lípidos, e na faixa de referência para apolipoproteínas A-I, B e E, demonstrando que a maioria dos indivíduos selecionados não apresentou alterações significativas nos perfis lipídico convencional e apolipoprotéico, em virtude do próprio desenho do estudo, que excluiu indivíduos em uso de drogas hipolipemiantes e com níveis de TG superiores a 400mg/dL.

Os dados da Tabela 18 mostram que foi observada uma correlação positiva na ordem de 93% entre o LDLc direto e o LDLc Friedewald ($p < 0,0001$), apesar das médias obtidas para os valores de LDLc direto terem se apresentado cerca de 5% mais elevadas em relação ao LDLc Friedewald nos grupos estudados. Alguns estudos já haviam demonstrado que os valores de LDLc obtidos pela equação de Friedewald podem ser subestimados. Lindsey *et al.* (2004), estudando indivíduos com DAC ou com alto risco de desenvolver a doença, relataram uma forte correlação entre o LDLc direto e o LDLc estimado pela equação de Friedewald ($r = 0,94$, $p < 0,05$) com uma subestimação de aproximadamente 20mg/dL pelo último método.

Os dados apresentados nas Tabelas 5 e 10 permitem observar que os pacientes dos grupos ALM e AG apresentaram estenose coronariana, mesmo apresentando níveis lipídicos e apolipoprotéicos normais ou moderadamente elevados, demonstrando que, apesar da enorme contribuição das dislipidemias para o desenvolvimento de DAC, outros fatores também contribuíram para a progressão da aterosclerose nestes indivíduos. Atualmente, está claro na literatura que, apesar da hipercolesterolemia ser fator importante em aproximadamente 50% dos pacientes com DAC, outros fatores de risco devem ser levados em consideração (ROSS, 1999), uma vez que muitos eventos cardiovasculares ocorrem em indivíduos

normolipêmicos (PACKARD & LIBBY, 2008). No presente estudo, as médias encontradas para os níveis plasmáticos de LDLc, determinados pelos dois processos, nos grupos ALM e AG (Tabela 5) não descartam a hipótese de que o LDLc possa ter contribuído para a presença de aterosclerose nestes grupos, considerando que as partículas de LDL são heterogêneas em relação ao tamanho e densidade. As partículas de LDL pequenas e mais densas são predominantemente mais aterogênicas (SBC, 2001), como resultado de uma maior penetração na parede arterial e de uma menor afinidade pelo receptor de LDL, prolongando a meia-vida desta no plasma, bem como por uma menor resistência à oxidação (HIRANO *et al.*, 2003). Tal fato indica que o fenótipo das subclasses de LDL do indivíduo também é relevante além dos níveis plasmáticos elevados de LDLc no desenvolvimento da aterosclerose.

6.2 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E APOLIPOPROTEÍNAS

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias obtidas para as apolipoproteínas A-I e B, bem como para o índice apoB/apoA-I nos três grupos estudados (Figura 3). Estes dados indicam que os parâmetros apolipoproteínas A-I e B e índice apoB/apoA-I não apresentaram contribuição adicional a respeito da gravidade da DAC nos indivíduos estudados. Alguns estudos prospectivos recentes destacam importantes evidências para a associação entre as apolipoproteínas A-I e B e a DAC. O Quebec Cardiovascular Study (LAMARCHE *et al.*, 1996) avaliou 2155 homens canadenses e foi o primeiro estudo prospectivo a demonstrar que a determinação da apo B foi superior aos parâmetros lipídicos convencionais na predição de risco cardiovascular. Na avaliação de cerca de 170.000 indivíduos

suecos, o estudo AMORIS (WALLDIUS & JUNGNER, 2001) demonstrou que a apo B se apresentou como melhor marcador de risco cardiovascular do que o LDLc, especialmente em indivíduos com níveis desejáveis de LDLc, independente do sexo. O índice apoB/apoA-I foi identificado neste estudo como a variável isolada mais fortemente associada com o aumento do risco de IAM fatal, principalmente quando os níveis lipídicos estavam na faixa de valores desejáveis.

Enquanto alguns estudos demonstraram a utilidade de níveis elevados de apo B como preditores de risco cardíaco (WESTERVELD *et al.*, 1998; MEISINGER *et al.*, 2005), outros atribuíram este risco à diminuição dos níveis de apo A-I (LUC *et al.*, 2002). Entretanto, prevalece um consenso na literatura de que o balanço entre as partículas aterogênicas e antiaterogênicas, refletido pelo índice apoB/apoA-I, representa um parâmetro adicional e importante para predição do risco cardiovascular, sendo atualmente considerado superior aos lípidos, lipoproteínas e índices lipídicos convencionais (WALLDIUS & JUNGNER, 2004; KIM *et al.*, 2005). O presente estudo demonstrou uma ausência de associação entre o índice apoB/apoA-I e a gravidade da DAC estabelecida por angiografia. Com relação a estudos angiográficos, a literatura sugere a associação entre o índice apoB/apoA-I e estenose coronariana com obstrução superior a 50% (GARFAGNINI *et al.*, 1995; HORIMOTO *et al.*, 2005). No entanto, não foram encontrados estudos angiográficos envolvendo a associação de estenose coronariana com obstrução superior a 70% e o índice apoB/apoA-I. Considerando este fato, estudos adicionais, envolvendo grande número de indivíduos são essenciais para esclarecer, com fidedignidade, a relação entre o índice apoB/apoA-I e diferentes graus de ateromatose coronariana.

A associação entre a presença do polimorfismo apo E, presença do alelo $\epsilon 4$, níveis elevados de LDLc e DAC tem sido descrita em várias populações (WILSON *et*

et al., 1996). Estudos prévios em indivíduos hipercolesterolêmicos (BERTOLINI *et al.*, 2004) e diabéticos (TAVINTHARAM *et al.*, 2006) têm observado uma menor concentração de LDLc nos portadores do alelo $\epsilon 2$ e maiores níveis nos portadores do alelo $\epsilon 4$. No presente estudo, os níveis plasmáticos de apo E (Tabela 10), bem como os genótipos da apo E (Tabela 16) não foram associados à presença de DAC e não se correlacionaram com a gravidade da doença nos indivíduos estudados. Resultados semelhantes foram previamente descritos em outro estudo envolvendo pacientes com DAC na população brasileira (SOUZA *et al.*, 2007). A associação entre a gravidade da doença e a presença do alelo $\epsilon 4$ ainda não está totalmente consolidada pela literatura, mas a identificação deste alelo torna-se importante em pacientes com DAC, uma vez que, além do mesmo apresentar-se associado ao aumento de LDLc (LEHTINEN *et al.*, 1995), estudos recentes têm demonstrado uma menor resposta ao tratamento com estatinas nos pacientes portadores do alelo $\epsilon 4$ (PEDRO-BOTET *et al.*, 2001; TAVINTHARAN *et al.*, 2006).

Atualmente, na população brasileira, a prevalência dos genótipos da apo E e a frequência dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ já foram descritas tanto para idosos (SCHWANKE *et al.*, 2002; FUZIKAWA *et al.*, 2007) quanto para adultos (FIEGENBAUM *et al.*, 2007) e crianças (DE FRANÇA *et al.*, 2004). No presente estudo, as frequências observadas para os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ entre indivíduos angiograficamente normais e com DAC foram 6%, 72% e 22%, respectivamente, valores similares às frequências observadas em outros estudos envolvendo a população brasileira (Tabela 17). Dos seis genótipos esperados para o polimorfismo do gene da apo E, apenas o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ não foi identificado nos indivíduos estudados (Tabela 16). Este dado pode ser explicado pelo pequeno número de indivíduos estudados e pela baixa prevalência

(cerca de 2%) do referido genótipo encontrado em estudos envolvendo a população brasileira (SCHWANKE *et al.*, 2002; MENDES-LANA *et al.*, 2007).

6.3 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E LIPOPROTEÍNA(a)

Os dados da Tabela 11 mostram que para o parâmetro Lp(a), a diferença entre as medianas foi estatisticamente significativa entre os grupos AnN e AG ($p < 0,001$), entre os grupos AnN e ALM ($p < 0,001$) e entre os grupos ALM e AG ($p < 0,001$), confirmando dados do estudo prévio (LIMA, 2005). Observa-se nos dados apresentados na Tabela 11 um aumento progressivo nos níveis plasmáticos de Lp(a) de acordo com a gravidade da aterosclerose coronariana. O grupo AG apresenta valores médios de Lp(a) cerca de três vezes superior ao grupo AnN. A análise dos resultados de Lp(a) mostrou, também, que no grupo AnN 3 indivíduos (8,6%) apresentaram níveis de Lp(a) acima da faixa de referência recomendada pelo método. No entanto, a prevalência de níveis plasmáticos superiores a 30mg/dL foi significativamente mais elevada nos grupos ALM (64,5%; $p < 0,001$) e AG (63,2%; $p < 0,001$). Estes dados indicam que, apesar da grande variabilidade interindividual dos níveis plasmáticos de Lp(a), valores elevados de Lp(a) foram associados com a presença de estenose coronariana confirmada pela angiografia neste estudo. Correlação positiva entre Lp(a) e DAC estabelecida por angiografia foi demonstrada por Gupta *et al.* (1996) na população indiana e também por Labeur *et al.* (1992) na população belga, os quais observaram elevações dos valores de Lp(a) com o aumento da gravidade da DAC, nos casos mais graves com estenose significativa em mais de duas artérias coronárias.

