

ANNA LETÍCIA SOARES

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMOSTÁTICOS
E MOLECULARES EM MULHERES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E DIFERENTES
GRAUS DE ACOMETIMENTO DE CARÓTIDA**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2008

ANNA LETÍCIA SOARES

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMOSTÁTICOS
E MOLECULARES EM MULHERES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E DIFERENTES
GRAUS DE ACOMETIMENTO DE CARÓTIDA**

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: Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Carvalho

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marinez de Oliveira Sousa

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2008

Doutoranda: Anna Letícia Soares

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa

Colaboradores: Profa Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Dr. Pedro Wesley Rosário – Médico endocrinologista

Dra. Michelle Aparecida Ribeiro Borges – Médica endocrinologista

Linha de Pesquisa - PPGCF

Análises Clínicas e Toxicológicas

Áreas de conhecimento

4.01.01.05-3 – Hematologia

2.08.00.00-2 – Bioquímica

Instituições Participantes:

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

Em 2002, tive a oportunidade de iniciar um gratificante estudo sobre diabetes e hipercoagulabilidade. Em 2004, parte deste estudo foi concluída e uma nova oportunidade de avançar nesse vasto campo me foi concedida. Agora, mais uma etapa concluída. Durante todo esse tempo contei com o apoio de muitas pessoas. Aprendi muito, ensinei um pouco. As oportunidades e os acontecimentos foram além da minha expectativa.

Quero agradecer, em especial, à Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, minha orientadora neste e em muitos outros trabalhos. Cresci cientificamente, profissionalmente e como pessoa sempre tendo a Profa. Graça como referência.

Quero agradecer também:

À Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa, minha co-orientadora, pela confiança, (pelos “passeios” no Itamaraty) e por ter mantido as portas do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG sempre abertas.

À Profa. Dra Ana Paula Salles Moura Fernandes, que sempre me apoiou nos experimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG.

À Profa. Dra. Luci Maria Sant’Ana Dusse e ao Prof. Dr. Lauro Mello Vieira, que mais que professores sempre foram incentivadores neste e em diversos outros trabalhos científicos.

À Geralda de Fátima Guerra Lages pelo fundamental apoio logístico na condução deste estudo.

Ao Dr. Pedro Wesley Rosário e à Dra. Michelle Aparecida Ribeiro Borges pela triagem e encaminhamento dos pacientes avaliados nesse estudo.

À todos os funcionários do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG que muito contribuíram em várias etapas deste estudo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG que sempre me ajudaram ao longo desse caminho.

Aos grandes colegas da Faculdade de Farmácia: Heriely, Fernanda e Felipe pela presente participação em vários momentos deste estudo. Aos colegas de pós-graduação, especialmente, à Luciana, Cláudia Natália, Danyelle, Anna Paula e Lillian que me ajudaram a vencer os desafios ao longo desse período.

Aos meus grandes amigos Lara Carvalho Godoi, Flávia Beatriz Custódio, Leandro Augusto, João Paulo Bomfim pelo apoio constante.

Aos funcionários do Laboratório Geraldo Lustosa que muito contribuíram na execução deste estudo.

À Profa. Dra. Damaris Silveira, da UnB, que me ajudou abrindo as portas de uma instituição incrível e os olhos para o mundo dos metabólitos secundários.

Aos amigos de trabalho do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Sarah-Brasília, em especial à Farmacêutica-Bioquímica Myrna Tenório, que tornaram mais tranquilas as viagens da ponte aérea Brasília - Belo Horizonte.

À Profa. Denise Mafra Gonçalves e ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Siebra Beraldo que me receberam carinhosamente no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Associação das Pioneiras Sociais, com quem eu tenho o prazer de estender a convivência e muito aprender.

A todas as pacientes que se dispuseram a participar deste estudo doando material biológico, tempo e boa vontade.

Aos meus irmãos João Luiz Soares e Paulo Henrique Soares, incentivadores e colaboradores científicos. Às minhas cunhadas Gisele e Alessandra e à pequena Mariana.

Aos meus pais, Maria Pinto Soares e Manoel Felipe Soares, pessoas especiais capazes de tornar todos os momentos mais prazerosos e suaves. Amor incondicional.

São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram
da experimentação, mãe de todo conhecimento.
(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

LISTA DE QUADRO E TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VI
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 DIABETES MELLITUS.....	6
2.2 FATORES DE RISCO PARA LESÕES VASCULARES NO DIABETES.....	8
2.2.1 Hiperglicemia	8
2.2.2 Hiperinsulinemia	10
2.2.3 Dislipidemia	11
2.2.4 Hipertensão arterial.....	15
2.2.5 Microalbuminúria	16
2.2.6 Hiperhomocisteinemia.....	17
2.3 DIABETES E ACOMETIMENTO DE CARÓTIDA	18
2.4 HEMOSTASIA	19
2.4.1 Endotélio	20
2.4.2 Plaquetas.....	23
2.4.3 Cascata da coagulação.....	24
2.4.4 Anticoagulação natural	28
2.4.5 Fibrinólise.....	31
2.5 DIABETES E ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS.....	33
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	40
4.2 CASUÍSTICA	41
4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	45
4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.5 MÉTODOS	47
4.5.1 Doppler de carótida	47
4.5.2 Parâmetros bioquímicos	48
4.5.3 Parâmetros hemostáticos	52
4.5.4 Análises genéticas	59
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61

5 RESULTADOS	62
5.1 USO DE MEDICAMENTOS	63
5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	64
5.2.1 Perfil glicêmico	65
5.2.2 Perfil lipídico	71
5.2.3 Proteína C reativa ultra-sensível e homocisteína	84
5.3 PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS	90
5.4 ANÁLISES GENÉTICAS	106
6 DISCUSSÃO	110
6.1 USO DE MEDICAMENTOS	111
6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	113
6.2.1 Perfil glicêmico	113
6.2.2 Perfil lipídico	114
6.2.3 Proteína C reativa ultra-sensível e homocisteína	118
6.3 PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS	120
6.4 ANÁLISES GENÉTICAS	129
6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	131
7 CONCLUSÕES	133
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
ANEXO 1	145
ANEXO 2	146

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 -	Propriedades antitrombóticas do endotélio.....	20
Tabela 1 -	Pacientes excluídas e os critérios adotados.....	42
Tabela 2 -	Caracterização do grupo de estudo.....	43
Tabela 3 -	Caracterização dos subgrupos de acordo com o resultado do Doppler de carótida.....	44
Tabela 4 -	Caracterização do grupo-controle.....	45
Tabela 5 -	Uso de medicamentos das pacientes diabéticas.....	63
Tabela 6 -	Uso de medicamentos das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	64
Tabela 7 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas.....	65
Tabela 8 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas ao grupo-controle.....	65
Tabela 9 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina.....	66
Tabela 10 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	66
Tabela 11 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina.....	67
Tabela 12 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	67
Tabela 13 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas.....	68
Tabela 14 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	68
Tabela 15 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores.....	69
Tabela 16 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	69

Tabela 17 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA).....	70
Tabela 18 -	Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	70
Tabela 19 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas.....	71
Tabela 20 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas com o grupo-controle.....	72
Tabela 21 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina.....	73
Tabela 22 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	74
Tabela 23 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina.....	75
Tabela 24 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	76
Tabela 25 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas.....	77
Tabela 26 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	79
Tabela 27 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores.....	80
Tabela 28 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	81
Tabela 29 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA).....	82
Tabela 30 -	Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	83
Tabela 31 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas.....	84
Tabela 32 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas com o grupo controle.....	84

Tabela 33 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina.....	85
Tabela 34 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida..	85
Tabela 35 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina.....	86
Tabela 36 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	86
Tabela 37 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas.....	87
Tabela 38 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	87
Tabela 39 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores.....	88
Tabela 40 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	88
Tabela 41 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA).....	89
Tabela 42 -	Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	89
Tabela 43 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas.....	91
Tabela 44 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas com o grupo-controle.....	92
Tabela 45 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina	96
Tabela 46 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	97

Tabela 47 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina.....	98
Tabela 48 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	99
Tabela 49 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas.....	100
Tabela 50 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	101
Tabela 51 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores.....	102
Tabela 52 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	103
Tabela 53 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA).....	104
Tabela 54 -	Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.....	105
Tabela 55 -	Freqüência do polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) nas pacientes diabéticas.....	107
Tabela 56 -	Avaliação da influência do polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) nos níveis plasmáticos de homocisteína.....	107
Tabela 57 -	Freqüência do polimorfismo P1 ^A no gene da glicoproteína IIIa (GPIIIa) de plaquetas nas pacientes diabéticas.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da ativação dos fatores da coagulação para formação da fibrina e da regulação promovida pelos anticoagulantes naturais.....	27
Figura 2 -	Representação esquemática da formação da rede de fibrina a partir do fibrinogênio e a geração do fragmento dímero D, após ação da plasmina.....	28
Figura 3 -	Representação esquemática da inativação da trombina pela antitrombina, catalisada pelo sulfato de heparan, gerando o complexo trombina-antitrombina (TAT).....	29
Figura 4 -	Representação esquemática da ativação da proteína C (PC) em proteína C ativada (PCa) e da inativação do fator Va pela PCa e o seu co-fator proteína S (PS).....	30
Figura 5 -	Representação esquemática do sistema fibrinolítico.....	32
Figura 6 -	Fotos de microscopia eletrônica de varredura.....	35
Figura 7 -	Correlação entre os valores de HDLc e apolipoproteína A-I (apoA-I).....	78
Figura 8 -	Correlação entre os valores de HDLc e índice apolipoproteína B/apolipoproteína A-I (apoB/apoA-I).....	78
Figura 9 -	Distribuição dos valores do fator von Willebrand (fvW).....	93
Figura 10 -	Distribuição dos valores de trombomodulina (TM).....	93
Figura 11 -	Distribuição dos valores do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2).....	93
Figura 12 -	Distribuição dos valores de dímero D (D-Di).....	93
Figura 13 -	Distribuição dos valores do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1).....	94
Figura 14 -	Distribuição dos valores de fator VII (VII).....	94
Figura 15 -	Distribuição dos valores de fator VIII (VIII).....	94
Figura 16 -	Distribuição dos valores de fibrinogênio (FIB).....	94
Figura 17 -	Distribuição dos valores de proteína C (PC).....	95
Figura 18 -	Distribuição dos valores de antitrombina (AT).....	95
Figura 19 -	Correlação entre os valores de fator VIII (VIII) e fator von Willebrand (fvW).....	95
Figura 20 -	Identificação do polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR).....	106
Figura 21 -	Identificação do polimorfismo no gene da glicoproteína GPIIIa (P1 ^A).....	108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
ADAMTS-13	A Desintegrina e Metaloproteinase com sítio de Trombospondina tipo 1, membro 13
ADP	Adenosina difosfato
ADPase	Enzima degradadora de adenosina difosfato
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
ANOVA	Análise de variância
apo-a	Apolipoproteína a
apoA	Apolipoproteína A
apoA-I	Apolipoproteína A-I
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
AT	Antitrombina
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
β -TG	Beta-tromboglobulina
Beta-bloq	Beta-bloqueador
C	Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
CRE	Creatinina plasmática
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
D-Di	Dímero D

DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
e-NOS	NO sintase endotelial
ELFA	Ensaio imunoenzimático fluorescente
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
ET-1	Endotelina-1
F1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FAL	Fosfatase alcalina
FPA	Fibrinopeptídeo A
FT	Fator tecidual
fvW	fator von Willebrand
G	Guanina
GLI	Glicemia de jejum
GLI PP	Glicemia pós-prandial
GPIb	Glicoproteína Ib
GPIIbIIIa	Glicoproteína IIbIIIa
GPIIIa	Glicoproteína IIIa
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
Hcys	Homocisteína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLc	Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
IMT	Espessura da íntima-média da carótida
i-NOS	NO sintase induzida
K ⁺	Íon potássio
LDLc	Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	Lipoproteína (a)
MTHFR	Metileno-tetra-hidrofolato redutase
Na ⁺	Íon sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
pb	Pares de base
PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCRus	Proteína C reativa ultra-sensível
PDF	Produto de degradação da fibrina
PF4	Fator 4 plaquetário
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina

PKC	Proteína quinase C
PS	Proteína S
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
T	Timina
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TG	Triglicérides
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TM	Trombomodulina
TNF	Fator de necrose tumoral
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Ativador do plasminogênio tipo tecidual
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
TVP	Trombose venosa profunda
u-PA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
US	Ultra-sonografia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VPN	Valor preditivo negativo

RESUMO

O risco de doença cardiovascular em mulheres com diabetes tipo 2 (DM2) é cinco vezes maior que em mulheres não diabéticas. Alterações no sistema hemostático precedem o diabetes e acompanham a progressão da lesão macrovascular. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações bioquímicas, hemostáticas e genéticas de mulheres com diabetes tipo 2 segundo o grau de acometimento da carótida avaliado pelo Doppler. Foram avaliadas 64 mulheres com diabetes tipo 2, sendo 25 sem alteração no Doppler (íntima-média menor que 1mm), 15 com espessamento de íntima-média (maior que 1mm e sem placa) e 24 com placa aterosclerótica (com estenose menor que 50%). Como covariável foi avaliada a influência do uso dos medicamentos mais utilizados pelas pacientes. Após análise e discussão dos resultados pode-se concluir que a avaliação isolada do perfil lipídico de mulheres diabéticas, após intervenção clínica e farmacológica, não permite inferir sobre o grau de lesão macrovascular. Todavia, mulheres com diabetes tipo 2 e maior comprometimento macrovascular apresentam aumento dos níveis plasmáticos de dímero D, fibrinogênio e notadamente do fator VIII. O aumento dos níveis de PAI-1 não está associado à progressão da lesão macrovascular, bem como a presença das mutações nos genes da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e da glicoproteína IIIa não estão associadas ao diabetes tipo 2. Os resultados analisados como um todo sugerem, à exceção do fibrinogênio, dímero D e do fator VIII, que o agravamento da doença macrovascular, ainda em estágio precoce, não está associado aos parâmetros laboratoriais avaliados em mulheres com DM2, nas condições deste estudo.

ABSTRACT

Risk for cardiovascular disease is five-fold higher in type 2 diabetes women than in women without diabetes. Increased plasma levels of hemostatic markers precede the development of type 2 diabetes and are associated with macrovascular disease. The aim of this study was to evaluate the biochemical, hemostatic and genetic changes in type 2 diabetes women with different carotid intima-media thickness assessed by doppler. Sixty four type 2 diabetes women classified into the following subgroups according to the carotid intima-media thickness were studied: 25 with normal result (<1mm), 15 intermediate (>1mm and without plaque) and 24 with plaque (stenosis lower than 50%). Influence of medication use was evaluated as a covariant among patients. The results of this study show that a single assessment of the lipid profile in type 2 diabetes women, after clinical and pharmacological intervention, do not allow speculation about the macrovascular disease progression. However, type 2 diabetes women with macrovascular disease present increased plasma levels of D-dimer, fibrinogen and factor VIII. Elevated PAI-1 levels in type 2 diabetes women are not associated with macrovascular progression; as well as MTHFR and glycoprotein IIIa polymorphism are not associated with type 2 diabetes. The results taken together, except fibrinogen, D-dimer and factor VIII, suggest that the worsening of this disease still in an earlier stage is not associated to the other laboratory parameters assessed in type 2 diabetes women in the conditions of the present study.

***1 INTRODUÇÃO E
RELEVÂNCIA DO TEMA***

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico de alta prevalência que compromete a qualidade de vida de milhões de indivíduos em todo o mundo. Aproximadamente 80% das causas de morte nos diabéticos são em decorrência de eventos trombóticos e 75% desses são eventos cardiovasculares.

O aumento do risco cardiovascular em mulheres diabéticas é maior do que o observado entre os homens diabéticos, ficando essas mais susceptíveis aos eventos cardiovasculares.

Várias alterações no mecanismo hemostático já foram descritas no diabetes, porém, não se sabe exatamente a dinâmica do desenvolvimento e do agravamento dessas alterações. A associação entre as alterações hemostáticas e as complicações microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia) e macrovasculares (doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e doença arterial obstrutiva periférica) decorrentes do diabetes estão sendo amplamente estudadas, almejando o desenvolvimento de novas abordagens de controle e tratamento dos indivíduos diabéticos.

O novo contexto de abordagem do diabetes tem influenciado nos procedimentos adotados para tratamento. Existem evidências que um tratamento mais agressivo, não somente a hiperglicemia, mas também os fatores de risco cardiovascular como hipertensão, dislipidemia e obesidade visceral no indivíduo com DM2 reduz significativamente a morbimortalidade cardiovascular.

Sabe-se que a evolução do diabetes se dá de forma heterogênea nos indivíduos acometidos por esse distúrbio e é de grande interesse dos profissionais da área de saúde conhecer as particularidades envolvidas e, possivelmente, determinantes nesse processo, em nosso meio, considerando a influência de variáveis epidemiológicas regionais. Portanto, um maior conhecimento do sistema hemostático é de grande importância para se estabelecer novas diretrizes para a adoção de medidas preventivas e profiláticas no diabetes.

Pretende-se neste trabalho caracterizar as alterações bioquímicas, hemostáticas e moleculares porventura presentes em mulheres com DM2 em função da presença de alterações macrovasculares, notadamente as carotídeas. Não é do nosso conhecimento, a existência de uma

abordagem ampla sobre o perfil hemostático em pacientes com diferentes graus de manifestações clínicas. Tal estudo poderá fornecer importante subsídio para um maior conhecimento dos perfis hemostático, lipídico e glicêmico em mulheres diabéticas, em nosso meio.

A importância do presente estudo consiste na investigação de parâmetros hemostáticos no estágio ainda controlado da doença, em pacientes apresentando diferentes graus de comprometimento vascular, porém, sem manifestações clínicas. O maior grau de comprometimento vascular incluído no presente estudo consistiu na presença de placa aterosclerótica nas carótidas com estenose inferior à 50%, tendo sido excluídos todos os casos mais graves. Frente a esse conhecimento, é possível que medidas profiláticas possam ser adotadas trazendo potenciais benefícios aos pacientes que ainda não evoluíram para complicações inexoráveis e mais graves, conforme se espera à luz dos conhecimentos atuais, considerando a história natural da doença.

O escopo do trabalho tem como prioridade estudar as possíveis alterações bioquímicas e hemostáticas em função do agravamento da doença sob o ponto de vista do processo de formação de placas ateroscleróticas nas carótidas, em estágio precoce da doença.

Para a composição dos grupos algumas medidas foram tomadas para excluir a presença de fatores que pudessem confundir a interpretação dos resultados. Fatores de risco sabidamente conhecidos que interferem na história natural da doença foram controlados, tais como controle lipídico, uso de medicamentos, idade, tabagismo, hipertensão arterial e controle glicêmico. Tais fatores foram rigorosamente controlados através do ajuste em cada grupo, mantendo percentuais equivalentes de cada covariável, objetivando a composição de grupos bastante semelhantes nas covariáveis. Dessa forma, a classificação quanto ao grau de lesão macrovascular constituiu o ponto principal entre os grupos.

O planejamento experimental deste estudo excluiu indivíduos com desequilíbrio metabólico (forma descompensada do diabetes). Muitos estudos sobre diabetes apresentam resultados conflitantes justamente por não distinguirem a presença de comorbidades que também contribuem

para alterações no perfil hemostático. Poucos são os trabalhos que focalizam pacientes diabéticos controlados sob o ponto de vista clínico-laboratorial.

Dentro desse contexto, o presente trabalho se propôs a investigar a hipótese de que alterações macrovasculares estão associadas à exacerbação do estado de hipercoagulabilidade, ou seja, a presença concomitante de tais alterações estaria, possivelmente, relacionada.

Fatores genéticos e/ou adquiridos, ambientais, circunstanciais e familiares podem interferir sobre a expressão do distúrbio. Assim, o estabelecimento de um estudo fundamentado dentro da nossa realidade poderá trazer respostas mais fidedignas e adequadas, tendo em vista que a grande maioria do conhecimento sobre o DM, acumulado ao longo do tempo, foi obtido através de estudos conduzidos fora do nosso meio.

Um melhor conhecimento sobre o diabetes e suas complicações macrovasculares poderá contribuir de forma positiva para o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção e tratamento do diabetes, além de uma melhor caracterização acerca das alterações hemostáticas e bioquímicas dessa doença em nosso meio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

As grandes mudanças no comportamento humano, no meio ambiente e no estilo de vida têm acompanhado a globalização, e estão favorecendo o aumento do número de indivíduos obesos e diabéticos (Zimmet et al., 2001). O aumento do número de indivíduos diabéticos adquiriu um caráter de “epidemia” nas últimas décadas. Em 2000, o número de indivíduos diabéticos na população mundial era de aproximadamente 151 milhões e a previsão é de que em 2010 chegue a 221 milhões e em 2025, 324 milhões (Cheng, 2005).

Existem dois tipos de *Diabetes mellitus* que são mais prevalentes. O diabetes tipo 1 (DM1) que se caracteriza pela destruição auto-imune das células beta do pâncreas, resultando na deficiência absoluta de insulina. O segundo tipo, o diabetes tipo 2 (DM2), que corresponde a aproximadamente 90% dos casos de diabetes no mundo, se caracteriza pela resistência à insulina e/ou secreção reduzida de insulina (Zimmet et al., 2001).

A insulina é um hormônio que regula a concentração de glicose no plasma e que também apresenta outras funções importantes, tais como: estimula o crescimento e a diferenciação celular; promove o armazenamento de energia sob a forma de gordura estimulando a lipogênese, a síntese de glicogênio e a de proteínas, além de inibir a lipólise, a glicogenólise e a quebra de proteínas. A deficiência ou resistência à insulina resulta em um desarranjo nesses processos e produz elevação dos níveis plasmáticos de glicose e lípidos (Saltiel and Kahn, 2001).

A epidemia de diabetes está particularmente relacionada ao DM2. Paradoxalmente, parte do problema está relacionado ao melhoramento dos programas de saúde pública durante o século 20 e ao aumento da expectativa de vida. Doenças que não são de notificação compulsória como diabetes e doenças cardiovasculares são, atualmente, os maiores problemas de saúde pública, responsáveis pelas causas do aumento da morbidade e mortalidade no século 21 (Zimmet et al., 2001).

Como os custos envolvidos no tratamento da doença primária e no tratamento das complicações são muito altos, tem-se investido muito na prevenção primária (para reduzir a

incidência de DM) e na prevenção secundária (para reduzir as complicações imediatas e de longo prazo). O tratamento da hipertensão arterial, redução dos níveis de colesterol total e triglicérides, bem como o controle dos níveis de glicemia são medidas básicas para prevenir o desenvolvimento das complicações (Zimmet et al., 2001).

O DM2 está relacionado com o aumento do risco de complicações microvasculares e macrovasculares (Nazimek-Siewniak et al., 2002). As formas mais prevalentes das complicações microvasculares são a nefropatia, a retinopatia e a neuropatia; já dentre as macrovasculares, destacam-se a doença arterial coronariana (DAC), o acidente vascular cerebral (AVC) e a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (Brownlee, 2001).

Homens e mulheres diabéticos apresentam elevado risco para DAC, com duplicação do risco total para homens, comparando com homens sem diabetes, e um aumento de cinco vezes para mulheres quando comparadas com mulheres não-diabéticas. O aumento do risco cardiovascular para mulheres diabéticas já foi confirmado por vários estudos epidemiológicos (Sowers et al., 2001, Koerbel and Korytkowski, 2003).

A incidência de DM2 entre homens e mulheres é a mesma quando os fatores de risco, como a obesidade, são levados em consideração, e não há influência do gênero na progressão da doença (Resnick and Howard, 2002).

Entre os indivíduos não diabéticos, as mulheres apresentam um risco cardiovascular menor que o dos homens. De fato, o diabetes “anula” o efeito protetivo da mulher em relação à doença cardiovascular. Nas mulheres o controle glicêmico é afetado pela alta incidência de distúrbios alimentares, uso de contraceptivo hormonal, menstruação, gravidez e climatério. Outros fatores também contribuem para aceleração do risco de DAC em mulheres com diabetes, tais como, hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade central, depressão e baixo nível sócio-econômico (Koerbel and Korytkowski, 2003).

Mulheres com níveis normais de estrógeno, geralmente, apresentam baixo risco cardiovascular. Na menopausa, com a redução do estrógeno, observa-se aumento do LDLc, redução

do HDLc, aumento na deposição de gordura abdominal e hipertensão. Todo esse fenômeno é acompanhado pelo aumento da idade (Resnick and Howard, 2002).

Pacientes com diabetes são significativamente mais pesados que os pacientes não-diabéticos. O acúmulo de gordura visceral está mais associado à disfunção do controle glicêmico do que a gordura subcutânea. Estudos epidemiológicos já observaram que não é possível distinguir os dois tipos de acúmulo de gordura com o uso da medida da circunferência abdominal, embora essa medida esteja associada ao diabetes. O índice de massa corporal (IMC) é a medida mais fidedigna para expressar tamanho corporal (Resnick and Howard, 2002).

2.2 FATORES DE RISCO PARA LESÕES VASCULARES NO DIABETES

O DM2 é uma doença multifatorial que mostra heterogeneidade em muitos aspectos. O DM2 pode ser caracterizado como um distúrbio metabólico que associa a hiperglicemia a um conjunto de fatores de risco cardiovasculares que incluem hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensão, obesidade visceral, microalbuminúria e hipercoagulabilidade (Zimmet et al., 2001).

2.2.1 Hiperglicemia

A hiperglicemia causa anormalidades no fluxo sanguíneo e aumenta a permeabilidade vascular. Quatro principais hipóteses sobre como a hiperglicemia causa as complicações micro e macrovasculares vêm sendo estudadas (Brownlee, 2001).

1) Aumento do fluxo da via do poliol

A aldose redutase (EC 1.1.1.21) tem uma baixa afinidade pela glicose em concentrações fisiológicas e o metabolismo da glicose por essa via ocorre, normalmente, em baixa porcentagem. Porém, em

situações de hiperglicemia ocorre o aumento da conversão enzimática conduzindo à formação de sorbitol que é oxidado a frutose e à redução de NADPH. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito deletério induzido pela hiperglicemia no fluxo da via do poliol, dentre estes se destacam o estresse oxidativo induzido pelo sorbitol, redução da atividade da enzima $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$, aumento do NADH/NAD⁺ citosólico e redução do NADPH citosólico. Vários estudos clínicos têm questionado a relevância desse mecanismo em humanos, entretanto, um estudo multi-dose com placebo confirmou que a inibição da aldose redutase reduz a nefropatia diabética (Brownlee, 2001).

2) Aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Os AGEs são encontrados em grandes quantidades nos vasos da retina e do glomérulo renal de diabéticos. Os AGEs podem ser originados pela auto-oxidação da glicose a glioxal, decomposição dos produtos de Amadori a 3-deoxiglicosona, e pela fragmentação do gliceraldeído 3-fosfato e fosfato de dihidroxiacetona em metilglioxal. A produção de AGEs causa lesão celular por três mecanismos: primeiro, as proteínas intracelulares modificadas pelos AGEs possuem função alterada; segundo, componentes da matriz extracelular modificados pelos AGEs interagem de forma anormal com outros componentes da matriz; terceiro, proteínas plasmáticas modificadas por AGEs ligam aos receptores de AGEs nas células endoteliais, mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (Brownlee, 2001).

3) Ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC)

A hiperglicemia promove o aumento de diacilglicerol (DAG) que ativa PKC. A ativação de PKC tem um número de conseqüências patogênicas tais como a redução da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) e de endotelina-1 (ET-1), aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), aumento do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), aumento do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), do fator de transcrição NF-kappaB e de NADPH oxidase (Brownlee, 2001).

4) Aumento do fluxo da via de hexosaminas

A ativação da via de hexosaminas pela hiperglicemia pode resultar em várias mudanças na expressão gênica e na função de proteínas, que juntas contribuem para a patogênese de complicações diabéticas (Brownlee, 2001).

Estudos recentes apontam que os quatro mecanismos patogênicos refletem um único processo induzido pela hiperglicemia que é a produção excessiva de superóxidos pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Brownlee, 2001).

Frente a esse cenário, torna-se necessário evidenciar esforços no monitoramento dos níveis plasmáticos de glicose para minimizar os efeitos deletérios causados pela hiperglicemia, principalmente, através da dosagem da glicohemoglobina (HbA1c). Atualmente, esse marcador é utilizado para monitorar os pacientes diabéticos e não para fazer diagnóstico. A quantidade de hemoglobina glicada é proporcional ao tempo e à concentração de glicose referente a um período retrospectivo de 4 a 12 semanas (Genuth et al., 2003).

