

CALEB GUEDES MIRANDA DOS SANTOS

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS
INSERÇÃO/DELEÇÃO, *Xba*I E *Eco* RI NO GENE DA
APOLIPOPROTEINA B E PIA1/A2 NO GENE DA
GLICOPROTEÍNA IIB/IIIA EM PACIENTES JOVENS
COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL**

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

CALEB GUEDES MIRANDA DOS SANTOS

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS
INSERÇÃO/DELEÇÃO, *Xba*I E *Eco* RI NO GENE DA
APOLIPOPROTEINA B E PIA1/A2 NO GENE DA
GLICOPROTEÍNA IIB/IIIA EM PACIENTES JOVENS
COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.a. Dra. Ana Paula S. Moura Fernandes

Co-Orientador: : Prof.a. Dra. Karina Braga Gomes

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

**Dedico este trabalho à Deus, Àquele que me amou primeiro;
que me levou no colo quando nem eu mais acreditava.**

**Dedico à minha esposa Aline que me sustentou com seu amor,
paciência e dedicação sempre dispensados.**

**Dedico à minha mãe Lucrécia por seu amor que sempre esteve
comigo, mesmo a quilômetros de distância.**

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes pela sua postura firme e corajosa, pela sua seriedade e competência, concentração e dedicação, atributos aos quais, não apenas aprendi a admirar, mas a considerar indispensáveis para se realizar qualquer coisa de maneira excelente. Também por ser a chefe.

À Professora Dra. Karina Braga Gomes pela dedicação exercida em todos os momentos que eu precisei, por nunca me dizer “não”, quando a procurei, pelo compromisso, amizade e confiança.

Ao Dr. Adriano Sabino por ter se dedicado intensamente à seleção dos pacientes com AVCi, por todo o suporte prestado ao desenvolvimento e análise do trabalho e pela sua paciência em me atender dentro e fora do horário de trabalho.

À Professora Dra. Maria das Graças Carvalho, a quem tanto admiro por seu conhecimento, garra e simpatia; pela mais que colaboração.

À Professora Dra. Marinez de Oliveira Sousa pela colaboração e incentivo.

Ao Dr. Daniel Dias Ribeiro pelo trabalho, seleção e encaminhamento dos pacientes que compuseram o Banco de Amostras Biológicas utilizado no desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Telma Gadelha da Universidade Federal do Rio de Janeiro por ceder amostras e dados demográficos de um grupo de 65 pacientes com AVCi.

À Sabrina pelo extremo companheirismo; ao Mateus e Taíse pelo ano maravilhoso que tivemos juntos no laboratório.

Ao Jarbas (“Jarbinhas”) pela alegria contagiante, risadas, músicas e apresentações inesquecíveis.

À Daniela Diniz por uma amizade sem mácula e por ser a mascote do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica que carregaram o pesado fardo junto comigo: Mayara e Fernanda Rocha.

Ao Professor Dr. Laurent Gil e à Professora Dra. Rossimíriam Pereira de Freitas por me iniciarem à metodologia científica e ensinarem a perguntar “Porquê” quando um resultado não era o esperado. Também pela consideração e pelas palavrinhas em francês que eu guardo até hoje.

Aos professores da Faculdade de Farmácia, principalmente aos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, por me apresentarem o conhecimento clínico.

Ao meu avô Pedro (*in memoriam*) pelo cuidado e amor dispensados.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Eventos trombóticos arteriais, inflamação e aterosclerose	19
1.2 Fatores de risco adquiridos e aterosclerose	22
1.3 Fatores de risco genéticos e aterosclerose	28
1.3.1 Mutações no gene da apolipoproteína b.....	30
1.3.2 Glicoproteína (GP) IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	33
1.4 Fatores de risco para avci em indivíduos jovens da população brasileira	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivos gerais.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Banco de amostras biológicas	38
3.2 Casuística	39
3.2.1 Seleção dos pacientes do estudo	39
3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão	41
3.2.3 Características da população estudada.....	41
3.3 Amostras biológicas	42
3.4 Análise molecular	43
3.4.1 Extração de DNA.....	43
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e enzimas de restrição.....	44
3.4.3 Eletroforese	48
3 5 Análise estatística	52
3.5.1 Descrição dos dados	52
3.5.2 Comparações entre as variáveis	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Análise de associação entre genótipos.....	66
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	75
6 CONCLUSÕES	90

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS90**ANEXOS**

A - Parecer do Comitê de Ética para o Banco de Amostras Biológicas..... 101

B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 102

C - Aprovação do projeto de pesquisa..... 104

D - Código de letras de aminoácidos..... 105

APÊNDICES

A - Fichas Clínicas..... 106

B - Protocolos para a preparação dos reagentes 108

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Significância estatística para valores de perfil lipídico, apolipoprotéico e de PCR em pacientes com AVCi e controles saudáveis.	37
TABELA 02 - Comparações entre grupo de pacientes do Rio de Janeiro e de Belo Horizonte para os polimorfismos de I/D, <i>Xba</i> I e <i>Eco</i> RI no gene da apo B e PLA1/A2 no gene da gp IIb/IIIa.....	57
TABELA 03 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo I/D em relação à idade.....	58
TABELA 04 - Análise da associação entre o polimorfismo I/D no gene da apolipoproteína B e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....	59
TABELA 05 - Frequências alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo I/D	58
TABELA 06 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo <i>Xba</i> I em relação à idade.....	59
TABELA 07 - Análise da associação entre o polimorfismo <i>Xba</i> I no gene da apolipoproteína B e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.	61
TABELA 8 - Frequências alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo <i>Xba</i> I	61
TABELA 9 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo <i>Eco</i> RI em relação à idade.	62

TABELA 10 - Análise da associação entre o polimorfismo <i>Eco</i> R I no gene da apolipoproteína B e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.	63
TABELA 11 - Frequência alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo <i>Eco</i> RI.	64
TABELA 12 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo PLA1/A2 em relação à idade.	64
TABELA 13 - Análise da associação entre o polimorfismo PLA1/A2 no gene da gp lib/IIIa e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.	65
TABELA 14 - Frequência alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo PLA1/A2.	65
TABELA 15 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para todos os polimorfismos em relação à idade.	66
TABELA 16 – Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e <i>Xba</i> I e risco para ocorrência de AVCi os participantes do estudo.....	67
TABELA 17 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e <i>Eco</i> RI e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....	68
TABELA 18 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e PLA1/A2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....	69

TABELA 19 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos *Xba* I e *Eco* RI e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....70

TABELA 20 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos de *Xba* I e PLA1/A2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....72

TABELA 21- Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos de *Eco* RI e PLA1/A2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....73

TABELA 22 - Análise da associação entre a presença combinada de alelos e genótipos dos polimorfismos I/D, *Xba* I, *Eco* RI e PLA1/PLA2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.....74

LISTA DE QUADROS

- Quadro 01 - Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos dos genes da apo B e GPIIb/IIIa.
.....45
- Quadro 02 - Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR para pesquisa dos polimorfismos de interesse, após padronização.....46
- Quadro 03 - Protocolos para execução da PCR para os polimorfismos de *I/D* e *Xba I*.
.....47
- Quadro 04 - Protocolos para execução da PCR para os polimorfismos de *Eco RI* e *PLA1A2*.47
- Quadro 05 - Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na digestão enzimática dos fragmentos resultantes da reação em cadeia da polimerase, após padronização.....48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Nas canaletas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 DNAs de indivíduos com o fragmento específico de 710bp (*Xba* I); na canaleta 2, o padrão de peso molecular; na canaleta 10, o branco da reação.....50

Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Nas canaletas 2, 3 e 4 DNAs de indivíduos com o fragmento específico de 480 bp (*Eco* RI); na canaleta 1, o padrão de peso molecular; na canaleta 5, o branco da reação.....50

Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Nas canaletas 1, 2, 4, 5 e 6 DNAs de indivíduos com o fragmento específico de 282 bp (*PLA1A2*); na canaleta 3, o padrão de peso molecular; na canaleta 7, o branco da reação.....51

Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular; nas canaletas 2, 3, 4 e 7, DNAs de indivíduos heterozigotos para a mutação ; na canaleta 5, DNA de indivíduo com dois alelos de Deleção (D), DNA de indivíduo homozigoto com dois alelos de Inserção(I).....53

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular; Nas canaletas 2, 4, 6, 9 e 11 DNAs de indivíduos homozigotos para a ausência da mutação (X-X-); Nas canaletas 3, 7, 8, 10 e 11 DNAs correspondentes a pacientes homozigotos para a presença dos alelos mutantes (X+X+); Nas canaletas 5 e 13 DNAs de indivíduos heterozigotos.54

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular . Na canaleta 2 DNA de indivíduo homozigoto para a mutação e ausência do sítio para a enzima *Eco* RI (E-E-); Na canaletas 3 e 4

DNAs correspondentes a pacientes homozigotos selvagens e com a presença do sítio para a enzima *Eco* RI (E+E+).55

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular . Nas canaletas 4, 5, 6 e 7 há DNAs de indivíduos homozigotos para a ausência da mutação (PLA1A1); Na canaleta 2 há DNA correspondente a um paciente homozigoto para a presença dos alelos mutantes (PLA2A2); Na canaleta 3, DNA de indivíduo heterozigoto.....56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

apo- apolipoproteínas

apoA- apolipoproteína A

apoB- apolipoproteína B

APS - persulfato de amônio

AVCi- acidente vascular cerebral isquêmico

CMLV- células musculares lisas vasculares

CT- colesterol total

DAC- doença arterial coronariana

DAOP- doença vascular obstrutiva periférica

FVL- fator V leiden

FVW- fator de von willebrand

GP- glicoproteína

Hcy- homocisteína

HDL-C- lipoproteína de alta densidade

IAM- infarto agudo do miocárdio

ICA- índice cintura/altura

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-6- interleucina 6

IMC- índice de massa corporal

LDL-C- lipoproteína de baixa densidade

Lp (a)- lipoproteína a

OR- *odds ratio*

PCR - reação em cadeia da polimerase

PCR- proteína C reativa

PT- protrombina

RFLP- polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição

RMN- ressonância magnética nuclear

TG- triglicerídeos

RESUMO

O Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi) é uma doença multifatorial, caracterizada por manifestações clínicas resultantes de processos trombóticos arteriais. Estes processos têm como principal causa a aterosclerose, um processo inflamatório crônico resultante de lesão vascular e deposição lipídica na parede das artérias. Este estudo teve como objetivo investigar a associação entre polimorfismos *Xba* I, *I/D* e *Eco* RI no gene da apoB, PLA1A2 no gene da glicoproteína GPIIb/IIIa e AVCi em um grupo de pacientes jovens, através da técnica de PCR-RFLP. Foram avaliados 113 pacientes, sendo 48 deles provenientes do estado de Minas Gerais e 65 do estado do Rio de Janeiro. O grupo controle foi composto por 291 indivíduos saudáveis provenientes do estado de Minas Gerais. Não houve diferença significativa entre os pacientes de Minas Gerais e do Rio de Janeiro quando comparada a frequência de cada um dos polimorfismos. Foi observada uma maior frequência do alelo mutante E- (*Eco* RI) no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle. Os alelos X+, D e A2 associados à predisposição à doença apresentaram frequências significativamente maiores no grupo de pacientes apenas quando a comparação foi feita com, pelo menos, dois polimorfismos simultaneamente. Além disso, a presença do alelo A1 (GPIIb/IIIa), combinada à ausência do alelo mutante E- (*Eco* RI), mostrou-se fortemente associada a uma menor predisposição ao desenvolvimento de AVCi. Assim, pode-se concluir para os polimorfismos estudados que a presença do alelo mutante E- configura-se como possível fator de risco para desenvolvimento de AVCi.