Alguns estudos demonstram que o valor preditivo da Lp(a) para a gravidade e extensão da DAC seria maior em mulheres (FROHLICH *et al.*, 2004), entretanto o presente estudo não evidenciou diferença significativa entre a prevalência de níveis elevados de Lp(a) entre homens e mulheres na população estudada. Por outro lado, alguns estudos não demonstraram correlação entre níveis plasmáticos de Lp(a) e DAC (CANTIN *et al.*, 1998) e outros atribuem o real valor preditivo à sub-população de Lp(a) com alta afinidade por fibrina, formada por isoformas de baixo peso molecular (ANGLÉS-CANO *et al.*, 2001). De acordo com este conceito, alguns fenótipos de Lp(a) não estariam associados à aterotrombose e nem todos os indivíduos com elevação de Lp(a) apresentariam risco aumentado de DAC. No estudo de Kronenberg *et al.* (1999) as pequenas isoformas de Lp(a) comportaram-se como fatores preditivos independentes de lesões ateroscleróticas avançadas (ateromatose grave) mas não de lesões recentes (ateromatose leve). Entretanto, diversos estudos, inclusive prospectivos têm demonstrado que a Lp(a) representa um fator de risco independente para aterosclerose coronariana e de artérias cerebrais (DURIEZ *et al.*, 1996; KOSCHINSKY, 2004; KOSCHINSKY & MARCOVINA, 2004; RIM *et al.*, 2000). Prevalece um consenso na literatura de que a Lp(a) é um fator de risco independente para DAC em diferentes populações, incluindo caucasianos, negros e orientais (PATI & PATI, 2000). De fato, o presente estudo demonstrou uma associação entre a presença de estenose coronariana superior a 70% e os níveis plasmáticos de Lp(a), independente do sexo, idade, índice de massa corporal, tabagismo, hipertensão arterial, sedentarismo, história familiar ou perfil lipídico ($p=0,004$; Tabela 21). Recente estudo envolvendo a população brasileira demonstrou que os níveis plasmáticos de Lp(a) foram associados com a presença de DAC e outros fatores de risco para a doença, como

idade, colesterol total e LDLc (CÂNDIDO *et al.*, 2007), não podendo ser considerados de forma independente.

Uma análise da Figura 4 permite observar que, quando o grupo AG foi subdividido pelo número de artérias acometidas pela estenose, o grupo AG-3 apresentou valores de Lp(a) mais elevados em relação aos demais subgrupos, inclusive apresentando diferença significativa em relação aos grupos AnN e ALM ($p < 0,001$). Deve-se considerar que a concentração plasmática de Lp(a) pode ser influenciada por uma resposta de fase aguda (MAEDA *et al.*, 1989), sugerindo que a associação da Lp(a) com DAC pode ser duplamente explicada: por elevadas concentrações de Lp(a) e pelo próprio processo inflamatório da aterosclerose. Sendo assim, níveis plasmáticos mais elevados de Lp(a) no grupo AG-3 pode também ser parte da consequência e não somente a causa do processo aterosclerótico.

6.4 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, ANTICORPOS Anti-LDL OXIDADA, FOSFOLIPASE A2 E PROTEÍNA C REATIVA ULTRA-SENSÍVEL

A modificação oxidativa da LDL nas placas ateroscleróticas parece ocorrer em dois estágios. O primeiro ocorre antes da ativação dos monócitos e resulta na oxidação dos lípidos integrantes da LDL, com pequena alteração na apo B (LDL minimamente oxidada). O segundo inicia-se com a ativação dos monócitos, que são convertidos em macrófagos ativados e contribuem com grande capacidade oxidativa (BERLINER *et al.*, 1995). Neste estágio, a apo B também sofre oxidação resultando na partícula de LDL altamente oxidada. As duas formas podem ser detectadas nas placas ateroscleróticas (SJOGREN *et al.*, 2005). Embora as formas altamente oxidadas não tenham sido descritas no plasma, uma pequena proporção de

partículas de LDL tem propriedades de partículas de LDL minimamente oxidadas e podem ser dosadas no plasma (YAMASHITA *et al.*, 2007). Anticorpos anti-LDLox são encontrados no plasma e, em vários estudos, a elevação do título de tais anticorpos foram associados com a progressão da aterosclerose e suas complicações (RIDKER *et al.*, 2007).

Neste estudo, pode-se observar na Tabela 10 títulos significativamente elevados de anticorpos anti-LDLox no grupo AG quando comparado com o grupo AnN ($p=0,014$). O subgrupo ateromatose grave com três ou mais artérias afetadas (Figura 5) também apresentou títulos significativamente elevados de anticorpos anti-LDLox quando comparado com os grupos ateromatose leve/moderada ($p=0,006$) e ateromatose grave com uma artéria afetada ($p=0,002$). Resultados similares foram descritos por He *et al.* (2007), que também demonstraram títulos significativamente mais elevados de anti-LDLox nos subgrupos com estenose multiarterial quando comparados com o subgrupo com apenas uma artéria afetada. Os autores concluíram que os títulos de anti-LDL-ox foram associados com a gravidade da aterosclerose coronariana, apesar das evidências da oxidação lipídica ser observada em todos os estágios da aterosclerose, tanto nas lesões iniciais, como nas intermediárias e avançadas, ricas em macrófagos (CARPENTER *et al.*, 1995).

Apesar da correlação positiva e significativa observada entre os títulos de anti-LDLox e a estenose coronariana superior a 70% ($r=0,42$; $p<0,0001$; Tabela 19), a análise multivariada do presente estudo demonstrou ausência de associação independente entre os dois parâmetros. Estes dados confirmam que, em se tratando de uma doença de origem multifatorial, os resultados não podem ser interpretados de forma isolada. Estudos prévios evidenciaram uma associação entre LDLox circulante e valores de LDLc e apo B (SJOGREN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2004). O

presente estudo demonstrou uma correlação positiva da ordem de 16% entre os títulos de anti-LDLox e os valores de apo B ($p=0,04$; dado não apresentado na Tabela 18). No entanto, ao contrário dos dados da literatura, não foi observada correlação entre os valores de anti-LDLox e LDLc nos indivíduos estudados.

No presente estudo, a atividade aumentada da enzima sPLA2 e níveis elevados de PCRus, ambas proteínas de fase aguda, foram associados com a presença de DAC (Tabela 10). Após ajuste para os fatores de risco clássicos e níveis plasmáticos de PCRus, a atividade da enzima sPLA2 demonstrou uma associação independente com a estenose coronariana superior a 70% ($p<0,001$; Tabela 21). Quando o grupo AG foi subdividido pelo número de artérias afetadas, o subgrupo AG-3 apresentou níveis significativamente mais elevados tanto de sPLA2 quanto de PCRus, quando comparado com o grupo AnN ($p<0,001$; Figuras 6 e 7, respectivamente). Entretanto, apenas a atividade da sPLA2 apresentou-se significativamente elevada nos subgrupos AG-1 ($p<0,0001$) e AG-2 ($p<0,0001$) quando comparados com o grupo AnN. Considerando a atividade da sPLA2 (Figura 6), o subgrupo AG-3 também apresentou diferença significativa em relação aos grupos ALM ($p<0,001$), AG-1 ($p<0,001$) e AG-2 ($p<0,001$). Estes resultados podem sugerir que a atividade da sPLA2 poderia refletir o caráter inflamatório da aterosclerose de forma diferente da observada para os níveis plasmáticos da PCRus.

Os dados obtidos com o presente estudo estão de acordo com resultados recentes que demonstraram uma associação independente entre a enzima PLA2 e DAC (BOEKHOLD *et al.*, 2005; SUDHIR, 2005). Em 2005, Boekholdt *et al.* demonstraram que os níveis plasmáticos de sPLA2 foram associados com um risco aumentado de DAC tanto em homens quanto em mulheres aparentemente

saudáveis. Após o ajuste para fatores de risco clássicos e níveis de PCRus, os valores de sPLA2 no terceiro quartil apresentaram um risco 34% maior comparado com os valores do primeiro quartil. Estes achados, aliados aos dados ora apresentados corroboram com a hipótese de que os níveis de PLA2 poderiam refletir um processo patofisiológico relevante no desenvolvimento da DAC, porém diferente daquele esperado para níveis de PCRus. De forma semelhante, outro estudo prospectivo demonstrou que, entre pacientes sintomáticos com DAC, aqueles com níveis elevados de sPLA2 apresentaram um risco aumentado para a recorrência do evento (KUGIYAMA *et al.*, 2000), enquanto dois estudos prospectivos investigaram a associação entre um membro da família da PLA2, a lipoproteína associada à PLA2 (Lp-PLA2), e o risco de DAC. Os níveis plasmáticos de Lp-PLA2 mostraram-se importantes preditores de DAC tanto em homens com níveis elevados de LDLc (PACKARD *et al.*, 2000) quanto em indivíduos aparentemente saudáveis (BALLANTYNE *et al.*, 2004). Em contraste com os vários estudos disponíveis para o risco de DAC e níveis de sPLA2, bem como a Lp-PLA2, os estudos envolvendo a atividade da sPLA2 e a gravidade da DAC são raros. Num estudo prospectivo, Kugiyama *et al.* (2000) demonstraram que as concentrações plasmáticas de sPLA2 foram significativamente mais elevadas em pacientes com angina instável quando comparados com pacientes com angina estável e com indivíduos hígidos. Este estudo também demonstrou que os altos níveis de sPLA2 comportaram-se como preditores de isquemia cardíaca em pacientes com angina instável, independente de outros fatores de risco, inclusive PCRus. No trabalho ora apresentado, diferente do estudo de Kugiyama *et al.* (2000), os participantes dos grupos ALM e AG não apresentaram isquemia cardíaca recente, mas placas ateroscleróticas potencialmente capazes de evoluir para IAM. Outra diferença marcante foi que o

presente estudo avaliou a atividade da sPLA2, e não a concentração da enzima, como realizou os autores do referido estudo.

Várias evidências sustentam a hipótese do envolvimento da sPLA2 na aterogênese. Em 1999, Ivandic *et al.* demonstraram que ratos transgênicos que expressavam sPLA2 humana desenvolviam mais aterosclerose, já que a mesma afeta o metabolismo lipídico (TIETGE *et al.*, 2000; DE BEER *et al.*, 1997; IVANDIC *et al.*, 1999; DE BEER *et al.*, 2000). Em humanos, a sPLA2 apresenta uma alta expressão nas placas ateroscleróticas e nos macrófagos adjacentes (MENSCHIKOWSKI *et al.*, 1995; ELINDER *et al.*, 1997; HURT-CAMEJO *et al.*, 1997; ANTHONSEN *et al.*, 2000). Além disso, esta enzima pode ser produzida em resposta a uma variedade de citocinas inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL)-1 e IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (VAN DER HELM *et al.*, 2000; AKIBA *et al.*, 2001). Ao mesmo tempo, a sPLA2 também induz diretamente a produção de citocinas e a adesão de moléculas no endotélio microvascular (BECK *et al.*, 2004). Então, a sPLA2 poderia funcionar tanto como um sinalizador do local da inflamação, acelerando o processo, como também poderia apresentar efeitos aterogênicos diretos, possivelmente através da modificação da estrutura das lipoproteínas.