2.2.2 Hiperinsulinemia

Os indivíduos com DM2 podem apresentar um quadro de resistência à insulina e/ou secreção reduzida de insulina (Zimmet et al., 2001). Especificamente na resistência à insulina, observa-se o desenvolvimento de hiperinsulinemia, essa resultante de uma maior secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, atuando como um mecanismo compensatório do organismo (Kopelman, 2000).

O período de resistência à insulina geralmente precede o aparecimento do DM2, e esse período pode durar vários anos. A hiperinsulinemia compensatória também está associada a baixos níveis de estrógenos e altos níveis de andrógenos. Embora os eventos cardiovasculares sejam relativamente raros na pré-menopausa, os fatores de risco antes da menopausa podem acumular ao longo dos anos e somente se tornarem aparentes na pós-menopausa (Resnick and Howard, 2002).

O papel da hiperinsulinemia como um fator de risco independente para doença cardiovascular ainda não foi esclarecido. Seu efeito, aparentemente, não é em decorrência do efeito tóxico direto da insulina (Meigs et al., 2000).

A insulina apresenta efeito anabolizante, possivelmente, pela ligação aos receptores do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). Dessa forma, o aumento da atividade mitogênica nas situações de hiperinsulinemia pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento da aterogênese, promovendo a proliferação de células musculares lisas dos vasos (DeFronzo, 1997).

A insulina também está envolvida no metabolismo de lípidos a qual é responsável pela regulação da transcrição da lipase lipoproteica, enzima que hidrolisa os triglicérides presentes nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e nos quilomicrons (DeFronzo, 1997, Ruotolo and Howard, 2002). Alterações na concentração e na funcionalidade da insulina promovem anormalidades no metabolismo lipídico favorecendo as complicações macrovasculares no diabetes (Kopelman, 2000, Saltiel and Kahn, 2001).

2.2.3 Dislipidemia

A dislipidemia, isoladamente, constitui um importante fator de risco para a doença cardiovascular. A associação de dislipidemia à hipertensão e/ou diabetes aumenta aproximadamente em 20% o risco da ocorrência de um evento cardiovascular (DeFronzo, 1997).

A dislipidemia nos pacientes com diabetes apresenta algumas características particulares. Muitas evidências indicam que as alterações qualitativas nas lipoproteínas são mais expressivas que as alterações quantitativas (Goldberg, 2001).

As complicações macrovasculares no diabetes se devem principalmente à formação de placas ateroscleróticas. Algumas teorias sobre os mecanismos da aterosclerose em diabéticos têm

sido baseadas nas mesmas propostas para a população não-diabética. As placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos parecem ser morfológicamente muito similares as dos indivíduos não-diabéticos. As duas teorias principais propostas para os fatores iniciadores associados à aterosclerose são: primeiro, a alteração dos lípides plasmáticos e hipercolesterolemia e, conseqüentemente, a formação de extensas lesões ricas em lípidos sem evidências de perda do endotélio e presença de trombos; e segundo, a lesão endotelial num estado de normocolesterolemia como fator iniciador, sendo que essa lesão ocorre em locais de fluxo turbulento, como na entrada de um vaso ramificado ou nas seções de vasos adjacentes aos que têm estenose por aterosclerose (Winocour, 1994).

Na síndrome metabólica os principais componentes associados à dislipidemia são: aumento de triglicérides de jejum e pós-prandial, redução da lipoproteína de alta densidade (HDLc) e aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDLc) (Ruotolo and Howard, 2002). A dislipidemia observada nos indivíduos com DM2 é caracterizada por aumento de triglicérides e redução de HDLc. Contrariamente, os níveis de LDLc não diferem entre os indivíduos com e sem DM2 (Resnick and Howard, 2002). Entretanto, acredita-se que as partículas de LDL de pacientes diabéticos sejam mais aterogênicas devido à alteração na composição, glicação e susceptibilidade à oxidação. Sabe-se, também, que essas partículas de LDL são menores e mais densas (Goldberg, 2001, Resnick and Howard, 2002).

O aumento de triglicérides e, conseqüentemente do VLDL, deve-se, em parte, a deficiência relativa da lipase lipoproteica endotelial, que é uma enzima regulada pela insulina (Goldberg, 2001, Ruotolo and Howard, 2002).

Além da regulação exercida pela insulina, a disfunção endotelial também favorece hipertrigliceridemia, uma vez que a enzima lipase lipoproteica endotelial encontra-se também reduzida nessa situação. Dessa forma, há um favorecimento da formação de placas ateroscleróticas; em linhas gerais é a lesão microvascular favorecendo a progressão da lesão macrovascular (Kashiwazaki et al., 1998, Yudkin, 1999).

Existem várias razões para a redução do HDLc nos indivíduos diabéticos. A hipótese mais difundida se deve a hipertrigliceridemia que faz com que a partícula de HDL substitua o colesterol pelo triglicérides no transporte plasmático. Como o HDL mensurado laboratorialmente é o HDLc, esse é encontrado reduzido. O sedentarismo, a obesidade e o tabagismo também ocasionam redução do HDLc (Goldberg, 2001).

A manutenção dos níveis plasmáticos ideais dos lípides constitui um dos objetivos do tratamento dos indivíduos diabéticos justamente para evitar a progressão das complicações macrovasculares secundárias ao diabetes (Goldberg, 2001).

Os benefícios do tratamento com estatinas (inibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase – HMG-CoA) não estão restritos à redução dos níveis de colesterol. Evidências clínicas e experimentais têm mostrado que as estatinas também atuam sobre o endotélio aumentando a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), estabilizam e reduzem a placa aterosclerótica, regulam a angiogênese, reduzem a resposta inflamatória e apresentam propriedades antitrombóticas (Undas et al., 2005, Ibanez et al., 2007).

Particularmente em pacientes diabéticos com DAC, várias anormalidades nas concentrações e na composição de lipoproteínas já foram descritas na literatura (Roselli della et al., 2003).

Alguns estudos já demonstraram que a lipoproteína (a) [Lp(a)] é um fator de risco independente para a DAC. A Lp(a) consiste de uma partícula de LDL modificada, ligada por uma ponte dissulfeto à apolipoproteína a (apo-a). A Lp(a) é encontrada em placas ateroscleróticas e apresenta propriedades trombogênicas devido a alta homologia estrutural da apo-a com o plasminogênio. Entretanto, o mecanismo pela qual a concentração de Lp(a) aumenta em indivíduos diabéticos permanece obscura (Morishita et al., 1996).

A apolipoproteína A-I (apoA-I) é a principal proteína do HDL, correspondendo a 45% de sua massa molecular. A redução dos níveis de HDLc está diretamente relacionada à redução dos níveis de apoA-I (Frank and Marcel, 2000).

A apolipoproteína B (apoB) é a principal proteína do LDL, IDL, VLDL e quilomícrons. Os níveis de apoB estimam bem o total de massa de partículas aterogênicas. Altos níveis de apoB são comumente encontrados em indivíduos normocolesterolêmicos, sugerindo que nem todos os riscos cardiovasculares relacionados aos lípidos possam ser estimados pela determinação convencional do perfil lipídico (Relimpio et al., 2002). Vários estudos já demonstraram que a produção hepática de apoB está aumentada em pacientes diabéticos (Goldberg, 2001). A apoB está sendo reconhecida como melhor preditor de risco para eventos cardiovasculares do que o LDLc (Walldius and Jungner, 2006).

As apolipoproteínas B e A-I e a relação apoB/apoA-I estão sendo descritas como melhores preditores de eventos cardiovasculares do que o LDLc e permanecem com o poder preditivo mesmo em pacientes que fazem uso de terapia para controle lipídico (Walldius and Jungner, 2004).

Outra vantagem do uso do índice apoB/apoA-I é de carácter metodológico. ApoA-I e apoB são mensuradas diretamente no soro, enquanto que o LDLc, principal marcador utilizado para nortear o tratamento para dislipidemia, é um parâmetro calculado pela dosagem de colesterol total, triglicérides e HDLc usando a fórmula de Friedewald, válida somente para triglicérides abaixo de 400mg/dL. Os níveis de triglicérides sofrem grande influência pelo tempo de jejum realizado antes da coleta de sangue e o coeficiente de variação oscila entre 5 a 10%. Já os erros nas dosagens das apolipoproteínas são inferiores a 5% (Walldius and Jungner, 2006). Pacientes com aumento de triglicérides podem apresentar valores de HDLc mais baixos por deslocamento do colesterol por triglicérides ligado à molécula de HDL.

A apolipoproteína E (apoE) é um componente estrutural do LDL, IDL, VLDL, HDL e quilomícrons. Em humanos, a apoE é uma proteína polimórfica com três isoformas predominantes, E2, E3 e E4. Para a maioria das populações, indivíduos com apoE2 apresentam níveis mais baixos de colesterol quando comparados com os indivíduos que apresentam apoE3, enquanto que indivíduos com apoE4 apresentam níveis aumentados de colesterol, especialmente LDLc (Ou et al.,

1998). Aumento dos níveis de LDLc decorrente da presença de apoE4 está associado ao aumento de DAC (Ou et al., 1998).

Embora alguns estudos já tenham observado que a frequência do polimorfismo para apoE em indivíduos diabéticos (Leiva et al., 2005) é a mesma encontrada na população não-diabética, a presença da isoforma E4 pode ter maior frequência nos indivíduos estratificados segundo a presença de lesão ateromatosa em indivíduos diabéticos, correlacionando positivamente com o agravamento da doença.

2.2.4 Hipertensão arterial

As disfunções do endotélio vascular estão relacionadas à fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes, e têm sido definidas como uma alteração no balanço de fatores relaxantes e contráteis (Ouvina et al., 2001).

Estima-se que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) acometa cerca de 70% dos indivíduos com DM2 (Dodson, 2002) e esses, geralmente, apresentam controle glicêmico ineficaz e dislipidemia. Outra estimativa expressiva é de que mais de 75% das complicações cardiovasculares nos pacientes diabéticos podem ser atribuídas à hipertensão (Sowers et al., 2001).

A hipertensão arterial produz um efeito de estresse por cisalhamento sobre as células endoteliais vasculares e isso pode alterar a produção e/ou liberação de substâncias vasoativas como o óxido nítrico (NO). Citocinas inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) exercem vários efeitos sobre o endotélio e podem levar a um estado pró-trombótico e pró-inflamatório e estimular a produção de NO através da i-NOS - NO sintase induzida (Ouvina et al., 2001).

Um estudo longitudinal de 14 anos observou que a hipertensão é um fator de risco para as complicações micro e macrovasculares. Enquanto a hiperglicemia favorece o aumento da incidência

de complicações microvasculares, a hipercolesterolemia favorece as macrovasculares (Nazimek-Siewniak et al., 2002). Sabe-se também que a redução da pressão sistólica em até 130mmHg para pacientes diabéticos proporciona uma redução das complicações macro e microvasculares (Resnick and Howard, 2002). Para indivíduos com DM2, as recomendações em relação ao controle da pressão arterial são para sejam alcançados os níveis de 130/80mmHg ou menos para a redução da progressão da nefropatia diabética (Chobanian et al., 2003).

Os fatores de risco mais importantes para o AVC em indivíduos diabéticos são, respectivamente, idade superior a 60 anos, sexo masculino e hipertensão (Davis et al., 1999).

A normalização da pressão arterial, a redução da microalbuminúria e a prevenção da nefropatia são os principais objetivos da terapêutica anti-hipertensiva nos indivíduos diabéticos, reduzindo o risco de lesões micro e macrovasculares (Resnick and Howard, 2002).

2.2.5 Microalbuminúria

Nos pacientes com DM1, a microalbuminúria indica aumento da filtração glomerular e da excreção urinária de albumina, fase que precede a nefropatia diabética caracterizada pela insuficiência renal e proteinúria, estando assim associado à microangiopatia. No DM2 há uma forte associação entre microalbuminúria e risco de doença cardiovascular, que é independente dos fatores de risco convencionais como hipertensão e tabagismo, sendo paradoxalmente um preditor de macroangiopatia e de mortalidade cardiovascular em pacientes com DM2 (Fioretto et al., 1998, Sowers et al., 2001, Stehouwer et al., 2002).

Mais de 30% das pessoas quando são diagnosticadas para o diabetes já apresentam albuminúria no exame de urina. Estima-se que cerca de 75% dessas pessoas apresentam microalbuminúria e 25% apresentam nefropatia diabética (Tobe et al., 2002).

Um estudo correlacionando fator von Willebrand solúvel (fvW) e trombosmodulina solúvel (TM) – marcadores de lesão vascular – com albuminúria observou que a albuminúria em indivíduos diabéticos não é somente um indicador de nefropatia (lesão renal), mas sim um indicador de lesão vascular sistêmica (Hirano et al., 2000).

A presença de microalbuminúria pode ser considerada como um preditor do agravamento da nefropatia diabética e um fator de risco independente para a doença cardiovascular (Fioretto et al., 1998, Tobe et al., 2002).

A prevenção da microalbuminúria nos DM1 e DM2 pode ser alcançada através de um bom controle glicêmico e controle da pressão arterial com o uso de medicamentos anti-hipertensivos (Tobe et al., 2002).

2.2.6 Hiperhomocisteinemia

O risco elevado de mortalidade por doença cardiovascular não é totalmente explicado pelos fatores de risco tradicionais como dislipidemia, tabagismo e hipertensão. A hiperhomocisteinemia também é um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento de aterosclerose e trombose (Glueck et al., 1995) e no diabetes pode ser um agravante.

A homocisteína, que é um indutor de lesão endotelial, pode atuar agravando as complicações micro e macrovasculares. Muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar a influência da hiperhomocisteinemia e da presença do polimorfismo no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) na evolução da nefropatia diabética (Neugebauer et al., 1998, Mazza et al., 2000, Noiri et al., 2000).

A MTHFR é uma enzima envolvida na via de transmetilação na qual a homocisteína é convertida à metionina. O polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR leva a uma variante termolábil que predispõe à hiperhomocisteinemia (Neugebauer et al., 1998).

Como muitos nefrologistas suspeitam que alguns pacientes com nefropatia diabética evoluem para hemodiálise mais rapidamente que outros, mesmo estando sob o mesmo controle de pressão arterial e glicemia, tem-se investido em estudos que avaliam a influência da hiperhomocisteinemia sobre a lesão endotelial. Em um estudo retrospectivo, analisando a presença do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR e o tempo transcorrido entre a detecção da proteinúria e o início da hemodiálise, pode ser observada uma correlação significativa entre a presença do polimorfismo e uma progressão mais rápida da lesão renal (Noiri et al., 2000).

A hiperhomocisteinemia também é comumente observada em pacientes sob hemodiálise, e tem sido associada a um aumento da frequência de doença cardiovascular nesses pacientes. A presença do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR proporciona um aumento mais expressivo dos níveis de homocisteína nos indivíduos sob hemodiálise. Aparentemente, a distribuição de frequência do polimorfismo nesses indivíduos é a mesma observada na população em geral (Fodinger et al., 1997).

2.3 DIABETES E ACOMETIMENTO DE CARÓTIDA

A lesão macrovascular no indivíduo diabético ocorre de maneira inespecífica. Sabe-se que há uma inter-relação entre a DAC e a doença arterial carotídea, sendo assim, o exame de Doppler de carótida avalia o risco de AVC e de infarto agudo do miocárdio (IAM) (Graner et al., 2006). O Doppler de carótida é um exame que mostra as artérias carotídeas, bem como o fluxo e a velocidade do sangue no vaso. Trata-se de um exame de ultrassom, uma técnica não-invasiva que permite identificação de placas ateroscleróticas e medida da espessura da parede do vaso (íntima-média).

A medida da espessura da íntima-média da carótida (IMT) está relacionada com a presença de lesão aterosclerótica na perna, na aorta e em outras artérias carotídeas e já está estabelecida como uma medida de aterosclerose generalizada (Dijk et al., 2006).

O aumento da IMT está associado não somente a maioria dos fatores de risco para aterosclerose como hipertensão sistólica, colesterol total e LDLc, tabagismo, PCRus e diabetes, mas também está associado ao risco de ocorrência de eventos cardíacos. Um aumento de 0,19mm no IMT proporciona um aumento no risco de doença coronariana de 69% em mulheres e 36% em homens. Já o risco de AVC é 8,5 maior em mulheres e 3,6 em homens, com IMT maior ou igual a 1mm, comparado com aqueles com IMT menor que 0,6mm (Zielinski et al., 2007).

2.4 HEMOSTASIA

O sistema hemostático atua de forma a manter o sangue no estado líquido e dentro do leito vascular, prevenindo a formação de trombos e/ou eventos hemorrágicos (Lux et al., 2003).

Quando ocorre uma lesão vascular o organismo responde à exposição do subendotélio com formação de um tampão plaquetário, geração do coágulo de fibrina e deposição de leucócitos no local da lesão que iniciam um processo inflamatório. Em seguida tem-se o reparo do local e o restabelecimento da hemostasia (Furie and Furie, 1992).

Para um melhor entendimento do complexo sistema hemostático, uma abordagem dos seus componentes é apresentada a seguir.

2.4.1 Endotélio

O endotélio é constituído por uma camada única de células endoteliais que revestem internamente a superfície dos vasos sanguíneos, estabelecendo uma barreira entre o sangue e o vaso sanguíneo (Sumpio et al., 2002).

O endotélio íntegro contribui para a manutenção da fluidez do sangue por três mecanismos: a) prevenção de agregação plaquetária; b) presença de propriedades anticoagulantes e c) estímulo do sistema fibrinolítico (Quadro 1).

Quadro 1: Propriedades antitrombóticas do endotélio (van, V, 2001)

Prevenção de agregação plaquetária	Propriedades anticoagulantes	Sistema fibrinolítico
Síntese de prostaciclina (PGI ₂) e prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	Ligação da antitrombina ao sulfato de heparan	Síntese e liberação do ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA)
Expressão na superfície de ADPase	Síntese e liberação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI)	Síntese induzida do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) e do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)
Proteoglicanos de superfície (sulfato de heparan)	Síntese e liberação de proteína S (PS)	Expressão de receptores para plasminogênio e u-PA
Síntese de óxido nítrico (NO)	Expressão de trombomodulina Síntese de anexina V	

Na prevenção da agregação plaquetária, a ativação e a adesão plaquetária são limitadas pela prostaciclina (PGI₂) e pela prostaglandina E₂ (PGE₂) que são liberadas pelo endotélio íntegro depois da estimulação por agentes vasoativos e trombina. O efeito da prostaciclina é ampliado pelo óxido nítrico (NO) que também é um vasodilatador. Além disso, a superfície endotelial expressa ectonucleotidases (como a ADPase) que convertem o ADP, um estimulante das plaquetas, em adenosina. As cargas negativas dos proteoglicanos, especialmente o sulfato de heparan, repelem as plaquetas da superfície endotelial e previnem a adesão plaquetária. O NO, PGI₂, PGE₂ e adenosina também induzem vasodilatação, fato que dificulta também a formação de trombos (van, V, 2001).

O endotélio fornece condições que contribuem para a eficácia da anticoagulação natural. O sulfato de heparan, presente na superfície endotelial, catalisa a ligação trombina-antitrombina formando o complexo trombina-antitrombina (TAT). Da mesma forma, a trombomodulina catalisa a ativação da proteína C (PC) pela trombina à proteína C ativada (PCa), que inativa os co-fatores Va e VIIIa. O endotélio também sintetiza o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) que inativa os fatores VIIa e Xa, inibindo a via extrínseca da coagulação. As células endoteliais produzem ainda a proteína S (PS), co-fator da PCa. *In vitro* as células endoteliais sintetizam anexina V, substância que cobre os fosfolípides de carga negativa necessários na ativação da cascata da coagulação (van, V, 2001, Sumpio et al., 2002).

Após a formação do coágulo de fibrina, o endotélio fornece componentes regulatórios da fibrinólise para manter a fluidez do sangue. O endotélio sintetiza o ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) que catalisa a conversão do plasminogênio em plasmina e também regula esse processo com a síntese do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1). O endotélio também expressa sobre a superfície receptores para o plasminogênio e o u-PA – ativador do plasminogênio tipo uroquinase (van, V, 2001).

Alterações na síntese de NO podem favorecer um estado pró-trombótico e contribuir para aumento da adesão plaquetária, aterosclerose, entre outros eventos. Já o aumento da produção de

NO pela NO sintase induzida (i-NOS) é indicativo de estado inflamatório, que também contribui para os eventos anteriormente citados (Ouvina et al., 2001).

O processo inflamatório é reconhecido como um fator crítico para o desenvolvimento de processos aterotrombóticos, e a medida da proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) tem mostrado ser um preditor de risco cardiovascular e um alvo de intervenção terapêutica (Ridker, 2004).

Uma maneira para avaliar a integridade vascular é através da determinação de trombomodulina plasmática (TM), uma vez que a TM é essencialmente uma proteína de membrana (Aso et al., 2000). Dessa forma, níveis plasmáticos aumentados de TM podem implicar em evidência laboratorial de lesão endotelial e, indiretamente, redução da eficácia do sistema da anticoagulação via PC (Weiler and Isermann, 2003).

Particularmente nos pacientes com DM2, o aumento dos níveis de TM parece estar associado a uma lesão vascular difusa e não tecido-específica (Hirano et al., 2000).

Outro marcador de lesão endotelial é o fator von Willebrand (fvW). Em algumas condições como hipertensão e hiperinsulinemia encontra-se níveis aumentados de fvW, e pacientes com doença coronariana submetidos a tratamento para redução da hipercolesterolemia apresentam redução dos níveis de fvW (Blann and Lip, 1998).

A maior parte do fvW é sintetizada pelas células endoteliais, sendo que os dímeros são secretados para o plasma e para o subendotélio, enquanto que os multímeros são armazenados nos corpos de Weibel-Palade, dentro da célula endotelial (Sumpio et al., 2002). Por isso, quando há lesão endotelial, o aumento dos níveis de fvW é marcante e expressa um possível estado de hipercoagulabilidade.

A contribuição do fvW para a formação de um trombo é direta pelo fato de mediar a adesão das plaquetas aos componentes do subendotélio e indireta pela associação ao fator VIII prevenindo o *clearance* do fator VIII do plasma, permitindo a geração de trombina (Ruggeri, 2003).

2.4.2 Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos e não possuem núcleo. Apresentam forma discóide, diâmetro médio de 2 a 3µm e vida média de 6 a 10 dias. Apesar da aparência morfológica simples na microscopia ótica, as plaquetas possuem uma estrutura funcional complexa, permitindo um rápido reconhecimento da lesão vascular, a fim de dar início à formação do tampão plaquetário (Steen and Holmsen, 1987, Kottke-Marchant and Corcoran, 2002).

As plaquetas apresentam grânulos denominados densos e alfa. Os principais constituintes dos grânulos densos são: adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e íons cálcio. Os grânulos alfa possuem diversos tipos de proteínas normalmente encontradas no plasma e, especificamente, apresentam o fator 4 plaquetário (PF4) e a beta-tromboglobulina (β-TG). A determinação dos níveis plasmáticos dessas duas últimas substâncias tem sido utilizada como marcador de ativação das plaquetas (Lux et al., 2003).

A dinâmica da formação do tampão plaquetário envolve diferentes etapas que incluem adesão, mudança de forma, agregação e secreção de grânulos das plaquetas. O objetivo da formação do tampão plaquetário através da interação das plaquetas com o subendotélio frente a uma lesão endotelial é de isolar o local da lesão. Esse processo é mediado pela glicoproteína Ib (GPIb) da plaqueta e o fator von Willebrand (fvW) presente junto ao colágeno subendotelial (Steen and Holmsen, 1987, Kottke-Marchant and Corcoran, 2002).

A PGI₂ sintetizada pelo endotélio íntegro limita a expansão do tampão, evitando a oclusão da luz do vaso (Lux et al., 2003).

Após a adesão das plaquetas ao subendotélio, ocorre uma mudança de forma das plaquetas e exposição de fosfolípidos de carga negativa e receptores até então internalizados. A liberação de ADP dos grânulos densos junto com a mobilização de cálcio resulta em mudanças conformacionais na plaqueta que expõe a glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) permitindo a interação plaqueta-plaqueta, por intermédio de moléculas de fibrinogênio. Esse processo inicia a agregação plaquetária. A

secreção dos grânulos sinaliza o recrutamento de outras plaquetas para a parede do vaso e formação do tampão plaquetário (Kottke-Marchant and Corcoran, 2002).

A avaliação da expressão de GPIIb/IIIa na superfície de plaquetas é uma forma de mensurar a ativação de plaquetas (Kuhne et al., 1995).

Estudos recentes mostraram que um polimorfismo na GPIIIa (P1^{A2}), quando em homozigose, está associada com um risco três vezes maior de doença cardiovascular isquêmica e de quatro vezes maior de infarto do miocárdio. A influência funcional do polimorfismo sobre a reatividade da plaqueta permanece sem explicação (Pamukcu et al., 2005).

2.4.3 Cascata da coagulação

A coesão presente no tampão plaquetário é insuficiente para interromper o sangramento de vasos de grande calibre ou resistir à pressão intravascular presente no sistema arterial. Nessas circunstâncias, faz-se necessário a formação de um coágulo de fibrina, que tem o tampão plaquetário como suporte (Lux et al., 2003).

Em condições normais, as proteínas e os componentes celulares envolvidos na coagulação sangüínea estão presentes no sangue nas formas inativas. Quando ativados, ocorre uma seqüência de reações que, através da geração de proteases, culmina na conversão de fibrinogênio em fibrina (Furie and Furie, 1992).

O mecanismo pelo qual a coagulação é iniciada *in vivo*, em resposta a um trauma, acontece através da exposição de fator tecidual (FT) que é uma proteína de membrana presente em abundância nas células ao redor do leito vascular. O fator VII, na forma ativa ou de zimógeno, se liga ao FT e forma um complexo (FT-FVIIa), esse complexo enzimático ativa os fatores IX e X (Rau et al., 2007). Processos inflamatórios induzem a expressão de FT de monócitos/macrófagos,

proporcionando também ativação da coagulação (Esmon, 2003). Essa via é tradicionalmente referida como via extrínseca (Dahlback, 2005).

Sabe-se que os termos vias extrínseca e intrínseca não se aplicam ao funcionamento do mecanismo de coagulação no organismo, entretanto, essa divisão permanece para a compreensão da formação do coágulo *in vitro*, para a avaliação laboratorial da anticoagulação e diagnóstico de distúrbios hemorrágicos (Furie and Furie, 1992, Dahlback, 2005).

O mecanismo alternativo pelo qual a coagulação pode ser iniciada *in vitro* é a via intrínseca. Essa envolve o fator XII, cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e a pré-caliceína. A ativação se inicia com a união do fator XII às superfícies com carga negativa. Há uma mudança conformacional do fator XII que se torna ativado. O fator XIIa converte a pré-caliceína em caliceína, e a caliceína também ativa mais fator XII. O complexo trimolecular (XIIa, caliceína e HMWK) é responsável pela clivagem do fator XI em XIa. O fator XIa atua sobre o fator IX formando IXa (Dahlback, 2000, Dahlback, 2005). Essa via é chamada via intrínseca, e a importância fisiológica dessa via ainda não está completamente compreendida. A deficiência de fator XII prolonga o exame de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), mas não está associada a distúrbios hemorrágicos (Dahlback, 2005). *In vivo*, especula-se que o fator IX seja ativado pela trombina. O fator IXa forma um complexo enzimático com fosfolípidos de membranas, íons cálcio e o co-fator VIIIa. Esse complexo, denominado tenase ativa o fator X em Xa.

A via comum inicia com a ativação do fator X, que pode ocorrer tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca. O fator Xa forma um complexo enzimático denominado protrombinase com fosfolípidos de membranas, íons cálcio e o co-fator Va, cujo complexo cliva o fator II (protrombina) em IIa (trombina) (Furie and Furie, 1992).

Durante o processo no qual a protrombina é convertida em trombina, há a liberação de um fragmento denominado fragmento 1+2 da protrombina (F1+2). Esse fragmento é um marcador de geração de trombina, e tem sido utilizado para avaliar situações onde há suspeita de estados de hipercoagulabilidade (Furie and Furie, 1992, Dahlback, 2000, Mascia et al., 2000).

A trombina é a enzima chave da coagulação, pois é responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, pela ativação de plaquetas, pela ativação do fator XIII que estabiliza o coágulo de fibrina, dentre outras ações (Dahlback, 2000). A Figura 1 representa esquematicamente a ativação da cascata da coagulação.

Além da atuação no processo hemostático, a trombina regula muitos processos inflamatórios incluindo expressão de moléculas de adesão de leucócitos sobre o endotélio, ativação plaquetária, síntese endotelial de fatores pró-trombóticos. A trombina é também um potente fator de crescimento que estimula a proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (Rau et al., 2007).