Palavras-chaves: AVCi, apolipoproteína B, *Xba* I, *I/D*, *Eco* RI, GPIIb/IIIa.

ABSTRACT

Ischemic Stroke (IS) is a multifactorial disease characterized by symptoms resulting from arterial thrombotic processes. These cases are mainly caused by atherosclerosis, a chronic inflammatory disease that results from vascular injury and lipid deposition on the wall of the arteries. This study aimed to investigate the association between the polymorphisms Xba, I, I/D and Eco RI in the apolipoprotein B and PLA1A2 of the glycoprotein GPIIb / IIIa genes and ischemic stroke in a group of young patients by means PCR/RFLP technique. We evaluated 113 patients, 48 of them from Minas Gerais State and 65 from Rio de Janeiro State. The control group was composed by 291 healthy subjects from Minas Gerais State. There was no difference between patients from Minas Gerais and Rio de Janeiro when compared the frequency of each polymorphisms. However, it was observed a greater frequency of the E- mutant allele (*Eco RI*) in the patients compared to the control group. The alleles X+, D, and A2 associated to predisposition to ischemic stroke showed frequencies significantly increased in patients only when the comparison was established to, at least, two polymorphism simultaneously. In addition, presence of the allele A1 (GPIIb/IIIa), coupled to the absence of the E-mutant allele (*Eco RI*), showed to be strongly associated to a lower predisposition to the IS development. Thus, it can be concluded that the presence of E- mutant allele configures as a possible risk factor for development of IS.

Key-words: ischemic stroke, atherosclerosis, apolipoprotein B, Xba, I, I/D, Eco RI, GPIIb/IIIa.

1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), a doença arterial coronariana-DAC (infarto agudo de miocárdio) e as doenças isquêmicas vasculares periféricas (doença vascular obstrutiva periférica ou DAOP) constituem manifestações clínicas agudas ou crônicas, recorrentes ou não dos processos trombóticos arteriais (GRANT, 2004). A trombose arterial resulta da obstrução total ou parcial de uma artéria por trombos formados em decorrência de alterações patológicas que envolvem a hemostasia. Isto pode dificultar ou impedir o fluxo de sangue normal característico, causando isquemia e necrose.

A doença arterial coronariana (DAC) está associada aos maiores índices de mortalidade, resultando em mais de 7 milhões de mortes por ano em todo o mundo, (WHO, 2002). Já a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é um distúrbio crônico de artérias de membros inferiores, conseqüente à aterosclerose no interior desses vasos. A DAOP atinge cerca de 12% da população geral e pode chegar a 20% das pessoas com mais de 70 anos (HIATT *et al.*, 1995).

Acidentes vasculares cerebrais podem ser divididos em 3 tipos principais: O AVC isquêmico (AVCi), a hemorragia intracerebral e a hemorragia subaracnóidea, sendo que o AVCi constitui a maioria dos casos (FRASER, 2007). O AVCi tem sido associado à aproximadamente 5,7 milhões de mortes por ano em todo o mundo (WHO, 2004; WHO, 2007). Esta doença torna-se particularmente dramática na população jovem por causa do grande impacto social e econômico decorrente de sua morbidade e mortalidade

(RUBATTU *et al.*, 2005). Desta forma, a elucidação dos mecanismos etiológicos tem sido alvo de um grande número de estudos (GAO *et al.*, 2006).

Cumprе ressaltar que pouco conclusivos são os estudos conduzidos na população brasileira com o objetivo de avaliar a relação entre a ocorrência de trombose arterial e a presença de fatores genéticos, principalmente em indivíduos jovens (FORTI, 2003).

1.1 EVENTOS TROMBÓTICOS ARTERIAIS, INFLAMAÇÃO E ATEROSCLEROSE

A trombose arterial é uma doença multifatorial e, tanto fatores genéticos como adquiridos, têm importância para seu curso. A causa mais freqüente de trombose arterial consiste na aterosclerose, uma doença inflamatória crônica resultante de lesão vascular, deposição lipídica, ativação e proliferação de macrófagos, células musculares lisas e plaquetas, além de alterações hemostáticas que culminam com a formação do trombo (ZAGO *et al.*, 2001; SPRONK, 2004).

A aterosclerose é consequência de muitos anos de exposição a fatores de risco aterogênicos que levam, até mesmo em jovens, ao desenvolvimento precoce de lesões aterotrombóticas. A lesão aterosclerótica se inicia na infância com depósitos de colesterol e de seus ésteres, correspondendo a acúmulos graxos na camada íntima muscular principalmente de grandes artérias. As placas de ateroma podem afetar qualquer vaso sanguíneo, mas os principais alvos são as coronárias e os sistemas arteriais cerebrais e periféricos. Em determinados locais desses vasos, uma maior quantidade de lípidos se acumula e o conjunto é então coberto por um tampão fibromuscular, dando origem a uma capa fibrosa (MCGILL *et al.*, 2000). Na presença de fatores ligados à idade e ao sexo, estas lesões têm seu desenvolvimento acelerado por

determinantes genéticos (tais como os relacionados com perfil lipídico, metabolismo de glicose e pressão arterial) e determinantes ambientais, incluindo tabagismo, má alimentação e outros (SPRONK, 2004).

O início de uma lesão aterosclerótica é caracterizado pela oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) sérica à LDL oxidada (LDLox) no interior da matriz da camada íntima vascular. Essa passagem da LDLox pelas células endoteliais estimula o recrutamento de monócitos circulantes para a parede do vaso. A diferenciação de monócitos em macrófagos com posterior captação da LDLox, devido à expressão de receptores denominados de *scavenger*, resulta na formação de células espumosas (SPRONK, 2004), que secretam citocinas pró-inflamatórias desencadeando a inflamação local (LIBBY, 2002). Esse processo promove então a migração e proliferação de células musculares lisas vasculares (CMLV). Nestas células, assim como nos macrófagos, ocorre a expressão de fator tissular, um importante fator pro inflamatório que contribui para a conversão de fibrinogênio em fibrina. Além disso, essas células podem sofrer apoptose e expor uma maior quantidade de fator tissular (SPRONK, 2004).

Considerando a aterosclerose como uma inflamação crônica, o ambiente inflamatório leva a uma grande produção de citocinas. Dentre elas, destaca-se a IL-6 que induz a expressão de fator tissular por monócitos circulantes gerando maior produção de trombina e fibrina. É importante ressaltar que produtos de degradação da fibrina formada são fatores quimiotáticos para a atração de mais CMLV e monócitos afetando a estabilidade e a estrutura da placa (DE MAAT, 2003; SPRONK, 2004). Esses fagócitos mononucleares se destacam nas complicações da aterosclerose ao

produzirem enzimas metaloproteinases que podem degradar matriz extracelular causando instabilidade na placa (SPRONK, 2004).

Assim, evidências sugerem que mecanismos inflamatórios são também importantes fatores de risco no acidente vascular cerebral. Nenhum marcador genético (ou grupos de marcadores) ou testes não-invasivos são, até o momento, capazes de prever com precisão o risco de morte por doenças vasculares. Por isso, marcadores de inflamação têm sido avaliados como preditores de risco individual no que se refere ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica; contudo a inflamação vascular por si só não é menos complexa do que aterosclerose (MADAMANCHI et al 2004).

Marcadores inflamatórios como a Proteína C Reativa (PCR) podem refletir a gravidade da aterosclerose local (DE MAAT et al., 2003). Proteína de fase aguda sintetizada no fígado, além de importante preditora de eventos cardiovasculares futuros em homens e mulheres aparentemente saudáveis, pode participar diretamente na patogênese da aterosclerose através de sua interação com células endoteliais (CALABRO, 2003; SANTOS et al., 2003). Mais de 20 estudos prospectivos já demonstraram a grande sensibilidade da PCR como fator preditor independente para AVCi (HANKEY, 2006; RIDKER et al, 2004). Sua produção é fortemente induzida pela presença de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6). Polimorfismos relacionados a PCR foram associados a níveis séricos aumentados dessa proteína de fase aguda (REITZ et al., 2007).

O rompimento da capa fibrosa de uma placa aterosclerótica rica em lípidos configura, então, a trombose aguda, que consiste em um evento precipitante resultado da transição de uma doença aterosclerótica estável e subclínica para um infarto agudo do miocárdio (IAM), AVCi ou oclusão arterial periférica (ROSS, 1999).

1. 2 FATORES DE RISCO ADQUIRIDOS E ATEROSCLEROSE

Estudos epidemiológicos têm identificado diversos fatores de risco adquiridos para a aterosclerose (MEHTA et al., 1998). Em AVCi, a hipertensão arterial, as dislipidemias, a estenose de carótida e a fibrilação atrial são claramente fatores de risco causais, uma vez que estudos clínicos randomizados mostraram que seu tratamento reduz a incidência do evento (LAWES et al., 2004; CTT, 2005; ROTHWELL et al., 2003; MRC, 2004; HART, 1999). Já o tabagismo, diabetes mellitus, DAC, doenças cardíacas valvulares e doenças cardíacas congênitas, como o Forâmen Ovale Patente, configuram como fatores de risco prováveis. Isso porque estudos epidemiológicos, caso-controle e de *coorte* mostraram que essas características seriam significativamente associadas a um aumento do risco para o AVCi (HANKEY, 2006; GOLDSTEIN, 2006).

O mais importante preditor de risco para as trombozes venosas e arteriais tem sido a idade, uma vez que os aumentos na incidência e na prevalência de ambas com a idade são exponenciais, tanto em mulheres como em homens. As razões possíveis para o risco aumentado das trombozes arteriais (DAC, AVCi ou dos membros-periféricos) com idade incluem: a prevalência crescente da aterosclerose; a prevalência crescente (e/ou efeitos cumulativos) de fatores de risco "clássicos" incluindo a obesidade, diabetes, hipertensão e dislipidemias; os crescentes marcadores circulantes da inflamação, tais como a proteína C reativa (PCR), além de variáveis trombóticas e reológicas (LOWE, 2004).

A hipertensão arterial tem sido relacionada como uma das principais causas de AVCi e DAC (como o infarto agudo do miocárdio e morte cardíaca súbita) (OATES,

2001). A relação entre pressão arterial e o risco de doenças cardiovasculares é linear, contínua, consistente e independente de outros fatores de risco. Além disso, quanto maior a pressão arterial, maior o risco de acidente vascular cerebral (GOLDSTEIN, 2006; REDON, 2007).

Sabe-se que a hipertensão atinge cerca de 1 bilhão de pessoas. É interessante ressaltar que, globalmente, existe um indicativo de que aproximadamente 62% das doenças cerebrovasculares e 49% das doenças isquêmicas do coração são atribuíveis a pressão arterial sistólica superior a 115 mmHg, com pequena variação devido ao sexo (WHO, 2002).