Uma análise da Figura 6 permite observar que a atividade da sPLA2 apresentou-se associada com a presença de estenose coronariana detectada por angiografia, independente do grau, uma vez que a atividade da enzima apresentou-se significativamente elevada nos grupos ALM ($p < 0,0001$) e AG ($p < 0,0001$) quando comparados com o grupo AnN. Além disso, foi demonstrada uma associação independente entre a atividade da sPLA2 e a presença de estenose coronariana superior a 70% ($p < 0,001$; Tabela 21), quando foram ajustados modelos de análise multivariada utilizando-se todas as outras variáveis estudadas, incluindo os níveis

plasmáticos de PCRus e os títulos de anti-LDLox, apesar da correlação positiva e significativa observada entre a sPLA2 e os títulos de anti-LDLox ($r=0,81$; $p<0,001$; Tabela 18). Esta correlação é embasada pela literatura, considerando que a sPLA2 causa uma redução substancial na fosfatidilcolina da superfície da LDL, gerando partículas de LDL pequenas e densas, com alterações também na configuração da molécula de apo B na lipoproteína (SARTIPY *et al.*, 1999). A alteração na configuração da molécula de apo B pode levar a uma maior exposição de segmentos ricos em arginina e lisina que interagem fortemente com os glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular (CAMEJO *et al.*, 1998). Tal fato pode explicar a maior afinidade com componentes da matriz extracelular apresentada pelas lipoproteínas modificadas pela sPLA2 (SARTIPY *et al.*, 1999; HAKALA *et al.*, 2001). Esta afinidade aumentada por elementos da matriz extracelular resulta em aumento do tempo de retenção da partícula de LDL no espaço subendotelial da parede arterial, com conseqüente oxidação, formação das células espumosas e progressão da lesão aterosclerótica (OORNI *et al.*, 2000).

6.5 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, HOMOCISTEÍNA E MUTAÇÃO NA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE

Vários estudos importantes foram publicados correlacionando níveis plasmáticos de homocisteína e DAC. Alguns demonstraram uma associação entre hiper-homocisteinemia e a incidência de DAC, enquanto outros relataram ausência de associação entre os dois parâmetros (VOUTILAINEN *et al.*, 2000). Algumas razões podem explicar os resultados controversos das pesquisas envolvendo a concentração de homocisteína e DAC: os fatores que afetam os níveis plasmáticos

deste aminoácido são diferentes em cada população, além dos fatores como hábitos nutricionais, fatores genéticos, estilo de vida e raça que podem também afetar a concentração da homocisteína circulante (MURPHY-CHUTORIAN & ALDERMAN, 1994). Na população brasileira, que apresenta uma heterogeneidade de etnias (PARRA *et al.*, 2003), os resultados das pesquisas envolvendo níveis plasmáticos de homocisteína e DAC são igualmente controversos. Torna-se oportuno ressaltar que a maioria dos autores considera a hiper-homocisteinemia um fator de risco para DAC (CHUA *et al.*, 2005). A análise da Tabela 12 permite observar que os níveis plasmáticos de homocisteína foram significativamente mais altos no grupo AG quando comparado com o grupo AnN ($p < 0,001$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos AnN e ALM, bem como entre os grupos ALM e AG.

Folson *et al.* (1998) sugeriram que o aumento de homocisteína poderia ser uma consequência da DAC e não apenas a causa da doença. Esses autores também sugeriram que a hiper-homocisteinemia poderia prever um prognóstico ruim, refletindo a gravidade da DAC. Entretanto, a hipótese do aumento da concentração plasmática de homocisteína em consequência da lesão aterosclerótica não foi aceita por Boston & Selhub (1999), por não ser a mesma apoiada pela evidência epidemiológica de vários estudos. Os resultados do presente estudo sinalizam que a hiper-homocisteinemia, se não apresenta contribuição para a gravidade da DAC nos indivíduos avaliados, no mínimo, está implicada no processo aterosclerótico. A dúvida, porém persiste, ou seja, se o aumento da homocisteína é fator agravante para a doença ou se manifesta com o desenvolvimento do processo aterosclerótico. Estudos prospectivos com acompanhamento, envolvendo um grande número de

indivíduos já apresentando hiper-homocisteinemia, porém ainda sem coronariopatia, são essenciais para esclarecer a relação entre hiper-homocisteinemia e DAC.

No presente trabalho, o método utilizado para a dosagem de homocisteína preconiza um valor de referência para este parâmetro de 3 a 20 μ mol/L. Outro ponto de controvérsia entre os autores são os valores de referência da homocisteína na população em geral. Alguns autores consideram a concentração “normal” de homocisteína plasmática entre 5 e 15 μ mol/L (MALINOW *et al.*, 1999; CHRISTEN *et al.*, 2000; STANGL *et al.*, 2002; GIRELLI *et al.*, 2003), enquanto outros admitem que o valor médio na população em geral para este parâmetro está em torno de 9 a 10 μ mol/L (MALINOW, 1990; DUEL *et al.*, 1998;). Boushey *et al.* (1995) concluíram, em estudo de metanálise envolvendo 27 trabalhos e mais de 4 mil pacientes, que se os valores de homocisteína são maiores que 10 μ mol/L, cada 5 μ mol/L acrescidos neste valor de homocisteína circulante estão associados a 80% de risco para DAC em mulheres e 60% em homens. Atualmente, valores iguais ou maiores que 10 μ mol/L são considerados hiper-homocisteinemia e estão relacionados com risco aumentado para DAC (YANG *et al.*, 2005). No presente estudo, 72% dos pacientes do grupo AG apresentaram valores plasmáticos de homocisteína na faixa de referência do método utilizado. Observação semelhante foi feita por Gravina-Taddei *et al.* (2005) analisando idosos com e sem doença coronária usando método semelhante ao deste trabalho.

Entre os 63 indivíduos que compuseram os grupos AnN, ALM e AG para a avaliação da homocisteína (Tabela 12), a presença da mutação C677T no gene da enzima MTHFR em homozigose foi observada apenas em quatro indivíduos (Tabela 14), resultando numa incidência de 6,3%. Considerando os indivíduos avaliados no estudo para este parâmetro (n=63), a frequência observada para a mutação em

heterozigose foi de 44,4%, totalizando 28 indivíduos (Tabela 14). De acordo com Arruda *et al.* (1998) a prevalência desta mutação em caucasianos brasileiros está em torno de 10,3% e 54,2% em homozigose e heterozigose, respectivamente. No entanto, os indivíduos avaliados neste trabalho (n=63) se dividiram em 28,1% de caucasianos, 22,8% de negros e 49,1% de mestiços (mulato, pardo ou outros mestiços), não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os três grupos para as diferentes etnias.

A mutação C677T no gene da enzima MTHFR foi mais freqüente em indivíduos com aterosclerose grave (62,0%), entretanto, não foi demonstrada diferença significativa entre o grupo AG e os demais grupos estudados. Uma possível explicação para este resultado seria o fato de que multifatores estão relacionados com o aumento dos níveis de homocisteína e, considerando que o número de participantes avaliados foi insuficiente para qualquer conclusão neste sentido, seria necessário um estudo epidemiológico e multicêntrico. Pisciotta *et al.* (2005) demonstraram resultados semelhantes avaliando indivíduos com hipercolesterolemia e DAC, com uma maior prevalência da mutação em pacientes com DAC, porém sem diferença significativa em relação aos indivíduos não acometidos pela doença.

A correlação positiva observada entre níveis plasmáticos elevados de homocisteína e a presença de DAC ($r=0,42$; $p<0,001$; Tabela 19) está de acordo com a literatura (DEDOUSSIS *et al.*, 2004). Entretanto, não foi observada correlação entre a presença da mutação e níveis elevados de homocisteína na população estudada. Apesar de o grupo AG ter apresentado a maior incidência da mutação e níveis significativamente mais elevados de homocisteína, este grupo não apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos quanto à prevalência da

mutação. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (GIRELLI *et al.*, 1998; YILMAZ *et al.*, 2005). Logo, o aumento da homocisteína nestes casos deve ser explicado por outros mecanismos não explorados no presente trabalho.

Entre os indivíduos com DAC, considerando os participantes dos grupos ALM e AG (n=43), 22 apresentaram a mutação em heterozigose (51,1%) e 3 em homozigose (6,9%), não apresentando diferenças significativas em relação ao grupo AnN (Tabela 14). Por outro lado, Almawi *et al.* (2004) obtiveram uma maior frequência (71,9%) da mutação em heterozigose nos pacientes com DAC e de 45,5% no grupo controle, com diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,001$). Esses autores demonstraram também uma incidência bem maior da mutação em homozigose (31,3%) em pacientes com aterosclerose grave, quando comparado com o presente estudo (6,9%). O pequeno contingente amostral dos dados ora apresentados pode ter contribuído para a obtenção de dados discordantes com a literatura.

Neste estudo, não foi observada correlação entre a presença da mutação e a presença de aterosclerose coronariana, considerando os indivíduos dos grupos ALM e AG (n=43). Folsom *et al.* (1998) também demonstraram uma ausência de associação entre DAC e a mutação C677T no gene da enzima MTHFR, num estudo prospectivo envolvendo mais de 15.000 participantes. Da mesma forma, Kölling *et al.* (2004) demonstraram ausência de associação entre a mutação e a presença de DAC angiograficamente estabelecida, num estudo caso-controle envolvendo 2.121 pacientes com DAC e 617 indivíduos angiograficamente normais. Os dois estudos citados demonstraram níveis significativamente elevados de homocisteína plasmática nos indivíduos com DAC quando comparados com o grupo controle, dados concordantes com o estudo ora apresentado.

Apesar do número de indivíduos avaliados terem sido suficiente para demonstrar diferenças significativas entre os grupos, os trabalhos da literatura utilizam um contingente amostral bem maior, principalmente para avaliar a associação entre a mutação C677T e DAC. Outro fator limitante foi que o presente estudo não considerou outros fatores importantes do metabolismo da homocisteína, como hábitos nutricionais e as concentrações plasmáticas de vitamina B12 e ácido fólico dos indivíduos participantes, dados que poderiam enriquecer a discussão deste trabalho.

6.6 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, FATOR TISSULAR E INIBIDOR DA VIA DO FATOR TISSULAR

O possível valor preditivo dos níveis plasmáticos de TF e TFPI, responsáveis pelo aparecimento de um estado hipercoagulável, à medida que ocorre a progressão da aterosclerose coronariana foi avaliado. Sabe-se que o sistema da coagulação assume um papel importante na evolução e progressão clinicamente silenciosa do ateroma, e nos eventos que se seguem à ruptura da placa e ativação da coagulação que produz os sintomas clínicos.