A molécula de fibrinogênio apresenta dois domínios D e um domínio E central em sua estrutura. A trombina converte o fibrinogênio em monômero de fibrina promovendo a retirada de dois fragmentos, denominados fibrinopeptídeos A e B. A presença desses peptídeos no plasma também é utilizada como marcador de ativação da cascata da coagulação (Dahlback, 2000, Mosesson, 2005). Os monômeros de fibrina se organizam formando uma rede de fibrina frágil que em seguida é estabilizada pelo fator XIIIa, através da formação de ligações covalentes entre os domínios D cruzados. Após a fibrina cumprir o seu papel ocorre a degradação do polímero pela plasmina (sistema fibrinolítico) levando à formação do dímero D (Mosesson, 2005) – Figura 2.

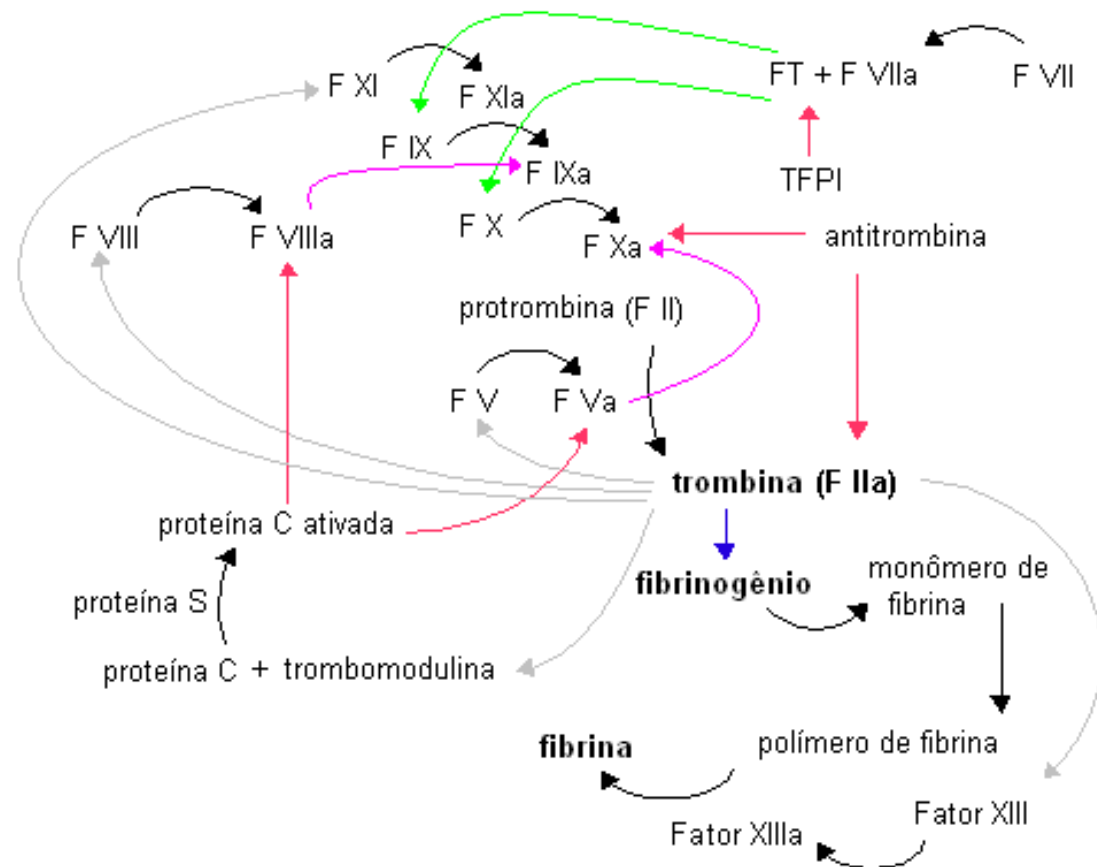


Figura 1 – Representação esquemática da ativação dos fatores da coagulação para formação da fibrina e da regulação promovida pelos anticoagulantes naturais. FT (fator tecidual), TFPI (inibidor da via do fator tecidual).

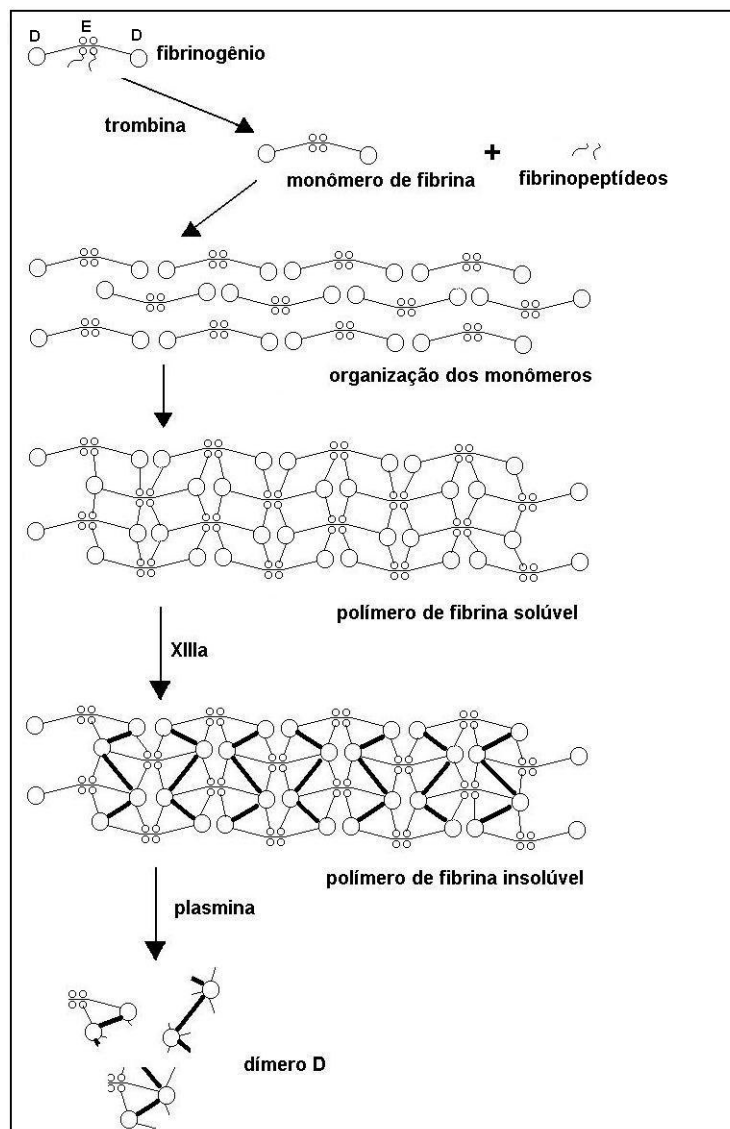


Figura 2 - Representação esquemática da formação da rede de fibrina a partir do fibrinogênio e da geração do fragmento dímero D, após ação da plasmina.

2.4.4 Anticoagulação natural

A coagulação sanguínea é potencialmente perigosa e um ponto importante é a regulação desse processo para que não se torne generalizada. Alguns desses mecanismos regulatórios já foram

identificados e são denominados anticoagulantes naturais. Existem dois grandes grupos: 1) inibidores de serinoproteases (antitrombina, co-fator II da heparina, inibidor da via do fator tecidual) e 2) inibidores de co-fatores ativados (PC e PS). Esses mecanismos permitem que a formação de fibrina se limite à área onde há lesão endotelial (Dahlback, 2005).

A antitrombina (AT) é um inibidor de serinoproteases. A principal enzima inibida pela AT é a trombina e as demais serinoproteases inibidas são Xa, IXa, XIa e XIIa. A molécula de heparina e outros heparonóides, como o sulfato de heparan presente na superfície da célula endotelial íntegra, catalisam a reação de inibição em mais de 17.000 vezes (Figura 3). Dessa forma, a AT limita a atividade enzimática pró-coagulante excessiva ou indesejável (Quinsey et al., 2004).

A determinação plasmática do complexo trombina-antitrombina (TAT) é utilizada como um parâmetro quantitativo da geração de trombina, enzima chave no processo de formação de fibrina (Lux et al., 2003, Rau et al., 2007).

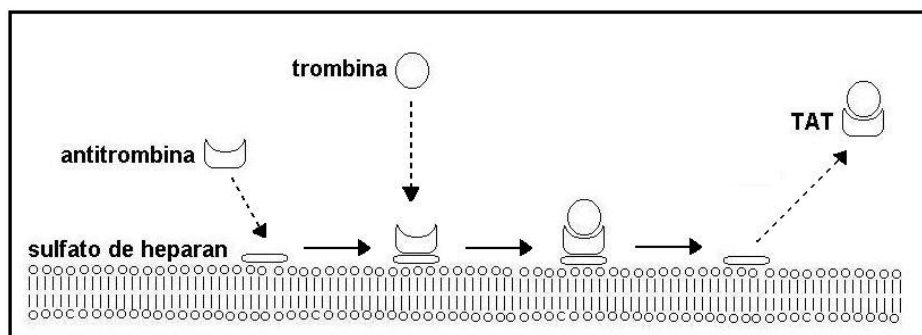


Figura 3 – Representação esquemática da inativação da trombina pela antitrombina, catalisada pelo sulfato de heparan, gerando o complexo TAT (TAT: complexo trombina-antitrombina).

O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) apresenta dois domínios, um que inibe o complexo VIIa/FT e um segundo que inibe o fator Xa. Devido a essa sua característica o TFPI é conhecido como o inibidor da via extrínseca da coagulação (Lux et al., 2003, Dahlback, 2005). A deficiência de TFPI é incompatível com a vida (Dahlback, 2005).

Desde a década de 80, a via anticoagulante da PC destacou-se como uma importante via regulatória do processo de coagulação. Essa via anticoagulante inicia quando a trombina se liga à trombomodulina (TM) presente na superfície da célula endotelial. O complexo ativa a PC quando essa se encontra ligada ao receptor endotelial de proteína C (EPCR). Quando a PC ativada (PCa) dissocia do EPCR, ocorre a interação da PCa com o co-fator PS, e esse complexo enzimático catalisa a inativação dos co-fatores Va e VIIIa – Figura 4 (Esmon, 2000).

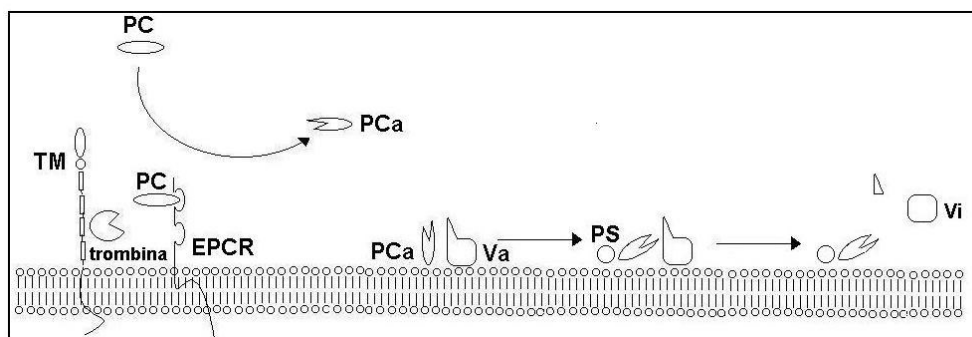


Figura 4 – Representação esquemática da ativação da PC em PCa e da inativação do fator Va pela PCa e o seu co-fator PS (PC: proteína C; PCa: proteína C ativada; TM: trombomodulina; EPCR: receptor endotelial para proteína C; Va: fator V ativado; PS: proteína S; Vi: fator V inativo).

As proteínas C e S, bem como os fatores II, VII, IX e X, constituem as chamadas proteínas dependentes da vitamina K. Essas proteínas após serem sintetizadas no fígado sofrem um processo de gama-carboxilação que confere à molécula uma carga negativa que possibilita a ligação ao íon cálcio. A vitamina K é um co-fator nesta reação (Furie and Furie, 1992, Dahlback, 2000).

A atividade proteolítica da PCa é regulada predominantemente pelo inibidor da PCa (PCI). Adicionalmente, o PAI-1 e o inibidor da alfa1-protease também são capazes de inibir a PCa, embora no presente momento, o papel desses inibidores não estão completamente compreendidos na hemostasia (Rau et al., 2007).

2.4.5 Fibrinólise

Após a reconstituição do endotélio, o coágulo de fibrina é degradado pela ação do sistema fibrinolítico. O plasminogênio é convertido à plasmina e essa atua sobre a fibrina levando à formação dos produtos de degradação da fibrina (PDF) e, em último estágio, o dímero D (D-Di). O sistema fibrinolítico também é regulado por ativadores e inibidores (Lux et al., 2003).

Dois ativadores fisiológicos promovem a ativação do plasminogênio: o ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). O fator XIIa, HMWK e pré-caliceína também são capazes de ativar o plasminogênio (Lijnen and Collen, 1995).

O sistema fibrinolítico pode ser inibido em dois alvos distintos. O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) inibe os ativadores do plasminogênio (t-PA e u-PA), reduzindo a geração de plasmina. Já outros inibidores atuam diretamente sobre a plasmina, inibindo a sua ação catalítica, como a alfa2-antiplasmina (Rijken, 1995).

A determinação dos níveis plasmáticos de D-Di avalia a função do sistema fibrinolítico. Níveis aumentados indicam uma exarcebação da formação de fibrina caracterizando um quadro de hipercoagulabilidade (Matsuo et al., 2000).

O sistema fibrinolítico pode ficar comprometido em situações nas quais observa-se presença de níveis aumentados de PAI-1. Tal condição favorece a permanência do coágulo de fibrina e conseqüentemente o desenvolvimento de trombos (Lux et al., 2003) – Figura 5.

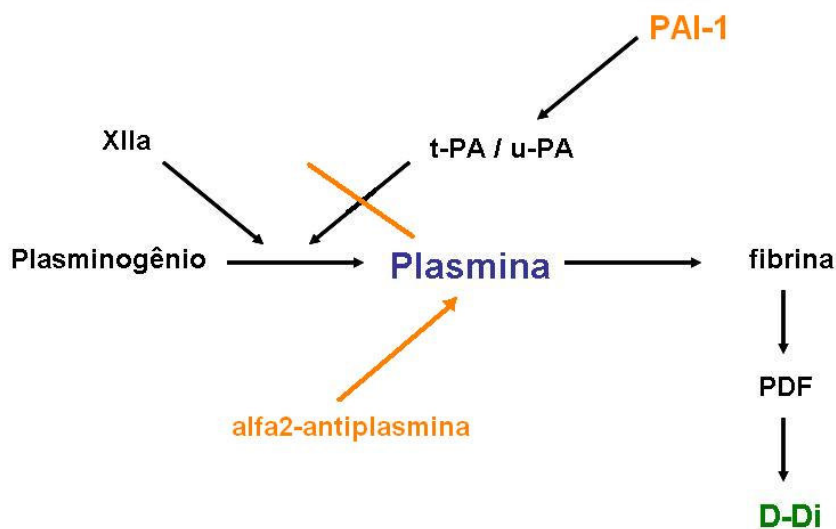


Figura 5 – Representação esquemática do sistema fibrinolítico, seus ativadores (XIIa, t-PA e u-PA), inibidores (PAI-1 e alfa2-antiplasmina) e produtos de degradação (PDF e D-Di).

A hiperglicemia atua sobre o sistema fibrinolítico estimulando a produção de PAI-1, contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade no DM (Du et al., 2000).

Alguns estudos mostram que níveis elevados de PAI-1 são também um fator de risco independente para o desenvolvimento do DM2 em indivíduos saudáveis, isto é, o aumento de PAI-1 precede o desenvolvimento do DM2 (Grant, 2007).

O PAI-1 é sintetizado por várias fontes como as células endoteliais, tecido adiposo e hepático. Grandes quantidades de PAI-1 são armazenadas nas plaquetas e proporcionam a formação de coágulos ricos em plaquetas resistentes à fibrinólise. Várias citocinas inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) estimulam a síntese endotelial de PAI-1, bem como fatores de crescimento e hormônios (estrógeno, trombina e insulina) (Vaughan, 2005).

2.5 DIABETES E ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS

Em geral, pacientes com diabetes apresentam um quadro de hipercoagulabilidade e hipofibrinólise. Entretanto, correlações entre as complicações vasculares no diabetes e o grau de anormalidade do sistema hemostático ainda não foram claramente estabelecidas (Yamada et al., 2000).

Cerca de 80% dos indivíduos diabéticos morrem em decorrência de eventos trombóticos e 75% dessas mortes resultam de eventos cardiovasculares (Carr, 2001).

Devido a essa condição clínica, o diabetes representa um importante fator de risco para trombose arterial, caracterizando-se por um estado de hipercoagulabilidade. Marcadores de hipercoagulabilidade tais como fibrinopeptídeo A (FPA), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), complexo trombina-antitrombina (TAT), fibrinogênio, fator tecidual (FT), fator von Willebrand solúvel (fvW), trombomodulina solúvel (TM), dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), entre outros, podem se encontrar elevados, fato que evidencia uma hiperativação do sistema hemostático indicando um favorecimento à formação de fibrina (Aso et al., 2000, Hirano et al., 2000, Meigs et al., 2000, Yamada et al., 2000, Carr, 2001).

Indivíduos diabéticos com diferentes graus de complicações vasculares e com controle glicêmico similar apresentam alterações em alguns marcadores de hipercoagulabilidade como D-Di, F1+2 e TAT (Yamada et al., 2000). Como a etiologia da complicação vascular no diabético é multifatorial, não se sabe se o estado de hipercoagulabilidade é causa ou consequência da lesão vascular.

Pacientes diabéticos com risco cardiovascular apresentam vários aspectos de distúrbios do sistema hemostático em comum, tais como (Juhan-Vague et al., 1996):

- hiperatividade das plaquetas e aumento da concentração plasmática de fvW, que promove adesão plaquetária;

- aumento da formação de trombina;
- altos níveis de fibrinogênio, que promovem agregação plaquetária e induzem mudanças reológicas e formação do coágulo de fibrina;
- redução da atividade fibrinolítica e aumento dos níveis de PAI-1 que levam à redução da remoção dos depósitos de fibrina.

Embora a hiperglicemia, a dislipidemia e a hipertensão possam independentemente causar lesão vascular, a disfunção endotelial pode ser intrínseca ao DM2. Esse quadro pode conduzir a um estado ativado caracterizado em parte pela adesão plaquetária e aumento de agregação (Ouvina et al., 2001). Em adição, o efeito osmótico da glicose consiste de um mecanismo pelo qual a hiperglicemia aumenta a propensão das plaquetas a agregarem e degranularem (Keating et al., 2003).

Não está claro se as plaquetas interagem mais intensamente com os vasos lesados de indivíduos diabéticos, porém, esse fato pode contribuir para uma maior propensão de eventos trombóticos arteriais. Muitos estudos avaliando a função plaquetária *in vitro* de indivíduos diabéticos encontraram aumento da reatividade, aumento do número de moléculas das glicoproteínas Ib e IIbIIIa e redução da fluidez das membranas correlacionada à glicação das proteínas da membrana das plaquetas (Winocour, 1994).

A utilização profilática de antiagregantes plaquetários vem sendo discutida e muitas vezes justificada em alguns pacientes, tendo em vista que o diabetes raramente acontece como fator de risco isolado para a trombose. Entre os fatores de risco comumente associados com o diabetes, podem ser destacados: obesidade, tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemia, idade avançada, infecções de repetição, imobilizações, tumores malignos, mulheres no climatério ou em uso de contraceptivos orais, entre outros (Cheng, 2005).

Pacientes com diabetes sem um evento prévio de infarto possuem risco de doença cardiovascular similar aos indivíduos não-diabéticos com história prévia de infarto. O tratamento de

indivíduos de alto-risco reduz o risco de doenças cardiovasculares e os benefícios são similares em pacientes com e sem diabetes (Mykkanen, 2000).

Outro efeito direto da hiperglicemia no sistema hemostático é sobre o fibrinogênio. A glicação do fibrinogênio leva à formação de um coágulo mais denso, com fibras mais finas e resistentes à fibrinólise – Figura 6. A fibrina glicada liga menos ao t-PA e ao plasminogênio, gera menos plasmina e aumenta a ligação da antiplasmina (Grant, 2007).

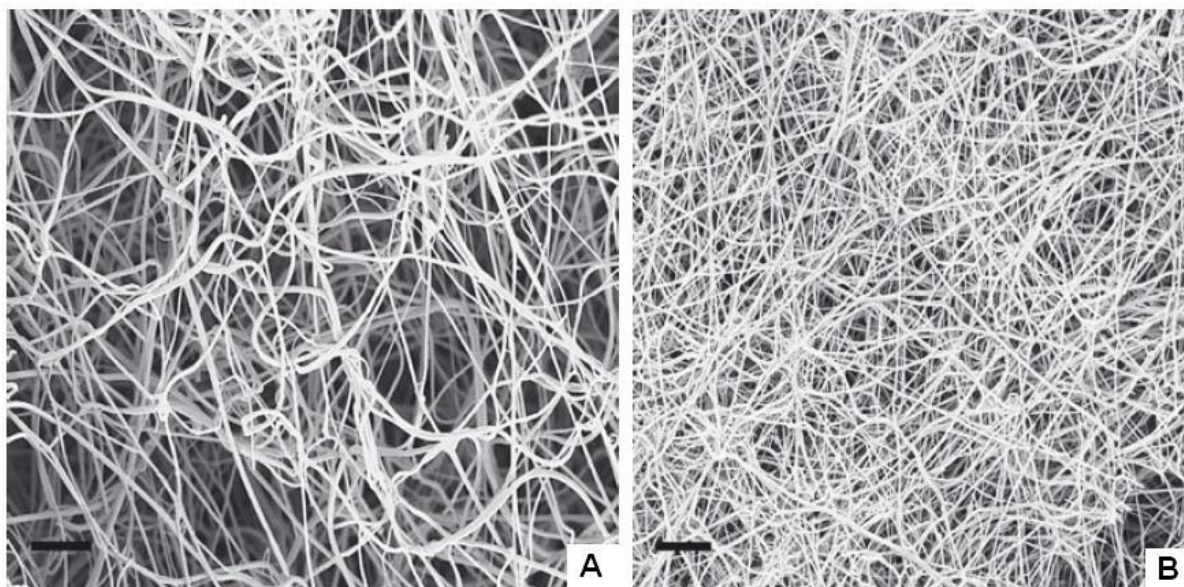


Figura 6 – Fotos de microscopia eletrônica de varredura. A) Estrutura da fibrina formada com fibrinogênio purificado de indivíduos controle. B) Estrutura da fibrina formada com fibrinogênio de indivíduos diabéticos com controle glicêmico inadequado - o fibrinogênio glicado forma coágulos com fibras mais finas, densas e resistentes à fibrinólise (Grant, 2007).

O mecanismo relacionado ao aumento de fator VIII/fvW nos indivíduos com resistência à insulina e DM2 pode estar relacionado à presença de disfunção endotelial e/ou processo inflamatório (Grant, 2007).

Indivíduos saudáveis com síndrome metabólica e pacientes com DM2 apresentam valores aumentados de fator VII. Esse aumento de fator VII está relacionado à dislipidemia presente nas

duas condições. Há uma correlação positiva entre fator VII e triglicérides e uma das hipóteses é de que parte do fator VII circula no plasma ligado às partículas de VLDL, ricas em triglicérides o que prolonga a meia-vida plasmática do fator VII (Grant, 2007).

Níveis aumentados de PAI-1 estão associados aos componentes da síndrome de resistência à insulina, tais como IMC aumentado, hipertensão, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia em indivíduos saudáveis com resistência à insulina, em pacientes com DM2 e em pacientes com doença cardiovascular. O aumento de PAI-1 é um fator de risco independente para o desenvolvimento de DM2 em indivíduos saudáveis. Estudos intervencionais mostraram que a perda de peso, exercícios físicos e o uso de metformina ocasionam redução dos níveis de PAI-1 (Grant, 2007).

A observação de que níveis aumentados de PAI-1 precedem o desenvolvimento do DM2 (presença de resistência à insulina e ausência de hiperglicemia) fornecem evidências de que anormalidades do sistema fibrinolítico ocorrem antes do estabelecimento do DM2 (Grant, 2007).

Atualmente, muito já se conhece sobre as associações entre diabetes e marcadores hemostáticos, entretanto, pelo fato do diabetes ser uma doença multifatorial pode-se observar algumas discrepâncias entre os estudos, tornando-se necessário estudos mais delimitados para a elucidação do processo e esclarecimento dos interferentes envolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os perfis bioquímico, hemostático e genético de mulheres diabéticas, porém em equilíbrio metabólico, com e sem acometimento macrovascular, avaliado pelo Doppler de carótida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Investigar se há associação entre alterações no perfil lipídico, PCRus e homocisteína e os diferentes graus de lesão macrovascular, identificados pelo resultado do Doppler de carótida, em mulheres com DM2.

➤ Investigar se há associação entre alterações no perfil hemostático e os diferentes graus de lesão macrovascular, identificados pelo resultado do Doppler de carótida, em mulheres com DM2.

➤ Investigar se há associação entre a presença do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR e os diferentes graus de lesão macrovascular, identificados pelo resultado do Doppler de carótida, em mulheres com DM2.

➤ Investigar se há associação entre a presença do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR e os níveis plasmáticos de homocisteína.

➤ Investigar a presença do polimorfismo PI^{A2} no gene da GPIIIa nos diferentes graus de lesão macrovascular, identificados pelo resultado do Doppler de carótida, em mulheres com DM2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP (Anexo 1) e do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (Anexo 2), como parte integrante de um projeto maior intitulado “Avaliação de parâmetros hemostáticos em pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2”. Todas participantes receberam esclarecimento sobre os objetivos do projeto, responderam à ficha clínica e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Um total de 74 pacientes diabéticas foram selecionadas no ambulatório de Endocrinologia da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte por equipe médica especializada.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Critérios de inclusão

- Ser do sexo feminino.
- Faixa etária entre 40 e 75 anos.
- Diagnóstico clínico de DM2, segundo os critérios da OMS (1999), que incluem glicemia de jejum igual ou superior a 126mg/dL, ou uso de medicamentos anti-diabéticos.
- Controle glicêmico com hemoglobina glicada inferior a 9,0% (método HPLC).
- Concentração plasmática de triglicérides inferior a 400mg/dL.
- Exame de Doppler de carótida para identificação do grau de lesão macrovascular.

Critérios de exclusão

- Doença renal crônica - concentração de creatinina sérica igual ou superior a 2,0mg/dL (Hirano et al., 2000), proteinúria (microalbuminúria acima de 300mg/g de creatinina) ou *clearance* de creatinina inferior à 70%.
- Tratamento de reposição hormonal.
- Bacteriúria e hematúria.
- Tabagismo.
- Função hepática alterada com fosfatase alcalina (FAL) superior a duas vezes o limite superior de referência (Dufour et al., 2000).
- História clínica de tumor maligno, doença infecciosa aguda, trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, infarto agudo do miocárdio, desequilíbrio metabólico, ou uso de medicamento com efeito sobre a função hemostática.

4.2 CASUÍSTICA

O cálculo do tamanho da amostra para este estudo utilizou como referência o estudo “Importance of hypercoagulability over hyperglycemia for vascular complications in type 2 diabetes”(Yamada et al., 2000) e como desfecho primário o marcador F1+2 do grupo de pacientes diabéticos com complicações macrovasculares.

A seguinte fórmula foi adotada:

$$\bar{X} = t \cdot s / \sqrt{n} \quad \text{e} \quad \bar{X} = \Delta$$

Onde $\bar{X} = 1,69\text{nmol/L}$; $s = 0,59$; $t = 2$; e $\Delta = 10\%$ da média

O cálculo do “n” foi de 48 utilizando ambos os sexos no estudo.

Como o presente grupo se propôs a estudar somente um sexo (mulheres) e com estratificação da lesão macrovascular (espessamento de íntima e placa), adotamos o “n” de 25 para cada subgrupo como meta a ser alcançada.

Na análise *post hoc* dos dados obtidos, tendo o fator VIII como desfecho primário, a composição dos subgrupos foi validada com $\alpha < 0,05$ e $\beta = 0,91$.

Do total das 74 pacientes selecionadas, posteriormente foram excluídas 10 pacientes devido a informações adicionais não concordantes com a consulta clínica e resultados laboratoriais anormais que poderiam atuar como co-variáveis na análise dos resultados (Tabela 1)

Tabela 1 – Pacientes excluídas e os critérios adotados

Crítérios	n
Trombose venosa profunda	2
Hiperprolactinemia	1
Aumento inespecífico de dímero D	1
Tabagismo	2
Recusa em realizar o exame de Doppler	1
DM secundário ao uso de medicamentos	2
Infarto agudo do miocárdio	1
Total	10

As 64 pacientes que efetivamente participaram deste estudo apresentavam as seguintes características:

Tabela 2 – Caracterização do grupo de estudo

Pacientes com DM2	
n	64
Idade (anos)	57,6 ± 8,5
IMC (kg/m ²)	28,3 ± 5,1
Tempo de DM2 (anos)	5,0 (2,0 – 12,5)
Hipertensão (n, %)	51 (79,7)
CRE (mg/dL)	0,89 ± 0,22

Caracterização quanto ao tamanho (n), idade, índice de massa corporal (IMC), tempo de diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão e creatinina (CRE), sendo os valores expressos como frequência absoluta, frequência relativa, média e desvio padrão, mediana e interquartil, quando apropriado.