O tabagismo acarreta grande prejuízo à qualidade de vida. Componentes do cigarro afetam a função das células endoteliais, aumentam a adesão, a ativação e a agregação plaquetária, causam vasoconstrição, aumento significativo na pressão arterial e da geração de trombina, alterações das lipoproteínas do plasma, além de favorecer a migração de células musculares lisas e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade nos macrófagos, que são reconhecidos como “células espumosas” ou “*foam cells*”. Isso pode explicar o impacto que o tabagismo causa à morbidade e mortalidade cérebro e cardiovasculares (KIMURA, 1994, JEFREY et al., 2004, AMBROSE, 2005).

Fumar é obviamente um fator de risco bem conhecido para aterosclerose. Isso atualmente têm sido observado em pacientes jovens. Forte e independente correlação foi observada entre tabagismo e pacientes com AVCi (BANG et al., 2007). Tudo isso confirma o fato de muitos estudos afirmarem que fumar é o mais importante fator de risco para AVCi no início de meia-idade (LEE et al., 2002; GOLDSTEIN et al., 2006; JOHNSON et al., 2007).

O sobrepeso e obesidade conduzem a efeitos metabólicos adversos nos níveis de colesterol e triglicerídeos (TG), na pressão arterial e no diabetes mellitus. Riscos de DAC, AVCi e diabetes mellitus tipo 2 aumentam continuamente com o índice de massa corporal crescente, sendo que 21% das doenças isquêmicas do coração estão associadas a um elevado índice de massa corporal (IMC) (WHO, 2002). Maiores IMC e índice cintura/altura (ICA) foram associados linearmente com o aumento do risco de doenças cardiovasculares em homens e mulheres, tanto jovens, como velhos. A associação com os jovens parece ser mais intensa (GELBER, 2008).

O diabetes mellitus tipo 2 também está relacionado a aumento do risco de doenças micro e macrovasculares (DAC, AVC e DAOP) (NAZIMEK-SIEWNIAK, 2002). Pessoas com diabetes tipo 2 têm um aumento da susceptibilidade à aterosclerose e da prevalência de fatores de risco aterogênicos; notavelmente da hipertensão, obesidade e lipídios sanguíneos anormais. Além disso, estudos caso-controle e prospectivos de pacientes com AVCi têm confirmado um efeito independente do diabetes em eventos isquêmicos (GOLDSTEIN, 2006).

Recentemente, a síndrome metabólica, um conjunto de fatores de risco vasculares altamente prevalentes (incluindo hipertensão, hiperglicemia, obesidade e dislipidemias) e relacionados à resistência a insulina, tem sido considerada um fator de risco independente para desenvolvimento de aterosclerose intracraniana (PARK et al., 2008) e acidente vascular (BODEN-ALBALA et al., 2008).

As dislipidemias também têm uma estreita relação com aterosclerose. Deposições lipídicas nas artérias são bastante comuns e a frequência e intensidade de sua distribuição podem ser influenciadas pelos níveis lipídicos. Estudos prospectivos mostraram que altas concentrações séricas das lipoproteínas de baixa densidade, LDL-

colesterol (LDL-C), constituem o fator de risco principal para doenças coronarianas. Assim, o LDL-C é atualmente considerado o alvo primário na terapia de redução do colesterol (GRUNDY, 2004).

Em AVCi, inicialmente os estudos epidemiológicos não encontraram associação consistente entre níveis de colesterol e desenvolvimento do evento. No entanto, estudos prospectivos posteriores mostraram aumentos da incidência de AVCi em pacientes com níveis elevados de colesterol total, sobretudo acima de 240 mg / dL. A Organização Mundial de Saúde publicou em 2002 um estudo mostrando que níveis séricos altos de colesterol total são estimados como causa de 18% das doenças cerebrovasculares (principalmente eventos não fatais) e 56% das doenças isquêmicas do coração em todo o mundo (WHO, 2002). Considerando apenas o LDL-C, poucos estudos analisaram sua relação com AVCi, sendo os resultados até aqui apresentados, inconsistentes (GOLDSTEIN, 2006).

A lipoproteína de alta densidade (HDL-C) também possui importante papel no desenvolvimento da aterosclerose. Baixos níveis de HDL-C estão associados com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares, inclusive AVCi (KWITEROVICH, 1998; WALLDIUS, 2007; RIZZO, 2008). Estudos prospectivos e de base populacional têm demonstrado redução de 47% para todos os eventos isquêmicos encefálicos com o aumento do colesterol HDL-C. Também foi observado o aumento das taxas de AVCi em homens com baixos níveis de HDL-C, especialmente níveis de 30 a 35 mg / dL (GOLDSTEIN, 2006).

Há também muitas evidências de que altos níveis de TG sejam um fator de risco independente para doenças cardiovasculares. Níveis de TG elevados foram associados

a um risco cardiovascular aumentado de 76% nas mulheres e 32% em homens (NGUYEN et al, 2002). Pacientes que desenvolveram AVCi também têm demonstrado tendências a apresentar altos níveis de triglicerídeos (GOLDSTEIN, 2006).

Assim, no que diz respeito ao AVCi, o papel das alterações dos parâmetros convencionais do perfil lipídico tais como HDL-C, LDL-C e TG como marcadores de risco, ainda é controverso. No entanto a redução desses parâmetros no tratamento com estatinas tem diminuído significativamente o risco de desenvolvimento para o AVCi (ENDRES, 2005; WALLDIUS *et al.*, 2006).

Marcadores não convencionais como Lp (a) (lipoproteína a) e apolipoproteínas (apo) têm sido também avaliados. As apolipoproteínas são proteínas associadas aos lípidos nas partículas de lipoproteína. Essas desempenham funções importantes no metabolismo lipoprotéico, direcionando os lípidos para certos órgãos e tecidos do organismo, ativando ou inibindo enzimas envolvidas, solubilizando e estabilizando os lípidos e ajudando na interação com os fosfolípidos de membrana (JIANG, 2000; MARTINEZ, 2003).

Cada uma das partículas de lipoproteínas aterogênicas (LDL-C e VLDL) contém uma molécula de apolipoproteína B (apoB) e, por conseguinte, a concentração de apoB fornece uma medida direta da quantidade dessas lipoproteínas circulantes (BARTER *et al.*, 2006; HANKEY, 2006). Assim, já existem indícios consideráveis de que apoB seria um parâmetro mais exato para o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares do que qualquer um dos outros parâmetros de colesterol (WALLDIUS *et al.*, 2006). Relatos com base em resultados de quatro grandes estudos prospectivos sugerem que a apoB é superior ao colesterol total e ao LDL-C como marcador do risco de doenças vasculares (SNIDERMAN *et al.*, 2003).

Dados recentes têm sugerido que 88mg/dl seria um nível "desejável" de apoB. Esse é o nível encontrado em pessoas jovens e com valores baixos de LDL-C (BALLANTYNE, 2008). Concentrações de apoB menores que 90 mg/dl foram também propostos para pacientes de alto risco de desenvolvimento de doenças vasculares, além de LDL-C menor que 100 mg/dl (GRUNDY, 2002).

A apolipoproteína A (apoA) também possui importante papel na aterosclerose. Sob a forma de apoA-I, ela é a principal apolipoproteína da partícula da HDL-C, possuindo efeitos antiaterogênicos e cardioprotetores. Ela está criticamente envolvida no transporte reverso do excesso de colesterol dos tecidos para o fígado (MARCOVINA, 2006; CHAN, 2006; WALLDIUS et al., 2007; FORTI et al., 2007). Concentrações reduzidas de apoA-I foram relacionadas ao desenvolvimento de todos os subtipos de acidentes vasculares (WALLDIUS, 2006; WALLDIUS, 2007).

Resultados recentes indicam que o índice (apoB/apoA) pode constituir um parâmetro mais preciso e uma evidência adicional aos parâmetros lipídicos convencionais observados isoladamente, no que se refere ao risco de eventos ateroscleróticos como DAC e, mais recentemente, AVCi (WALLDIUS *et al.*, 2006). Quanto maior numericamente o índice, maior o risco. Nele, apoB reflete o número de partículas potencialmente aterogênicas (LDL-C, VLDL, IDL) e apoA-I o número de partículas antiaterogênicas presentes no HDL-C. Ele poderia então indicar com mais precisão o risco de doenças cardiovasculares do que LDL-C ou outros parâmetros lipídicos (WALLDIUS, 2006; JUNGNER, 2006). O índice parece ser também de superior importância aos índices de CT/HDL-C ou LDL-C/HDL-C como índices globais de risco de doença aterosclerótica na prática clínica (SNIDERMAN, 2003; SNIDERMAN et al., 2006).

1.3 FATORES DE RISCO GENÉTICOS E ATEROSCLEROSE

Nas últimas décadas, as investigações de fatores de risco para a trombose arterial têm focado nas alterações moleculares associadas (VOETSCH et al., 2004). Anormalidades genéticas que comprometam a produção, atividade, biodisponibilidade ou o metabolismo de fatores específicos podem alterar o balanço fisiológico e predispor aos eventos tromboembólicos e aterotrombóticos prematuros. Sabe-se que o AVCi tem causas multifatoriais, combinações de fatores de risco ambientais e genéticos. No entanto, descobrir fatores genéticos que desempenham um papel em seu desenvolvimento ou estabelecer vínculos de causalidade são tarefas muito difíceis, devido aos múltiplos genes relacionados. Além disso, a importância relativa de fatores genéticos é afetada freqüentemente pelos fatores ambientais (MURATA, 2000; XUGUANG et al., 2006; TONK, 2007). Assim, a relação entre a maioria dos polimorfismos e o risco de CAD, AVCi e DAOP é freqüentemente modesta, continua e controversa, necessitando de estudos adicionais (KIM et al., 2003; VOETSCH et al., 2004; PEZZINI et al., 2005).

As mutações são modificações estruturais na seqüência do DNA que envolvem alterações em um único ou múltiplos nucleotídeos e que apresentam freqüência menor que 1% em uma população. Já os polimorfismos correspondem a modificações estruturais no DNA mais freqüentes, onde o alelo mutado apresenta freqüência superior a 1% (FORTI, 2003).

Variações genéticas nos componentes da resposta inflamatória têm sido implicados como fatores de risco, agindo conjuntamente com fatores de risco proinflamatórios convencionais (LIBBY *et al.*, 2005; BEVAN, 2008). Muitos dos genes

que regulam citocinas inflamatórias e moléculas de adesão são altamente polimórficos. O aumento na frequência de polimorfismos associados, como os de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), IL-1 β , IL-6, ICAM (Molécula de Adesão Intercelular) e outros têm sido associados com inflamação, aterosclerose e AVCi (DEGRABA, 2004).

Um outro marcador genético foi descrito como importante para o AVCi. Algumas metanálises têm sugerido associação entre o polimorfismo de Inserção/Deleção da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e risco de AVCi (HUMPHRIES, 2004). Indivíduos homozigotos para o alelo "D" apresentaram aumento de 56% da atividade de ECA em comparação com os homozigotos para o alelo "I". A ECA converte a angiotensina I em angiotensina II, que é conhecida por estar envolvida na hipertrofia vascular, vasoconstrição e processos ateroscleróticos (CASAS et al., 2004).