A análise da Tabela 13 permite observar que os níveis plasmáticos de TF foram significativamente mais elevados em pacientes com ateromatose grave em relação aos indivíduos angiograficamente normais ($p < 0,01$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ALM e AnN, bem como entre os grupos ALM e AG. Spronk *et al.* (2004) sugeriram que, embora o fibrinogênio e a fibrina participem da gênese das placas iniciais, uma atividade aumentada da coagulação sistêmica não exerce maior influência no risco de trombose. Apesar da

presença do complexo TF-FVIIa nestas placas, é improvável que toda a fibrina formada na superfície dessas seja resultado direto de atividade coagulante local. O efeito dominante da coagulação na placa inicial seria anticoagulante, a trombina formada aumentaria a ativação da proteína C por meio de uma maior expressão de trombosmodulina (TM) pelas células endoteliais. Já a aterosclerose avançada, com grande impacto de componentes inflamatórios que oprimem as forças anticoagulantes protetoras, estas podem se tornar menos eficientes para a regulação de TM e expressão do receptor de proteína C (EPCR). Nesta fase, o processo inflamatório leva à maior expressão de TF e formação de complexos catalíticos em agregados de células e micropartículas, mantendo certo nível de produção de trombina e fibrina (SPRONK *et al.*, 2004). Este fato pode justificar, em parte, a maior expressão de TF nos pacientes com ateromatose grave encontrada neste estudo.

O TF ativo presente na parede de vasos ateroscleróticos provavelmente é o responsável pelas complicações clínicas da aterosclerose, como a trombose aguda após ruptura da placa (KATO, 2002). Alguns estudos demonstraram o aumento dos níveis plasmáticos de TF em pacientes com SCA (FALCIANI *et al.*, 1998; FREEBURN *et al.*, 1998) quando comparados a indivíduos hígidos. Entretanto, o comportamento do TF em diferentes graus de ateromatose não está completamente elucidado e poucos trabalhos avaliaram os dois parâmetros. Contrariando os dados obtidos no presente estudo, Chung *et al.* (2003) demonstraram ausência de correlação entre TF e a gravidade da DAC estabelecida angiograficamente. Entretanto, tal estudo considerou como ateromatose grave estenose coronariana superior a 50% em uma ou mais artérias.

Apesar de uma maior expressão de TF observada nos pacientes com grau de estenose superior a 70%, não foi demonstrada diferença significativa entre o grupo AG e os demais grupos estudados para os níveis plasmáticos de TFPI. Níveis significativamente elevados de TFPI têm sido relatados em pacientes com SCA comparados com indivíduos hígidos (LWALEED & BASS, 2006; FALCIANI *et al.*, 1998; FREEBURN *et al.*, 1998), e uma correlação positiva entre TF e TFPI tem sido observada nestes pacientes. A hiperativação do sistema da coagulação em pacientes com SCA pode, em parte, ser compensada pelo TFPI, que pode não ser suficiente para atenuar a elevação de TF circulante (FALCIANI *et al.*, 1998). Entre os 69 indivíduos que compuseram os grupos AnN, ALM e AG (Tabela 13), foi observada uma correlação positiva da ordem de 34% entre TF e TFPI ($p=0,004$), entretanto, torna-se oportuno salientar que os participantes dos grupos ALM e AG não apresentaram SCA e sim a presença de placas ateromatosas potencialmente capazes de evoluir para SCA. A DAC é uma doença evolutiva, o que hoje é leve a moderado amanhã poderá ser avançada, portanto, torna-se importante o conhecimento do comportamento de marcadores laboratoriais com potencialidade preditiva da doença em momentos que antecedem o evento isquêmico agudo. Bilgen *et al.* (2005) demonstrou níveis plasmáticos de TFPI significativamente elevados em pacientes com estenose coronariana superior a 50% em uma ($p<0,05$), duas ($p<0,05$) ou três ($p<0,001$) coronárias atingidas quando comparados com indivíduos hígidos, entretanto, as concentrações de TFPI dos pacientes não foram comparadas com indivíduos angiograficamente normais. Contrariamente aos resultados de Bilgen *et al.* (2005), os dados obtidos com o presente estudo indicam que os níveis plasmáticos de TFPI não contribuíram para diferenciar lesões ateroscleróticas iniciais de lesões avançadas na população estudada. Torna-se

necessário considerar que, em virtude do desenho do estudo, 77% dos participantes faziam uso regular de ácido acetilsalicílico, o que pode ter influenciado nos resultados de TFPI, uma vez que este medicamento promove a inibição da enzima ciclooxigenase, diminuindo a liberação de tromboxane A2 e a agregação plaquetária. O TFPI se manifesta após a geração de limitada quantidade de fator X ativado e aproximadamente 10% do TFPI do organismo é transportado por plaquetas (NOVOTNY *et al.*, 1988), que expressam o TFPI apenas quando ativadas pela trombina. Desta forma, quando ocorre agregação plaquetária, níveis elevados de TFPI podem ser encontrados. Considerando que as plaquetas interagem com os fatores da coagulação “*in vivo*” fornecendo uma superfície fosfolipídica de carga negativa que favorece a ativação seqüencial daqueles fatores, presume-se que a redução da ativação plaquetária poderia estar contribuindo para uma menor formação de trombina e, conseqüentemente, diminuindo a expressão de TFPI na população estudada.

6.7 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA, INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1 E POLIMORFISMO (-675 4G/5G)

Vários autores demonstraram a associação de níveis elevados de PAI-1 com a presença da DAC, resultados que dão suporte ao conceito da contribuição da fibrina intravascular na aterotrombogênese (TOUSOULIS *et al.*, 2003). A diminuição da atividade fibrinolítica, principalmente causada pelo aumento na concentração plasmática do PAI-1, tem sido associada com a DAC em vários estudos (NARAN *et al.*, 2008). No presente estudo, os níveis plasmáticos de PAI-1 foram significativamente elevados no grupo AG quando comparado com os grupos AnN

($p < 0,001$) e ALM ($p = 0,024$) (Tabela 10). As médias obtidas para os subgrupos AG-1, AG-2, e AG-3 também se mostraram significativamente elevadas quando comparadas com o grupo AnN ($p < 0,05$; Figura 8). Estes dados evidenciam uma associação entre a concentração plasmática de PAI-1 e a gravidade da DAC, considerando a porcentagem de estenose superior a 70%, independente do número de artérias afetadas. Após ajustes para os fatores de risco e demais variáveis estudadas, os resultados obtidos com a análise multivariada permitem inferir sobre uma associação independente entre os níveis plasmáticos de PAI-1 e a presença de estenose coronariana superior a 70% ($p = 0,002$; Tabela 21). O subgrupo AG-1 também apresentou diferença significativa em relação ao grupo ALM ($p = 0,004$). A presença de dois valores extremos neste subgrupo (186 e 257; Figura 8) pode justificar, parcialmente, tal resultado.

Outro dado do presente estudo foi a associação entre o genótipo 4G/4G, o aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 ($r = 0,28$; $p < 0,001$; Tabela 20) e estenose coronariana com obstrução superior a 70%, sugerindo que a presença do alelo 4G pode ter influenciado no aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 e que este aumento pode ter afetado o sistema fibrinolítico e constituído um fator decisivo para a progressão da aterosclerose nos indivíduos avaliados. Estudos prévios já haviam demonstrado a associação entre o alelo 4G e concentrações elevadas de PAI-1 (ERIKSSON *et al.*, 1995; STEGNAR *et al.*, 1998). Os níveis plasmáticos de PAI-1 podem ser influenciados por vários fatores, dentre os quais os fatores genéticos. Hong *et al.* (1997) demonstraram que 42% das variações encontradas nos níveis plasmáticos de PAI-1 foram devidas a fatores genéticos, num estudo envolvendo a população sueca. Naram *et al.* (2008), analisando a população da África do Sul, observou que níveis plasmáticos mais baixos de PAI-1 foram obtidos para a

população de raça negra quando comparados com a população de raça branca. Os autores concluíram que a principal razão para a detecção de níveis mais baixos de PAI-1 nos indivíduos de raça negra foi a baixa prevalência do alelo 4G neste grupo de indivíduos. Apesar das diferenças étnicas exercerem influência nos níveis plasmáticos de PAI-1, o presente estudo não demonstrou diferença significativa nos níveis de PAI-1 para as diferentes etnias. O próprio desenho do estudo poderia justificar tal achado, uma vez que o grupo estudado neste trabalho (n=123) constou de 30,9% de caucasianos, 26,8% de negros e 42,3% de mestiços (mulato, pardo ou outros mestiços), porém uniformemente distribuídos nos três grupos (Tabela 8), não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos para as diferentes etnias. A frequência dos alelos 4G e 5G descrita para a população brasileira, que apresenta uma heterogeneidade de etnias, ainda não está completamente estabelecida pela literatura. Neste estudo, 51% dos participantes (n=123) apresentaram o alelo 4G, enquanto que 49% apresentaram o alelo 5G. Torna-se oportuno salientar que estudos envolvendo a prevalência de polimorfismos genéticos necessitam de um contingente amostral maior, e não fez parte dos objetivos do presente estudo.

6.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os indivíduos participantes deste trabalho preencheram todos os critérios de seleção estabelecidos, uma vez que a entrevista e o preenchimento da ficha clínica antecederam a coleta do sangue, excluindo os indivíduos que não se encontravam em estado metabólico de equilíbrio e/ou que se enquadravam em pelo menos um dos critérios de exclusão.

Neste trabalho, todas as amostras foram aliqüotadas e congeladas sob as mesmas condições. As alíquotas foram descongeladas uma única vez antes da realização dos testes, procurando minimizar os efeitos do descongelamento nas determinações dos níveis plasmáticos dos parâmetros bioquímicos e hemostáticos. Todas as amostras foram analisadas ao mesmo tempo para cada parâmetro e submetidas, rigorosamente, às mesmas condições técnicas.

O número total de participantes avaliados neste trabalho parece pequeno diante da grande incidência de DAC, porém foi suficiente para responder os objetivos estudados. Mesmo quando o grupo AG foi subdividido de acordo com o número de artérias afetadas, o poder dos testes estatísticos obtidos foram superiores a 90% ($\beta > 0,90$), garantindo que, se de fato houvesse alguma diferença, haveria uma probabilidade de 90% de detectá-la, minimizando o erro tipo II.

Deve-se considerar que os indivíduos que constituíram o grupo AnN podem apresentar alterações não detectadas pela angiografia, uma vez que este método não oferece cobertura total da real situação das placas de ateroma, considerando as limitações do mesmo. Então, não se pode excluir inteiramente a presença de indivíduos afetados pela aterosclerose coronariana neste grupo. No entanto, o grupo AG, cujo ponto de corte se insere em 70% de estenose, indubitavelmente congrega pacientes com alterações diversas que obrigatoriamente levariam a intervenção terapêutica a critério clínico.