Como previamente delineado para o trabalho, as pacientes diabéticas foram classificadas de acordo com o resultado do Doppler de carótida (item 4.5.1), e compuseram os seguintes grupos:

1) Mulheres com DM2 sem alteração carotídea (Sem alteração)

Grupo constituído de 25 mulheres com diagnóstico prévio de DM2, sem alteração macrovascular na carótida que não apresentaram, no momento da coleta, outras manifestações clínicas e laboratoriais.

2) Mulheres com DM2 e espessamento de íntima média (Espessamento)

Grupo constituído de 15 mulheres com diagnóstico prévio de DM2, com espessamento de íntima média e ausência de placa aterosclerótica (confirmado por Doppler de carótida).

3) Mulheres com DM2 e placa aterosclerótica (Placa)

Grupo constituído de 24 mulheres com diagnóstico prévio de DM2 e com presença de placa aterosclerótica (confirmado por Doppler de carótida).

Tabela 3 – Caracterização dos subgrupos de acordo com o resultado do Doppler de carótida

	DM2		
	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	25	15	24
Idade (anos)	55,2 ± 7,8	56,9 ± 9,0	60,5 ± 8,4
IMC (kg/m ²)	28,6 ± 4,9	27,4 ± 4,0	28,4 ± 6,0
Tempo de DM2 (anos)	3,0 (0,9 – 9,3)	3,0 (1,6 – 9,5)	11,0 (4,5 – 19,5) * **
Hipertensão (n, %)	18 (72,0)	11 (73,3)	22 (91,7)
CRE (mg/dL)	0,90 ± 0,15	0,84 ± 0,19	0,90 ± 0,29

Caracterização quanto ao n (tamanho), idade, IMC (índice de massa corporal), tempo de diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão e creatinina (CRE), sendo os valores expressos como frequência absoluta, frequência relativa, média e desvio padrão, mediana e interquartil, quando apropriado. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Sem alteração e ** vs Espessamento).

Como descrito anteriormente, este estudo faz parte de um projeto maior. Em um outro momento, foi composto um grupo-controle de mulheres não diabéticas com faixa etária semelhante e que não faziam uso de qualquer medicamento na ocasião da avaliação. Apesar do presente estudo não ter sido delineado para um estudo de caso-controle, em alguns momentos, o grupo-controle foi utilizado para comparações.

Tabela 4 – Caracterização do grupo-controle

Grupo-controle	
n	12
Idade (anos)	51,9 ± 4,3
IMC (kg/m ²)	25,0 ± 3,3
Hipertensão (n, %)	0 (0)
CRE (mg/dL)	0,95 ± 0,25

Caracterização quanto ao n (tamanho), idade, IMC (índice de massa corporal), hipertensão e creatinina (CRE), sendo os valores expressos como média e desvio padrão, quando apropriado.

4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue venoso foram obtidas entre 8:00 e 10:00h da manhã, após jejum de 12 a 14 horas. A coleta de sangue foi realizada utilizando tubos do sistema Vacuette® (Geiner Bio-One) sendo 5mL em tubo sem anticoagulante (para as dosagens bioquímicas), 5mL em tubo com EDTA (para extração do DNA) e 4,5mL em tubo com citrato de sódio 3,2% (para as dosagens dos marcadores hemostáticos).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos. O soro e o plasma citratado foram aliquotados, identificados e estocados a -70°C até o momento da realização dos testes.

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento deste estudo foi observacional, analítico e transversal.

As frequências dos principais medicamentos utilizados pelas pacientes foram avaliadas, bem como a influência do uso e não uso sobre os marcadores laboratoriais.

Os parâmetros laboratoriais avaliados neste estudo foram:

Parâmetros bioquímicos

- a) Glicemia de jejum (GLI) e glicemia pós-prandial (GLI PP)
- b) Hemoglobina glicada (HbA1c)
- c) Colesterol total (CT)
- d) Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade (HDLc)
- e) Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDLc)
- f) Triglicérides (TG)
- g) Apolipoproteína A-I (apoA-I)
- h) Apolipoproteína B (apoB)
- i) Lipoproteína (a) [Lp(a)]
- j) Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus)
- k) Homocisteína total (Hcys)
- l) Creatinina (CRE)

Parâmetros hemostáticos

- a) Fator von Willebrand (fvW)
- b) Trombomodulina (TM)
- c) Fragmento 1+2 do protrombina (F1+2)
- d) Dímero D (D-Di)
- e) Inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)
- f) Fator VII (VII)
- g) Fator VIII (VIII)

- h) Fibrinogênio (FIB)
- i) Proteína C (PC)
- j) Antitrombina (AT)

Análises genéticas

- a) Polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR
- b) Polimorfismo da glicoproteína plaquetária GPIIIa

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Doppler de carótida

O Doppler de carótida consiste de uma técnica não-invasiva que avalia o sistema arterial carotídeo (carótida externa, interna e comum) através de imagens de ultra-som. A avaliação da estrutura, do fluxo sanguíneo, bem como da velocidade do sangue no vaso permitem a identificação da espessura da parede do vaso e a presença de placas ateroscleróticas.

As imagens de ultra-sonografia (US) B-modal das carótidas foram realizadas utilizando um aparelho eco-color Doppler de alta resolução com transdutor linear de 7,5MHz. Todos os exames e as análises das imagens foram realizados por dois examinadores, concordantes quanto à definição dos achados ultra-sonográficos, e que desconheciam os achados clínicos das pacientes.

Resumidamente, as imagens das artérias carotídeas direita e esquerda foram avaliadas para a medida da espessura da íntima-média (IMT) e das placas nas projeções longitudinal e transversal de um segmento de 30mm da artéria carótida comum, na bifurcação e em 15mm da artéria carótida interna. A medida da IMT se dá pela visualização do espaço entre duas linhas ecogênicas criadas pela interface entre a luz arterial e a camada íntima e entre a camada média e a adventícia e o

resultado é expresso pela média das medidas. A reprodutibilidade e a acurácia da medida da IMT foi examinada pela repetição do procedimento após 1 semana em 20 indivíduos. A diferença absoluta média entre as duas medidas foi de 5%.

As pacientes foram agrupadas de acordo com o resultado da US:

- Normal: espessura da íntima-média < 1mm;
- Espessamento de íntima-média: espessura da íntima-média \geq 1mm, mas com ausência de placa aterosclerótica;
- Placa aterosclerótica: presença de placa aterosclerótica com estenose < 50%.

Pacientes com estenose de carótida \geq 50% foram excluídas, pois este achado equivale à doença macrovascular clínica.

4.5.2 Parâmetros bioquímicos

a) Glicemia de jejum e glicemia pós-prandial (GLI e GLI PP)

A determinação da glicemia de jejum foi realizada no plasma fluoretado, pelo método enzimático glicose oxidase previamente padronizado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante em sistema automatizado.

Valor de referência: 70 a 99mg/dL (Genuth et al., 2003).

b) Hemoglobina glicada (HbA1c)

A determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) foi realizada no sangue total colhido em EDTA, pelo método de cromatografia líquida de troca iônica (HPLC), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante em sistema automatizado.

Valor de referência: 3,4 a 6,5%.

c) Colesterol total (CT)

A determinação do colesterol total foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico COLESTEROL (BIOCLIN[®]), pelo método enzimático-Trinder (esterase/oxidase), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: Desejável < 200mg/dL

d) Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade (HDLc)

A determinação do HDLc foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico HDL DIRETO (BIOCLIN[®]), pelo método enzimático-Trinder (esterase/oxidase) na presença de surfactantes específicos para HDL, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: Homens > 40mg/dL e mulheres > 50mg/dL

e) Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDLc)

A determinação da concentração plasmática de LDLc foi realizada através da fórmula de Friedewald ($LDLc = CT - (HDLc + TGL/5)$).

Valor de referência: Recomendado para diabéticos < 100mg/dL

Desejável < 130mg/dL

f) Triglicérides (TG)

A determinação do triglicérides foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico TRIGLICÉRIDES (BIOCLIN[®]), pelo método enzimático colorimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: Desejável < 150mg/dL

g) Apolipoproteína A-I (apoA-I)

A determinação da apoA-I foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico APOLIPOPROTEÍNA A (BioTécnica[®]), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: 110 a 210mg/dL.

h) Apolipoproteína B (apoB)

A determinação da apoB foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico APOLIPOPROTEÍNA B (APOB) (BioTécnica[®]), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: 60 a 155mg/dL.

i) Lipoproteína (a) [Lp(a)]

A determinação da Lp(a) foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico LPA (BioTécnica[®]), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: até 30mg/dL.

j) Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus)

A determinação da PCRus foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico PCR TURBILÁTEX (BioTécnica[®]), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus[®] em sistema automatizado.

Valor de referência: 0,1 a 2,5 mg/dL

k) Homocisteína total (Hcys)

A determinação quantitativa da homocisteína foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico ADVIA Centaur[®] Homocysteine (Bayer[®]), cujo princípio analítico é quimioluminescência, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Advia Centaur[®] (Bayer[®]) em sistema completamente automatizado.

Valor de referência: 5,0 a 13,9 μ mol/L

l) Creatinina (CRE)

A determinação da concentração de creatinina plasmática foi realizada utilizando soro, pelo método de cinética colorimétrica, previamente padronizado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante em sistema automatizado.

Valor de referência no soro: 0,4 a 1,4mg/dL

4.5.3 Parâmetros hemostáticos**a) Fator von Willebrand (fvW)**

A determinação quantitativa do fvW plasmático foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico ASSERACHROM[®] VWF:Ag (DIAGNOSTICA STAGO[®]), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A leitura a 450nm foi realizada utilizando-se o leitor de ELISA (Multiskan EX[®] Labsystems).

O teste de ELISA se baseia na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. Os antígenos presentes na amostra (no caso, fvW) se ligam aos anticorpos monoclonais específicos fixados à superfície da placa (anticorpos anti-fvW). Em seguida, anticorpos monoclonais marcados com uma enzima (no caso, anticorpos anti-fvW marcados com peroxidase) se ligam à outros determinantes antigênicos. Os anticorpos que não se ligam são retirados por sucessivas lavagens. Na próxima etapa, o substrato cromógeno (tetrametilbenzidina) é adicionado e reage com a enzima produzindo 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.

A curva de calibração foi construída utilizando-se o calibrador, fornecido pelo fabricante. Um controle, também fornecido pelo fabricante, foi utilizado para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 50 a 160 %

b) Fragmento 1+2 da protrombina (F1+2)

A determinação do F1+2 plasmático foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico Enzygnost[®] F1+2 (Dade Behring[®]) cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A leitura em 450nm foi realizada utilizando-se o leitor de ELISA (SpectraMax 340).

O teste de ELISA para determinação do F1+2 se baseia no mesmo princípio já descrito para o fvW.

A curva de calibração foi construída utilizando-se o calibrador, fornecido pelo fabricante. Um controle, também fornecido pelo fabricante, foi utilizado para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 69 a 229 pmol/L

c) Trombomodulina solúvel (TM)

A determinação quantitativa da TM plasmática foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico IMUBIND[®] Thrombomodulin (American Diagnostica[®] Inc.), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A leitura a 450nm foi realizada utilizando-se o leitor de ELISA (SpectraMax 340).

O teste de ELISA para determinação da TM se baseia no mesmo princípio já descrito para o fvW.

A curva de calibração foi construída utilizando-se o calibrador, fornecido pelo fabricante. Um controle, também fornecido pelo fabricante, foi utilizado para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: ainda não estabelecido.

OBS: o fabricante informa que mulheres jovens apresentam valor médio de 2,73ng/mL e que mulheres acima de 60 anos apresentam valor médio de 4,79ng/mL.

d) Dímero D (D-Di)

A determinação quantitativa do D-Di foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico VIDAS[®] D-Dimer New (BioMérieux[®]), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático fluorescente (ELFA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho MiniVidas[®] (BioMerieux[®]) em sistema completamente automatizado.

O teste se baseia na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. A amostra é incubada com anticorpos monoclonais anti-D-Di (esses anticorpos encontram-se marcados com fosfatase alcalina). Um cone com anticorpos monoclonais anti-D-Di adsorvidos à superfície aspira a mistura antígeno-anticorpo marcado, proporcionando a ligação do antígeno ao segundo anticorpo (fixo). Os anticorpos que não se ligam são retirados por sucessivas lavagens. Na próxima etapa, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é adicionado ao sistema e ocorre então a formação de um produto fluorescente cuja leitura é realizada em 450nm. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do antígeno na amostra.

A curva de calibração fornecida pelo fabricante foi confirmada utilizando-se dois calibradores fornecidos pelo fabricante. Dois plasmas controles foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: até 500ng/mL

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

A determinação quantitativa do PAI-1 foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico IMUBIND[®] Plasma PAI-1 ELISA (American Diagnostica[®] Inc.), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A leitura em 490nm foi realizada utilizando-se o leitor de ELISA (SpectraMax 340).

O teste de ELISA para determinação do PAI-1 se baseia no mesmo princípio já descrito para o fvW.

A curva de calibração foi construída utilizando-se o calibrador, fornecido pelo fabricante.

Valor de referência: 2 a 47ng/mL

f) Fator VII (VII)

A determinação quantitativa da atividade do fator VII foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico Neoplastin CI Plus® (Stago®) juntamente com o Plasma deficiente em fator VII (Stago®), pelo método coagulométrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. As determinações foram realizadas utilizando-se o aparelho STA Compact (Stago®) para sistema automatizado.

O fundamento do ensaio consiste no tempo de protrombina (TP) modificado pela adição de plasma deficiente em fator VII. Dessa forma, o tempo de formação do coágulo é dependente somente da atividade do fator VII presente na amostra.

A curva de calibração foi construída utilizando-se Unicalibrador. Os controles P e N do mesmo fabricante foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 70 a 130%

g) Fator VIII (FVIII)

A determinação quantitativa da atividade do fator VIII foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico PTT® (Stago®) juntamente com o Plasma deficiente em fator VIII (Stago®), pelo método coagulométrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. As determinações foram realizadas utilizando-se o aparelho STA Compact (Stago®) para sistema automatizado.

O fundamento do ensaio consiste no tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) modificado pela adição de plasma deficiente em fator VIII. Dessa forma, o tempo de formação do coágulo é dependente somente da atividade do fator VIII presente na amostra.

A curva de calibração foi construída utilizando-se Unicalibrador. Os controles P e N do mesmo fabricante foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 60 a 150%

h) Fibrinogênio (FIB)

A determinação quantitativa do fibrinogênio foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico FIBRINOGEN® (Stago®), pelo método coagulométrico de Clauss, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. As determinações foram realizadas utilizando-se o aparelho STA Compact (Stago®) para sistema automatizado.

O fundamento do ensaio consiste no tempo de formação do coágulo de fibrina pela adição de trombina em excesso ao plasma teste.

A curva de calibração foi construída utilizando-se Unicalibrador. Os controles P e N do mesmo fabricante foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 200 a 400mg/dL

i) Proteína C (PC)

A determinação quantitativa da atividade da PC foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico STACHROM Protein C® (Stago®), pelo método cromogênico cinético, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. As determinações foram realizadas utilizando-se o aparelho STACompact (Stago®) para sistema automatizado.

No ensaio a PC é ativada à PCa pelo extrato do veneno de víbora (*Agkistrodon c. contortrix*). A quantidade de PCa formada é dosada pela sua atividade amidolítica sobre o substrato sintético CBS 42.46. A liberação de paranitroanilina é medida a 405nm.

A curva de calibração foi construída utilizando-se Unicalibrador. Os controles P e N do mesmo fabricante foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 70 a 130%

j) Antitrombina (AT)

A determinação quantitativa da AT foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico STACHROM® Antithrombin III (Stago®), pelo método cromogênico cinético, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. As determinações foram realizadas utilizando-se o aparelho STACompact (Stago®) para sistema automatizado.

O teste se baseia na formação do complexo trombina-antitrombina (TAT) na presença de excesso de heparina, sendo que a antitrombina se encontra na amostra e a trombina e heparina nos reagentes fornecidos pelo fabricante. Após incubação, a trombina residual é dosada pela sua atividade amidolítica sobre o substrato cromógeno CBS 61.50. A liberação de paranitroanilina é medida a 405nm. A intensidade de cor é inversamente proporcional à quantidade de antitrombina presente na amostra.

A curva de calibração foi construída utilizando-se Unicalibrador. Os controles P e N do mesmo fabricante foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 80 a 120%

4.5.4 Análises genéticas

a) Polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR

Para a pesquisa do polimorfismo no gene da enzima MTHFR (C677T) foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de digestão com enzimas de restrição para análise do Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP).

As amostras de DNA foram obtidas a partir de 300µL 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®).

A identificação da troca de uma C por uma T na posição 677 do gene da enzima MTHFR foi realizada como descrito previamente (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'. As condições da reação de PCR consistiram de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por um minuto, anelamento à 64°C por 30 segundos e extensão à 72°C por um minuto, precedidos de um passo inicial de desnaturação à 94°C por três minutos e finalizados com um passo de 72°C por 10 minutos.

O produto de PCR de 198pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hinf* I (Promega®). A presença do polimorfismo 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 o polimorfismo 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®) foi utilizado como referência nas eletroforeses. Os fragmentos com menos de 100pb não são visualizados no gel corado.

b) Polimorfismo da GPIIIa (P1^A)

A análise do polimorfismo do gene da glicoproteína IIIa de plaqueta foi realizado através do procedimento de PCR-RFLP, utilizando-se os oligonucleotídeos e a metodologia descrita por Pamukcu (Pamukcu et al., 2005), conforme descrito abaixo:

Após a extração de DNA total, uma região de 282 pares de bases do gene codificador da GPIIIa foi amplificado, utilizando-se os oligonucleotídeos 5' GCT CCA ATG TAC GGG GTA AAC 3' e 5' GGG GAC TGA CTT GAG TGA CCT 3'. As condições da reação de PCR consistiram de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 45 segundos, precedidos de um passo inicial de desnaturação à 94°C por quatro minutos e finalizados com um passo de 72°C por 8 minutos.

O produto de PCR de 282pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Msp* I (Promega[®]). A presença do polimorfismo cria uma sequência que a enzima *Msp* I reconhece e leva à quebra do fragmento em duas partes, uma de 125pb e outra de 157pb. Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam três fragmentos (282, 157 e 125pb) e homozigotos possuem os dois fragmentos (157 e 125pb).

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[®]) foi utilizado como referência nas eletroforeses. Os fragmentos com menos de 100pb não são visualizados no gel corado.

As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis discretas estão apresentadas como frequências absolutas e relativas. Para comparar as variáveis discretas foi usado o teste de X^2 . Para as variáveis contínuas foram calculados os valores de média e desvio-padrão, mediana e interquartil, quando apropriado. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para comparação dos grupos e para localizar a diferença foram aplicados os testes de Tukey (paramétrico) e Kruskal-Wallis/Dunn (não-paramétrico), também quando apropriado. Os testes t de *Student* (paramétrico) e Mann-Whitney (não-paramétrico) foram utilizados para comparação de dois grupos. Para o marcador D-Di foi realizada transformação logarítmica dos dados.

Foram utilizados os programas *Prism* 3.0., *SigmaStat* 2.0 e *SPSS* 13.0.

Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 USO DE MEDICAMENTOS

O levantamento do uso de medicamentos foi realizado tendo em vista dois objetivos: conhecer o perfil de uso de medicamentos do grupo de estudo e registrar essa informação, para caso fosse necessário, realizar uma análise posterior tendo o medicamento como uma covariável dos resultados laboratoriais. No primeiro momento, o desejado era que os subgrupos apresentassem freqüências semelhantes quanto ao uso dos grupos de medicamentos. Os medicamentos avaliados foram os mais utilizados pelas pacientes para o controle glicêmico, lipídico e para tratamento de hipertensão.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, a seguir, nas pacientes e nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida.

Tabela 5 - Uso de medicamentos das pacientes diabéticas

Pacientes com DM2	
n	64
Metformina (n, %)	46 (71,9)
Insulina (n, %)	18 (28,1)
Estatina (n, %)	45 (70,3)
Beta-bloq (n, %)	14 (21,9)
IECA (n, %)	34 (53,1)

Tamanho do grupo (n), beta-bloqueador (Beta-bloq), inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA). Os valores estão expressos como freqüência absoluta e relativa.

Tabela 6 - Uso de medicamentos das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2		
	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	25	15	24
Metformina (n, %)	17 (68,0)	10 (66,7)	19 (79,2)
Insulina (n, %)	2 (8,0) *	6 (40,0)	10 (41,7)
Estatina (n, %)	17 (68,0)	9 (60,0)	19 (79,2)
Beta-bloq (n, %)	5 (20,0)	4 (26,7)	5 (20,8)
IECA (n, %)	11 (44,0)	9 (60,0)	14 (58,3)

Tamanho do grupo (n), beta-bloqueador (Beta-bloq), inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA). Os valores estão expressos como frequência absoluta e relativa. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* entre os demais subgrupos).

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os resultados dos parâmetros bioquímicos obtidos neste trabalho encontram-se nas Tabelas a seguir. Os dados estão apresentados com os valores de médias e dos desvios padrão para as pacientes diabéticas.

5.2.1 Perfil glicêmico

Para avaliação do perfil glicêmico das pacientes envolvidas neste estudo, foram avaliados, conforme o planejamento experimental, os parâmetros glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c). Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas abaixo.

Tabela 7 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas

Pacientes com DM2	
n	64
GLI (mg/dL)	139,6 ± 53,4
GLI PP (mg/dL)	130,0 (110,0 – 197,0)
HbA1c (%)	7,7 ± 1,8

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Tabela 8 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas ao grupo-controle

	Controle	DM2		
		Sem alteração	Espessamento	Placa
n	12	25	15	24
GLI (mg/dL)	92,5 (86,0 – 97,5)	129,0 (106,5 – 144,8) *	113,0 (100,3 – 129,8) *	148,5 (107,0 – 178,0) *
GLI PP (mg/dL)	_____	126,0 (106,7 – 183,3)	124,0 (110,5 – 183,5)	152,5 (110,0 – 238,0)
HbA1c (%)	_____	7,1 ± 1,3	7,6 ± 2,0	8,4 ± 2,0 **

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Controle; ** vs Sem alteração).

Tabela 9 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina

	DM2	
	Metformina SIM	Metformina NÃO
n	46	18
GLI (mg/dL)	132,0 (105,0 – 166,0)	122,0 (101,0 – 143,0)
GLI PP (mg/dL)	135,0 (110,0 – 214,0)	122,5 (108,0 – 170,0)
HbA1c (%)	8,0 ± 1,9	6,8 ± 1,0 *

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Metformina SIM).

Tabela 10 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Metformina SIM			Metformina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	10	19	8	5	5
GLI (mg/dL)	135,0 (122,0 – 162,3)	109,0 (99,0 – 156,0)	149,0 (111,3 – 170,0)	117,5 (101,5 – 136,5)	118,0 (106,8 – 127,3)	148,0 (93,8 – 187,3)
GLI PP (mg/dL)	126,0 (108,3 – 202,8)	132,0 (112,0 – 240,0)	145,0 (110,0 – 210,0)	122,5 (99,0 – 152,0)	112,0 (106,0 – 118,3)	189,0 (137,3 – 284,8)
HbA1c (%)	7,3 ± 1,4	8,3 ± 2,2	8,5 ± 2,1	6,6 ± 0,6	6,2 ± 0,3	7,7 ± 1,5 **

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (** vs Metformina NÃO / Espessamento).

Tabela 11 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina

	DM2	
	Insulina SIM	Insulina NÃO
n	18	46
GLI (mg/dL)	147,0 (111,0 – 185,0)	126,0 (103,0 – 150,0)
GLI PP (mg/dL)	206,0 (124,0 – 268,0)	124,5 (108,0 – 170,0) *
HbA1c (%)	8,9 (8,2 – 9,9)	6,7 (6,2 – 7,5) *

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Insulina SIM).

Tabela 12 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Insulina SIM			Insulina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	2	6	10	23	9	14
GLI (mg/dL)	151,0 ± 17,0	172,8 ± 123,0	148,3 ± 57,1	133,2 ± 37,7	112,7 ± 13,2	145,4 ± 44,9
GLI PP (mg/dL)	241,0 ± 38,2	214,5 ± 111,0	190,7 ± 94,6	122,0 (104,0 – 170,0)	112,0 (109,5 – 127,3)	150,5 (102,0 – 192,0)
HbA1c (%)	8,4 ± 0,1	9,7 ± 1,6	9,3 ± 2,4	7,0 ± 1,3	6,2 ± 0,4	7,7 ± 1,3 **

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (** vs Insulina NÃO / Espessamento).

Tabela 13 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas

	DM2	
	Estatina SIM	Estatina NÃO
n	45	19
GLI (mg/dL)	126,0 (100,8 – 156,0)	139,0 (111,5 – 187,3)
GLI PP (mg/dL)	130,0 (109,5 – 198,3)	124,0 (110,5 – 166,5)
HbA1c (%)	7,2 (6,4 – 8,7)	7,2 (6,2 – 8,5)

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 14 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Estatina SIM			Estatina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	9	19	8	6	5
GLI (mg/dL)	124,9 ± 32,7	127,3 ± 76,2	145,8 ± 46,0	155,3 ± 37,9	150,8 ± 91,3	149,6 ± 66,0
GLI PP (mg/dL)	115,0 (106,8 – 183,3)	137,0 (107,5 – 208,5)	170,0 (113,8 – 249,0)	155,6 ± 53,2	153,3 ± 97,5	152,2 ± 69,3
HbA1c (%)	6,7 (6,3 – 7,3)	8,1 (6,3 – 9,1)	8,0 (6,8 – 8,9) *	7,3 (6,6 – 8,4)	6,2 (5,9 – 6,7)	7,9 (7,2 – 9,5)

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c).

Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Estatina SIM / Sem alteração).

Tabela 15 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores

	DM2	
	Beta-bloq SIM	Beta-bloq NÃO
n	14	50
GLI (mg/dL)	137,0 (111,0 – 167,0)	125,5 (103,0 – 156,0)
GLI PP (mg/dL)	117,0 (110,0 – 214,0)	132,0 (108,0 – 196,0)
HbA1c (%)	8,4 ± 2,6	7,5 ± 1,5

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 16 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Beta-bloq SIM			Beta-bloq NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	5	4	5	20	11	19
GLI (mg/dL)	154,6 ± 40,8	162,0 ± 100,6	140,0 ± 61,3	129,6 ± 34,8	127,5 ± 75,0	148,3 ± 47,3
GLI PP (mg/dL)	122,0 (109,0 – 222,8)	126,0 (111,0 – 226,5)	110,0 (103,0 – 183,0)	128,0 (105,5 – 174,5)	124,0 (109,0 – 182,8)	170,0 (125,8 – 249,0)
HbA1c (%)	7,7 ± 1,5	7,9 ± 3,1	9,6 ± 3,2	6,9 ± 1,2	7,5 ± 1,7	8,0 ± 1,5

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 17 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA)

	DM2	
	IECA SIM	IECA NÃO
n	34	30
GLI (mg/dL)	149,1 ± 63,8	128,8 ± 36,5
GLI PP (mg/dL)	138,5 (110,0 – 199,0)	125,0 (110,0 – 181,0)
HbA1c (%)	7,4 (6,4 – 8,9)	7,0 (6,3 – 8,4)

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 18 - Perfil glicêmico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	IECA SIM			IECA NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	11	9	14	14	6	10
GLI (mg/dL)	131,4 ± 32,6	153,2 ± 102,0	160,5 ± 52,1	137,1 ± 40,5	112,0 ± 12,4	127,1 ± 39,2
GLI PP (mg/dL)	137,8 ± 39,1	184,7 ± 99,0	176,0 ± 81,3	156,4 ± 63,9	113,3 ± 9,4	169,0 ± 79,1
HbA1c (%)	6,9 ± 1,2	8,4 ± 2,3	8,3 ± 1,6	7,2 ± 1,3	6,5 ± 1,1	8,5 ± 2,4

Tamanho do grupo (n), glicemia de jejum (GLI), glicemia pós-prandial (GLI PP) e hemoglobina glicada (HbA1c). Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.2.2 Perfil lipídico

Para a análise do perfil lipídico foi excluída uma paciente pertencente ao grupo Placa que na triagem não possuía TG > 400mg/dL mas que após a execução dos métodos apresentou TG acima deste valor.