Fatores trombofílicos clássicos associados à ocorrência de trombose venosa tem sido também investigados em relação à associação com AVCi. A mutação do gene da protrombina (PT) que promove aumento dos níveis de trombina, a mutação do Fator V Leiden (FVL), que torna este fator resistente à clivagem e inativação pela proteína C ativada e a mutação no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR), que pode estar associada ao aumento dos níveis de homocisteína (Hcy), aminoácido tóxico para o endotélio vascular (WILLIAMS, 2001; CASAS et al., 2004; TONK, 2007). Apesar de seu importante papel no desenvolvimento da trombose venosa, a influência desses fatores na DAC e AVCi ainda é controversa (FEINBLOOM, 2005; SABINO et al, 2006).

KIM et al. (2003) relataram que esses polimorfismos aumentam o risco de infarto de miocárdio e AVCi, particularmente em mulheres e pacientes jovens. No entanto, essa associação é apenas modesta e por isso, em muitos estudos, têm sido limitada a

capacidade de detectá-las como fatores de risco significativo (KIM *et al.*, 2003; HANKEY, 2006).

1.3.1 - Mutações no gene da Apolipoproteína b

A apolipoproteína B, como apoB-48, está presente nos quilomícrons e como apoB-100, nas lipoproteínas VLDL, IDL, LDL. Ela é o principal componente protéico da partícula de LDL-C e, assim como os níveis plasmáticos de LDL estão associados a doenças vasculares, os de apoB também estão (BOEKHOLDT *et al.*, 2003; BARTER, *et al.*, 2006; WALLDIUS, 2007).

Vários estudos têm sugerido a relação entre polimorfismos no gene de apoB e níveis de lípidos plasmáticos (PAJUKANTA, 1996; BENN *et al.*, 2007). Assim, alterações genéticas e estruturais da apoB têm sido associadas com a ligação defeituosa da apoB com o receptor de LDL-C, conduzindo a hipercolesterolemia, um fator de risco importante para aterosclerose (CAVALLI, 2000; TAHRI-DAIZADEH *et al.*, 2004). Além disso, níveis elevados de apoB aumentam a relação apoB/apoA, que constitui um marcador de risco de eventos ateroscleróticos como DAC e AVCi, recentemente identificado (WALLDIUS *et al.*, 2006; WALLDIUS, 2007; CHAN, 2006).

Em estudos prospectivos de base populacional, o aumento dos níveis plasmáticos de apoB foram associados ao aumento do risco de doenças isquêmicas cerebrovasculares e AVCi. Mas se polimorfismos de apoB estão associados com o aumento ou diminuição do risco dessas doenças, isso ainda é incerto (BENN *et al.*, 2007).

O gene da apoB, de 43 Kb de tamanho, possui numerosos polimorfismos já descritos. Ele está localizado no braço curto do cromossomo 2, possui 29 exons, 28

íntrons e dentre os polimorfismos mais estudados destacam-se os de Inserção(I)/Deleção(D), *Eco RI*, *Xba I*, *MspI* e N4311S (BYDLOWSKI *et al.*, 1996; LEREN *et al.*, 1998; TAHRI-DAIZADEH *et al.*, 2004; BERNARD *et al.*, 2004; PANDEY *et al.*, 2007).

O polimorfismo I/D é resultante da inserção (I)/deleção (D) no exon 1, de 3 códons (9 pares de base), gerando um peptídeo sinal de 27/24 aminoácidos. Ele possui um potencial impacto fisiológico porque altera a estrutura (3 aminoácidos, Leu-Ala-Leu) do peptídeo sinal (BOERWINKLE *et al.*, 1989). Isso pode afetar a síntese e expressão do gene da apoB que possui papel central no metabolismo lipídico (KALLEL *et al.*, 2006). A deleção (D) caracteriza o polimorfismo.

O polimorfismo resultante da troca de um “C” por “T” na posição 2488 no exon 26 do gene da apoB é reconhecido pela enzima de restrição *Xba I*, resultando na formação do sítio de restrição para a enzima. Apesar disso, a mutação é silenciosa e não há troca do resíduo de aminoácido. O alelo denominado X⁺ é o mutante e identifica o sítio criado para a enzima. Já o polimorfismo *Eco RI* é resultante da troca de um “G” por “A” no exon 29 do gene da apoB, ocorrendo assim a perda do sítio para a enzima de restrição (*Eco RI*) e a troca do resíduo do aminoácido Glu→Lys na posição 4514. O alelo E- identifica a mutação e a perda do sítio enzimático. Ambos polimorfismos têm sido relacionados com níveis alterados de LDL-C (CHIODINI, 2003).

A relação entre dislipidemias e os polimorfismos *Xba I* e *Eco RI* ainda é controversa. Enquanto alguns estudos sugerem que eles estariam relacionados a níveis lipídicos e lipoprotéicos alterados, outros não encontram associação (TAHRI-DAIZADEH *et al.*, 2004).

Gusman *et al.* (2000) pesquisaram os polimorfismos Ins/del, *Xba* I e *Eco* RI de apoB por PCR (*Polimerase Chain reaction*)- RFLP (restriction fragment length polymorphism) em 93 controles sadios e 104 indivíduos caucasianos apresentando um perfil lipídico de risco alto para doenças coronarianas. O genótipo X-X- (homozigoto selvagem) para o polimorfismo de *Xba* I mostrou-se associado a concentrações séricas mais altas de (CT) e (LDL-C).

Outro estudo encontrou moderado, mas consistente aumento nos níveis de CT, LDL-C e apoB em pacientes de 10 a 25 anos de ambos os sexos com genótipo X+X+ (homozigoto mutante) de *Xba* I em relação ao genótipo X-X-. No entanto, o mesmo estudo demonstrou não haver associação entre o genótipo X+X+ e o risco de se desenvolver doenças cardíacas isquêmicas ou doenças isquêmicas cerebrovasculares (BENN *et al.*, 2005).

Em uma metanálise, verificou-se que os polimorfismos Ins/Del e *Eco* RI aumentam significativamente o risco de DAC, diferentemente de portadores da mutação de *Xba* I onde não houve aumento significativo no risco (CHIODINI *et al.*, 2003).

Apesar destas evidências, o papel desses polimorfismos na aterosclerose continua controverso. Os três polimorfismos foram associados com níveis lipídicos alterados, mas não necessariamente de forma consistente, com risco aumentado para doenças isquêmicas, conforme afirmam em outra metanálise, BOEKHOLDT *et al.* (2003).

Dados consistentes sobre esses polimorfismos e AVCi são raros, principalmente na população brasileira.

1.3.2 - Glicoproteína (GP) IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)

A glicoproteína (GP) IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) é um receptor plaquetário específico presente na superfície (membrana) de plaquetas. Este receptor de adesão celular é um membro da família das integrinas (CALVETE, 1994). Ele consiste de duas subunidades: 1) a “ α ” ou GPIIb, um polipeptídeo 136 KDa formado de cadeias leve e pesada e 2) a “ β ” ou GPIIIa com uma cadeia simples com 92 KDa (LEKAKIS, 2008).

A integrina ($\alpha_{IIb}\beta_3$) é, reconhecidamente, o receptor para fibrinogênio ou fator de Von Willebrand (FVW), mediando a agregação plaquetária (SANTOSO, 2001). Os receptores GPIIb/IIIa plaquetários são importantes na formação e no desenvolvimento do trombo (RIDKER, 1997). A sustentação para o papel da GPIIb/IIIa na trombose arterial fundamentou-se inicialmente no desenvolvimento de diversos antagonistas de GPIIb/IIIa, uma classe dos agentes anti-trombóticos que foram utilizados para reduzir, com sucesso, a morbidade e a mortalidade entre pacientes com síndromes coronarianas agudas e aqueles que se submetem a procedimentos de revascularização (O'HALLORAN et al., 2005).

A importância de polimorfismos plaquetários pode ser sugerida ao se observar o aspecto de um trombo formado. O trombo arterial tem aspecto branco acinzentado por conter menos eritrócitos que os trombos venosos. É um trombo muito rico em plaquetas contendo também fibrina, eritrócitos e leucócitos em degeneração (ROBINS, 2000). Por conter tantas plaquetas, os polimorfismos plaquetários podem ser muito importantes no desenvolvimento de trombos brancos. Essa importância é confirmada pela afirmação de que as plaquetas ativadas formam um tampão arterial com um mínimo de fibrina, chamado “trombo branco”, que causa morte em torno do tecido (FRANCO et al., 2005).

É importante destacar que glicoproteínas plaquetárias de membrana são altamente polimórficas (WEISS, 1996). Os dois principais polimorfismos da glicoproteína são o C→T 1565 Leu/Pro gerando os alelos HPA-1a(PIA1 ou A1) e HPA-1b(PIA2 ou A2) na subunidade GPIIIa, e o T→G 2622 Ser/Ile gerando os alelos HPA-3(a ou b), na subunidade GPIIb (LEKAKIS, 2008). Para o polimorfismo da posição 1565, o RNAm de GPIIIA contém os códons CGC (Pro33) para o alelo A2 mutante e CUG (Ile33), para o alelo A1 normal (NEWMAN et al., 1989), com freqüências gênicas de 0,15 e 0,85 respectivamente em população caucasiana (SANTOSO, 2001). Esse polimorfismo pode ser identificado a partir do sítio para a enzima *Msp* I que é formado pela troca dos nucleotídeos no alelo A2.

Plaquetas A2 positivas, quando comparadas às A1 positivas, mostraram-se mais facilmente ativáveis no processo de coagulação, na degranulação e na ligação ao fibrinogênio, constituindo um estado denominado de “hiperreativo”. Esse estado, *in vivo*, poderia exercer uma grande tendência à trombose em indivíduos com alelos A2 (PAMUKCU et al, 2005).

Foi sugerida uma forte associação entre o alelo A2 e trombose coronária aguda. A freqüência gênica do alelo HPA-1b (A2) foi 3,6 vezes mais alta entre pacientes jovens com infarto de miocárdio (IAM) ou angina instável, quando comparados aos controles de idade semelhante (WEISS, 1996). Vários outros relatos descreveram a relação do alelo A2 com DAC, bem como a sua importância como preditor de morte súbita por eventos cardíacos em idade relativamente jovem. Entretanto, conclusões consistentes ainda não foram firmadas, devido à heterogeneidade das populações e dos estudos (PAMUKCU et al., 2005). Sabe-se também que a mesma importância não foi sugerida

para AVCi. Não foi encontrada, por exemplo, associação entre o alelo A2 e mulheres jovens com AVCi (KATHRYN et al., 1998).

Poucas investigações foram realizadas na população brasileira e, portanto, não se conhece bem a frequência desse polimorfismo em nossa população. Não se sabe também se ele realmente está relacionado ao desenvolvimento de eventos trombóticos arteriais.

Sabendo-se que a agregação plaquetária é muito importante para a formação do trombo arterial, a qual é dependente da quantidade de receptores GPIIb/IIIa expressos na membrana plaquetária, acredita-se que o estudo de tal polimorfismo poderá ser útil no entendimento mais amplo do papel desta glicoproteína na fisiopatologia do AVCi em pacientes jovens de nossa população.