O desenvolvimento deste estudo contemplou vários processos bioquímicos envolvidos na formação e na progressão da aterosclerose, incluindo o metabolismo lipídico e das apolipoproteínas, resposta inflamatória, função endotelial, fibrinólise, metabolismo da homocisteína, entre outros. Cada um destes processos bioquímicos apresenta constituintes múltiplos, como enzimas e receptores celulares, que são

geneticamente codificados. Portanto, alterações genéticas podem afetar a função destes constituintes, dentro de vias que resultam em susceptibilidade variável ao desenvolvimento e à progressão da aterosclerose. Desta forma, acredita-se ser importante a realização de estudos deste tipo envolvendo a nossa população, pois os dados obtidos de trabalhos conduzidos fora do nosso meio não devem ser extrapolados, na íntegra, para a população brasileira.

Os vários resultados obtidos com o desenvolvimento deste estudo refletiram bem o caráter multifatorial da DAC. Dentre os processos estudados, ficou evidente o envolvimento de parâmetros bioquímicos, inflamatórios e hemostáticos no agravamento do processo aterosclerótico, refletidos pelos níveis plasmáticos elevados de homocisteína, proteína C reativa ultra-sensível e fator tissular associados com a presença de estenose coronariana superior a 70%. Também ficou evidente o comprometimento do sistema fibrinolítico nos indivíduos constituintes do grupo AG, refletido pelos níveis significativamente aumentados de Lp(a) e PAI-1. O aumento de Lp(a) poderia diminuir a atividade fibrinolítica neste grupo devido à homologia estrutural apresentada entre a apo(a) constituinte da Lp(a) e o plasminogênio, enquanto níveis altos de PAI-1 poderiam acarretar em menor geração de plasmina, contribuindo para a permanência do coágulo de fibrina. Em adição, a similaridade entre a Lp(a) e LDL e entre Lp(a) e o plasminogênio sugerem que o mecanismo patogênico da Lp(a) envolve efeitos pró-aterogênicos e pró-trombóticos/antifibrinolíticos. A Lp(a) pode interferir na ativação do plasminogênio mediada pelo t-PA, inibindo a geração da plasmina, diminuindo a fibrinólise e gerando um estado de hipercoagulabilidade *in vivo*.

Finalmente, deve-se ressaltar que alguns dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de DAC são passíveis de ser modificados. Mudanças no estilo de

vida e o controle rigoroso dos fatores de risco modificáveis devem ser incorporados à rotina de vida da população, bem como um maior conhecimento/conscientização do problema, como estratégias de prevenção e controle da DAC. Uma dieta saudável aliada à realização de exercícios físicos regulares, além do constante cuidado à saúde por meio de apoio e orientação de equipe multidisciplinar poderá contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população, conseqüentemente diminuindo a morbimortalidade em decorrência da DAC. Por outro lado, do ponto de vista científico, investigações futuras devem ser incentivadas em nosso meio visando um maior conhecimento dos fatores desencadeantes da DAC, o que permitiria a adoção de medidas profiláticas e/ou terapêuticas mais adequadas. Além disso, o desenvolvimento de tais estudos contribui decisivamente para a formação de recursos humanos, capacitando profissionais para ensino e investigação científica com importante atuação nos meios acadêmicos e impactos altamente favoráveis à sociedade.

7 CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos no presente estudo permite concluir que:

- 1) Os perfis lipídico e apolipoproteico dos indivíduos angiograficamente normais e dos pacientes apresentando ateromatose leve/moderada ou grave se mostraram similares nos grupos estudados, não apresentando informações adicionais com relação à gravidade da DAC.
- 2) A frequência dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ da apolipoproteína E mostrou-se similar à observada em outros estudos envolvendo a população brasileira. Os genótipos desta proteína não foram associados à presença de DAC e não se correlacionaram com a gravidade da doença nos indivíduos estudados.
- 3) A associação observada entre o aumento dos níveis de fosfolipase A2 e proteína C reativa com a presença de estenose coronariana superior a 70%, refletiu o caráter inflamatório da aterosclerose.
- 4) A associação observada entre níveis elevados de TF e a presença de estenose coronariana superior a 70%, sugere que a presença de lesões ateroscleróticas avançadas promoveu uma maior expressão do TF, correlacionando-se com a gravidade da DAC nos indivíduos avaliados. Os níveis plasmáticos de TFPI total não se associaram com a gravidade da doença.
- 5) Foi evidenciada uma associação entre hiper-homocisteinemia e a presença de estenose coronariana superior a 70%. No entanto, não foi observada correlação

entre a presença da mutação C677T na enzima MTHFR, hiper-homocisteinemia e a gravidade da DAC.

6) A associação demonstrada entre o aumento dos títulos de anticorpos anti-LDLox e a presença de estenose coronariana superior a 70%, sugere que o grupo AG apresentou maior grau de oxidação da LDL, apesar dos níveis plasmáticos de LDL serem similares nos três grupos estudados.

7) O aumento progressivo nos valores de Lp(a), de acordo com a gravidade da aterosclerose coronariana, sinaliza para o fato de que, mesmo existindo diversas isoformas da apo(a), o impacto dos níveis elevados desta lipoproteína na DAC parece relevante, considerando a sua forte associação com o agravamento da doença.

8) Os níveis plasmáticos de Lp(a) e sPLA₂, bem como os títulos de anticorpos anti-LDLox foram associados com a gravidade e com a extensão da DAC, considerando o aumento significativo destes parâmetros nos indivíduos com três ou mais artérias coronárias apresentando estenose superior a 70%.

9) A associação entre o genótipo 4G/4G, o aumento da concentração de PAI-1 e a presença de estenose coronariana com obstrução superior a 70%, sugere que a presença do alelo 4G pode ter influenciado o aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1.

10) Uma análise conjunta dos dados permite concluir que, dentre todos os

parâmetros avaliados, a Lp(a), o PAI-1 e a sPLA2 podem constituir importantes parâmetros adicionais com potencial valor para se inferir sobre a gravidade da DAC, considerando a sua associação independente com o agravamento da doença, demonstrado pela regressão logística múltipla.

**8 REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

ACTON, S. et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, v. 271, p. 518-520, 1996.

AKIBA, S. et al. Secretory phospholipase A₂ mediates cooperative PG generation by growth factor and cytokine independently of preceding cytosolic phospholipase A₂ expression in rat gastric epithelial cells. *J Biol Chem*. v. 276, p. 21854–21862, 2001.

ALMAWI, W. Y. et al. Factor V G1691A, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase [MTHFR] C677T gene polymorphism in angiographically documented coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*, v. 17, p. 199-205, 2004.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. NCEP Report: Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation*, v. 110, p. 227-239, 2004.

ANGLÉS-CANO, E.; PEÑA-DÍAZ, A.; LOYAU, S. Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein(a). *Ann N Y Acad Sci*, v. 936, p. 261-275, 2001.

ANTHONSEN, M. W. et al. Mildly oxidized LDL induces expression of group IIa secretory phospholipase A(2) in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 1276–1282, 2000.

ARAI, H. et al. Comparison of quantitative coronary arteriography using cinefilm and digital images. *J Cardiol*, v.37(5), p. 241-248, 2001.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. *Statistical methods in medical research*. 3 Ed. Blackwell Science, 1994. 396p.

ARRUDA, V. R. et al. Prevalence of the mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Gen*, v. 78, 332-335, 1998.

AVOGARO, P. et al. Are apolipoproteins better discriminators than lipids for

atherosclerosis? *Lancet*, v. 1, p. 901-903, 1979.

BALLANTYNE, C. M. et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*, v. 109, p. 837-842, 2004.

BARONI, M. G. et al. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Medical Genetics*, v. 4, p. 962-968-9, 2003.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq Bras Cardiol*, v. 68(1), p. 55-63, 1997.

BECK, G. C. et al. Secreted phospholipases A2 induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochem Biophys Res Comm*, v. 300, p. 731-737, 2004.

BEISIEGEL, U. Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J*, v. 19, p. S20-23, 1998. Suplemento A.

BERTOLINI, S. et al. Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, v. 174(1), p. 57-65, 2004.

BERG, K. A new serum type system in man: the Lp system. *Acta Pathol Scand*, v. 59, p. 382-386, 1963.

BERLINER, J. A. et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, v. 91, p. 2488-2496, 1995.

BILGEN, D. et al. The relationship of TFPI, Lp(a), and oxidized LDL antibody levels in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem*, v. 38(1), p. 92-96, 2005.

BISOENDIAL, R. J. et al. Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ Res*, v. 96(7), p. 714-716, 2005.

BOEKHOLDT, S. M. et al. Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, p. 839-846, 2005.

BOLIVAR, I. et al. Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Thromb Haemost*, v. 84, p. 955-960, 2000.

BOSTOM, A.; SELHUB, J. Homocysteine and arteriosclerosis: subclinical and clinical disease associations. *Circulation*, v. 99, p. 2361-2363, 1999.

BOUSHEY, C. I. et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, v. 274, p. 1049-1057, 1995.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v. 232, p. 34-37, 1986.

BROWN, S. A. et al. Influence of short term dietary cholesterol and fat on human plasma Lp(a) and LDL levels. *J Lipid Res*, v. 32, p. 1281-1289, 1991.

BURTZ, A.; ASHWOOD, D. (Ed.). *Fundamentos de Química Clínica*. 4 ed., São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

CAMEJO, G. et al. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*, v. 139, p. 205-222, 1998.

CÂNDIDO, A. P. et al. Lipoprotein(a) as a risk factor associated with ischemic heart disease: Ouro Preto Study. *Atherosclerosis*, v. 191, p. 454-459, 2007.

CANTIN, B. et al. Is lipoprotein(a) an independent risk factor for ischemic heart disease in men? The Quebec Cardiovascular Study. *JACC*, v. 31(3), p. 519-525, 1998.

CAPLICE, N. M. et al. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation*, v. 98, p. 1051-1057, 1998.

CARPENTER, K. L. H. et al. Lipids and oxidized lipids in human atherosclerosis lesions at different stages of development. *Biochem Biophys Acta*, v. 1256, p. 141-150, 1995.

CHAN, D. C.; WATTS, G. F. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *QJM*, v. 99, p. 277-287, 2006.