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas e Figuras abaixo.

Tabela 19 – Perfil lipídico das pacientes diabéticas

Pacientes com DM2	
n	63
CT (mg/dL)	170,9 ± 27,4
HDLc (mg/dL)	46,1 ± 10,6
LDLc (mg/dL)	101,6 ± 24,5
TG (mg/dL)	115,7 ± 50,0
apoA-I (mg/dL)	164,6 ± 34,1
apoB (mg/dL)	61,5 ± 11,4
apoB/apoA-I	0,39 ± 0,12
Lp(a) (mg/dL)	25,2 ± 18,6

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)].

Tabela 20 – Perfil lipídico das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas com o grupo-controle

	Controle		DM2		
			Sem alteração	Espessamento	Placa
n	12	25	15	23	
CT (mg/dL)	191,9 ± 39,4	183,2 ± 25,8	156,3 ± 26,8 *, **	166,9 ± 24,5	
HDLc (mg/dL)	49,8 ± 9,2	43,8 ± 11,1	46,3 ± 13,1	48,4 ± 7,6	
LDLc (mg/dL)	126,4 ± 34,4	115,8 ± 21,8	85,7 ± 19,8 *, **	96,6 ± 22,2 *, **	
TG (mg/dL)	78,8 ± 41,6	118,1 ± 50,9	121,4 ± 62,5	109,3 ± 41,0	
apoA-I (mg/dL)	134,4 (129,5 – 140,4)	156,5 (131,5 – 188,4)	169,6 (154,1 – 196,9) *	171,6 (147,4 – 197,6) *	
apoB (mg/dL)	67,1 ± 12,1	66,0 ± 11,2	58,8 ± 13,0	58,5 ± 9,5	
Índice apoB/apoA-I	0,49 ± 0,09	0,43 ± 0,12	0,38 ± 0,15	0,36 ± 0,09 *	
Lp(a) (mg/dL)	24,3 (8,9 – 50,3)	15,1 (8,0 – 30,8)	30,0 (17,7 – 43,9)	19,7 (9,5 – 36,3)	

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Controle e ** vs Sem alteração).

Tabela 21 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina

	DM2	
	Metformina SIM	Metformina NÃO
n	46	17
CT (mg/dL)	169,8 ± 28,5	173,6 ± 24,8
HDLc (mg/dL)	45,2 ± 10,6	48,5 ± 10,5
LDLc (mg/dL)	101,3 ± 26,0	102,6 ± 20,5
TG (mg/dL)	116,7 ± 50,7	112,9 ± 49,6
apoA-I (mg/dL)	162,8 ± 34,4	169,1 ± 34,0
apoB (mg/dL)	61,8 ± 12,6	60,8 ± 8,2
Índice apoB/apoA-I	0,40 ± 0,13	0,38 ± 0,10
Lp(a) (mg/dL)	20,2 (9,1 – 37,6)	20,4 (12,5 – 33,7)

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 22 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Metformina SIM			Metformina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	10	19	8	5	4
CT (mg/dL)	184,4 ± 23,4	150,8 ± 30,8 *	166,8 ± 25,9	180,9 ± 32,1	167,4 ± 12,5	167,0 ± 19,9
HDLc (mg/dL)	40,6 ± 9,4	45,5 ± 14,3	49,2 ± 7,9	50,5 ± 12,1	48,0 ± 11,6	45,0 ± 5,6
LDLc (mg/dL)	119,8 ± 18,9	79,3 ± 19,1 *	96,3 ± 23,9 *	107,4 ± 26,2	98,6 ± 15,4	98,0 ± 14,0
TG (mg/dL)	119,7 ± 47,6	130,0 ± 71,6	106,9 ± 40,5	114,8 ± 60,7	104,2 ± 39,6	120,3 ± 47,3
apoA-I (mg/dL)	153,9 ± 30,4	164,3 ± 43,1	170,0 ± 32,7	173,7 ± 36,1	169,0 ± 37,4	162,0 ± 33,6
apoB (mg/dL)	68,5 ± 11,0	56,6 ± 14,9 *	58,5 ± 10,3 *	60,9 ± 10,3	63,3 ± 6,8	58,3 ± 6,1
Índice apoB/apoA-I	0,46 ± 0,11	0,38 ± 0,17	0,36 ± 0,09 *	0,37 ± 0,11	0,39 ± 0,11	0,37 ± 0,09
Lp(a) (mg/dL)	22,5 ± 20,6	34,2 ± 19,8	24,2 ± 18,8	21,2 ± 16,3	23,7 ± 10,2	28,0 ± 20,5

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Metformina SIM / Sem alteração).

Tabela 23 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina

	DM2	
	Insulina SIM	Insulina NÃO
n	17	46
CT (mg/dL)	163,6 ± 31,0	173,5 ± 25,8
HDLc (mg/dL)	48,1 ± 11,8	45,3 ± 10,1
LDLc (mg/dL)	95,0 ± 24,9	104,1 ± 24,1
TG (mg/dL)	102,5 ± 39,9	120,5 ± 52,9
apoA-I (mg/dL)	167,3 ± 38,7	163,5 ± 32,6
apoB (mg/dL)	58,4 ± 11,8	62,7 ± 11,2
Índice apoB/apoA-I	0,37 ± 0,12	0,40 ± 0,12
Lp(a) (mg/dL)	23,2 (13,3 – 49,0)	20,1 (8,6 – 35,3)

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 24 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Insulina SIM			Insulina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	2	6	9	23	9	14
CT (mg/dL)	194,0 ± 12,7 **	138,2 ± 29,1	173,8 ± 23,3 **	182,3 ± 26,6	168,4 ± 17,8	162,4 ± 25,1
HDLc (mg/dL)	52,5 ± 16,3	47,7 ± 16,5	47,4 ± 8,2	43,0 ± 10,8	45,4 ± 11,3	49,1 ± 7,5
LDLc (mg/dL)	125,9 ± 2,7	73,6 ± 18,4	102,3 ± 19,6	114,9 ± 22,5	93,8 ± 17,0 *	92,9 ± 23,7 *
TG (mg/dL)	78,0 ± 31,1	84,5 ± 42,0	120,0 ± 34,9	121,6 ± 51,2	146,0 ± 63,4	102,4 ± 44,2
apoA-I (mg/dL)	177,5 ± 44,0	163,3 ± 53,1	167,7 ± 31,8	158,8 ± 32,7	167,5 ± 32,1	168,9 ± 33,9
apoB (mg/dL)	69,4 ± 2,5 **	46,1 ± 7,2	63,5 ± 8,9 **	65,7 ± 11,6	67,2 ± 7,8	54,9 ± 8,4 *, **
Índice apoB/apoA-I	0,40 ± 0,09	0,33 ± 0,20	0,39 ± 0,07	0,43 ± 0,12	0,42 ± 0,10	0,34 ± 0,10
Lp(a) (mg/dL)	44,3 ± 41,2	34,2 ± 16,7	25,6 ± 21,4	20,2 ± 16,4	28,4 ± 18,8	24,6 ± 17,5

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Insulina NÃO / Sem alteração; ** vs Insulina SIM e Insulina NÃO / Espessamento).

Tabela 25 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas

	DM2	
	Estatina SIM	Estatina NÃO
n	44	19
CT (mg/dL)	171,0 ± 30,6	170,4 ± 18,7
HDLc (mg/dL)	48,2 ± 10,0	41,2 ± 10,4 *
LDLc (mg/dL)	100,7 ± 27,1	103,8 ± 17,1
TG (mg/dL)	110,6 ± 52,1	127,5 ± 43,8
apoA-I (mg/dL)	173,7 ± 30,0	143,1 ± 34,4 *
apoB (mg/dL)	60,9 ± 12,4	62,9 ± 8,9
Índice apoB/apoA-I	0,36 ± 0,12	0,46 ± 0,10 *
Lp(a) (mg/dL)	20,1 (8,8 – 37,7)	20,6 (12,7 – 35,1)

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Estatina SIM).

As Figuras 7 e 8 apresentam as correlações entre os resultados de HDLc e apoA-I (no qual foi encontrada correlação positiva) e HDLc e índice apoB/apoA-I (no qual foi encontrada correlação negativa).

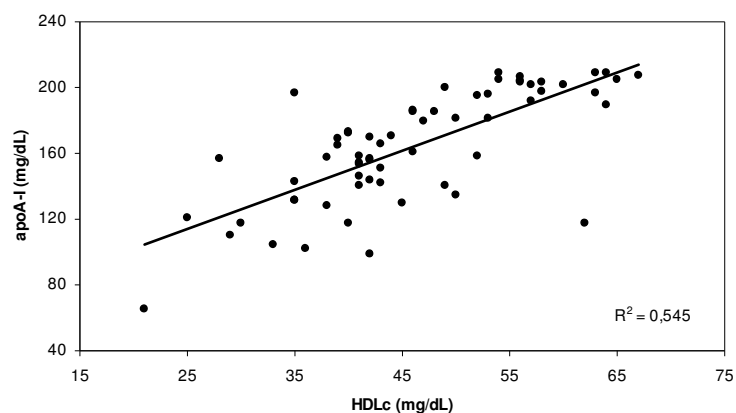


Figura 7 – Correlação entre os valores de HDLc e apolipoproteína A-I (apoA-I).

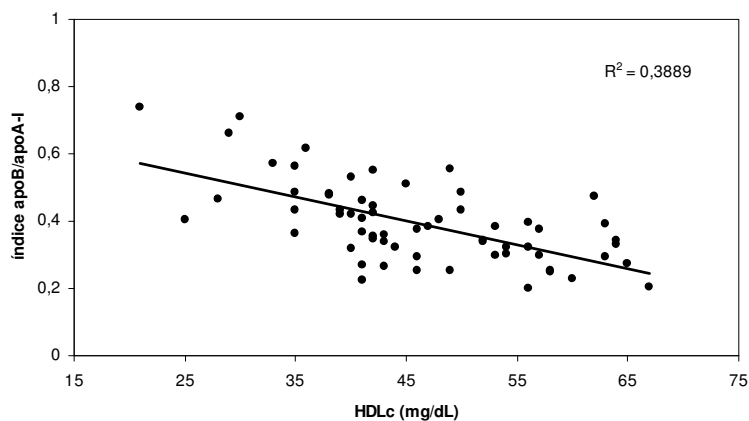


Figura 8 – Correlação entre os valores de HDLc e índice apolipoproteína B/apolipoproteína A-I (apoB/apoA-I).

Tabela 26 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Estatina SIM			Estatina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	9	18	8	6	5
CT (mg/dL)	187,5 ± 28,9	147,3 ± 23,5 *	167,3 ± 27,3	174,1 ± 15,5	169,8 ± 27,7	165,2 ± 11,5
HDLc (mg/dL)	46,6 ± 11,8	49,1 ± 11,8	49,3 ± 7,2	37,8 ± 6,7	42,2 ± 14,9	45,4 ± 9,4
LDLc (mg/dL)	117,3 ± 24,6	77,6 ± 16,4 *	96,6 ± 24,2 *	112,6 ± 14,8	97,9 ± 19,1	96,7 ± 15,0
TG (mg/dL)	117,7 ± 57,2	103,2 ± 62,7	107,5 ± 43,1	119,0 ± 37,3	148,7 ± 56,1	115,6 ± 35,4
apoA-I (mg/dL)	169,3 (137,6 – 197,7)	195,8 (157,9 – 202,3)	186,0 (159,0 – 202,4)	152,3 ± 25,8	140,4 ± 48,4	131,7 ± 29,9
apoB (mg/dL)	66,9 ± 12,6	53,8 ± 11,7 *	59,0 ± 10,5	64,3 ± 7,7	66,3 ± 11,6	56,5 ± 3,4
Índice apoB/apoA-I	0,43 ± 0,14	0,30 ± 0,08 *	0,34 ± 0,07 *	0,43 ± 0,04	0,51 ± 0,14	0,45 ± 0,10
Lp(a) (mg/dL)	20,1 (6,8 – 37,5)	30,0 (15,5 – 42,0)	18,1 (8,9 – 33,9)	17,4 ± 10,7	29,3 ± 15,2	34,6 ± 23,7

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Estatina SIM / Sem alteração).

Tabela 27 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores

	DM2	
	Beta-bloq SIM	Beta-bloq NÃO
n	14	49
CT (mg/dL)	164,1 ± 16,6	172,8 ± 29,7
HDLc (mg/dL)	45,6 ± 10,3	46,2 ± 10,7
LDLc (mg/dL)	95,3 ± 20,2	103,4 ± 25,4
TG (mg/dL)	116,2 ± 48,6	115,5 ± 50,9
apoA-I (mg/dL)	158,9 ± 33,5	166,2 ± 34,4
apoB (mg/dL)	60,9 ± 8,7	61,7 ± 12,2
Índice apoB/apoA-I	0,40 ± 0,09	0,39 ± 0,13
Lp(a) (mg/dL)	30,3 ± 21,7	23,8 ± 17,6

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 28 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Beta-bloq SIM			Beta-bloq NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	5	4	5	20	11	18
CT (mg/dL)	169,0 ± 16,6	162,8 ± 15,0	160,2 ± 19,9	186,8 ± 26,8	154,0 ± 30,3 *	168,7 ± 25,8
HDLc (mg/dL)	41,6 ± 4,3	51,0 ± 15,9	45,2 ± 9,4	44,4 ± 12,3	44,6 ± 12,3	49,3 ± 7,1
LDLc (mg/dL)	106,3 ± 21,3	86,3 ± 16,0	91,4 ± 20,7	118,2 ± 21,7	85,5 ± 21,7 *	98,0 ± 23,0 *
TG (mg/dL)	105,6 ± 31,4	127,5 ± 83,6	117,8 ± 34,3	121,3 ± 54,9	119,2 ± 57,8	106,9 ± 43,2
apoA-I (mg/dL)	164,3 ± 23,2	187,9 ± 22,4	130,1 ± 28,8 **	159,2 ± 35,4	157,8 ± 42,7	178,4 ± 25,3
apoB (mg/dL)	65,2 ± 9,6	62,2 ± 9,6	55,5 ± 4,6	66,2 ± 11,7	57,6 ± 14,2	59,2 ± 10,3
Índice apoB/apoA-I	0,40 ± 0,05	0,34 ± 0,09	0,44 ± 0,11	0,44 ± 0,13	0,40 ± 0,17	0,34 ± 0,07 *
Lp(a) (mg/dL)	19,2 ± 13,1	39,5 ± 26,3	34,1 ± 24,2	17,6 (7,7 – 28,7)	24,8 (17,7 – 37,8)	18,1 (8,9 – 33,9)

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Beta-bloq NÃO / Sem alteração; ** vs Beta-bloq SIM / Espessamento).

Tabela 29 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA)

	DM2	
	IECA SIM	IECA NÃO
n	33	30
CT (mg/dL)	173,3 ± 29,2	168,1 ± 25,6
HDLc (mg/dL)	45,7 ± 11,2	46,6 ± 10,0
LDLc (mg/dL)	103,4 ± 25,5	99,6 ± 23,5
TG (mg/dL)	121,2 ± 50,4	109,6 ± 49,8
apoA-I (mg/dL)	162,6 ± 35,8	166,9 ± 32,5
apoB (mg/dL)	62,5 ± 11,6	60,3 ± 11,3
Índice apoB/apoA-I	0,41 ± 0,12	0,38 ± 0,11
Lp(a) (mg/dL)	28,3 ± 18,0	21,7 ± 18,9

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 30 - Perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	IECA SIM			IECA NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	11	9	13	14	6	10
CT (mg/dL)	192,5 ± 29,6	154,4 ± 28,7 *	170,2 ± 19,6	176,0 ± 20,7	159,2 ± 26,1	162,5 ± 30,4
HDLc (mg/dL)	42,7 ± 12,0	47,7 ± 14,9	46,8 ± 7,5	44,4 ± 12,3	44,3 ± 10,8	50,6 ± 7,7
LDLc (mg/dL)	124,3 ± 22,4	81,9 ± 16,8 *	100,7 ± 19,3 *	118,2 ± 21,7	91,5 ± 24,0	91,2 ± 25,5
TG (mg/dL)	127,4 ± 52,3	124,4 ± 70,5	113,7 ± 32,7	121,3 ± 54,9	116,8 ± 54,1	103,5 ± 51,1
apoA-I (mg/dL)	142,8 (130,3 – 181,2)	195,8 (150,0 – 202,3)	171,6 (151,4 – 195,4)	165,4 ± 34,5	160,9 ± 30,7	172,6 ± 33,1
apoB (mg/dL)	69,6 ± 12,0	56,2 ± 13,6 *	61,1 ± 7,0	63,3 ± 10,1	62,6 ± 12,0	54,8 ± 11,5
Índice apoB/apoA-I	0,47 ± 0,11	0,37 ± 0,18	0,38 ± 0,08	0,40 ± 0,12	0,40 ± 0,11	0,33 ± 0,10
Lp(a) (mg/dL)	23,5 ± 18,3	30,7 ± 21,1	30,5 ± 16,3	15,1 (6,0 – 23,6)	34,0 (20,1 – 37,8)	9,1 (6,7 – 18,1)

Tamanho do grupo (n), colesterol total (CT), triglicérides (TG), apolipoproteína A-I (apoA-I), apolipoproteína B (apoB), índice apoB/apoA-I (apoB/apoA-I) e lipoproteína (a) [Lp(a)]. Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs IECA SIM / Sem alteração).

5.2.3 Proteína C reativa ultra-sensível e homocisteína

Outros dois marcadores comumente avaliados nas doenças cardiovasculares são a proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e a homocisteína (Hcys). Por esse motivo, esses dois marcadores foram incluídos no estudo.

Tabela 31 – Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas

Pacientes com DM2	
n	64
PCRus (mg/L)	1,6 (1,0 – 3,3)
Hcys (μmol/L)	10,5 ± 3,5

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys).

Tabela 32 – Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas com o grupo-controle

	Controle	DM2		
		Sem alteração	Espessamento	Placa
n	12	25	15	24
PCRus (mg/L)	1,7 (1,1 – 4,6)	1,6 (1,0 – 3,5)	2,1 (0,8 – 3,2)	1,7 (1,2 – 3,2)
Hcys (μmol/L)	8,6 (7,1 – 10,5)	9,1 (7,8 – 11,1)	10,3 (7,7 – 12,5)	10,2 (8,9 – 13,0)

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 33 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina

DM2		
	Metformina SIM	Metformina NÃO
n	46	18
PCRus (mg/L)	1,6 (1,0 – 3,3)	1,9 (0,8 – 3,2)
Hcys (μmol/L)	10,4 ± 3,4	10,6 ± 3,9

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 34 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

DM2						
	Metformina SIM			Metformina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	10	19	8	5	5
PCRus (mg/L)	1,4 (1,0 – 3,1)	2,1 (1,0 – 4,9)	1,6 (1,1 – 3,2)	2,8 ± 2,3	1,9 ± 1,1	2,6 ± 2,1
Hcys (μmol/L)	9,6 ± 2,7	11,3 ± 3,7	10,6 ± 3,7	9,7 ± 3,7	9,4 ± 2,3	13,2 ± 4,9

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 35 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina

	DM2	
	Insulina SIM	Insulina NÃO
n	18	46
PCRus (mg/L)	1,0 (0,8 – 2,3)	1,9 (1,3 – 3,7)
Hcys ($\mu\text{mol/L}$)	11,3 \pm 4,8	10,1 \pm 2,8

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 36 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Insulina SIM			Insulina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	2	6	10	23	9	14
PCRus (mg/L)	0,6 \pm 0,3	2,4 \pm 2,8	1,8 \pm 1,2	1,6 (1,1 – 3,6)	2,5 (1,5 – 3,5)	1,9 (1,4 – 6,0)
Hcys ($\mu\text{mol/L}$)	8,0 \pm 1,8	10,7 \pm 4,2	12,3 \pm 5,5	9,8 \pm 3,0	10,6 \pm 3,0	10,4 \pm 2,4

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 37 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas

	DM2	
	Estatina SIM	Estatina NÃO
n	45	19
PCRus (mg/L)	1,6 (1,0 – 3,5)	2,1 (1,1 – 3,0)
Hcys (μ mol/L)	10,2 \pm 3,0	11,2 \pm 4,5

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 38 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Estatina SIM			Estatina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	9	19	8	6	5
PCRus (mg/L)	1,6 (0,8 – 4,5)	1,0 (0,8 – 2,3)	1,7 (1,3 – 3,2)	1,7 \pm 0,8	3,7 \pm 1,7	2,3 \pm 2,3
Hcys (μ mol/L)	9,7 \pm 2,9	10,7 \pm 3,5	10,4 \pm 2,8	9,6 \pm 3,3	10,6 \pm 3,4	14,3 \pm 6,5

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 39 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores

	DM2	
	Beta-bloq SIM	Beta-bloq NÃO
n	14	50
PCRus (mg/L)	1,9 (1,4 – 3,2)	1,6 (1,0 – 3,3)
Hcys (μmol/L)	10,5 ± 4,0	10,4 ± 3,4

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 40 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Beta-bloq SIM			Beta-bloq NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	5	4	5	20	11	19
PCRus (mg/L)	1,4 (1,2 – 4,1)	3,1 (2,3 – 5,3)	1,6 (1,3 – 3,1)	1,6 (0,9 – 3,6)	1,5 (0,8 – 2,5)	1,7 (1,1 – 3,2)
Hcys (μmol/L)	10,4 ± 3,8	8,9 ± 2,1	11,9 ± 5,4	9,5 ± 2,8	11,3 ± 3,6	11,0 ± 3,7

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 41 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA)

	DM2	
	IECA SIM	IECA NÃO
n	34	30
PCRus (mg/L)	1,6 (1,1 – 4,2)	1,7 (0,8 – 3,2)
Hcys (μmol/L)	10,4 (8,5 – 12,6)	9,3 (7,6 – 10,9)

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 42 - Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e homocisteína das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	IECA SIM			IECA NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	11	9	14	14	6	10
PCRus (mg/L)	1,4 (1,1 – 3,6)	1,9 (0,9 – 4,6)	1,7 (1,3 – 4,3)	2,4 ± 2,1	2,3 ± 1,4	2,3 ± 1,7
Hcys (μmol/L)	10,6 ± 3,1	10,9 ± 3,7	11,3 ± 3,7	7,9 (7,1 – 9,3)	10,0 (7,6 – 12,2)	9,9 (9,0 – 13,0)

Tamanho do grupo (n), proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), homocisteína (Hcys). Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.3 PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS

Os resultados dos parâmetros hemostáticos obtidos neste trabalho encontram-se nas Tabelas e Figuras a seguir. Os dados estão apresentados com os valores de médias e dos desvios padrão para as pacientes diabéticas.

A dosagem de creatinina sérica foi realizada para confirmar a ausência de lesão renal e como medida de precaução, caso fosse necessário fazer a correção de algum parâmetro hemostático, mas, entretanto, não foi indicado. Sabe-se que os marcadores hemostáticos aumentam quando há redução do clearance renal. Os resultados de creatinina sérica estão apresentados na casuística (item 4.2). Essa estratégia é comumente adotada nos casos de aumento de creatinina e a expressão dos resultados é dada como índice corrigido pela creatinina sérica.

Tabela 43 – Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas

Pacientes com DM2	
n	64
fvW (%)	123,4 ± 40,0
TM (ng/mL)	2,9 (2,2 – 3,8)
F1+2 (pmol/L)	363,2 ± 155,5
D-Di (ng/mL)	356,5 (260,7 – 566,2)
PAI-1 (ng/mL)	99,4 ± 49,0
VII (%)	112,2 ± 33,8
VIII (%)	171,4 ± 69,6
FIB (mg/dL)	367,2 ± 92,1
PC (%)	129,2 ± 24,8
AT (%)	105,0 ± 13,1

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT).

Tabela 44 – Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida comparadas com o grupo-controle

	Controle	DM2		
		Sem alteração	Espessamento	Placa
n	12	25	15	24
fvW (%)	100,8 ± 31,6	108,6 ± 37,3	130,5 ± 33,1	134,3 ± 43,2
TM (ng/mL)	_____	3,1 (2,3 – 3,8)	2,7 (2,2 – 3,5)	2,9 (2,1 – 3,9)
F1+2 (pmol/L)	_____	331,4 ± 96,0	362,8 ± 179,5	396,6 ± 186,5
D-Di (ng/mL)	266,0 (231,8 – 386,6)	319,9 (213,6 – 434,6)	353,7 (278,2 – 454,3)	403,3 (318,5 – 631,9) *, **
PAI-1 (ng/mL)	37,6 ± 33,2	108,8 ± 48,5 *	109,7 ± 62,6 *	83,2 ± 36,0 *
VII (%)	_____	110,0 (94,8 – 130,0)	99,0 (83,3 – 169,5)	93,5 (84,0 – 118,5)
VIII (%)	121,2 ± 40,7	133,8 ± 46,8	184,5 ± 74,3 *, **	202,5 ± 70,5 *, **
FIB (mg/dL)	_____	335,2 ± 67,3	359,0 ± 95,9	405,8 ± 101,0 **
PC (%)	127,0 ± 15,6	122,6 ± 21,8	138,9 ± 26,0	130,0 ± 25,8
AT (%)	115,4 ± 9,3	100,7 ± 11,5 *	107,9 ± 9,3	107,7 ± 15,6

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Controle e ** vs Sem alteração).

As Figuras a seguir ilustram as distribuições dos dados obtidos para os parâmetros hemostáticos avaliados.

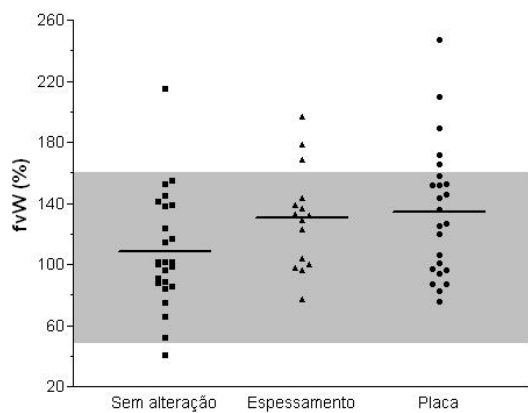


Figura 9 – Distribuição dos valores do fator von Willebrand (fvW). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (50 a 160%) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

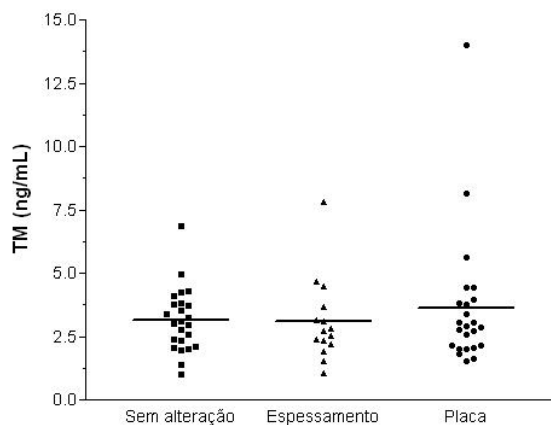


Figura 10 – Distribuição dos valores de trombomodulina (TM). As linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

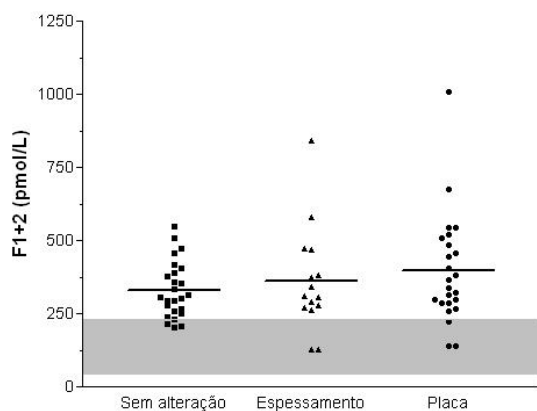


Figura 11 – Distribuição dos valores do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (69 a 229 pmol/L) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

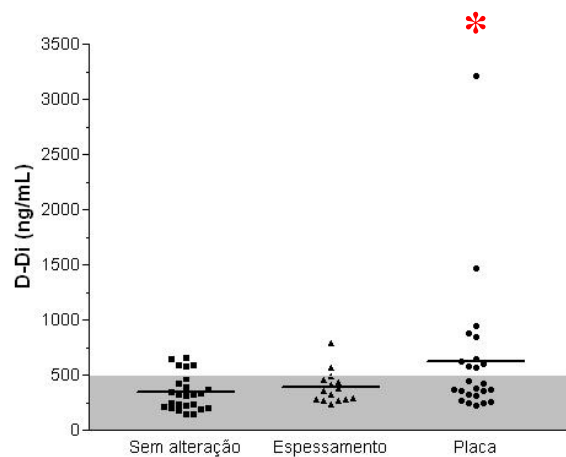


Figura 12 – Distribuição dos valores do dímero D (D-Di). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (inferior à 500 ng/mL) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. * representa diferença significativa em relação ao grupo Sem alteração.