1.4 FATORES DE RISCO PARA AVCI EM INDIVÍDUOS JOVENS DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

A manifestação de doença aterotrombótica em indivíduos jovens não é comum e precisa receber uma especial atenção. Isso porque esses pacientes podem não estar expostos aos mesmos fatores de risco que idosos. Um importante marcador do risco de ocorrência precoce de AVCi é a evidência prévia de aterosclerose de grandes artérias, com estenose superior a 50% (HANKEY, 2003). Muitos avanços têm sido alcançados na definição de fatores de risco biológicos, adquiridos e ocorrência de aterosclerose (GORELICK, 2002; SACCO, et al., 2006). No entanto, a identificação de fatores de risco para a aterosclerose cerebrovascular sintomática de acordo com idade tem sido pouco investigada. Uma maior investigação poderia resultar em melhor acompanhamento de indivíduos jovens, possíveis intervenções no modo de vida e nos fatores de risco

associados, como medidas de saúde pública, especialmente se consistentes entre indivíduos de diferentes origens étnicas. Além disso, a ocorrência de AVCi em indivíduos jovens pode estar mais fortemente relacionada a fatores genéticos.

Desde 2003, o Grupo de Pesquisa em Trombofilias e Hipercoagulabilidade do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG tem avaliado fatores de risco para AVCi em pacientes brasileiros jovens, comparando casos e controles com idades e sexo pareados. Inicialmente, pacientes e controles foram comparados quanto às frequências das mutações FVL, G20210A e C677T. Frequências semelhantes foram observadas para a mutação C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) entre pacientes e controles. No entanto, frequências aumentadas do FVL (6,1%) e do gene da protrombina G20210A (2,4%) foram detectadas em pacientes quando comparados aos controles (0,6% para ambas as mutações). Apesar disso, apenas o FVL foi significativamente associado com o risco de AVCi (odds ratio 9.05, $p= 0.01$). Nesses pacientes, o AVCi ocorreu como primeiro evento vascular em 56,8% deles (SABINO et al., 2006; SABINO et al., 2008).

Foram avaliados também os níveis de homocisteína (Hcy), proteína C reativa (PCR) das apolipoproteínas A e B (apoB e apoA) e demais parâmetros tradicionais do perfil lipídico. Não foi observada diferença significativa em relação ao aumento dos níveis de Hcy (SABINO et al., 2007). No entanto, diferenças significativas foram observadas em relação aos níveis de PCR, bem como para apoA, apoB e demais marcadores do perfil lipídico, conforme apresentado na tabela 1 (Sabino et al., 2008). Cumpre ressaltar que, embora elevados em relação aos níveis observados no grupo controle, os níveis de apoA e apoB se encontram próximos aos valores de referência preconizados pela literatura. Em conjunto, esses dados sugerem a presença de

processo aterosclerótico e inflamatório nesses pacientes e que os mesmos estão associados como fatores de risco à ocorrência de AVCi.

Tabela 1 – Significância estatística para valores de perfil lipídico, apolipoprotéico e de PCR em pacientes com AVCi e controles saudáveis. Resultados publicados por Sabino et al., (2008).

	Control	IS	P
TC (mmol/L)	4.56 ± 0.98	5.23 ± 1.40	0.02
HDLc (mmol/L)	1.49 ± 0.42	1.25 ± 0.24	<0.001
LDLc (mmol/L)	2.56 ± 0.83	3.28 ± 1.20	<0.001
TG (mmol/L)	1.12 ± 0.60	1.50 ± 0.95	0.002
ApoA-I (g/L)	1.63 ± 0.16	1.49 ± 0.95	<0.001
ApoB (g/L)	0.64 ± 0.17	0.86 ± 0.21	<0.001
ApoB/ApoA-I	0.40 ± 0.11	0.58 ± 0.16	<0.001
hs-CRP (mg/dL)*	0.9	1.7	<0.001

Considerando as alterações nos níveis de apoB observadas e o importante papel que a mesma apresenta como fator de risco para aterosclerose e ocorrência de AVCi, foi objetivo do presente trabalho investigar em pacientes jovens da população brasileira, incluindo aqueles previamente avaliados por Sabino *et al.*,(2006; 2007; 2008), a frequência dos polimorfismos no gene da apoB e sua associação com a ocorrência de AVCi. Além disso, o fato do polimorfismo PLA1/A2 estar relacionado à hiperreatividade plaquetária, este foi também incluído na presente investigação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a existência de associação entre polimorfismos nos genes da apoB e GPIIB/IIIA e acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) em um grupo de pacientes brasileiros jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 - Padronizar as técnicas de PCR alelo-específica ou PCR-RFLP (polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição) para os polimorfismos I/D, *Xba* I e *Eco* RI do gene da apoB e PLA1/A2 do gene da GPIIb/IIIa ;

2.2.2 - Determinar a freqüência para os polimorfismos em questão em indivíduos do grupo controle (que não apresentem histórico de AVCi ou outras doenças cardiovasculares) e nos casos (grupo de pacientes) com (AVCi);

2.2.3 - Avaliar por meio de análises estatísticas a associação de cada polimorfismo separadamente e em conjunto, na forma de análise de associação, com o risco de AVCi comparando-se casos (pacientes jovens) e indivíduos do grupo controle.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BANCO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Neste trabalho, foram utilizadas alíquotas de DNA extraídas de sangue coletado em trabalhos anteriores do grupo de pesquisas e que constituem, na atualidade, um

banco de amostras biológicas, mantido sob a responsabilidade do Grupo de Pesquisa em Trombofilias e Hipercoagulabilidade do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Este banco de amostras biológicas está regulamentado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer ETIC 0216/06 – anexo A).

Amostras e dados demográficos de um grupo de 65 pacientes também foram utilizadas. Eles foram fornecidos pela Dr. Telma Gadelha da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A todos os participantes do estudo foram esclarecidos os objetivos da pesquisa e solicitada assinatura do TCLE (anexo B). Suas amostras foram então incluídas no banco de amostras biológicas e de lá foram retiradas para o desenvolvimento do presente trabalho.

A aprovação do projeto de pesquisa, anteriormente intitulado “Estudo de polimorfismos de potencial interesse em doenças arteriais” também encontra-se em anexo (anexo C).

3.2 CASUÍSTICA

3.2.1 - Seleção dos pacientes do estudo

Foram constituídos três grupos para o presente estudo:

- Grupo I (pacientes com AVCi, n=48): Formado por pacientes ($34,5 \pm 14,6$ anos), 56,3% mulheres e 43,7% homens, que sofreram AVCi, oriundos do estado de Minas Gerais.

- Grupo II: (pacientes com AVCi, n=65): Formado por pacientes ($33,2 \pm 9,2$ anos) que sofreram AVCi, 63,7% de mulheres e 36,9% de homens oriundos do estado do Rio de Janeiro.
- Grupo III: (controles saudáveis, n=291): Indivíduos aparentemente saudáveis ($32,9 \pm 14,4$ anos) e que não apresentam história pregressa de trombose, selecionados da comunidade cujas amostras foram inseridas no Banco de Amostras Biológicas. Foi constituído por 65,4% de mulheres e 34,6% de homens.

Os pacientes participantes do Grupo I foram encaminhados à Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais objetivando uma investigação mais detalhada dos fatores de risco, uma vez que são pacientes jovens e que não apresentaram, na maioria dos casos, os fatores de riscos adquiridos mais comumente associados à trombose arterial tais como hipertensão e tabagismo. Deles foram coletadas as amostras biológicas e dados clínicos.

De maneira semelhante, os pacientes jovens que compuseram o Grupo II foram encaminhados a laboratórios de hemostasia de Hospitais universitários da cidade do Rio de Janeiro.

As fichas clínicas (apêndice A) destes pacientes e controles foram disponibilizadas para levantamento dos dados de interesse, como local de ocorrência do evento trombótico, recorrência do mesmo, data do diagnóstico, história familiar, fatores de risco associados, dados laboratoriais, dentre outros.

3.2.2 - Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos, neste estudo, pacientes com diagnóstico de AVCi, confirmado por cintilografia ou ressonância magnética nuclear (RMN). Os pacientes foram incluídos seqüencialmente no estudo.

No grupo-controle, foram incluídos indivíduos sem história pregressa de trombose venosa ou arterial, bem como indivíduos sem parentesco com os pacientes. Apesar disso procurou-se estabelecer pareamento de idade e sexo entre os grupos. Todos eram provenientes do estado de Minas Gerais.

Pacientes com história pregressa de trombose venosa ou embolia pulmonar não foram incluídos, assim como aqueles com DAC definida por evento anterior ou por comprovada presença de estenose em angiografia coronariana.

Além disso, participantes com menos de 8 anos ou mais de 60 anos ou com hemoglobinúria paroxística noturna, câncer hepático, infecção, doenças auto-imunes ou mieloproliferativas, assim como aqueles com distúrbios da coagulação que não o AVCi, foram excluídos. Também não foram incluídos participantes que haviam sido expostos a imobilização prolongada ou que foram submetidos à cirurgia recentemente.

3.2.3 - Características da população estudada

a) Para a caracterização dos pacientes e controles foram definidos alguns fatores de risco adquirido:

- Informações sobre tabagismo, uso de medicamentos e a história pessoal de doenças foram recolhidas através de uma entrevista padronizada feita por profissionais de saúde treinados. Além disso, todos os participantes realizaram um extenso e padronizado exame médico. Índice de massa corporal (IMC) foi

observado. Foram considerados obesos os indivíduos com índices de massa corporal maior que 30 Kg/m^2 .

- A Pressão arterial sistólica e diastólica foi medida no braço direito com o paciente na posição sentada. Os participantes que relataram hipertensão, que tomavam medicação anti-hipertensiva, e/ou que registraram uma pressão arterial base de 160/90 mmHg, foram definidos como portadores de hipertensão.

- Os indivíduos foram classificados como tendo diabetes mellitus se relatassem a doença ao serem perguntados ou se estavam em uso de anti-diabéticos orais ou insulina.

- Um fumante regular foi definido como um participante que atualmente fuma pelo menos um cigarro por dia.

- Participantes que relataram ter-se submetido a cirurgias, usar estrógenos ou terem passado por gravidez, tiveram esses dados computados.

- Como dislipidêmicos, foram considerados os participantes que apresentavam dosagem ou que declaravam ter índices de colesterol total, triglicerídeos ou LDL-C superiores a 240mg/dL, 200mg/dL e 160mg/dL, respectivamente. As dosagens foram realizadas por Sabino durante o desenvolvimento de tese de doutorado (SABINO, 2008), e seus resultados foram disponibilizados.

3.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, amostras de 5 mL de sangue em EDTA e 5mL de sangue em tubo sem anticoagulante foram coletadas dos participantes em jejum de 12 a 14 horas por punção venosa a vácuo com

sistema Vacutainer (Becton-Dickinson). Alíquotas em EDTA de 300 µL foram usadas para a extração de DNA. A amostra obtida em tubo sem anticoagulante foi centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, que foi utilizado nas determinações do perfil lipídico e apolipoprotéico.

3.4 ANÁLISE MOLECULAR

3.4.1 - Extração de DNA

Amostras de DNA foram extraídas dos leucócitos provenientes do sangue coletado em EDTA, utilizando-se o conjunto de reagentes “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega) e seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

A um volume de 900 µL de solução de lise de hemácias em um tubo tipo *Eppendorf*® de 1,5 mL foram adicionados 300 µL de sangue total colhido em EDTA e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a lise das hemácias, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 60 segundos à temperatura ambiente em microcentrifuga FANEN® USA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi solubilizado com 300 µL de solução de lise nuclear e homogeneizado cuidadosamente. Nesta etapa, foram adicionados 100 µL de solução de precipitação de proteínas, sendo a solução misturada no vórtex por 20 a 30 segundos e centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *Eppendorf*®, contendo 300 µL de isopropanol e homogeneizado para que ocorresse a precipitação do DNA. Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Logo após, foram adicionados 300 µL de etanol a 70%, invertendo-se o tubo várias vezes. Novamente, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante desprezado. Finalmente, foram adicionados 50 µL de

solução de hidratação (Tris 10mM/EDTA 0,1 mM). Após este procedimento, as amostras foram armazenadas no freezer a – 20° C para posterior pesquisa dos polimorfismos.