CHEN, G.; REDBERG, R. F. Noninvasive diagnostic testing of coronary artery disease in women. *Cardiol Rev*, v. 8(6), p. 354-360, 2000.

CHIMINI, G.; KAMINSKI, W. E.; SCHMITZ, G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter I (hABCI): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Comm*, v. 257, p. 29-33, 1999.

CHRISTEN, W. et al. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease. Causal or casual? *Arch Intern Med*, v. 169, p. 422-434, 2000.

CHUA, S. et al. Impact of elevated plasma total homocysteine concentration on coronary atherosclerosis in Chinese patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Int Heart J*, v. 46, p. 181-193, 2005.

CHUNG, N. A. et al. Angiogenesis, thrombogenesis endothelial dysfunction and angiographic severity of coronary artery disease. *Heart*, v. 89(12), p. 1411-1415, 2003.

COLMAN, R. W. et al. Overview of hemostasis. In: COLMAN, R. W.; HIRSH, J.; MARDER, V. J. ; CLOWES, A. W.; GEORGE, J. N. Ed. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 3-16, 2001.

CORDOVA, C. M. M. et al. Avaliação da dosagem direta do colesterol-LDL em amostras de sangue de 10.664 pacientes em comparação com o uso da fórmula de Friedewald. *Arq Bras Cardiol*, v. 83, p. 476-481, 2004.

CRAWLEY, J. et al. Expression, localization, and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 1362-1373, 2000.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. *Lancet*, v. 355, p. 1627-1632, 2000.

DANENBERG, H. D. et al. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*, v. 108, p. 512-515, 2003.

DAVIGNON, J. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 8, p. 1-21, 1988.

DE BEER, F. C. et al. HDL modification by secretory phospholipase A(2) promotes scavenger receptor class B type I interaction and accelerates HDL catabolism. *J Lipid Res*, v. 41, p. 1849–1857, 2000.

DE BEER, F. C. et al. Secretory non-pancreatic phospholipase A2: influence on lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*, v. 38, p. 2232–2239, 1997.

DEDOUSSIS, G. Y. et al. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on homocysteine concentrations in health adults: the ATTICA Study. *Am J Clin Nutr*, v. 80, p. 849-854, 2004.

DE FRANÇA, E. et al. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in Brazilian children. *Hum Biol*, v. 76(2), p. 267-275, 2004.

DI CARLI, M. et al. Relation among stenosis severity, myocardial blood flow, and flow reserve in patients with coronary artery disease. *Circulation*, v. 91, p. 1944-1951, 1995.

DUELL, P. B.; MALINOW, M.R. Homocysteinemia and risk of atherosclerosis: a clinical approach to evaluation and management. *Endocrinologist*, v. 8, p. 170-177, 1998.

DURIEZ, P.; DALLONGEVILLE, J; FRUCHART, J. C. Lipoprotein (a) as a marker for coronary heart disease. *Br J Clin Pract Suppl*, v. 77(1), p. S54-61, 1996. Suplemento A.

DURINGTON, P. N. Can measurement of apolipoprotein B replace the lipid profile in the follow-up of patients with lipoprotein disorders? *Clin Chem*, v. 48, p. 401-402, 2002.

DURINGTON, P. N. et al. Serum apolipoproteins AI and B and lipoproteins in middle-aged men with and without previous myocardial infarction. *Br Heart J*, v. 56, p. 206-212, 1986.

EICHNER, J. E. et al. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a huge review. *Am J Epidem*, v. 155, p. 487-495, 2002.

ELINDER, L. S. et al. Expression of phospholipase A2 isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, p. 2257-2263, 1997.

ERIKSSON, P. et al. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 92, p. 1851-1855, 1995.

ESTEBAN-SALÁN, M.; GUIMÓN-BERDESI, A.; DE LA VIUDA-UNZUETA, J.M. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. *Clin Chem*, v. 46, p. 1121-1131, 2000.

FALCIANI, M. et al. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb Haemost*, v. 79, p. 495-499, 1998.

FALK, E.; ZHOU, J.; MOLLER, J. Homocysteine and atherothrombosis. *Lipids*, v. 36, p. S3-11, 2001. Suplemento 1.

FERNANDES, A. B. Avaliação dos marcadores pró-inflamatórios e hemostáticos na doença arterial coronariana. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte.

FIGENBAUM, M. et al. Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in Brazilian subjects: Effect of gender, smoking and APOE genotypes. *Clin Chim Acta*, v. 380, p. 175-181, 2007.

FOLSON, A. R. et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism, and B vitamins. The Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*, v. 98, p. 204-210, 1998.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, 2001.

FRANK, S. L. The apolipoprotein(a) gene resides on human chromosome 6q26-27, in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Hum Genet*, v. 79, p. 352-356, 1988.

FRANK, P. G.; MARCEL, Y.L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res*, v. 41, p. 853-872, 2000.

FREEBURN, J. C. et al. Monocyte tissue factor-like activity in post myocardial infarction patients. *Br J Haematol*, v. 102, p. 605-608, 1998.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, v. 18, p. 499-552, 1972.

FROHLICH, J. et al. Gender differences in plasma levels of Lp(a) in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Physiol Res*, v. 53, p. 481-486, 2004.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, v. 10, p. 111-113, 1995.

FUZIKAWA, A. K. et al. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res*, v. 40(11), p. 1429-1434, 2007.

GARCIA-PALMIERI, M. R. The endothelium in health and in cardiovascular disease. *P R Health Sci J*, v. 16(2), p. 136-141, 1997.

GARFAGNINI, A. et al. Relationship between HDLc and apolipoprotein A-I and the severity of coronary artery disease. *Eur Heart J*, v. 16, p. 465-470, 1995.

GIRARD, T. J. et al. Functional significance of the Kuntz-type inhibitor domains of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature*, v. 338, p. 518-520, 1989.

GIRELLI, D. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from Northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood*, v. 11, p. 4158-4163, 1998.

GIRELLI, D. et al. The interaction between MTHFR 677 C→T genotype and folate status is a determinant of coronary atherosclerosis risk. *J Nutr*, v. 133, p. 1281-1285, 2003.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Progress in understanding the LDL receptor and HMGCoa reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res*, v. 25, p. 1450-1459, 1984.

GOMEZ, K.; McVEY, J. H. Tuddenham E. Inhibition of coagulation by macromolecular complexes. *Haematol J*, v. 90(11), p. 1570-1576, 2005.

GRAVINA-TADDEI, C. F. et al. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. *Arq Bras Cardiol*, v. 85, p. 166-173, 2005.

GRAW, A., HOBBS, H. H. Molecular genetics of lipoprotein(a): new pieces to the puzzle. *Curr Opin Lipidol*, v. 5, p. 149-155, 1994.

GUILLAND, J. C. et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? *Pathol Biol*, v. 51(2), p. 101-110, 2003.

GUPTA, R. et al. Correlation of lipoprotein(a) to angiographically defined coronary artery disease in Indians. *Int J Cardiol*, v. 57, p. 265-270, 1996.

HAJJAR, K. A.; NACHMAN, R. L. The role of lipoprotein(a) in atherogenesis and thrombosis. *Ann Rev Med*, v. 47, p. 423-442, 1996.

HAKALA, J. K. et al. Lipolysis of LDL by human secretory phospholipase A(2) induces particle fusion and enhances the retention of LDL to human aortic proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 21, p. 1053-1058, 2001.

HAMSTEIN, A. et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet*, v. 2, p. 3-9, 1987.

HANCOCK, M. A. et al. Inhibition of plasminogen activation by lipoprotein(a): critical domains in apolipoprotein(a) and mechanism of inhibition on fibrin and degraded fibrin surfaces. *J Biol Chem*, v. 278, p. 23260-23269, 2003.

HANSSON, G. K. et al. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Ver Pathol*, v. 1, p. 297-329, 2006.

HATTERS, D. M.; PETERS-LIBEU, C. A.; WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sciences*, v. 31(8), p. 445-454, 2006.

HE, X. M. et al. Comparison of plasma low-density lipoprotein and oxidized low-density lipoprotein levels with coronary lesion severities in patients with coronary artery disease. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, v. 35(5), p. 451-456, 2007.

HERZ, J.; HAMANN, U.; ROGNE, S. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*, v. 7, p. 4119-4127, 1988.

HIRANO, T. et al. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lip Res*, v. 44, p. 2193-2201, 2003.

HOFF, H. F.; O'NEIL, J.; YASHIRO, A. Partial characterization of lipoproteins containing apo(a) in human atherosclerotic lesions. *J lipid Res*, v. 34, p. 789-798, 1993.

HONG, Y. et al. Moderate genetic influences on plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 and evidence of genetic and environmental influences shared by plasminogen activator inhibitor-1, triglycerides, and body mass index. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, p. 2776-2782, 1997.

HORIMOTO, M. et al. Independent predictors of the severity of angiographic coronary atherosclerosis: the lack of association between impaired glucosa tolerante and stenosis severity. *Atherosclerosis*, v. 182, p. 113-119, 2005.

HURT-CAMEJO, E. et al. Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, p. 300–309, 1997.

HURT-CAMEJO, E. et al. Phospholipase A2 in vascular disease. *Circ Res*, v. 89, p. 298-304, 2001.

IBANEZ, B.; VILAHUR, G.; BADIMON, J. J. Plaque progression and regression in atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, v. 5(1), p. 292-299, 2007.

IMHOF, A. et al. Plasma lipoprotein Lp(a), markers of haemostasis and inflammation, and risk and severity of coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, v. 10(5), p. 362-370, 2003.

IVANDIC, B. et al. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 19, p. 1284–1290, 1999.

JAIN, P.; LAHIRI, A. Metabolic syndrome: an evolving threat in the genesis of coronary artery disease. *J Cardiometab Syndr*, v. 2(3), p. 190-197, 2007.

JUHAN-VAGUE, I.; HANS, M. From fibrinogen to fibrin and its dissolution. *Bull Acad Natl Med*, v. 187(1), p. 69-82, 2003.

KATO, H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor. Basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, p. 539-548, 2002.

KIM, H.K. et al. Association between plasma lipids, and apolipoproteins and coronary artery disease: a cross-sectional study in a low-risk Korean population. *Int J Cardiol*, v. 101, p. 435-440, 2005.

KNIGHT, C.J. Antiplatelet treatment in stable coronary artery disease. *Heart*, v. 89, p. 1273-1278, 2003.

KOENIG, W. et al. C-Reactive Protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially health middle-aged men. *Circulation*, v. 99, p. 237-242, 1999.