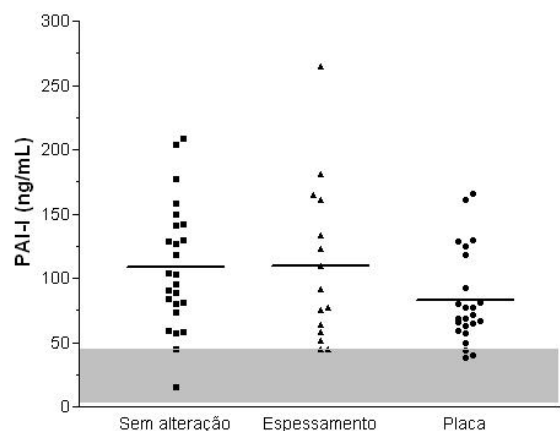


Figura 13 – Distribuição dos valores do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (2 a 47 ng/mL) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

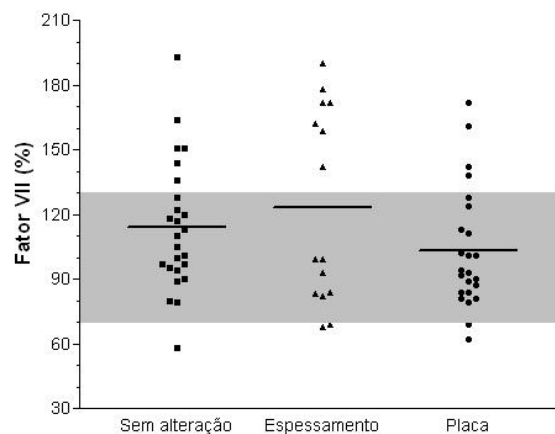


Figura 14 – Distribuição dos valores do inibidor do fator VII (VII). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (70 a 130 %) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

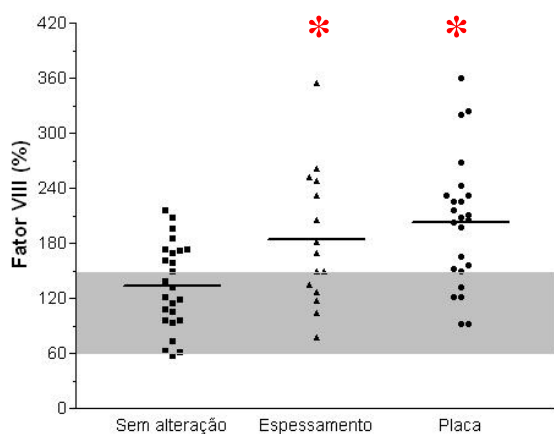


Figura 15 – Distribuição dos valores do fator VIII (VIII). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (60 a 150 %) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. * representa diferença significativa em relação ao grupo Sem alteração.

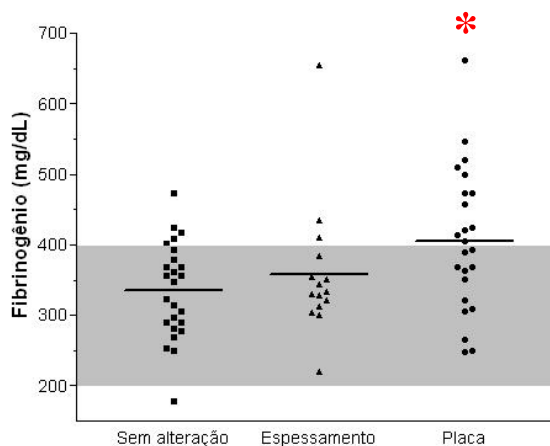


Figura 16 – Distribuição dos valores de fibrinogênio (FIB). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (200 a 400 mg/dL) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. * representa diferença significativa em relação ao grupo Sem alteração.

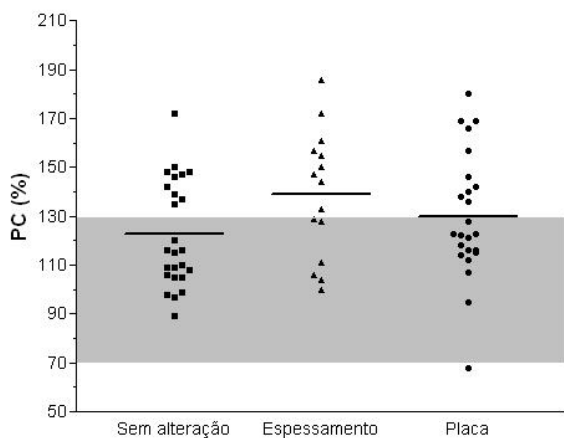


Figura 17 – Distribuição dos valores de proteína C (PC). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (70 a 130 %) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

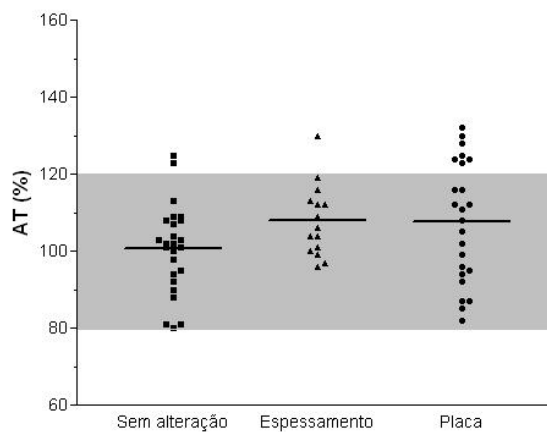


Figura 18 – Distribuição dos valores de antitrombina (AT). A área sombreada corresponde à faixa de normalidade (80 a 120 %) e as linhas horizontais representam as médias dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

A Figura 19 apresenta a correlação entre os resultados de fator VIII e fator von Willebrand (fvW)), expressos em porcentagem. Foi encontrada correlação positiva.

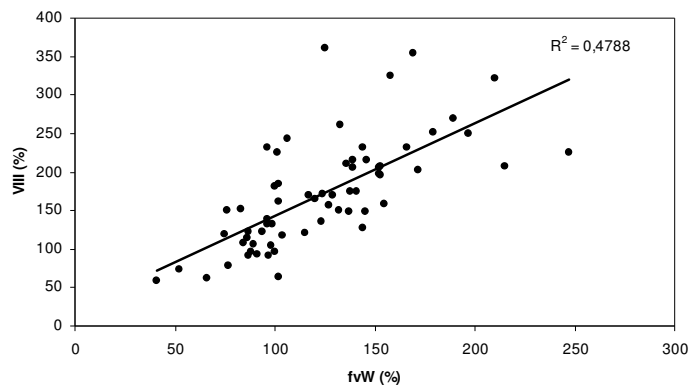


Figura 19 – Correlação entre os valores de fator VIII (VIII) e fator von Willebrand (fvW).

Tabela 45 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina

	DM2	
	Metformina SIM	Metformina NÃO
n	46	18
fvW (%)	119,8 ± 38,4	132,4 ± 43,5
TM (ng/mL)	2,9 (2,1 – 3,7)	3,0 (2,3 – 4,2)
F1+2 (pmol/L)	308,0 (265,0 – 416,0)	356,5 (302,0 – 507,0)
D-Di (ng/mL)	363,2 (266,1 – 567,5)	356,5 (248,9 – 462,4)
PAI-1 (ng/mL)	80,5 (66,0 – 127,0)	100,5 (57,0 134,0)
VII (%)	99,5 (84,0 – 138,0)	101,5 (93,0 – 122,0)
VIII (%)	172,2 ± 66,9	169,6 ± 78,0
FIB (mg/dL)	368,5 ± 96,9	364,1 ± 81,1
PC (%)	128,3 ± 25,2	131,4 ± 24,1
AT (%)	104,8 ± 14,2	105,4 ± 10,0

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 46 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de metformina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Metformina SIM			Metformina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	10	19	8	5	5
fvW (%)	104,9 ± 32,2	133,0 ± 31,9	126,3 ± 43,7	116,5 ± 47,9	125,4 ± 38,8	165,0 ± 25,3
TM (ng/mL)	3,0 (2,3 – 3,7)	2,8 (1,9 – 3,7)	2,8 (2,1 – 3,7)	3,0 ± 1,2	3,0 ± 0,9	3,7 ± 1,4
F1+2 (pmol/L)	317,1 ± 88,2	353,4 ± 208,1	390,0 ± 203,4	361,9 ± 110,6	381,6 ± 121,2	421,8 ± 113,1
D-Di (ng/mL)	319,9 (197,8 – 400,8)	350,8 (284,4 – 488,7)	426,6 (314,5 – 638,0) *	291,5 (235,8 – 617,8)	354,0 (267,2 – 438,5)	366,4 (336,8 – 700,0)
PAI-1 (ng/mL)	103,0 (78,5 – 135,0)	76,0 (58,0 – 161,0)	77,0 (66,3 – 111,8)	105,4 ± 42,7	136,7 ± 78,4	64,7 ± 37,3
VII (%)	115,1 ± 33,0	119,7 ± 49,4	105,7 ± 31,1	112,0 ± 24,6	131,0 ± 38,5	94,0 ± 7,6
VIII (%)	133,0 ± 43,2	205,7 ± 72,0 *	189,5 ± 67,5 *	135,6 ± 57,0	142,0 ± 65,3	251,6 ± 65,3 *, **
FIB (mg/dL)	335,1 ± 72,6	373,7 ± 106,6	395,6 ± 106,0	335,5 ± 59,2	329,6 ± 70,7	444,2 ± 75,5 *, **
PC (%)	121,9 ± 23,4	137,2 ± 26,0	129,4 ± 26,2	124,1 ± 19,3	142,2 ± 28,7	132,4 ± 27,1
AT (%)	100,3 ± 13,2	110,4 ± 9,5	106,0 ± 16,4	101,5 ± 7,7	102,8 ± 7,3	114,2 ± 11,7

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Metformina SIM e Metformina NÃO / Sem alteração; ** vs Metformina NÃO / Espessamento).

Tabela 47 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina

	DM2	
	Insulina SIM	Insulina NÃO
N	18	46
fvW (%)	137,5 ± 39,8	117,8 ± 39,1
TM (ng/mL)	3,3 (2,4 – 4,0)	2,8 (2,1 – 3,8)
F1+2 (pmol/L)	303,0 (269,0 – 457,0)	341,0 (265,0 – 416,0)
D-Di (ng/mL)	374,5 (312,6 – 567,5)	330,4 (240,4 – 564,9)
PAI-1 (ng/mL)	87,4 ± 47,0	104,1 ± 49,5
VII (%)	101,5 ± 32,0	116,4 ± 33,9
VIII (%)	219,1 ± 74,6	152,8 ± 58,4 *
FIB (mg/dL)	424,7 ± 115,6	344,7 ± 70,6 *
PC (%)	131,2 ± 27,0	128,5 ± 24,1
AT (%)	111,4 ± 12,6	102,5 ± 12,5 *

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Insulina SIM).

Tabela 48 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de insulina nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Insulina SIM			Insulina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	2	6	10	23	9	14
fvW (%)	101,0 ± 1,4	150,7 ± 26,8	136,9 ± 46,7	109,3 ± 38,9	117,0 ± 31,0	132,5 ± 42,2
TM (ng/mL)	3,5 (3,2 – 3,7)	2,3 (1,9 – 3,7)	3,6 (2,9 – 4,4)	3,0 (2,2 – 3,8)	2,8 (2,5 – 3,5)	2,4 (2,0 – 3,1)
F1+2 (pmol/L)	376,5 ± 113,8	233,7 ± 83,3	409,2 ± 147,4	327,5 ± 96,2	448,9 ± 176,7	387,6 ± 215,1
D-Di (ng/mL)	342,9 (312,6 – 373,3)	335,1 (284,4 – 488,7)	411,0 (359,0 – 575,4)	319,9 (208,8 – 458,9)	354,0 (273,6 – 438,5)	400,0 (270,4 – 881,0) *
PAI-1 (ng/mL)	146,6 ± 81,7	75,7 ± 45,5	82,6 ± 37,2	105,5 ± 46,1	132,5 ± 64,1	83,6 ± 36,6
VII (%)	93,0 (89,0 – 97,0)	83,0 (69,0 – 93,0)	96,5 (89,0 – 113,0)	115,9 ± 30,7	140,7 ± 37,0	101,6 ± 30,1 **
VIII (%)	140,5 ± 62,9	231,7 ± 74,6	227,2 ± 73,7	133,3 ± 47,0	153,0 ± 58,2	184,8 ± 65,0 *
FIB (mg/dL)	354,1 ± 9,9	402,5 ± 130,7	452,2 ± 116,0	333,6 ± 70,0	330,0 ± 55,4	372,6 ± 76,6
PC (%)	112,0 ± 4,2	129,3 ± 21,3	136,1 ± 31,7	123,6 ± 22,5	145,2 ± 28,0	125,7 ± 20,9
AT (%)	106,0 ± 4,2	108,0 ± 7,8	114,6 ± 15,5	100,2 ± 11,9	107,8 ± 10,7	102,8 ± 14,3

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Insulina NÃO / Sem alteração; ** vs Insulina NÃO / Espessamento).

Tabela 49 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas

	DM2	
	Estatina SIM	Estatina NÃO
n	45	19
fvW (%)	131,1 ± 40,0	105,1 ± 34,5 *
TM (ng/mL)	3,0 (2,0 – 3,8)	2,8 (2,4 – 3,8)
F1+2 (pmol/L)	369,7 ± 155,0	347,8 ± 160,0
D-Di (ng/mL)	373,3 (288,4 – 594,0)	240,4 (219,2 – 321,4) *
PAI-1 (ng/mL)	81,0 (62,0 – 129,0)	103,0 (68,3 – 133,0)
VII (%)	101,0 (86,3 – 136,5)	101,0 (91,0 – 136,0)
VIII (%)	177,2 ± 66,3	157,8 ± 77,0
FIB (mg/dL)	375,2 ± 81,9	348,4 ± 113,0
PC (%)	128,2 ± 24,4	131,5 ± 26,2
AT (%)	106,8 ± 12,1	100,8 ± 14,7

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Estatina SIM).

Tabela 50 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de estatinas nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Estatina SIM			Estatina NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	17	9	19	8	6	5
fvW (%)	114,5 ± 37,5	139,0 ± 30,0	142,2 ± 42,8	96,0 ± 35,9	117,7 ± 36,2	104,6 ± 32,6
TM (ng/mL)	3,1 (2,0 – 3,7)	2,7 (2,1 – 3,9)	2,9 (2,0 – 3,8)	3,4 ± 0,9	3,3 ± 2,3	4,2 ± 2,7
F1+2 (pmol/L)	344,5 ± 108,8	338,6 ± 129,7	407,1 ± 195,4	303,6 ± 57,1	399,2 ± 246,4	356,8 ± 160,0
D-Di (ng/mL)	349,1 (212,3 – 580,8)	375,8 (318,0 – 468,9)	379,3 (333,2 – 797,9)	274,9 (214,9 – 322,9)	280,3 (266,1 – 430,5)	426,6 (251,8 – 475,8)
PAI-1 (ng/mL)	95,0 (70,3 – 137,0)	92,0 (54,8 – 169,0)	72,0 (63,5 – 90,0)	111,2 ± 33,6	101,4 ± 41,2	80,7 ± 44,0
VII (%)	110,0 (93,0 – 138,0)	93,0 (79,5 – 162,3)	94,0 (84,8 – 127,0)	106,4 ± 26,3	139,2 ± 40,0	88,8 ± 18,8 **
VIII (%)	139,0 ± 47,4	189,3 ± 74,1	205,6 ± 63,1 *	122,9 ± 46,5	177,2 ± 81,0	190,4 ± 102,0
FIB (mg/dL)	346,4 ± 61,3	347,7 ± 46,4	413,9 ± 96,7 *	311,4 ± 77,5	376,0 ± 147,5	374,6 ± 122,6
PC (%)	122,2 ± 22,7	133,2 ± 24,3	131,3 ± 26,0	123,5 ± 21,1	147,3 ± 28,3	125,4 ± 27,5
AT (%)	104,1 ± 11,1	110,0 ± 6,2	107,6 ± 14,8	93,4 ± 9,2	104,7 ± 12,7	108,2 ± 20,4

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para p<0,05 (* vs Estatina SIM / Sem alteração; ** vs Estatina NÃO / Espessamento).

Tabela 51 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores

	DM2	
	Beta-bloq SIM	Beta-bloq NÃO
N	14	50
fvW (%)	103,6 ± 34,9	128,9 ± 39,9 *
TM (ng/mL)	2,9 (2,2 – 4,0)	2,9 (2,1 – 3,8)
F1+2 (pmol/L)	348,4 ± 129,5	367,4 ± 163,0
D-Di (ng/mL)	322,9 (241,5 – 426,6)	369,8 (269,8 – 576,8)
PAI-1 (ng/mL)	93,5 (80,0 – 130,0)	79,0 (59,0 – 129,0)
VII (%)	103,9 ± 27,2	114,5 ± 35,3
VIII (%)	170,6 ± 90,7	171,7 ± 63,6
FIB (mg/dL)	369,7 ± 128,9	366,5 ± 80,6
PC (%)	125,8 ± 22,2	130,2 ± 25,6
AT (%)	103,6 ± 13,9	105,4 ± 13,0

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Beta-bloq SIM).

Tabela 52 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de beta-bloqueadores nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	Beta-bloq SIM			Beta-bloq NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	5	4	5	20	11	19
fvW (%)	91,0 ± 43,7	131,0 ± 28,7	94,4 ± 19,4	113,0 ± 35,4	130,3 ± 35,9	144,8 ± 41,7 *
TM (ng/mL)	3,3 ± 1,1	3,0 ± 1,1	3,8 ± 2,5	3,1 (2,2 – 3,8)	2,7 (2,0 – 3,5)	2,9 (2,0 – 3,8)
F1+2 (pmol/L)	315,0 ± 62,8	346,8 ± 91,9	383,0 ± 203,2	335,5 ± 103,5	368,6 ± 206,1	400,2 ± 187,6
D-Di (ng/mL)	312,6 (204,7 – 388,1)	368,0 (283,1 – 449,4)	353,2 (251,8 – 463,8)	330,0 (211,2 – 446,8)	354,0 (278,2 – 454,4)	442,6 (334,7 – 797,9) *
PAI-1 (ng/mL)	103,3 ± 27,2	117,8 ± 50,8	89,1 ± 37,3	110,1 ± 53,0	106,8 ± 68,4	81,6 ± 36,6
VII (%)	104,6 ± 10,3	124,3 ± 40,2	87,0 ± 17,8	116,5 ± 33,0	123,2 ± 48,4	107,5 ± 29,1
VIII (%)	117,4 ± 52,4	205,3 ± 101,7	196,0 ± 103,3	138,0 ± 45,8	176,9 ± 66,2	204,2 ± 63,0 *
FIB (mg/dL)	336,4 ± 109,6	337,8 ± 65,0	428,6 ± 179,2	334,9 ± 56,5	366,7 ± 106,6	399,7 ± 75,6 *
PC (%)	122,8 ± 23,9	132,5 ± 16,6	123,4 ± 27,6	122,6 ± 21,9	141,2 ± 29,0	131,8 ± 25,9
AT (%)	96,2 ± 9,0	109,5 ± 10,0	106,4 ± 18,9	101,8 ± 12,0	107,3 ± 9,5	108,1 ± 15,3

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para p<0,05 (* vs Beta-bloq NÃO / Sem alteração).

Tabela 53 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA)

	DM2	
	IECA SIM	IECA NÃO
n	34	30
fvW (%)	123,2 ± 40,2	123,5 ± 40,4
TM (ng/mL)	2,8 (2,2 – 3,8)	3,1 (2,1 – 3,8)
F1+2 (pmol/L)	376,8 ± 185,7	347,8 ± 113,4
D-Di (ng/mL)	371,1 (255,3 – 567,5)	353,6 (276,0 – 564,9)
PAI-1 (ng/mL)	80,5 (58,0 – 130,0)	92,0 (67,0 – 129,0)
VII (%)	101,5 (84,0 – 136,0)	98,0 (89,0 – 138,0)
VIII (%)	177,1 ± 66,3	165,0 ± 73,8
FIB (mg/dL)	371,1 ± 87,8	362,9 ± 98,1
PC (%)	133,6 ± 23,5	124,2 ± 25,7
AT (%)	108,6 ± 12,7	100,9 ± 12,5 *

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs IECA SIM).

Tabela 54 - Marcadores hemostáticos das pacientes diabéticas de acordo com o uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) nos subgrupos de acordo com o Doppler de carótida

	DM2					
	IECA SIM			IECA NÃO		
	Sem alteração	Espessamento	Placa	Sem alteração	Espessamento	Placa
n	11	9	14	14	6	10
fvW (%)	108,6 ± 48,8	134,1 ± 33,0	127,7 ± 36,3	108,6 ± 27,2	125,0 ± 35,6	143,6 ± 51,9
TM (ng/mL)	3,0 (2,5 – 3,7)	3,1 (1,8 – 4,6)	2,7 (2,1 – 3,8)	3,3 (2,0 – 3,8)	2,6 (2,4 – 2,8)	3,2 (2,0 – 4,0)
F1+2 (pmol/L)	353,6 ± 108,0	375,0 ± 228,1	396,1 ± 213,7	313,9 ± 85,4	344,5 ± 79,6	397,3 ± 151,3
D-Di (ng/mL)	334,2 (208,8 – 550,3)	375,8 (280,8 – 469,0)	396,5 (255,3 – 644,2)	316,2 (223,4 – 373,3)	324,2 (276,0 – 430,5)	477,4 (358,9 – 619,4) *
PAI-1 (ng/mL)	112,9 ± 46,5	112,1 ± 75,2	78,7 ± 38,3	105,5 ± 51,5	106,3 ± 43,4	89,4 ± 33,5
VII (%)	123,2 ± 36,6	120,6 ± 49,2	97,5 ± 21,7	106,9 ± 22,7	127,8 ± 41,8	111,3 ± 34,8
VIII (%)	130,7 ± 49,2	211,3 ± 72,8 *	191,6 ± 56,3 *	136,3 ± 46,5	144,2 ± 61,0	217,7 ± 87,6 *
FIB (mg/dL)	345,5 ± 61,2	381,6 ± 112,5	384,4 ± 89,9	327,1 ± 72,9	325,2 ± 57,0	435,6 ± 112,7 *, **
PC (%)	129,0 ± 23,4	142,6 ± 26,6	131,5 ± 21,3	117,6 ± 19,8	133,3 ± 26,1	128,0 ± 32,3
AT (%)	104,9 ± 12,4	112,0 ± 9,5	109,4 ± 14,8	99,0 (90,0 – 103,0)	102,0 (97,0 – 104,0)	105,5 (92,0 – 116,0)

Tamanho do grupo (n), fator von Willebrand (fvW), trombomodulina (TM), fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), Dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII (VII), fator VIII (VIII), fibrinogênio (FIB), proteína C (PC), antitrombina (AT). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs IECA SIM e IECA NÃO / Sem alteração; ** vs IECA NÃO / Espessamento).

5.4 ANÁLISES GENÉTICAS

a) Polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR

A Figura 20 ilustra os resultados obtidos para identificação do polimorfismo no gene da enzima MTHFR (C677T), através da técnica de PCR-RFLP, em participantes deste estudo.

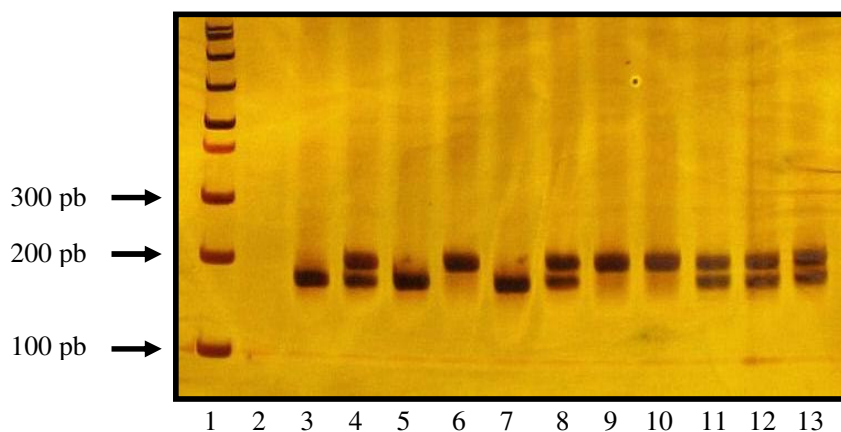


Figura 20: Identificação do polimorfismo no gene da enzima MTHFR (C677T).

Gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR seguida de digestão com a endonuclease de restrição Hinf I e eletroforese. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 2, branco da reação; na canaleta 7, banda de 175pb (controle homocigoto para o polimorfismo); na canaleta 8, uma banda de 198 e outra de 175pb (controle heterocigoto para o polimorfismo); nas canaletas 6, 9 e 10, banda de 198pb (indivíduos não portadores do polimorfismo); nas canaletas 3 e 5, banda de 175pb (indivíduos portadores do polimorfismo em homocigose); e nas canaletas 4, 11, 12 e 13, uma banda de 198 e outra de 175pb (indivíduos portadores do polimorfismo em heterocigose).

Tabela 55 – Frequência do polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) nas pacientes diabéticas

Polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR	Todas as pacientes	DM2		
		Sem alteração	Espessamento	Placa
n	64	25	15	24
Ausente (n, %)	28 (44)	9 (36)	8 (53)	11 (46)
Heterozigose (n, %)	33 (52)	14 (56)	7 (47)	12 (50)
Homozigose (n, %)	3 (4)	2 (8)	0 (0)	1 (4)

Tamanho do grupo (n), metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 56 – Avaliação da influência da presença do polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) nos níveis plasmáticos de homocisteína

Polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR	Pacientes diabéticas	Homocisteína (µmol/L)
Ausente	28	10,6 ± 2,9
Heterozigose	33	10,3 ± 3,9
Homozigose	3	10,8 ± 5,0

Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR). Não houve diferença significativa entre os grupos.

b) Polimorfismo da glicoproteína plaquetária GPIIIa (PI^A)

A Figura 21 ilustra os resultados obtidos para identificação do polimorfismo no gene da glicoproteína IIIa (PI^A), através da técnica de PCR-RFLP, em participantes deste estudo.

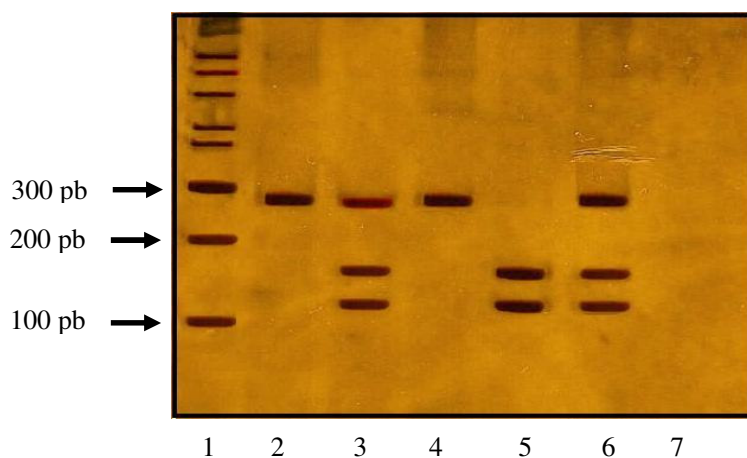


Figura 21: Identificação do polimorfismo na GPIIIa (PI^A).

Gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR seguida de digestão com a endonuclease de restrição Msp I e eletroforese. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 7, branco da reação; na canaleta 5, bandas de 157 e 125pb (controle homozigoto para o polimorfismo); na canaleta 6, bandas de 282, 157 e 125pb (controle heterozigoto para o polimorfismo); nas canaletas 2 e 4, banda de 282pb (indivíduos não portadores do polimorfismo); e na canaleta 3, bandas de 282, 157 e 125pb (indivíduo portador do polimorfismo em heterozigose).

Das amostras submetidas ao exame do polimorfismo GPIIIa, duas pacientes pertencentes ao subgrupo Espessamento não apresentaram material suficiente para análise.