3.4.2 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Enzimas de Restrição

Promoveu-se a investigação dos polimorfismos do gene da apoB (*Eco* RI, *Xba* I, I/D) e da glicoproteína GPIIb/IIIa (PLA1/A2) usando as técnicas de PCR alelo específica e RFLP (polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição). Os protocolos utilizados para as reações foram otimizados durante o desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Para a investigação do polimorfismo de Inserção/Deleção do exon 1 do gene da apoB foi realizada apenas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma vez que a genotipagem é alelo-específica e não necessita de digestão enzimática.

O Quadro 1 mostra os oligonucleotídeos iniciadores utilizados em todas as reações. Eles foram sintetizados pela Prodimol® . As sequências utilizadas para os polimorfismos da apoB (*Xba* I, *Eco* RI e I/D) foram descritas por RENGES et al., (1992) e as sequências para o polimorfismo de GPIIb/IIIa foram descritas por PAMUCKU et al., (2005).

Quadro 1 - Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos dos genes da apo B e GPIIb/IIIa

	Primer Senso	Primer Reverso
GPIIb/IIIa	5'-GCT CCA ATG TAC GGG GTA AAC-3'	5'-GGG GACTGA CTT GAG TGA CCT-3'
I/D	5' CAG CTG GCG ATG GAC CCG CCG A 3'	5'ACC GGC CCT GGC GCC CGC CAG CA 3'
EcoRI	5'CTG AGA GAA GTG TCT TCG AAG 3'	5'CTC GAA AGG AAG TGT AAT CAC 3'
XbaI	5'GGA GAC TAT TCA GAA GCT AA 3'	5'GAA GAG CCT GAA GAC TGA CT 3'

Utilizando-se da ferramenta "BLAST" disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, verificou-se a especificidade e similaridade dos oligonucleotídeos utilizados na detecção dos polimorfismos de apoB e de GPIIb/IIIa.

Nas reações de PCR foram utilizados desoxirribonucleotídeos fornecidos pela GIBCO BRL®; O tampão IB (15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de Triton-100) e a Taq polimerase da Phoneutria®. Essas reações foram padronizadas nas condições apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR para pesquisa dos polimorfismos de interesse, após padronização.

CONDIÇÕES PADRONIZADAS DE AMPLIFICAÇÃO					
Reagente	Estoque	PIA1/A2	I/D	XbaI	EcoRI
	(500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 15 MgCl ₂)				
Tampão IB		2,0 µL	2,0 µL	2,0µL	2,0 µL
dNTPs	2 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,1 mM	0,2 mM
Óligo senso	10 pmol/µL	0,4 µM	0,5 µM	0,1 µM	0,5 µM
Óligo antisenso	10 pmol/µL	0,4 µM	0,5 µM	0,1 µM	0,5 µM
Taq polimerase	5u/ µL (unidades)	0,5 u/µL	1 u/µL	0,5u/µL	0,5u/µL
DNA²	100ng/µL(media)	20µg	20µg	20µg	20µg
Água q.s.p		20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

A partir do descrito por RENGES et al., (1992) e por PAMUCKU et al., (2005) foram elaborados protocolos-teste para genotipagem das amostras para os quatro polimorfismos. Os testes foram conduzidos com amostras aleatórias do Banco de Amostras Biológicas, a fim de proceder a padronização da técnica nas condições do laboratório, e obter amostras controles para os genótipos estudados. Os protocolos padronizados, podem ser visualizados nos quadros 3 e 4.

Quadro 3 - Protocolos para execução da PCR para os polimorfismos de I/D e Xba I

Número ciclos	I/D		Xba I	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 min	95°C	5 min
	95°C	1 min	92°C	1 min
10	69°C	1 min	59°C	5 min
	72°C	1 min	72°C	1 min
	95°C	1 min	92°C	1 min
25	65°C	1 min	58°C	5 min
	72°C	1 min	72°C	1 min
	72°C	5 min	72°C	5 min
1	4°C	5 min	4°C	5 min
	10°C	Até 24hs	10°C	Até 24hs

Quadro 4 - Protocolos para execução da PCR para os polimorfismos de Eco RI e PLA1A2

Número ciclos	Eco RI		PLA1A2	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
1	92°C	5 min	94°C	4 min
	92°C	1 min	94°C	30 seg
35	60°C	5 min	55°C	30 seg
	72°C	1 min	72°C	45 seg
	72°C	10 min	72°C	8 min
1	4°C	5 min	4°C	10 min
	10°C	Até 24hs	10°C	Até 24 hs

As digestões para Xba I e Eco RI e PLA1A2 otimizadas, são apresentadas no quadro 5. Nelas, os produtos da PCR permaneceram em contato com as respectivas enzimas a 37°C, *overnight*. Foram usadas as enzimas de restrição da Promega® para as digestões enzimáticas.

Quadro 5 - Concentrações e quantidades dos reagentes utilizados na digestão enzimática dos fragmentos resultantes da reação em cadeia da polimerase, após padronização.

	<i>XbaI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>PIA1/2</i>
Água Mili-Q	8,0 µL	8,0 µL	8,2 µL
Tampão	(B)1µL	(H)1µL	1µL
Enzima	1,2u/ µL	1,0 u/µL	0,8
Volume total	10 µL	10 µL	10 µL

3.4.3 - Eletroforese

Os fragmentos resultantes das reações de PCR ou de digestões foram detectados através de eletroforese em géis de poliacrilamida a 8%. Cada gel foi preparado com 10 mL de solução de poliacrilamida, 86 µL de persulfato de amônio(APS) e 10 µL de TEMED. A solução foi então vertida em um molde de placas de vidro e um pente de plástico foi acoplado para que as canaletas fossem formadas durante a polimerização do gel. Depois de aproximadamente 20 minutos, o pente foi retirado e a cuba de eletroforese montada.

Para identificação do polimorfismo de I/D, em cada canaleta do gel, foram aplicados 5 µL de uma mistura preparada com 5 µL do produto da PCR e 5 µL de tampão de corrida da amostra. Além disso, em uma canaleta foi aplicado 5 µL de padrão de peso molecular de 1Kb. Para *Xba I*, *EcoR I* e *PIA1A2*, com o intuito de observar a amplificação do produto de PCR, em cada canaleta do gel foram aplicados 4 µL de uma mistura contendo 4 µL do produto da PCR e 4 µL de tampão de corrida da amostra. Além disso, em uma canaleta foi aplicado 4 µL de padrão de peso molecular de 1 Kb.

Cada eletroforese (pós amplificação ou digestão), foi realizada utilizando-se fonte de corrente elétrica (*EC - Apparatus Corporation*® USA, em conjunto com cubas pequenas *OLW*® USA. A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 60 minutos, com a voltagem de 100V, utilizando-se TBE 1X como tampão de eletroforese.

Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao procedimento de coloração. Eles foram primeiramente imersos em solução fixadora por 15 minutos, recebendo logo após, banho com solução de nitrato de prata, e incubados por mais 10 minutos. Finalmente os géis foram imersos em solução reveladora, onde permaneceram até que os fragmentos corados pelo nitrato de prata pudessem ser revelados e, portanto, visualizados.

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

A observação de fragmentos de 84 e 93 pares de bases identifica o genótipo para I/D. Para os outros polimorfismos (*Xba* I, *Eco* RI e *PLA1A2*), a observação de fragmentos específicos apenas confirmou a amplificação dos fragmentos de DNA por PCR, de 710, 480 e 282 pares de bases, respectivamente, como ilustrado nas figuras 1, 2 e 3.

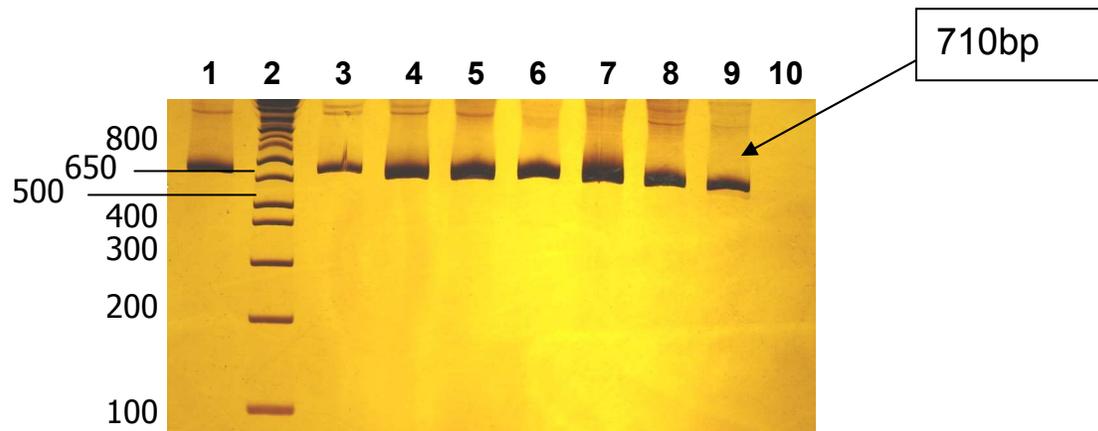


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Nas canaletas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 DNAs de indivíduos com o fragmento específico de 710bp (*Xba* I); na canaleta 2, o padrão de peso molecular; na canaleta 10, o branco da reação.

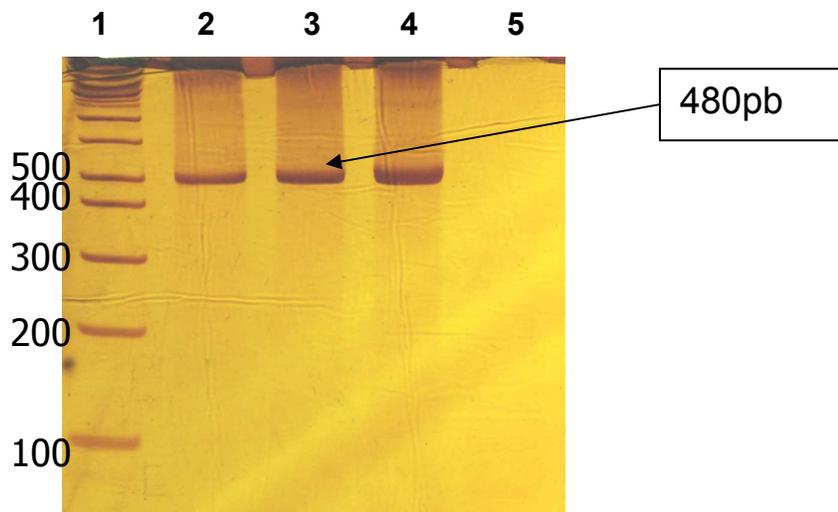


Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Nas canaletas 2, 3 e 4 DNAs de indivíduos com o fragmento específico de 480 bp (*Eco* RI); na canaleta 1, o padrão de peso molecular; na canaleta 5, o branco da reação.