KÖLLING, K. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol*, v. 93, p. 1201-1206, 2004.

KOSCHINSKY, M. L. Lipoprotein(a) and the link between atherosclerosis and thrombosis. *Can J Cardiol*, v. 20(8), p. 37B-43B, 2004. Suplemento B.

KOSCHINSKY, M. L.; MARCOVINA, S.M. Structure-function relationships in apolipoprotein(a): insights into lipoprotein(a) assembly and pathogenicity. *Curr Opin Lipidol*, v. 15(2), p. 167-174, 2004.

KREMPLER, F. et al. Lipoprotein(a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apolipoprotein B. *Biochim Biophys Acta*, v. 575, p. 63-70, 1979.

KRONENBERG, F.; KRONENBERG, M. F.; KIECHAL, S. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis. Prospective results from the Bruneck Study. *Circulation*, v. 100, p. 1154-1160, 1999.

KUGIYAMA, K. et al. Prognostic value of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, v. 86(7), p. 718-722, 2000.

LABEUR, C. et al. Plasma lipoprotein(a) values and severity of coronary artery disease in a large population of patients undergoing coronary angiography. *Clin Chem*, v. 38, p. 2231-2266, 1992.

LAMARCHE, B. et al. Apolipoprotein AI and B levels and the risk of ischaemic heart disease during a five-years follow-up of men in the Quebec cardiovascular study. *Circulation*, v. 94, p. 273-278, 1996.

LAWRENCE DE KONING, A. B. et al. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem*, v. 36(6), p. 431-441, 2003.

LEHTINEN, S. et al. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis*, v. 114(1), p. 83-91, 1995.

LIMA, L. M. Perfil lipídico e parâmetros hemostáticos em indivíduos submetidos à angiografia coronariana. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte.

LINDAHL, A. K.; SANDSET, P. M.; ABILDGAARD, U. The present status of tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolys*, v. 5, p. 439-449, 1994.

LINDSEY, C. C. et al. A clinical comparison of calculated versus direct measurement of low-density lipoprotein cholesterol level. *Pharmacotherapy*, v. 24(2), p. 167-172, 2004.

LIU, M. L. et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein and its association with carotid intima-media thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 24, p. 1492-1497, 2004.

LIU, P. Y. et al. Prognostic value and the changes of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*, v. 24, p. 1824-1832, 2003.

LORENZI, T. F. Manual de Hematologia – Propedêutica e clínica. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 655p.

LUC, G. et al. C-reactive protein, interleukin-6 and fibrinogen as predictors of

coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, p. 1255-1261, 2003.

LUC, G. et al. Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease. The PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, p. 1155-1161, 2002.

LWALEED, B. A.; BASS, P. S. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol*, v. 208(3), p. 327-339, 2006.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, v. 202, p. 498-499, 1964.

MADDAHI, J.; GAMBHIR, S. S. Cost-effective selection of patients for coronary angiography. *J Nucl Cardiol*, v. 4(2), p. S141-154, 1997. Suplemento 1.

MAEDA et al. Transient changes of serum lipoprotein(a) as an acute phase protein. *Atherosclerosis*, v. 78, p. 145-151, 1989.

MALINOW, M. R. Hyperhomocysteinemia. A common and easily resersible risk factor for occlusive atherosclerosis. *Circulation*, v. 81, p. 2004-2006, 1990.

MALINOW, M. R. et al. Homocysteine, diet, and cardiovascular diseases: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*, v. 99, p. 178-182, 1999.

MALY, M. et al. Tissue factor, tissue factor pathway inhibitor and cytoadhesive molecules in patients with an acute coronary syndrome. *Physiol Res*, v. 52, p. 719-728, 2003.

MANSFIELD, M. W.; STICKLAND, M. H.; GRANT, P. J. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promotor polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes. *Thromb Haemost*, v.74, p. 1032-1034, 1995.

MARCOVINA, S. M. et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. III Comparability of apolipoprotein A-I values by use of international reference material. *Clin Chem*, v. 39, p. 773-781, 1993.

MARCOVINA, S. M. et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. IV Comparability of apolipoprotein B values by use of international reference material. *Clin Chem*, v. 40, p. 586-592, 1994.

MARCOVINA, S. M. et al. Report of The National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease: recent advances and future directions. *Clin Chem*, v. 49, p. 1785-1796, 2003.

MARCOVINA, S.; PACKARD, J. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *J Intern Med*, v. 259, p. 437-446, 2006.

MARTINEZ, T. L. R. *Dislipidemias: da teoria à prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. 416p.

MARTINEZ, T. L. R. *Manual de condutas clínicas em dislipidemias*. Rio de Janeiro: Medline, 2003. 392p.

McLEAN, J. W.; TOMLINSON, J. E.; KUANG, W. J. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, v. 330, p. 132-137, 1987.

McNAMARA, J. R.; CONH, J. S.; WILSON, P. W. F. Calculated values of low-density lipoprotein in the assessment of lipid abnormalities and coronary disease risk. *Clin Chem*, v. 36, p. 36-42, 1990.

MEISINGER, C. et al. Prognostic value of apolipoprotein B and A-I in the prediction of myocardial infarction in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Eur Heart J*, v. 26, p. 271-278, 2005.

MENDES-LANA, A. et al. Apolipoprotein E polymorphism in Brazilian dyslipidemic individuals: Ouro Preto Study. *Braz J Med Biol Res*, v. 40(1), p. 49-56, 2007.

MENSCHIKOWSKI, M. et al. Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, v.118, p.173-181, 1995.

MILIONIS, H. J.; WINDER, A. F.; MIKHAILIDIS, D. P. Lipoprotein(a) and stroke. *J Clin Pathol*, v. 53, p. 487-496, 2000.

MOHANTY, D. et al. Thrombophilia in coronary artery disease: A double jeopardy. *Indian J Med Res*, v. 120, p. 13-23, 2004.

MOORE, K. J; FREEMAN, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26(8), p. 1702-1711, 2006.

MURPHY-CHUTORIAN, D.; ALDERMAN, E. L. The case that hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*, v. 73, p. 705-707, 1994.

NAUCK, M.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Rapid, homogeneous genotyping of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAI-1 gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Clin Chem*, v. 45, p. 1141-1147, 1999.

NARAN, H. N. et al. The influence of metabolic syndrome components on plasma PAI-1 concentrations is modified by the PAI-1 4G/5G genotype and ethnicity. *Atherosclerosis*, v. 196(1), p. 155-163, 2008.

NEHLER, M. R.; TAYLOR, L. M.; PORTER, J. M. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc Pathol*, v. 6, p. 1-9, 1997.

NIKFARDJAM, M.; GRAF, S.; HORNYKEWYCZ, S. Homocysteine plasma levels in young patients with coronary artery disease. Relation to history of acute myocardial infarction and anatomical extent of disease. *Thromb Res*, v. 103, p. 35-39, 2001. Suplemento 1.

NOVOTNY, W. F.; GIRARD, T. J.; MILETICH, J. P. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood*, v. 72, p. 2020-2025, 1988.

NYGÄRD, O.; NORDREHAUG, J. A.; REFSUM, H. S. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med*, v. 337, p. 230-236, 1997.

OORNI, K. et al. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res*, v. 41, p. 1703-1714, 2000.

OTT, I. Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med*, v. 3(2), p. 185-192, 2003.

OZAKI, Y. et al. Coronary arteriography for quantitative analysis: experimental and clinical comparison of cinefilm and video recordings. *Am Heart J*, v. 129(3), p. 471-475, 1995.

PACKARD, C. J. et al. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. *N Engl J Med*, v. 343, p. 1148–1155, 2000.

PACKARD, C. J.; SHEPHERD, J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.17, p.3542-3556, 1997.

PACKARD, R. R.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*, v. 54(1), p. 24-38, 2008.

PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*, v. 100, p. 177-182, 2003.

PATI, U.; PATI, N. Lipoprotein(a), atherosclerosis, and apolipoprotein(a) gene

polymorphism. *Mol Gen Met*, v. 71, p. 87-92, 2000.

PEDRO-BOTET, J. et al. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis*, v. 158, p. 183-193, 2001.

PEÑA-DÍAZ, A.; IZAGUIRRE-AVILA, R.; ANGLÉS-CANO, E. Lipoprotein Lp(a) and atherothrombotic disease. *Arch Med Res*, v. 31, p. 353-359, 2000.

PISCIOTTA, L. et al. Serum homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, v. 179, p. 333-338, 2005.

REES, A. The apo(a) gene: structure/function relationships and the possible link with thrombotic atheromatous disease. *Br Med Bull*, v. 46, p. 873-890, 1990.

RIDKER, P. M. et al. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*, v. 109, p. 6-19, 2007. Suplemento IV.

RIFAI, N.; BACHORIK, P. S.; ALBERTS, J. J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER (Ed.). *Tietz - textbook of clinical chemistry*. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 809-61.

RIM, L. et al. Lipoprotein (a): a new risk factor for coronary artery disease. *Tunis Med*, v. 78(11), p. 648-652, 2000.

ROETERS VAN LENNEP, J. E. et al. Apolipoprotein concentrations during treatment and recurrent coronary artery disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 2408-2413, 2000.

ROSS, R. Mechanisms of disease: atherosclerosis an inflammatory disease. *N Eng J Med*, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUSCHITZKA, F. T.; NOLL, G.; LUSCHER, T. F. The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology*, v. 88, p. 3-19, 1997. Suplemento 3.

SARTIPY, P. et al. Phospholipase A(2) modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, v. 274, p. 25913–25920, 1999.

SCANU, A. M. Structural and functional polymorphism of lipoprotein(a): biological and clinical implications. *Clin Chem*, v. 41(1), p. 170-172, 1995.

SCHACHTER, M. Lipoprotein (a) and cardiovascular risk. *Int J Cardiol*, v. 74, p. 169-170, 2000.

SCHWANKE, C. H. A. et al. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol*, v. 78, p. 571-579, 2002.

SHIN. J.; EDELBERG, J. E.; HONG, M. K. Vulnerable atherosclerotic plaque: clinical implications. *Curr Vasc Pharmacol*, v. 1(2), p. 183-204, 2003.

SIEST, G. et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*, v. 41, p.1068-1086, 1995.

SJOGREN, P et al. Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, p. 2580-2586, 2005.

SMITH, S. M. Haemostatic factors and atherogenesis. *Atherosclerosis*, v. 124(2), p. 137-143, 1996.

SNIDERMAN, A. D. et al. Errors that result from the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *J Intern Med*, v. 259, p. 455-461, 2006.