Tabela 57 – Frequência do polimorfismo PI^A no gene da glicoproteína IIIa (GPIIIa) nas pacientes diabéticas

Polimorfismo PI^A no gene da GPIIIa	Todas as pacientes	DM2		
		Sem alteração	Espessamento	Placa
n	62	25	13	24
$PI^{A1, A1}$ (n, %)	50 (81)	21 (84)	7 (54) *	22 (92)
$PI^{A1, A2}$ (n, %)	11 (18)	3 (12)	6 (46) *	2 (8)
$PI^{A2, A2}$ (n, %)	1 (1)	1 (4)	0 (0)	0 (0)

Tamanho do grupo (n), $PI^{A1, A1}$ (ausência do polimorfismo), $PI^{A1, A2}$ (heterozigose), $PI^{A2, A2}$ (homozigose). Diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$ (* vs Placa).

6 DISCUSSÃO

Indivíduos diabéticos apresentam o mesmo risco cardíaco de indivíduos não diabéticos que já sofreram um evento cardiovascular (Mykkanen, 2000). Mulheres diabéticas apresentam um risco cardíaco semelhante ao de homens diabéticos, perdendo o efeito protetivo relacionado ao sexo feminino (Koerbel and Korytkowski, 2003). Dessa forma, é de grande interesse avaliar marcadores bioquímicos, hemostáticos e genéticos de mulheres diabéticas para melhor entender a evolução natural da doença e o efeito do tratamento.

Neste estudo podemos observar que a idade e o IMC não estão associados com a progressão da lesão macrovascular. Já o tempo de DM2 mostrou-se significativamente mais elevado nas pacientes do grupo Placa – Tabela 3.

Existem alguns pontos que devem ser considerados na análise desse parâmetro. O tempo de diabetes é uma variável pouco fidedigna para análise, uma vez que o momento de diagnóstico da doença não corresponde exatamente ao início da mesma. Dessa forma, a análise isolada do tempo de doença pode não corresponder exatamente aos achados clínicos. Os tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos interferem muito no quadro clínico, principalmente nos níveis glicêmicos. Mesmo sendo uma informação sujeita a erros, há plausibilidade biológica na associação de que quanto maior o tempo de exposição à hiperglicemia, maior é a progressão das lesões macrovasculares. Já o aumento da idade e a obesidade, independente do DM2, são fatores de risco para a DAC.

6.1 USO DE MEDICAMENTOS

Os resultados encontrados em relação ao uso de medicamentos dentro do grupo de mulheres com diabetes tipo 2 corresponderam ao esperado.

Em relação aos medicamentos para controle glicêmico, as frequências observadas para o uso de metformina não mostraram diferença significativa entre os grupos, mesmo tendo o grupo Placa apresentado uma frequência um pouco mais elevada. O grupo Sem alteração apresentou uma frequência significativamente menor de uso de insulina (8,0%), enquanto que os grupos Espessamento e Placa apresentaram frequências semelhantes (~40,0%) – Tabela 6.

Em relação ao uso de estatinas, não houve diferença entre as frequências observadas nos grupos, entretanto, pode-se observar diferenças entre os grupos em relação ao perfil lipídico (resultado que será posteriormente discutido). No primeiro momento o esperado era que a contribuição do uso de estatinas estivesse homogeneamente distribuída entre os grupos. Entretanto, na coleta de informações, esse dado foi avaliado de forma dicotômica (uso e não uso). Não foi levado em consideração qual o tipo de estatina nem a dosagem utilizada do medicamento, uma vez que o presente estudo não teve como desfecho primário a avaliação da influência do uso de medicamentos nas variáveis medidas.

Atualmente, sabe-se que as estatinas apresentam outros efeitos que não somente a redução dos níveis de colesterol. Sobre o sistema hemostático, alguns estudos sugerem que as estatinas atuam reduzindo a expressão de fator tecidual (FT) em monócitos e várias células vasculares, resultando em uma redução na geração de trombina. As estatinas também podem atuar sobre o endotélio reduzindo a liberação de TM para o plasma e aumentando a disponibilidade da TM sobre a superfície endotelial. Tal fato contribui para uma maior eficácia do sistema anticoagulante da proteína C, contribuindo para o potencial antitrombótico da estatina (Undas et al., 2005).

Alguns estudos têm sugerido que o uso de estatinas reduz o risco de desenvolvimento de DM2 em cerca de 30%, pois a estatina aumenta a sensibilidade da insulina (Danesh and Kanwar, 2004). Outro ponto relevante é que alguns estudos têm sugerido que os benefícios clínicos do uso de estatinas podem ser em parte independentes dos efeitos de redução do colesterol, influenciando até na redução de lesão renal nos indivíduos diabéticos (Danesh and Kanwar, 2004).

Em relação ao uso de beta-bloqueadores e de IECA as frequências observadas entre os grupos não diferiram significativamente.

6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

6.2.1 Perfil glicêmico

Em relação aos parâmetros de avaliação do controle glicêmico não houve diferença entre os subgrupos de acordo com o Doppler de carótida em relação às médias das glicemias de jejum (GLI) e pós-prandial (GLI PP). Quando comparados ao grupo-controle, todos os sub-grupos de pacientes diabéticas apresentaram diferença significativa em relação à glicemia de jejum – Tabela 8.

Dentre os parâmetros de avaliação do perfil glicêmico, a HbA1c foi o marcador que apresentou diferença significativa entre os subgrupos Placa e o Sem alteração. Esse parâmetro é utilizado para o monitoramento do controle glicêmico, uma vez que reflete a glicemia dos últimos 120 dias. Dessa forma, é possível inferir que o pobre controle glicêmico está associado à progressão da lesão macrovascular, independente da intervenção farmacológica.

Em relação à avaliação do controle glicêmico, nem a GLI, nem a GLI PP podem refletir fielmente os efeitos da exposição a longo prazo, já a HbA1c é um marcador mais confiável pelas suas características intrínsecas. Vários estudos prospectivos sugerem que o controle glicêmico ineficaz aumenta o risco cardiovascular (Fuller et al., 2001).

Na análise estratificada para uso de medicamentos, pode-se observar que, considerando o uso de metformina, o grupo que não usa metformina apresentou valor médio de HbA1c inferior ao grupo que usa o medicamento. Esse cenário sugere que mulheres que não necessitam de medicamentos para controle glicêmico são aquelas que apresentam melhor perfil glicêmico.

Um quadro semelhante foi observado na análise das pacientes quanto ao uso de insulina. As pacientes que não fazem uso de insulina apresentam valores médios mais baixos de GLI PP e HbA1c.

Considerando o uso de estatinas, não houve diferença em relação aos parâmetros de avaliação do perfil glicêmico. Entretanto, na subanálise de acordo com o Doppler de carótida, o grupo que usa estatina e tem Placa apresentou valores de HbA1c significativamente mais altos.

Considerando o uso de beta-bloqueadores e de IECA, não foram observadas diferenças significativas do perfil glicêmico, inclusive quando levado em consideração os resultados do Doppler de carótida. Tal fato confirma que esses medicamentos não influenciam no perfil glicêmico e que as pacientes estavam igualmente distribuídas nos subgrupos sob esse aspecto.

6.2.2 Perfil lipídico

Muitos estudos já comprovaram a associação de DAC e AVC com fatores de risco clássicos como hipertensão, hipercolesterolemia e tabagismo, entretanto, para a população diabética, há falta de consistência entre os resultados dos estudos devido ao caráter multifatorial do DM2. Indivíduos que não apresentam os fatores de risco clássicos, ainda assim, podem apresentar eventos de DAC e AVC e uma possível justificativa é o fato de que alterações qualitativas dos lípidos possam ser mais importantes que as alterações quantitativas nos indivíduos diabéticos (Fuller et al., 2001).

No presente estudo, a avaliação do perfil lipídico das pacientes diabéticas de acordo com o resultado do Doppler de carótida mostrou uma redução dos níveis de CT (Placa X Sem alteração $p=0,077$; Espessamento X Sem alteração $p=0,006$; ANOVA $\beta=0,766$) e LDLc (Placa X Sem alteração $p=0,008$; Espessamento X Sem alteração $p<0,001$; ANOVA $\beta=0,980$) com o agravamento da lesão macrovascular. Quando comparados com o grupo de mulheres não diabéticas (grupo-controle) de mesma faixa etária pode-se observar os valores mais reduzidos de CT e LDLc e uma

grande semelhança do grupo-controle com o grupo Sem alteração – Tabela 20. Tem-se também aumento de apoA-I no subgrupos Espessamento e Placa e redução do índice apoB/apoA-I no subgrupos Placa quando comparados com o grupo-controle.

Esse resultado apresentando valores de perfil lipídico mais satisfatórios nos subgrupos com maior agravamento da lesão macrovascular foi exaustivamente analisado.

As análises do perfil lipídico na classificação das pacientes quanto ao uso de metformina e insulina não mostraram diferença significativa entre os grupos, indicando que os medicamentos para controle glicêmico não influenciam no perfil lipídico. Para os medicamentos beta-bloqueador e IECA, também não houve diferença entre os grupos para a análise do perfil lipídico. Nas análises estratificadas para os subgrupos de acordo com o Doppler de carótida, as diferenças significativas mantiveram um perfil semelhante ao observado na análise primária segundo o Doppler de carótida.

O uso de estatinas foi analisado como covariável para investigar o resultado do perfil lipídico inverso ao esperado no delineamento do estudo. A intervenção farmacológica mais intensa comumente associada ao agravamento da doença, adoção de medidas não-farmacológicas (por exemplo: dieta, mudanças no hábito alimentar, exercícios físicos), adesão ao tratamento, são medidas mais aceitas pelas mulheres do que pelos homens, por isso são mais evidentes nesse grupo.

As intervenções farmacológica e não-farmacológica sobre o perfil lipídico confundem a análise da associação dos resultados ao grau de lesão macrovascular. Apesar das frequências de uso de estatinas entre os grupos terem sido semelhantes, isto não impediu que os grupos apresentassem resultados com uma tendência de associação inversa, isto é, quanto maior o grau de lesão macrovascular melhores foram os valores dos marcadores do perfil lipídico convencional.

Cabe ressaltar que no presente estudo não se investigou qual estatina estava sendo utilizada, nem a dosagem da mesma. A introdução do tratamento farmacológico, bem como a posologia adotada são norteadas pelos valores basais de LDLc das pacientes e pela disponibilidade do medicamento na rede pública. Segundo a equipe de endocrinologistas envolvida neste estudo, atualmente, somente são submetidas ao tratamento as pacientes que apresentam LDLc maior que

130mg/dL e a meta do tratamento é que os níveis reduzam a valores inferiores a 100mg/dL. A Tabela 25 confirma essa informação com valores médios de LDLc próximos de 100mg/dL.

Admite-se que quanto maior for a dislipidemia, maior também será a lesão macrovascular; conseqüentemente a intervenção farmacológica para o controle lipídico deverá ser mais utilizada, podendo ser pelo uso de estatinas mais eficazes ou pelo uso de dosagens maiores.

Segundo a literatura, a dislipidemia observada em indivíduos diabéticos caracteriza-se por aumento de TG e redução do HDLc, sendo que o LDLc não altera (Resnick and Howard, 2002). O aumento de LDLc não é característico do DM2, porém o uso de estatinas proporciona redução dos níveis de LDLc. Essa redução beneficia os pacientes diabéticos uma vez que o LDLc nesses indivíduos aparenta ser mais aterogênico devido às alterações qualitativas da molécula (Ruotolo and Howard, 2002).

A influência do uso de estatinas sobre as pacientes diabéticas proporcionou aumento do valor médio de HDLc, aumento de apoA-I ($\beta=0,937$) e redução do índice apoB/apoA-I ($\beta=0,831$). Não houve diferença significativa entre os níveis de CT, LDLc, TG, apoB e Lp(a) entre as mulheres diabéticas que usavam e as que não usavam estatinas.

Cabe ressaltar que no presente estudo foram excluídas as pacientes com TG maior que 400mg/dL e que o TG sofre grande influência da dieta, sendo assim, o resultado de uma única avaliação deve ser analisado com cautela.

Como a apoA-I é uma apolipoproteína estrutural da molécula de HDL (Frank and Marcel, 2000) e a apoB é estrutural do LDL (Relimpio et al., 2002), o aumento de HDLc no grupo de uso de estatinas está correlacionado ao aumento de apoA-I (Figura 7). A correlação entre aumento de HDLc e redução do índice apoB/apoA-I (Figura 8) segue a mesma correlação anteriormente citada. Já em relação à apoB não houve diferença significativa entre os grupos devido à ausência de diferença do LDLc que é o atual parâmetro alvo no tratamento da dislipidemia.

A análise das pacientes diabéticas que faziam uso de estatinas, estratificadas segundo o Doppler de carótida, mostra que os parâmetros LDLc ($\beta=0,959$) e índice apoB/apoA-I ($\beta=0,794$)

encontraram-se reduzidos nos subgrupos Espessamento e Placa, enquanto que o CT ($\beta=0,847$) e apoB encontraram-se reduzidos apenas no subgrupo Espessamento.

O subgrupo Espessamento, aparentemente, apresenta um melhor perfil de controle lipídico podendo ser decorrente de uma resposta mais eficiente à intervenção farmacológica e/ou clínica.

Na literatura já está bem descrito que o uso do índice supera as dosagens isoladas das apolipoproteínas, e que o índice apoB/apoA-I tem se mostrado um melhor preditor de risco cardiovascular que o LDLc e outros índice propostos (Walldius and Jungner, 2006). O índice apoB/apoA-I mantém a capacidade de avaliar o risco cardiovascular mesmo em paciente em uso de estatinas. No presente estudo, todos os grupos, em todas as análises, apresentaram valores médios dentro da categoria de risco baixo para infarto agudo do miocárdio (0,3 a 0,6) (Walldius and Jungner, 2006).

Outro fator que aumenta o poder de análise deste estudo está relacionado à avaliação de apenas um sexo. Mulheres usualmente apresentam uma maior adesão aos tratamentos farmacológico e não-farmacológico, formando grupos menos heterogêneos. Como o risco cardiovascular para mulheres aumenta em cinco vezes pela presença do diabetes, espera-se que as alterações observadas no perfil lipídico sejam as mais detalhadas.

Para a Lp(a) não foi observada diferença significativa entre os grupos, independente do tipo de agrupamento. Segundo o presente estudo, o aumento de Lp(a), aparentemente, não está associado ao diabetes tipo 2, não contribui para a formação de placas e não sofre influência do uso de estatinas. Um outro estudo conduzido no Brasil com pacientes diabéticos com acidente vascular cerebral apresentou perfil semelhante ao nosso estudo (Holanda et al., 2004).

Embora alguns trabalhos demonstrem aumento de Lp(a) em indivíduos diabéticos, pode-se observar que indivíduos diabéticos sem angiopatia apresentam valores de Lp(a) semelhantes aos valores do grupo-controle, e que o aumento efetivo de Lp(a) está presente nos pacientes diabéticos com DAC. Dessa forma, o aumento de Lp(a) pode estar associado à doença macrovascular grave, e não propriamente ao diabetes (Morishita et al., 1996).

No presente estudo o grupo Placa era composto por mulheres com placa aterosclerótica com estenose inferior a 50%, tal fato pode justificar a ausência de valores aumentados de Lp(a), uma vez que os casos mais graves da doença foram excluídos.

Uma das limitações deste estudo se refere à composição do grupo-controle. As mulheres participantes deste grupo não faziam uso de qualquer medicamento e também não faziam uso constante de medidas não-farmacológicas para controle de dislipidemia. Isso justifica, em parte, o achado de alguns valores médios superiores em relação às mulheres diabéticas. Outro viés deste estudo foi o fato de não ter sido realizado Doppler de carótida para o grupo-controle, justamente por elas não apresentarem fatores de risco clínicos para a solicitação desse exame.

Este estudo também apresenta limitações em relação ao tamanho dos grupos para avaliação do perfil lipídico (mesmo com valores de β maiores que 0,80 para alguns parâmetros) e pode estar sujeito a erros do tipo II, ou seja, os resultados devem ser interpretados com cautela e outros estudos são necessários para reforçar os achados. Por outro lado, o desenho do presente estudo buscou minimizar o efeito de diferentes variáveis no sentido de obter grupos mais homogêneos, nos quais as covariáveis, tais como hipertensão e uso de medicamentos, fossem incluídas com igual proporcionalidade nos grupos.

Desta forma, pode-se concluir que a avaliação isolada do perfil lipídico de mulheres com diabetes tipo 2 não reflete sobre o grau de lesão macrovascular, independente do uso ou não de estatinas.

6.2.3 Proteína C reativa ultra-sensível e homocisteína

Em relação aos parâmetros PCRus e Hcys não foi observada diferença significativa entre os subgrupos e nem em relação ao grupo-controle. Esses dois marcadores, em momentos diferentes, já

foram considerados marcadores fidedígnos de risco cardíaco, mas atualmente não ocupam o mesmo lugar de destaque.

Alguns estudos já demonstraram que esses marcadores não estão associados exclusivamente à doença macrovascular e que podem sofrer influência de outras condições. Dessa forma, o uso desses parâmetros como marcadores de risco ou de prognóstico está cada vez menos valorizados (van and Stehouwer, 2002, Dhingra et al., 2007), fato corroborado pelos achados do presente estudo.

O processo inflamatório é reconhecido como um fator associado ao processo aterotrombótico. O uso da PCRus como marcador inflamatório foi largamente estudado e foram estabelecidos pontos de estratificação: menor que 1mg/L (baixo risco); entre 1 e 3mg/L (risco moderado) e maior que 3mg/L (alto risco) para eventos cardiovasculares (Ridker, 2004). Alguns estudos observaram o aumento de PCRus como preditor de eventos cardiovasculares, inclusive para pacientes diabéticos (Ridker et al., 2000, Takebayashi et al., 2006, Pfutzner and Forst, 2006).

Ao longo do tempo, estudos como o da Universidade de Montreal (Moussavi et al., 2004) mostraram que pacientes com DM2, bem controlados e sem complicações macrovasculares também apresentavam níveis elevados de PCRus.

Atualmente, o uso da PCRus está sendo bem menor, pois indivíduos sem lesão macrovascular, mas com processo inflamatório apresentam valores elevados de PCRus e esse dado deve ser interpretado com cautela (Dhingra et al., 2007). Além disso, o uso de medicamentos como estatinas, IECA, beta-bloqueadores, antiinflamatórios, hipoglicemiantes, entre outros, também ocasionam redução dos valores de PCRus, sendo esse mais um interferente que exige interpretação cautelosa dos resultados (Prasad, 2006).

Como existem interferentes que podem aumentar e reduzir os valores de PCRus, os resultados do presente estudo permitem inferir que as pacientes avaliadas não estavam com processo inflamatório agudo, o que poderia estar associado ao aumento de outros marcadores que também são proteínas de fase aguda, como o fibrinogênio e o fator VIII.

A hiperhomocisteinemia é reconhecida como um fator de risco independente para a aterosclerose e trombose (Glueck et al., 1995). Valores reduzidos de homocisteína em pacientes diabéticos já foram descritos e atribuídos à poliúria encontrada no diabetes (Mazza et al., 2000), bem como valores aumentados (Soinio et al., 2004).

A ausência de diferença significativa entre os grupos no presente estudo, assim como a ausência de valores elevados pode ser decorrente do fato do grupo de mulheres avaliadas estarem bem controladas em relação à doença de base, bem como não serem tabagistas, hábito associado ao aumento dos níveis de homocisteína.

Também não foi encontrada diferença significativa para esses marcadores na análise estratificada quanto ao uso de medicamentos.

6.3 PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS

Marcadores de lesão endotelial

O fator de von Willebrand (fvW) é uma glicoproteína multimérica sintetizada por megacariócitos e células endoteliais (Ouvina et al., 2001). O fvW atua na adesão plaquetária ao subendotélio e o aumento plasmático desse marcador está relacionado à lesão endotelial pois uma das organelas que armazenam fvW são os corpos de Weibel-Palade, presentes no citoplasma das células endoteliais (Ruggeri, 2003).

No presente estudo não foi observado diferença significativa entre os subgrupos de acordo com o Doppler de carótida (Tabela 44), mas pode-se observar uma tendência de aumento de fvW no grupo Placa. Na análise de variância o valor p encontrado foi de 0,056.

Muitos estudos epidemiológicos demonstram claramente que níveis elevados de fvW predizem o desenvolvimento e/ou a progressão de doenças cardiovasculares. Estudos

intervencionais mostraram que o fato de parar de fumar, o tratamento da hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes e hiperhomocisteinemia promovem redução dos níveis de fvW (Blann and Lip, 1998). A disfunção endotelial, evidenciada pelo aumento de fvW, precede o DM2 (Meigs et al., 2006) e há uma associação positiva entre o aumento de fvW e a progressão da disfunção microvascular (Hirano et al., 2000) e macrovascular (Blann and Lip, 1998) no diabetes.

Considerando o uso de metformina e insulina, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para o marcador fvW. Aparentemente, o controle glicêmico não está diretamente associado ao aumento plasmático de fvW.

Segundo o uso de estatinas, o grupo que não utilizava estatina apresentou valor médio de fvW inferior ao grupo que estava em uso. Tal resultado sugere que as pacientes que faziam uso de estatina apresentavam lesão endotelial mais exarcebada, independente do grau de lesão macrovascular.

Em relação ao uso de beta-bloqueador, o grupo que não usava o medicamento apresentou valor médio significativamente mais aumentado que o grupo que fazia uso. Sabe-se que pacientes hipertensos apresentam um estresse por cisalhamento que ocasionam lesão endotelial (Blann and Lip, 1998). Na análise estratificada pelo Doppler de carótida foi possível observar diferença significativa entre os grupos para as pacientes que não faziam uso de beta-bloqueador. O grupo Placa apresentou valor médio de fvW mais alto que o grupo Sem alteração.

Considerando o uso de IECA não houve diferença sinificativa entre os grupos, entretanto, na análise estratificada, pode-se observar uma tendência de aumento do fvW com o agravamento do resultado do Doppler de carótida. Nesse caso da análise estratificada, pode ter ocorrido um erro do tipo II devido à pequena amostragem em cada subgrupo.

Outro mecanismo envolvido na regulação dos níveis plasmáticos de fvW, porém não abordado no presente estudo, é a ação da A Desintegrina e Metaloproteinase com sítio de Trombospondina tipo 1, membro 13 (ADAMTS-13) que promove a clivagem do fvW. A deficiência de ADAMTS-13, bem como a presença de anticorpos contra ADAMTS-13, faz com que

haja aumento de fvW e aumento da ocorrência de trombose em pequenas artérias (Ruggeri, 2003, Rieger et al., 2005).

A trombomodulina (TM) é uma glicoproteína presente na superfície da membrana das células endoteliais e está funcionalmente envolvida no processo de ativação da PC (Aso et al., 2000). O aumento das concentrações plasmáticas de TM reflete o grau de lesão endotelial (Weiler and Isermann, 2003).

No presente estudo não foi encontrado diferença significativa entre os níveis de TM nos subgrupos de mulheres diabéticas de acordo com o grau de lesão macrovascular segundo o Doppler de carótida.

Nas análises quanto ao uso de medicamentos, também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para o marcador TM. Tal fato permite inferir que no presente estudo, o marcador TM não sofreu interferência frente as diferentes condições avaliadas para as pacientes diabéticas. Como já referido anteriormente, o uso de estatinas atua sobre o endotélio podendo reduzir a liberação de TM para o plasma, bem como aumentar a expressão de TM sobre o endotélio (Undas et al., 2005).

Outro estudo avaliando a progressão da lesão microvascular em indivíduos com DM2 mostrou que a TM era um bom marcador somente nos quadros mais acentuados de lesão (Hirano et al., 2000). Como no presente estudo as pacientes aparentemente estavam bem controladas, tal fato pode justificar a ausência de diferença entre os grupos.

Marcador de ativação da cascata de coagulação

O fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) é um fragmento gerado na conversão de protrombina em trombina, refletindo a ativação da cascata da coagulação (van der Putten et al.,

2006). No presente estudo não foi observado diferença significativa entre os subgrupos, entretanto pode-se observar uma leve tendência de aumento de valores médios – Tabela 44.

Na análise estratificada de acordo com o uso de medicamentos também não foi encontrada diferença significativa para o marcador F1+2.

Estudos envolvendo pacientes com DM2 já demonstraram aumento de F1+2 (Yamada et al., 2000, Mascia et al., 2000, Carr, 2001). Porém, como já mencionado, o DM2 é uma patologia multifatorial e a causa de aumento de F1+2 nesses estudos pode ser decorrente de outras condições presentes na síndrome, ou mesmo pela presença de pacientes apresentando um estágio mais complicado da doença.

Outro fator que pode influenciar nos resultados de F1+2 é a meia-vida do fragmento que é de 90 minutos, bem como a formação do fragmento *in vitro* (após a coleta de sangue) (van der Putten et al., 2006). Uma alternativa para confirmar o aumento de F1+2 é a realização de dosagens seriadas e a execução de estudos de acompanhamento para verificar a associação desse marcador com o risco cardiovascular.

Marcadores do sistema fibrinolítico

Os resultados do presente estudo mostraram uma associação positiva entre aumento de D-Di e aumento do comprometimento macrovascular em mulheres com DM2 (subgrupo Placa) sem eventos clínicos prévios, indicando uma maior formação de fibrina ($p < 0,05$; $\beta = 0,670$).

A elevação dos níveis plasmáticos de D-Di indica uma exarcebação na formação de fibrina além de confirmar a atuação do sistema fibrinolítico, caracterizando um quadro de hipercoagulabilidade (Matsuo et al., 2000).

A literatura apresenta dados controversos, mostrando aumento, redução e nenhuma alteração dos níveis de D-Di em pacientes diabéticos quando comparados aos não-diabéticos (Sumida et al.,

1997, Carr, 2001). Dessa forma, mais uma vez é reforçada a idéia de que outros parâmetros, e não a presença exclusiva do diabetes venha explicar o estado de hipercoagulabilidade nessa doença.

O aumento de D-Di já foi descrito na progressão da lesão microvascular (Wakabayashi and Masuda, 2007) e macrovascular (Nwose et al., 2007) de indivíduos com DM2.

No presente estudo todos os grupos apresentaram indivíduos com valores de D-Di acima do valor de referência, porém, pode-se observar o aumento significativo do marcador hemostático no grupo com maior comprometimento macrovascular (Figura 12).

A possível detecção da formação de fibrina antes da ocorrência de um evento trombótico é de grande valia, uma vez que poderá contribuir para a adoção de medidas profiláticas mais incisivas, contribuindo para a qualidade de vida dos pacientes diabéticos. Entretanto, a análise isolada desse parâmetro não permite estabelecer novas intervenções terapêuticas, necessitando da análise combinada com outros parâmetros hemostáticos para compreender melhor o processo envolvido na doença.

O marcador D-Di está muito bem estabelecido no uso de exclusão de trombose venosa profunda (TVP) devido ao seu alto valor preditivo negativo (VPN). Entretanto, o achado de níveis aumentados de D-Di está sendo largamente estudado, pois se sabe que pode estar relacionado a várias doenças e/ou condições, mas nada ainda está consolidado em relação a esse aspecto.

Na análise de acordo com o uso de medicamentos somente para estatina foi encontrada diferença significativa entre os grupos. O grupo que não fazia uso de estatina apresentou média de D-Di inferior ao grupo que fazia uso. Na análise dos subgrupos, o grupo Placa, sistematicamente apresentou valor de média superior aos demais grupos, independente da estratégia de análise. Tal resultado permite concluir que, apesar da intervenção terapêutica adotada, há uma associação positiva entre o aumento da lesão macrovascular de mulheres diabéticas e aumento de ativação da cascata da coagulação.

Para o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) não foi observado diferença significativa entre os subgrupos, entretanto, pode-se observar uma discreta redução do valor médio

no grupo Placa. Quando comparadas ao grupo-controle, as pacientes diabéticas apresentam valores aumentados de PAI-1. Sabe-se que os níveis elevados de PAI-1 precedem o aparecimento do diabetes e possivelmente esse aumento está associado à síndrome metabólica (Festa et al., 2006, Grant, 2007).

Os níveis de PAI-1 aumentam com o avanço da idade, apresentando nível médio de 50 a 60ng/mL, e variam desde níveis indetectáveis até valores superiores à 200ng/mL. Esse fato se justifica porque há uma variação circadiana na qual se observa níveis mais elevados na parte da manhã. Essa variação circadiana pode ter influência direta sobre o pico circadiano de incidência de infarto agudo do miocárdio (IAM) (Vaughan, 2005).

No presente estudo os níveis de PAI-1 das pacientes diabéticas apresentaram-se elevados, conforme esperado, entretanto não houve associação positiva com a progressão macrovascular. A coleta de todas as pacientes foi realizada no período da manhã, o que minimiza a variação circadiana e corresponde possivelmente aos níveis mais elevados que as pacientes possam apresentar ao longo do dia.

Independente da análise realizada, considerando o uso de medicamentos, não houve diferença significativa entre os grupos para o marcador PAI-1. Como o PAI-1 atua inibindo a fibrinólise, favorecendo a permanência do coágulo de fibrina, especula-se que, se as pacientes apresentassem níveis mais baixos de PAI-1, poderiam ser encontrados níveis mais elevados de D-Di. No presente estudo não foi observada correlação entre os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1.