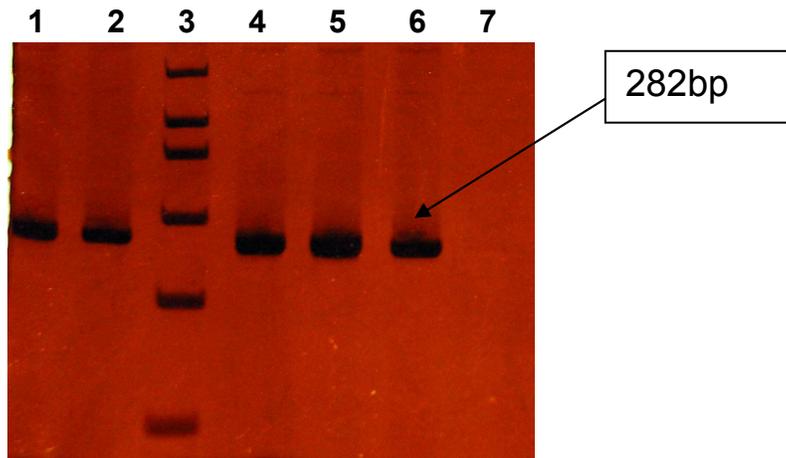


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Nas canaletas 1, 2, 4, 5 e 6 DNAs de indivíduos com o fragmento específico de 282 bp (PLA1A2); na canaleta 3, o padrão de peso molecular; na canaleta 7, o branco da reação.

Após visualização dos fragmentos amplificados nos géis de poliacrilamida, foi feita uma estimativa comparativa da quantidade de DNA presente em cada amostra (exceto para I/D) e, a partir desta informação, as reações de digestão com enzimas de restrição foram preparadas. Tal procedimento foi conduzido visando uma maior homogeneidade da quantidade de DNA a ser digerida entre as amostras analisadas e também a digestão completa dos produtos de PCR. Em cada conjunto de reações, foram incluídas amostras previamente genotipadas, como controle de atividade enzimática.

Para *Eco* RI, *Xba* I e PIA1A2, após digestão enzimática, em cada canaleta do gel foram aplicados 10 μ L de uma mistura preparada com 10 μ L do produto da PCR e 4 μ L de tampão de corrida da amostra. Além disso, em uma canaleta foi aplicado 4 μ L de padrão de peso molecular de 1 Kb.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 - Descrição dos Dados

As informações coletadas foram digitadas em um banco de dados desenvolvido no Excel®. Os resultados descritivos, apresentados na seção de resultados, foram obtidos utilizando as frequências e porcentagens das características das diversas variáveis categóricas e da obtenção de medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão) para as quantitativas.

Nas tabelas, onde são apresentados os resultados, a letra n corresponde ao número de observações, * corresponde ao teste Exato de Fisher e D.P. a desvio padrão.

3.5.2 - Comparações entre as Variáveis

As variáveis categóricas em estudo foram comparadas com a situação caso-controle dos pacientes a partir de tabelas de contingência sendo aplicado a elas o teste qui-quadrado de Pearson para comparação de proporções. Na presença de pelo menos uma frequência esperada menor que 5, foi utilizado o teste exato de Fisher. A categoria considerada como referência está indicada nas tabelas de resultados com o valor 1,0 na coluna para os valores de *odds ratio* (OR). Para a variável quantitativa Idade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se as observações apresentam distribuição normal ou simétrica. Na presença de normalidade, a comparação (igualdade de médias) entre as três categorias foi realizada utilizando o teste F (ANOVA) e caso contrário, com o teste de Kruskal-Wallis. Já para as comparações de dois grupos, se a distribuição era simétrica foi utilizado o teste-t de Student, e caso contrário o de Mann-Whitney (TRIOLA, 2005).

4 RESULTADOS

Inicialmente, foi conduzida a padronização das reações de PCR e digestão com enzimas de restrição nas condições do laboratório, com a subsequente genotipagem dos pacientes e controles para os polimorfismos propostos.

Para o polimorfismo INSERÇÃO (I)/ DELEÇÃO (D) no gene da apo B, o alelo (I) com inserção dos 9 pares de bases foi identificado pela amplificação de um fragmento de 93 pares de base, enquanto que o alelo (D-mutante) com a deleção dos 9 pares de base, foi identificado pela amplificação de um fragmento de 84 pares de base (RENGES, 1992), conforme ilustrado na Figura 4.

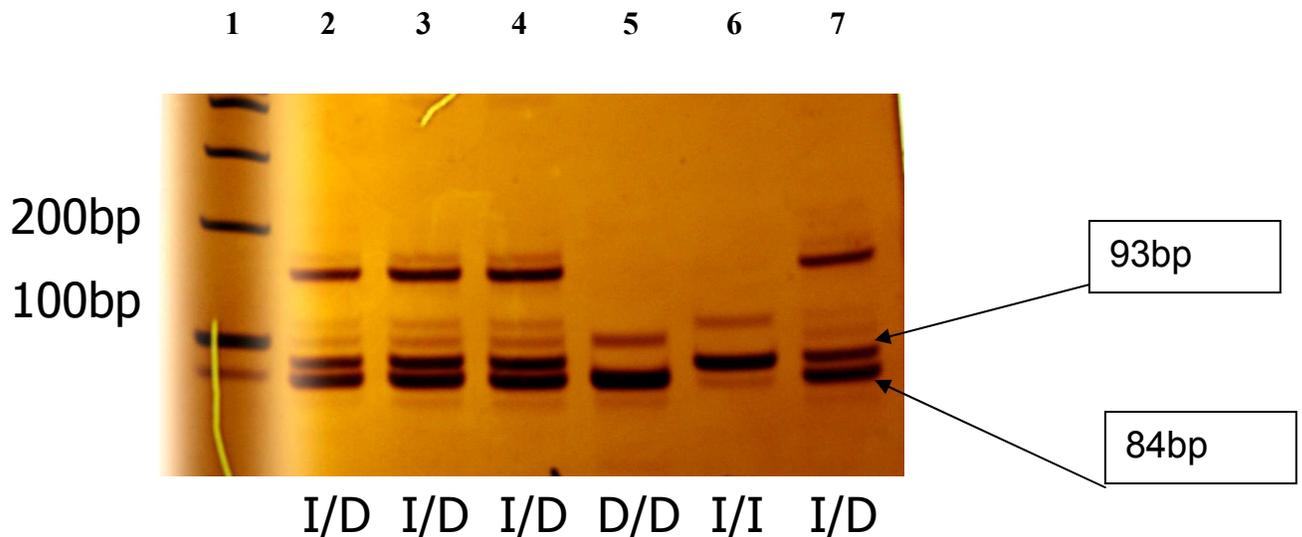


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular; nas canaletas 2, 3, 4 e 7, DNAs de indivíduos heterozigotos para a mutação ; na canaleta 5, DNA de indivíduo com dois alelos de Deleção (D) e na canaleta 6 DNA de indivíduo homozigoto com dois alelos de Inserção(I).

Para detecção do polimorfismo *Xba* I no gene da apo B, o produto amplificado na reação de PCR corresponde a 710 pb e foi submetido à digestão com a enzima de restrição específica *Xba* I. A presença da mutação (alelo "X+") faz com que *Xba* I clive o fragmento em duas partes, uma de 433 pb e outra de 277 pb, os quais são observados na figura 5.

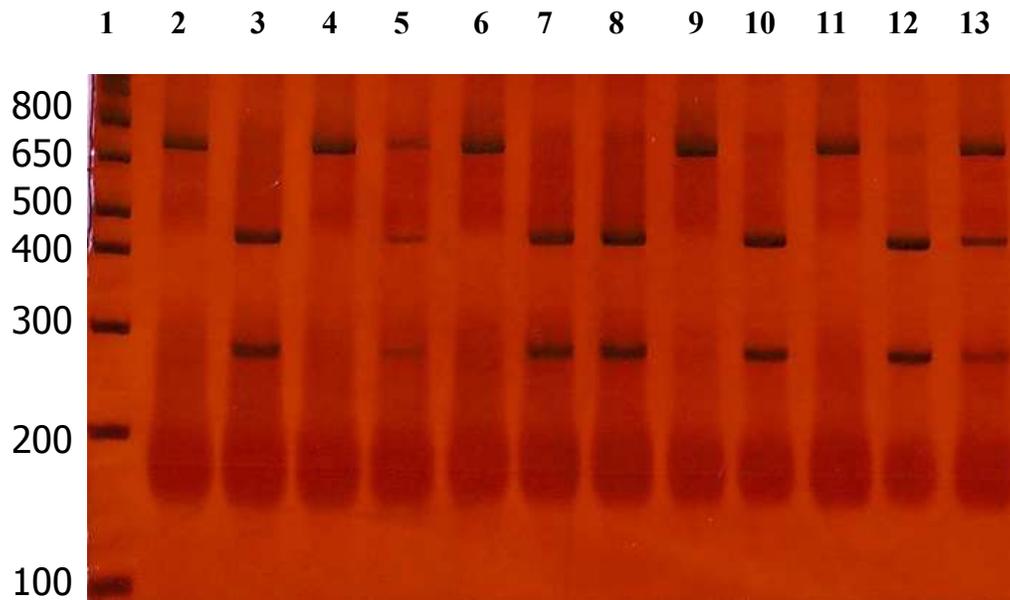


Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular; Nas canaletas 2, 4, 6, 9 e 11, DNAs de indivíduos homocigotos para a ausência da mutação (X-X-); Nas canaletas 3, 7, 8, 10 e 12, DNAs correspondentes a pacientes homocigotos para a presença dos alelos mutantes (X+X+); Nas canaletas 5 e 13 DNAs de indivíduos heterocigotos.

Para a detecção do polimorfismo *Eco* RI no gene da apo B, o produto final da amplificação por PCR foi submetido à digestão com a respectiva enzima de restrição (*Eco* RI). Na presença do sítio para a *Eco* RI (alelo E+), a digestão com esta enzima resultou em dois fragmentos, 253 e 227bp.

Os fragmentos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com sua revelação pelo nitrato de prata . A figura 6 mostra os DNAs digeridos e os respectivos genótipos.

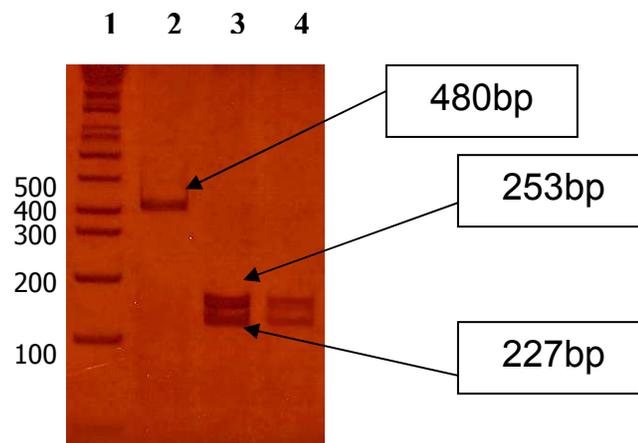


Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular . Na canaleta 2 DNA de indivíduo homocigoto para a mutação e ausência do sítio para a enzima *Eco* RI (E-E-); Na canaletas 3 e 4 DNAs correspondentes a pacientes homocigotos selvagens e com a presença do sítio para a enzima *Eco* RI (E+E+).