SNIDERMAN, A. D. et al. Association of hyperapobetalipoproteinemia with endogenous hypertriglyceridaemia and atherosclerosis. *Ann Intern Med*, v. 97, p.

833-839, 1982.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol, v. 77, p. 1-48, 2001. Suplemento III.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol, v. 88, p. 1-19, 2007. Suplemento I.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz de Doença Coronariana Crônica – Angina Estável. Arq Bras Cardiol, v. 83, p. 1-65, 2004. Suplemento II.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz de Indicações do Ultra-Som Intracoronariano na Prática Clínica. Arq Bras Cardiol, v. 81, p. 1-10, 2003. Suplemento II.

SOUZA, D. R. S. et al. Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. Braz J Med Biol Res, v. 40(2), p. 189-197, 2007.

SPRONK, H. M. H.; VAN DER VOORT, D.; CATE, H.T. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. Thromb J, v. 2(12), p. 1-10, 2004.

STANGL, V. et al. Coronary atherogenic risk factor in women. Eur Heart J, v. 23, p. 1738-1752, 2003.

STEGNAR, M. et al. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. Thromb Haemost, v. 79, p. 975-979, 1998.

SUDHIR, K. Lipoprotein-associated phospholipase A2, a novel inflammatory biomarker and independent risk predictor for cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab, v. 90, p. 3100-3105, 2005.

TALMUD, P. J. et al. Non-fasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 22, p. 1918-1923, 2002.

TAVINTHARAN, S. et al. Apolipoprotein E genotypes affects the response to lipid-lowering therapy in Chinese with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*, v. 9, p. 81-86, 2006.

THOMPSON, A.; DANESH, J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary artery disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med*, v. 259, p. 481-492, 2006.

TIETGE, U. J. et al. Overexpression of secretory phospholipase A(2) causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, v. 275, p. 10077–10084, 2000.

TOUSOULIS, D. et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*, v. 89(9), p. 993-997, 2003.

TSUKAMOTO, K. et al. Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *J Lab Clin Med*, v. 121(4), p. 598-602, 1992.

UTERMANN, G. The mysteries of lipoproteins(a). *Science*, v. 8, p. 904-910, 1989.

VAN DER HELM, H. A. et al. Regulation of the expression of group IIA and group V secretory phospholipases A₂ in rat mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*, v. 1484, 215–224, 2000.

VAN RINSBERG, V. W. M. The endothelium: vascular control and hemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol*, v. 95, p. 198-201, 2001.

VIEIRA, L.M. et al. Monocytes and plasma tissue factor levels in normal individuals

and patients with deep venous thrombosis of the lower limbs: potential diagnostic tools? *Thromb Res*, v. 119(2), p. 157-165, 2007.

VISANJI, J. M. et al. Influence of the –675 4G/5G dimorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 promoter on thrombotic risk in patients with factor V Leiden. *Brit J Haematol*, v. 110, p. 135-138, 2000.

VOUTILAINEN, S. et al. Plasma total homocysteine concentration and risk of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *J Intern Med*, v. 248, p. 217-222, 2000.

WALLDIUS, G. et al. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS Study): a prospective study. *Lancet*, v. 358, p. 2026-2033, 2001.

WALLDIUS, G. et al. The apoB/apoA-I ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med*, v. 42, p. 1355-1363, 2004.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *J Intern Med*, v. 255, p. 188-205, 2004.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. *J Intern Med*, v. 259, p. 493-519, 2006.

WALLENFELDT, K. et al. Apolipoprotein B/Apolipoprotein A-I relation to the metabolic syndrome and change in carotid artery intima-media thickness during 3 years in middle-aged men. *Stroke*, v. 35, p. 2248-52, 2004.

WARREN, C. J. What is homocysteine? Is this amino acid a predictor of heart disease? *Am J Nur*, v. 99(10), p. 39-41, 1999.

WESTERVELD, H. T. et al. Apolipoprotein B and coronary artery disease in women. A cross-sectional study in women undergoing their first coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 18, p. 1101-1107, 1998.

WILSON, P. W.; D' AGOSTINI, R. B.; LEVY, B. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, v. 97, p. 1837-1847, 1998.

WILSON, P.W. et al. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 16(10), p. 1250-1255, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>.2007. Acesso em: 20 nov. 2007.

YAMASHITA, T. et al. Elevated plasma levels of oxidized low-density lipoprotein relate to the presence of angiographically detected complex and thrombotic coronary artery lesion morphology in patients with unstable angina. *Circ J*, v. 71, p. 681-687, 2007.

YANG, F. et al. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Acta Physiol Sinica*, v. 57, p. 103-114, 2005.

YILMAZ, H. et al. C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct*, v. 9, p. 121-125, 2005.

YU, H. H.; GINSBRUG, G. S.; HARRIS, N. Evaluation and clinical application of a direct low density lipoprotein cholesterol assay in normolipemic and hyperlipidemic adults. *Am J Cardiol*, v. 80, p. 1295-1299, 1997.

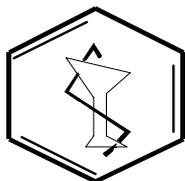
YUSUF, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, v. 364, p. 937-952, 2004.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PAQUINI, R. Hematologia – Fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001. 1081p.

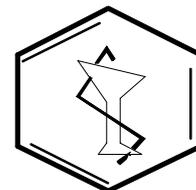
ZAMBON, A. et al. Genetics of apolipoprotein B and apolipoprotein AI and premature coronary artery disease. *J Intern Med*, v. 259, p. 473-480, 2006.

ZWAKA, T. P. et al. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, v. 103, p. 1194-1197, 2001.

APÊNDICE 1



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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO

PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, HEMOSTÁTICA E MOLECULAR DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA”

PESQUISADOR: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho
CARGO/FUNÇÃO: Professora de Hematologia Clínica
UNIDADE DA UFMG: Faculdade de Farmácia

- 2- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

- 3- DURAÇÃO DA PESQUISA: Cinco anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO:

A pesquisa que o senhor(a) está sendo convidado a participar tem o objetivo de estudar quais são os fatores laboratoriais que fazem com que um indivíduo tenha mais ou menos chance de apresentar uma doença do coração. Nesta pesquisa cada participante deve responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e retirar uma amostra de sangue que será enviada para os Laboratórios da Faculdade de Farmácia da UFMG. Da amostra enviada para o laboratório será extraído o seu DNA (material genético) que ficará armazenado. É nesse DNA que pesquisaremos características genéticas que podem influenciar no desenvolvimento das doenças do coração. Seu sangue será centrifugado para obtenção do soro ou plasma, materiais que serão usados nos testes bioquímicos e hemostáticos. Durante nenhum momento desse estudo, as pessoas que estarão trabalhando com seu material saberão que ele é seu, garantindo o sigilo de seus dados. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a sua identidade, que é confidencial. Sua participação é totalmente voluntária. Você poderá solicitar à equipe o seu desligamento do estudo a qualquer momento. Caso você queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora ou no futuro, poderá entrar em contato com a pesquisadora principal, professora Maria das Graças Carvalho, no telefone (31)3499-6881, ou com as outras pesquisadoras, professora Marinez de Oliveira Sousa, no telefone (31)3499-6896 ou a aluna de doutorado Luciana Moreira Lima, no telefone (31)3464-0357. É através desse tipo de pesquisa que esperamos poder aumentar o nosso conhecimento sobre os riscos de desenvolver doenças do coração. Sua participação poderá ajudar outras pessoas que tenham doenças do coração.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- 2- Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao seu tratamento.
- 3- Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
- 4- Disponibilidade de assistência no Laboratel, por eventuais danos à saúde, decorrentes da punção venosa na obtenção da amostra de sangue.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

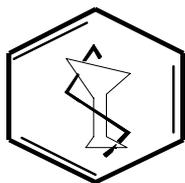
Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Belo Horizonte, ____/____/____

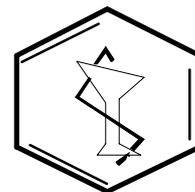
assinatura do sujeito da pesquisa

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

APÊNDICE 2



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



FICHA CLÍNICA

Projeto de Pesquisa “Caracterização Bioquímica, Hemostática e Molecular da Doença Arterial Coronariana”

I – IDENTIFICAÇÃO:

1.Nome: _____

2.Data de nascimento: ____/____/____

3.Endereço: _____

4.Telefone: _____ 5. CEP: _____

6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____ 7.Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

1.Sexo: M F

2.Estado conjugal: Solteiro Casado Separado Viúvo Divorciado

3.Você fuma atualmente? Não Sim (quantos cigarros por dia, em média? _____)

4.Você é ex-fumante? Não Sim (quanto tempo você fumou? _____ Que ano você parou de fumar? _____)

5.Você tem pressão alta? Não Sim

6.Você pratica alguma atividade física regular? Não Sim

7.Já lhe foi dito por um médico ou outro profissional de saúde que você tem colesterol alto? Não Sim

8.Qual o seu peso atual? _____ Qual sua altura? _____

9.Você tem diabetes? Não Sim

10.Você já teve Síndrome Coronariana Aguda? Não Sim (quando? _____)

com Supra ST? Não Sim Não se aplica

11.Você já teve Doença Vascular Periférica? Não Sim (quando? _____)

12.Você já teve Acidente Vascular Cerebral? Não Sim

13.Medicamentos em uso:

- Hipolipemiante oral Não Sim

- Terapia de reposição hormonal Não Sim Não se aplica

- Anticoncepcional Não Sim Não se aplica

- Anticoagulantes orais Não Sim

- Antiagregante Plaquetário Não Sim

- Outros medicamentos: _____

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

1.Etnia: Caucasiano Mestiço (mulato, pardo) Negro Índio Asiático

Outros Mestiços

2.Seu pai tem/tinha alguma doença? Não Sim (Qual? _____)

3.Sua mãe tem/tinha alguma doença? Não Sim (Qual? _____)

4.Algum filho seu tem alguma doença? Não Não se aplica Sim

(Qual? _____)

5.Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primo, avós, sobrinhos)? Não Sim (Qual e membros

afetados? _____)

IV – ANGIOGRAFIA CORONARIANA

1. ____ Coronárias angiograficamente normais.

2. ____ Ateromatose leve.

3. ____ Ateromatose moderada.

4. ____ Ateromatose grave: ____ Uniarterial

____ Biarterial

____ Triarterial ou mais

Descendente anterior: Sim Não

Observação: _____

Médico responsável
(carimbo e assinatura)