Fatores de coagulação

O fator VII é uma proteína vitamina K dependente sintetizada pelo fígado (Grant, 2007). O aumento de fator VII está relacionado à dislipidemia, especialmente ao aumento de TG e

quilomícrons. O fator VII se liga às partículas de VLDL ricas em TG e a deficiência no catabolismo do VLDL prolonga a meia-vida do fator VII, aumentando os níveis plasmáticos (Grant, 2007).

O fator VII ativado em complexo com o FT ativa os fatores X e IX, seqüência que precede a formação de fibrina (Furie and Furie, 1992, Rao et al., 1999, Dahlback, 2000). Sendo assim, o aumento de VII favorece a formação de fibrina e predispõe ao estado de hipercoagulabilidade.

Para o fator VII, no presente estudo, não foi observado diferença significativa entre os subgrupos de acordo com o Doppler de carótida. Entretanto, pacientes com dislipidemia grave (TG maior que 400mg/dL) foram excluídas do estudo.

Sabe-se que pacientes em uso de estatinas apresentam redução dos níveis plasmáticos de fator VII (Undas et al., 2005).

Dentre as pacientes que não faziam de insulina, o subgrupo Placa apresentou valor médio de fator VII inferior ao subgrupo Espessamento. O mesmo foi observado para as pacientes que não faziam uso de estatina. Como não há associação direta entre a lesão macrovascular e níveis reduzidos de fator VII, esse achado pode ter sido fortuito, uma vez que os valores médios dos subgrupos estão dentro dos valores de normalidade.

O fator VIII é uma glicoproteína que circula no plasma ligado ao fvW. Após ser ativado pela trombina, o fator VIII dissocia do fvW e passa a compor um complexo enzimático junto com o fator IX, denominado complexo tenase, que ativa o fator X (Duncan et al., 1999, Dahlback, 2000).

O aumento dos níveis de fator VIII no diabetes já é largamente conhecido (Duncan et al., 1999, Rao et al., 1999, Carr, 2001, Grant, 2007), porém pouco se sabe se há ou não associação do aumento dos níveis do fator com a progressão da lesão macrovascular.

Para o fator VIII, no presente estudo – Figura 15, foi observado diferença significativa entre os subgrupos Sem alteração e Espessamento e entre os subgrupos Sem alteração e Placa ($p=0,005$; $\beta=0,910$). Houve uma associação positiva entre o aumento da lesão macrovascular e o aumento dos níveis de fator VIII.

O aumento de fator VIII é sabidamente um fator de risco para eventos trombóticos (Tripodi and Mannucci, 2001). Como o fator VIII é também uma proteína de fase aguda poderia se atribuir o aumento de VIII a um processo inflamatório decorrente da lesão macrovascular ou outra patologia inflamatória subclínica. Entretanto, tal hipótese não foi confirmada uma vez que na avaliação da PCRus, outra conhecida proteína de fase aguda, não houve diferença significativa entre os subgrupos e nem foi encontrada correlação positiva entre os dois marcadores. Dessa forma, pode-se especular que o aumento de fator VIII nas pacientes diabéticas classificadas segundo o Doppler de carótida é independente de processo inflamatório. O presente estudo não permite concluir se o aumento de fator VIII é causa ou efeito da lesão macrovascular, apenas que há uma associação entre as duas variáveis favorecendo a ocorrência de um evento trombótico.

Independente do uso de medicamentos o aumento de fator VIII com a progressão da lesão macrovascular foi consistente. Dessa forma, pode-se inferir que em pacientes diabéticas têm-se aumento de fator VIII independente da terapêutica dotada. Corroborando ao achado do presente estudo, outros estudos mostram que não há efeito do uso de estatina sobre os níveis plasmáticos de fator VIII, bem como nos níveis de fvW (Undas et al., 2005).

O fibrinogênio (FIB) é a última proteína envolvida na cascata da coagulação que, quando clivado pela trombina, leva à formação do coágulo de fibrina. O fibrinogênio é sintetizado pelo fígado e é uma importante proteína de fase aguda (Furie and Furie, 1992, Duncan et al., 1999, Dahlback, 2000, Mosesson, 2005).

Níveis elevados de FIB têm se mostrado, consistentemente, nos estudos epidemiológicos, como um forte e independente fator de risco cardiovascular (Grant, 2007). Nos pacientes com diabetes vários estudos já observaram aumento de fibrinogênio (Duncan et al., 1999, Carr, 2001).

No presente estudo pode-se observar aumento do fibrinogênio no grupo Placa em relação ao grupo Sem alteração ($p=0,018$) – Figura 16.

O padrão de comportamento do fibrinogênio foi semelhante ao fator VIII, porém em menor proporção. A associação positiva entre a lesão macrovascular e o aumento dos níveis de

fibrinogênio foi independente da terapêutica adotada no tratamento das pacientes e pode estar associada ao mesmo processo envolvido no aumento do fator VIII.

O efeito das estatinas sobre as concentrações de fibrinogênio também já foi extensivamente estudado. Alguns estudos já mostraram aumento e redução, mas a maioria dos relatos se refere à ausência de alteração nos níveis de fibrinogênio. A maioria dos estudos que utilizam o método de Clauss conclui que as estatinas não alteram as concentrações de fibrinogênio (Undas et al., 2005). No presente estudo o mesmo foi observado, utilizando a mesma metodologia de dosagem.

Entretanto, uma característica particular ao DM, independente do aumento dos níveis plasmáticos, é a alteração do padrão de formação de fibrina ocasionada pela glicação do fibrinogênio. O fibrinogênio glicado forma uma fibrina com fibras mais finas e mais densas, que é resistente à fibrinólise. A fibrina glicada promove uma menor interação com o t-PA e com o plasminogênio, gerando menos plasmina e aumentando a ligação da antiplasmina. Tal condição favorece a permanência da fibrina, quando formada, favorecendo o desenvolvimento de novos coágulos (Carr, 2001, Grant, 2007). Logo, os níveis de D-Di, importante marcador de hipercoagulabilidade, podem estar subestimados em virtude da menor geração de plasmina, enzima responsável pela quebra da fibrina.

Anticoagulantes naturais

A proteína C (PC) é uma proteína dependente da vitamina K com atividade anticoagulante. A trombina quando se liga à trombomodulina sobre a superfície da célula endotelial é capaz de ativar a PC quando ligada ao receptor endotelial de PC (EPCR). A PC ativada (PCa) inativa os cofatores Va e VIIIa da cascata da coagulação. Alterações qualitativas e quantitativas da trombomodulina sobre a superfície endotelial podem comprometer a ação da PC (Esmon, 2000).

A antitrombina (AT) é uma glicoproteína de 58KDa sintetizada pelo fígado; é o anticoagulante natural mais importante nos mamíferos (Quinsey et al., 2004). A AT, preferencialmente, inibe as enzimas livres de complexos, como a trombina (Dahlback, 2000) e a ação enzimática é potencializada pela heparina (Furie and Furie, 1992).

As deficiências de PC e AT são fatores de risco para eventos trombóticos (Tripodi and Mannucci, 2001), já que ambas são essenciais para a eficiência dos principais mecanismos de anticoagulação natural.

No presente estudo não houve diferença significativa entre os subgrupos de pacientes diabéticas de acordo com o Doppler de carótida para os parâmetros PC e AT. Nenhuma paciente avaliada apresentou deficiência de PC ou AT.

O subgrupo Sem alteração quando comparado com o grupo-controle apresentou valor médio de AT significativamente mais baixo, entretanto, esse achado não tem significado clínico. O mesmo foi observado entre as pacientes classificadas de acordo com o uso de insulina e uso de IECA.

6.4 ANÁLISES GENÉTICAS

A hiperhomocisteinemia é reconhecida como um fator de risco para doenças cardiovasculares. O aumento dos níveis de homocisteína pode ser decorrente de mutações nas enzimas envolvidas nas vias de metabolismo. O polimorfismo C677T na enzima MTHFR em hetero e homozigose reduz a atividade da enzima tornando-a termolábil. Indivíduos com o polimorfismo C677T em homozigose apresentam níveis mais elevados de homocisteína. Por esse motivo, o polimorfismo na enzima MTHFR tem sido estudado, pois pode representar um fator de risco genético para a doença vascular (Frosst et al., 1995, Glueck et al., 1995).

Alguns estudos já mostraram associação do polimorfismo com a doença microvascular diabética (Neugebauer et al., 1998, Noiri et al., 2000), ausência de associação entre o polimorfismo

e os níveis de homocisteína em pacientes com DM2 (Mazza et al., 2000) e associação do polimorfismo com a doença macrovascular diabética (Sun et al., 2005).

Na análise da frequência do polimorfismo C677T para o gene da enzima MTHFR, no presente estudo, não foi encontrada diferença significativa entre a frequência descrita na literatura (Arruda et al., 1998) e nem entre os subgrupos de análise.

Não foi observada também associação entre níveis aumentados de homocisteína e a presença do polimorfismo em homozigose.

O presente estudo muito se assemelha a um estudo italiano (Scaglione et al., 2002) com pacientes com DM2 no qual também não foi encontrada associação entre níveis aumentados, polimorfismo na MTHFR e lesão macrovascular avaliada por Doppler de carótida.

A glicoproteína GPIIIa da superfície de plaquetas é um receptor de membrana para o fibrinogênio e fvW e tem um papel importante na agregação plaquetária. A presença do alelo A2 na GPIIIa em homozigose está associada com um aumento de três vezes do risco para doença cardiovascular (Pamukcu et al., 2005).

A presença do polimorfismo em indivíduos diabéticos é a mesma observada na população em geral (Kozieradzka et al., 2007) e muito se assemelha à frequência observada no presente estudo para o total de pacientes diabéticas.

A frequência observada no subgrupo Espessamento que diferiu da frequência do subgrupo Placa pode ter ocorrido devido ao “n” pequeno do subgrupo Espessamento, incorrendo em um erro do Tipo I. Esse resultado deve ser interpretado com cautela e o recomendado seria ampliar o grupo para confirmar ou refutar o achado. O resultado também não apresenta plausibilidade biológica, pois o esperado seria que o subgrupo Placa apresentasse uma maior frequência do alelo A2, caso a presença do polimorfismo realmente estivesse envolvido na progressão da lesão macrovascular.

Outros estudos concordam com a não associação entre o polimorfismo da GPIIIa e a progressão das lesões micro e macrovasculares no DM2 (Carter et al., 1998, Scaglione et al., 2000).

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A população mundial tem apresentado uma maior sobrevivência em função da melhoria da assistência à saúde, bem como do acesso à população menos favorecida, dentre outros aspectos. Por outro lado, com o envelhecimento aumenta a incidência das doenças crônicas, notadamente o *Diabetes mellitus*, causa de grande morbidade e mortalidade. Portanto, tornam-se prementes estudos adicionais para um melhor entendimento sobre a fisiopatologia dessa doença e co-morbidades associadas, nos diversos estágios de evolução, o que poderá impactar favoravelmente o diagnóstico, intervenção e prognóstico. Além do mais, é amplamente sabido pela comunidade científica que mudanças no estilo de vida e controle rigoroso dos fatores de risco desencadeantes do diabetes (prevenção primária) podem reduzir o número de portadores desse distúrbio. Assim, a adoção de dieta adequada, realização de exercícios físicos regulares, assistência e tratamento das co-morbidades, além de acompanhamento por profissionais especializados, são algumas das medidas que podem modificar positivamente a história natural da doença contribuindo para a melhoria de vida dos pacientes.

Este estudo pretende ter respondido os objetivos propostos, mesmo apresentando algumas limitações. Admite-se que o “n” reduzido de amostras estudadas, bem como o caráter multifatorial do DM2, tenham ocasionado o achado de resultados fortuitos, dificultando a devida interpretação para alguns parâmetros avaliados. Todavia, cumpre ressaltar que o desenho do presente estudo buscou minimizar fatores confusionais em decorrência de covariáveis como hipertensão e uso de medicamentos. Dessa forma, tais covariáveis foram criteriosamente observadas para que os subgrupos de estudo apresentassem proporcionalidade similar desses interferentes.

Além da seleção criteriosa dos grupos e do rigor na execução dos métodos laboratoriais, um aspecto positivo a ser levantado consiste no fato de que o presente estudo, obtido em nosso meio,

reflete o que acontece em parte da nossa população que certamente difere dos estudos americanos, europeus e asiáticos.

Por outro lado, ao longo da execução deste estudo, outros aspectos relevantes foram vislumbrados motivando interessantes discussões, novas idéias para pesquisas e melhoramentos na condução experimental. O grupo de estudos dos Laboratórios de Hematologia Clínica, Bioquímica Clínica e Biologia Molecular pretende, em breve, dar seguimento à análise do perfil hemostático, dentre outros aspectos, dos indivíduos com diabetes tipo 2.

Alguns parâmetros de interesse do grupo são, à priori: investigação da frequência de polimorfismo de hemocromatose, polimorfismo do PAI-1, níveis plasmáticos de LDL oxidada, investigação do grupo ABO, polimorfismo na ADAMTS 13, entre outros.

7 CONCLUSÕES

Após a análise, discussão e interpretação dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1 – A avaliação isolada do perfil lipídico de mulheres diabéticas, após intervenção clínica e farmacológica, não pode ser utilizada para inferir sobre o grau de lesão macrovascular, ou seja, sobre o agravamento da doença.

2 – As alterações no sistema hemostático de mulheres com DM2 e maior comprometimento macrovascular, avaliado pelo Doppler de carótida, foram evidenciadas pelo aumento de dímero D, fibrinogênio e notadamente, fator VIII.

3 – O aumento dos níveis de PAI-1 nas mulheres com DM2 não está associado à progressão da lesão macrovascular.

4 – Não foram observados níveis elevados de marcadores de lesão endotelial, tais como homocisteína e trombomodulina em função do agravamento da lesão macrovascular, embora tenha sido observada tendência de aumento dos níveis plasmáticos do fator von Willebrand.

5 – A presença do polimorfismo no gene da enzima MTHFR não interferiu nos níveis plasmáticos de homocisteína.

6 – Os resultados obtidos sugerem, com exceção do fibrinogênio, dímero D e fator VIII, que a formação da placa carotídea, configurando o agravamento precoce da doença, parece não estar associada aos outros fatores estudados nas pacientes com DM2, nas condições descritas.

***8 REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Arruda V R, Siqueira L H, Goncalves M S, von Zuben P M, Soares M C, Menezes R, nnichino-Bizzacchi J M, Costa F F. Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998; (78): 332-335.
- Aso Y, Fujiwara Y, Tayama K, Takebayashi K, Inukai T, Takemura Y. Relationship between soluble thrombomodulin in plasma and coagulation or fibrinolysis in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2000; (301): 135-145.
- Blann A D, Lip G Y. The endothelium in atherothrombotic disease: assessment of function, mechanisms and clinical implications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; (9): 297-306.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; (414): 813-820.
- Carr M E. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications* 2001; (15): 44-54.
- Carter A M, Mansfield M W, Grant P J. Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998; (15): 315-319.
- Cheng D. Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutr Metab (Lond)* 2005; (2): 29.
- Chobanian A V, Bakris G L, Black H R, Cushman W C, Green L A, Izzo J L, Jr., Jones D W, Materson B J, Oparil S, Wright J T, Jr., Roccella E J. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; (42): 1206-1252.
- Dahlback B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 2005; (257): 209-223.
- Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet* 2000; (355): 1627-1632.
- Danesh F R, Kanwar Y S. Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J* 2004; (18): 805-815.

- Davis T M, Millns H, Stratton I M, Holman R R, Turner R C. Risk factors for stroke in type 2 diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) 29. *Arch Intern Med* 1999; (159): 1097-1103.
- DeFronzo R A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med* 1997; (50): 191-197.
- Dhingra R, Gona P, Nam B H, D'Agostino R B, Sr., Wilson P W, Benjamin E J, O'Donnell C J. C-reactive protein, inflammatory conditions, and cardiovascular disease risk. *Am J Med* 2007; (120): 1054-1062.
- Dijk J M, van der G Y, Bots M L, Grobbee D E, Algra A. Carotid intima-media thickness and the risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the SMART study. *Eur Heart J* 2006; (27): 1971-1978.
- Dodson P M. Hypertension and diabetes. *Curr Med Res Opin* 2002; (18 Suppl 1): s48-s57.
- Du X L, Edelstein D, Rossetti L, Fantus I G, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; (97): 12222-12226.
- Dufour D R, Lott J A, Nolte F S, Gretch D R, Koff R S, Seeff L B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 2000; (46): 2050-2068.
- Duncan B B, Schmidt M I, Offenbacher S, Wu K K, Savage P J, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care* 1999; (22): 767-772.
- Esmon C T. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003; (1): 1343-1348.
- Esmon C T. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000; (1477): 349-360.
- Festa A, Williams K, Tracy R P, Wagenknecht L E, Haffner S M. Progression of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen levels in relation to incident type 2 diabetes. *Circulation* 2006; (113): 1753-1759.
- Fioretto P, Stehouwer C D, Mauer M, Chiesura-Corona M, Brocco E, Carraro A, Bortoloso E, van H, V, Crepaldi G, Nosadini R. Heterogeneous nature of microalbuminuria in NIDDM: studies of endothelial function and renal structure. *Diabetologia* 1998; (41): 233-236.

- Fodinger M, Mannhalter C, Wolf G, Pabinger I, Muller E, Schmid R, Horl W H, Sunder-Plassmann G. Mutation (677 C to T) in the methylenetetrahydrofolate reductase gene aggravates hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; (52): 517-523.
- Frank P G, Marcel Y L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* 2000; (41): 853-872.
- Frosst P, Blom H J, Milos R, Goyette P, Sheppard C A, Matthews R G, Boers G J, den H M, Kluijtmans L A, van den Heuvel L P, . A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; (10): 111-113.
- Fuller J H, Stevens L K, Wang S L. Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: the WHO Mutinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001; (44 Suppl 2): S54-S64.
- Furie B, Furie B C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992; (326): 800-806.
- Genuth S, Alberti K G, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler W C, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; (26): 3160-3167.
- Glueck C J, Shaw P, Lang J E, Tracy T, Sieve-Smith L, Wang Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 1995; (75): 132-136.
- Goldberg I J. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; (86): 965-971.
- Graner M, Varpula M, Kahri J, Salonen R M, Nyyssonen K, Nieminen M S, Taskinen M R, Syvanne M. Association of carotid intima-media thickness with angiographic severity and extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2006; (97): 624-629.
- Grant P J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* 2007; (262): 157-172.
- Hirano T, Ookubo K, Kashiwazaki K, Tajima H, Yoshino G, Adachi M. Vascular endothelial markers, von Willebrand factor and thrombomodulin index, are specifically elevated in type 2 diabetic patients with nephropathy: comparison of primary renal disease. *Clin Chim Acta* 2000; (299): 65-75.
- Holanda M M, Filizola R G, Costa M J, Andrade R V, Silva J A. Plasma lipoprotein(A) levels: a comparison between diabetic and non-diabetic patients with acute ischemic stroke. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; (62): 233-236.

- Ibanez B, Vilahur G, Badimon J J. Plaque progression and regression in atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; (5 Suppl 1): 292-299.
- Juhan-Vague I, Alessi M C, Vague P. Thrombogenic and fibrinolytic factors and cardiovascular risk in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* 1996; (28): 371-380.
- Kashiwazaki K, Hirano T, Yoshino G, Kurokawa M, Tajima H, Adachi M. Decreased release of lipoprotein lipase is associated with vascular endothelial damage in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 1998; (21): 2016-2020.
- Keating F K, Sobel B E, Schneider D J. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2003; (92): 1362-1365.
- Koerbel G, Korytkowski M. Coronary heart disease in women with diabetes. *Diabetes Spectrum* 2003; (16): 148-153.
- Kopelman P G. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; (404): 635-643.
- Kottke-Marchant K, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2002; (126): 133-146.
- Kozieradzka A, Kaminski K, Pepinski W, Janica J, Korecki J, Szepietowska B, Musial W J. The association between type 2 diabetes mellitus and A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa gene. *Acta Diabetol* 2007; (44): 30-33.
- Kuhne T, Hornstein A, Semple J, Chang W, Blanchette V, Freedman J. Flow cytometric evaluation of platelet activation in blood collected into EDTA vs. Diatube-H, a sodium citrate solution supplemented with theophylline, adenosine, and dipyridamole. *Am J Hematol* 1995; (50): 40-45.
- Leiva E, Mujica V, Orrego R, Prieto M, Arredondo M. Apolipoprotein E polymorphism in type 2 diabetic patients of Talca, Chile. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; (68): 244-249.
- Lijnen H R, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol* 1995; (8): 277-290.
- Lux S E, Stossel T P, Handin R I. *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- Mascia F, Paoletti P, Mameli G, Mamusa A M, Cirillo R, Marongiu F. Dermatan sulphate, heparin cofactor II, and F1+2 peptide in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Res* 2000; (97): 263-265.

- Matsuo T, Kobayashi H, Kario K, Suzuki S. Fibrin D-dimer in thrombogenic disorders. *Semin Thromb Hemost* 2000; (26): 101-107.
- Mazza A, Giugliano D, Motti C, Cortese C, Andreotti F, Marra G, Nulli A. Glycemia, MTHFR genotype and low homocysteine in uncomplicated type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2000; (149): 223-224.
- Meigs J B, Mittleman M A, Nathan D M, Tofler G H, Singer D E, Murphy-Sheehy P M, Lipinska I, D'Agostino R B, Wilson P W. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA* 2000; (283): 221-228.
- Meigs J B, O'Donnell C J, Tofler G H, Benjamin E J, Fox C S, Lipinska I, Nathan D M, Sullivan L M, D'Agostino R B, Wilson P W. Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2006; (55): 530-537.
- Morishita E, Asakura H, Jokaji H, Saito M, Uotani C, Kumabashiri I, Yamazaki M, Aoshima K, Hashimoto T, Matsuda T. Hypercoagulability and high lipoprotein(a) levels in patients with type II diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1996; (120): 7-14.
- Mosesson M W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; (3): 1894-1904.
- Moussavi N, Renier G, Roussin A, Mamputu J C, Buithieu J, Serri O. Lack of concordance between plasma markers of cardiovascular risk and intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2004; (6): 69-77.
- Mykkanen L. Prevention of coronary heart disease in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl* 2000;40-45.
- Nazimek-Siewniak B, Moczulski D, Grzeszczak W. Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes: results of longitudinal study design. *J Diabetes Complications* 2002; (16): 271-276.
- Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy in NIDDM patients. *Lancet* 1998; (352): 454.
- Noiri E, Taguchi J, Nakao A, Fujita T. MTHFR gene polymorphism as an exacerbation factor of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. Analysis in Japanese male hemodialysis patients. *Diabetes Care* 2000; (23): 260.
- Nwose E U, Richards R S, Jelinek H F, Kerr P G. D-dimer identifies stages in the progression of diabetes mellitus from family history of diabetes to cardiovascular complications. *Pathology* 2007; (39): 252-257.

- Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T, Amemiya H, Fujiwara H, Kawata K, Saito M, Kikuchi S, Noguchi Y, Sugishita Y, Hamaguchi H. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. *Atherosclerosis* 1998; (137): 23-28.
- Ouvina S M, La Greca R D, Zanaro N L, Palmer L, Sasseti B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res* 2001; (102): 107-114.
- Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y. The role of platelet glycoprotein IIIa polymorphism in the high prevalence of in vitro aspirin resistance in patients with intracoronary stent restenosis. *Am Heart J* 2005; (149): 675-680.
- Pfutzner A, Forst T. High-sensitivity C-reactive protein as cardiovascular risk marker in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2006; (8): 28-36.
- Prasad K. C-reactive protein (CRP)-lowering agents. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; (24): 33-50.
- Quinsey N S, Greedy A L, Bottomley S P, Whisstock J C, Pike R N. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; (36): 386-389.
- Rao A K, Chouhan V, Chen X, Sun L, Boden G. Activation of the tissue factor pathway of blood coagulation during prolonged hyperglycemia in young healthy men. *Diabetes* 1999; (48): 1156-1161.
- Rau J C, Beaulieu L M, Huntington J A, Church F C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007; (5 Suppl 1): 102-115.
- Relimpio F, Losada F, Pumar A, Mangas M A, Morales F, Astorga R. Relationships of apolipoprotein B(100) with the metabolic syndrome in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; (57): 199-207.
- Resnick H E, Howard B V. Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 2002; (53): 245-267.
- Ridker P M. Inflammation in atherothrombosis: how to use high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in clinical practice. *Am Heart Hosp J* 2004; (2): 4-9.
- Ridker P M, Hennekens C H, Buring J E, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; (342): 836-843.

- Rieger M, Mannucci P M, Kremer Hovinga J A, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, Zimmermann K, Scharrer I, Peyvandi F, Galbusera M, Remuzzi G, Bohm M, Plaimauer B, Lammle B, Scheiflinger F. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood* 2005; (106): 1262-1267.
- Rijken D C. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol* 1995; (8): 291-312.
- Roselli della R G, Lapolla A, Sartore G, Rossetti C, Zambon S, Minicuci N, Crepaldi G, Fedele D, Manzato E. Plasma lipoproteins, apoproteins and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. A nine-year follow-up study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003; (13): 46-51.
- Ruggeri Z M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; (1): 1335-1342.
- Ruotolo G, Howard B V. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002; (4): 494-500.
- Saltiel A R, Kahn C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; (414): 799-806.
- Scaglione L, Gambino R, Lillaz E, Bo S, Cassader M, Pagano G, Cavallo-Perin P. Platelet glycoprotein IIIa P1A1/A2 polymorphism and its relationship with diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Nephrol* 2000; (53): 253-256.
- Scaglione L, Gambino R, Rolfo E, Lillaz E, Gai M, Cassader M, Pagano G, Cavallo-Perin P. Plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid intima-media thickness in Italian type 2 diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 2002; (32): 24-28.
- Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Ronnema T. Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; (140): 94-100.
- Sowers J R, Epstein M, Frohlich E D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001; (37): 1053-1059.
- Steen V M, Holmsen H. Current aspects on human platelet activation and responses. *Eur J Haematol* 1987; (38): 383-399.
- Stehouwer C D, Gall M A, Twisk J W, Knudsen E, Emeis J J, Parving H H. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 2002; (51): 1157-1165.

- Sumida Y, Wada H, Fujii M, Mori Y, Nakasaki T, Shimura M, Hiyoyama K, Yano Y, Deguchi K, Shiku H, Adachi Y. Increased soluble fibrin monomer and soluble thrombomodulin levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; (8): 303-307.
- Sumpio B E, Riley J T, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; (34): 1508-1512.
- Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Lu H. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005; (229): 95-101.
- Takebayashi K, Suetsugu M, Matsutomo R, Wakabayashi S, Aso Y, Inukai T. Correlation of high-sensitivity C-reactive protein and plasma fibrinogen with individual complications in patients with type 2 diabetes. *South Med J* 2006; (99): 23-27.
- Tobe S W, McFarlane P A, Naimark D M. Microalbuminuria in diabetes mellitus. *CMAJ* 2002; (167): 499-503.
- Tripodi A, Mannucci P M. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001; (47): 1597-1606.
- Undas A, Brummel-Ziedins K E, Mann K G. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; (25): 287-294.
- van der Putten R F, Glatz J F, Hermens W T. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2006; (371): 37-54.
- van G C, Stehouwer C D. Diabetes mellitus and hyperhomocysteinemia. *Semin Vasc Med* 2002; (2): 87-95.
- van H, V. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; (95): 198-201.
- Vaughan D E. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; (3): 1879-1883.
- Wakabayashi I, Masuda H. Association of D-dimer with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Thrombolysis* 2007.
- 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* 2006; (259): 493-519.

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* 2004; (255): 188-205.

Weiler H, Isermann B H. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 2003; (1): 1515-1524.

Winocour P D. Platelets, vascular disease, and diabetes mellitus. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; (72): 295-303.

Yamada T, Sato A, Nishimori T, Mitsunashi T, Terao A, Sagai H, Komatsu M, Aizawa T, Hashizume K. Importance of hypercoagulability over hyperglycemia for vascular complication in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; (49): 23-31.

Yudkin J S. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? *Diabetes Care* 1999; (22 Suppl 3): C25-C30.

Zielinski T, Dzielinska Z, Januszewicz A, Rynkun D, Makowiecka C M, Tyczynski P, Prejbisz A, Demkow M, Kadziela J, Naruszewicz M, Januszewicz M, Juraszynski Z, Korewicki J, Ruzyllo W. Carotid intima-media thickness as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients with coronary artery disease. *Am J Hypertens* 2007; (20): 1058-1064.

Zimmet P, Alberti K G, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; (414): 782-787.

ANEXO 1

ANEXO 2