O produto final da amplificação para detecção do polimorfismo PIA1A2 foi submetido à digestão com a respectiva enzima de restrição (*Msp* I). Na presença do sítio para a *Msp* I (alelo A2), a digestão com esta enzima resultou em dois fragmentos, 125 e 157bp.

Os fragmentos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com sua revelação pelo Nitrato de prata. A figura 7 mostra os DNAs digeridos e os respectivos genótipos.

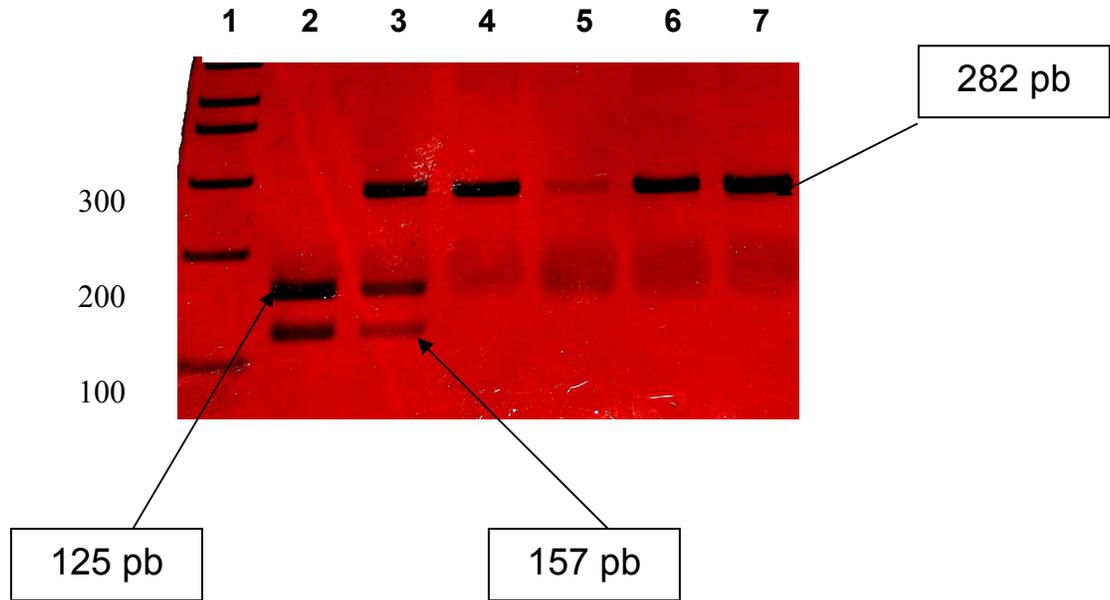


Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% revelado pelo nitrato de prata. Na canaleta 1, o padrão de peso molecular. Nas canaletas 4, 5, 6 e 7 há DNAs de indivíduos homocigotos para a ausência da mutação (PLA1A1); Na canaleta 2 há DNA correspondente a um paciente homocigoto para a presença dos alelos mutantes (PLA2A2); Na canaleta 3, DNA de indivíduo heterocigoto.

Como descrito na seção Materiais e Métodos, os pacientes estudados eram oriundos das cidades de Belo Horizonte e Rio de Janeiro. Devido à heterogeneidade étnica da população brasileira, inicialmente, foi conduzida uma análise comparando se havia diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos estudados entre os casos de Rio de Janeiro e Belo Horizonte. Os dados relativos a essa análise são apresentadas na Tabela 2. Não se observa diferença com significância estatística para nenhuma delas. Assim, para os resultados posteriores, considerou-se conjuntamente os pacientes das duas cidades. É importante ressaltar que consideramos “I” como indivíduos que apresentam pelo menos um alelo I (I/I + I/D), “D” como os indivíduos com pelo menos um alelo D (I/D + D/D), “X-” como aqueles com pelo menos um alelo X-

[(X-X-) + (X+X-)], e assim por diante para os demais alelos estudados (“X+”, “E+”, “E-“, “A1” e “A2”).

Tabela 2 - Comparações entre grupo de pacientes do Rio de Janeiro e de Belo Horizonte para os polimorfismos de I/D, Xba I e Eco RI no gene da apo B e PLA1/A2 no gene da gp IIb/IIIa

Covariável	Localização				Valor-p	OR	IC95%
	Belo Horizonte		Rio de Janeiro				
	n	%	N	%			
I/I							
Sim	24	50,0	27	44,3	0,551	1,3	0,6 a 2,9
Não	24	50,0	34	55,7		1,0	
I/D							
Sim	17	35,4	26	42,6	0,445	1,0	
Não	31	64,6	35	57,4		1,4	0,6 a 3,2
D/D							
Sim	7	14,6	8	13,1	0,825	1,1	0,3 a 3,8
Não	41	85,4	53	86,9		1,0	
“D”							
Sim	24	50,0	34	55,7	0,551	1,0	
Não	24	50,0	27	44,3		1,3	0,6 a 2,9
X-X-							
Sim	18	38,3	21	38,2	0,991	1,0	0,4 a 2,4
Não	29	61,7	34	61,8		1,0	
X+X-							
Sim	20	42,5	26	47,3	0,633	1,0	
Não	27	57,5	29	52,7		1,2	0,5 a 2,9
X+X+							
Sim	9	19,2	8	14,5	0,534	1,4	0,4 a 4,5
Não	38	80,8	47	85,5		1,0	
“X+”							
Sim	29	61,7	34	61,8	0,991	1,0	0,4 a 2,4
Não	18	38,3	21	38,2		1,0	
E+E+							
Sim	31	65,9	36	65,5	0,958	1,0	0,4 a 2,5
Não	16	34,1	19	34,5		1,0	
E+E-							
Sim	14	29,8	17	35,4	0,958	1,0	0,4 a 2,6
Não	33	70,2	41	64,6		1,0	
E-E-							
Sim	2	4,3	2	3,4	1,000	1,2	0,1 a 13,0
Não	45	95,7	56	96,6		1,0	
“E-“							
Sim	16	34,1	19	32,8	0,900	1,1	0,4 a 2,6
Não	31	65,9	39	67,2		1,0	
PLA1/A1							
Sim	33	68,7	45	69,2	0,956	1,0	
Não	15	31,3	20	30,8		1,0	0,4 a 2,5
PLA1/A2							
Sim	12	25,0	19	29,2	0,618	1,0	
Não	36	75,0	46	70,8		1,2	0,5 a 3,1
PLA2/A2							
Sim	3	6,3	1	1,5	0,310	4,3	0,4 a 110,1
Não	45	93,7	64	98,5		1,0	
“A2”							
Sim	15	31,3	20	30,8	0,956	1,0	0,4 a 2,5
Não	33	68,7	45	69,2		1,0	

Os pacientes do estudo eram jovens (grupos I e II), assim como os indivíduos pertencentes ao grupo controle (grupo III). Os principais fatores de risco convencionais encontrados foram hipertensão (21 pacientes e 11 controles), tabagismo (20 pacientes e 18 controles), dislipidemias (20 pacientes e 23 controles) e obesidade (2 pacientes e 6 controles). Somente um paciente e um controle foram classificados como diabéticos.

Importante é destacar que apesar de existirem 291 indivíduos do grupo controle, 48 pacientes de Belo Horizonte e 65 originados do Rio de Janeiro, apenas 247, 48 e 61 participantes, respectivamente, foram genotipados para o polimorfismo de I/D. Isto se deveu à dificuldades técnicas em que sucessivas tentativas de amplificação com variações no protocolo técnico foram feitas sem sucesso para as amostras que não foram genotipadas.

A Tabela 3 apresenta a comparação da média da idade entre os indivíduos do grupo de pacientes e do grupo controle. Não se observa diferença com significância estatística nesta comparação. Mulheres corresponderam a 58,7% (64) dos pacientes e 66,8% (165) dos indivíduos do grupo controle, enquanto que os homens a 41,3% (45) dos pacientes e 33,2% (82) dos indivíduos do grupo controle.

Tabela 3 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo I/D em relação à idade.

Covariável	Grupo								Valor-p
	Caso				Controle				
	n	Média	Dp	Mediana	n	Média	Dp	Mediana	
Idade (anos)	109	33,8	12,0	35,0	247	33,5	13,1	31,0	0,874 ¹

Legenda: ¹: Teste-t.

As comparações entre as freqüências do polimorfismo I/D detectadas para pacientes e controles são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise da associação entre o polimorfismo I/D no gene da apolipoproteína B e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.

Covariável	Grupo				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
I/D							
Sim	43	39,4	98	39,7	0,968	1,0	0,6 a 1,6
Não	66	60,6	149	60,3		1,0	
Comparação 1							
D/D	15	22,7	23	15,4	0,196	1,6	0,7 a 3,5
I/I	51	77,3	126	84,6		1,0	
Comparação 2							
D/D e I/D	58	53,2	121	49,0	0,463	1,2	0,7 a 1,9
I/I	51	46,8	126	51,0		1,0	
Comparação 3							
D/D	15	13,8	23	9,3	0,210	1,6	0,7 a 3,3
I/I e I/D	94	86,2	224	90,7		1,0	

Legenda: *: Teste Exato de Fisher.

Entre os pacientes com AVCi, 46,8% (51) têm o genótipo I/I, 39,4% (43) têm o genótipo I/D e 13,8% (15) apresentam o genótipo D/D. Já entre os indivíduos do grupo controle, 51,0% (126) não apresentam a mutação, 39,7% (98) apresentaram apenas um alelo mutante e 9,3% (23) eram homocigotos para a mutação. Apesar disso, não se observa diferença com significância estatística (valor-p \leq 0,05) em nenhuma das comparações. É importante ressaltar que, entre os pacientes, 58 (53,2%) possuem pelo menos um alelo mutante e entre os controles, 121 (49,0%) possuem. As frequências alélicas para esse polimorfismo são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequências alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo I/D.

Alelo	FREQUÊNCIA ALÉLICA				Valor-p	OR	IC95%
	CASOS		CONTROLES				
	n	%	n	%			
D	73	33,5	144	29,1	0,28	1,2	0,9 a 1,8
I	145	66,5	350	70,9		1,0	
TOTAL	218	100,0	494	100,0			

Procedendo-se a comparação dos alelos (D x I) entre pacientes e controles para AVCI, não se observou diferença estatística significativa. O valor de p foi de 0,28 com *odds ratio* de 1,2 e intervalo de confiança entre 0,9 e 1,8.

Para o polimorfismo *Xba* I no gene da apo B, foram genotipados 47 pacientes de Belo Horizonte, 55 do Rio de Janeiro e 264 controles. Assim como para o polimorfismo de I/D, problemas ocorreram na amplificação de algumas amostras. Mesmo com exaustivas variações no protocolo, não foi possível amplificar algumas amostras para *Xba* I.

A Tabela 6 apresenta a comparação da média da idade entre os indivíduos do grupo de pacientes e do grupo controle. Não se observa diferença com significância estatística nesta comparação. Mulheres corresponderam a 58,8% (60) dos pacientes e 64,8% (171) dos indivíduos do grupo controle, enquanto que os homens a 41,2% (42) dos pacientes e 35,2% (93) dos indivíduos do grupo controle.

Tabela 6 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo *Xba* I em relação à idade.

Covariável	Situação								Valor-p
	Caso				Controle				
	n	Média	Dp	Mediana	N	Média	Dp	Mediana	
Idade (anos)	102	34,1	11,9	35,5	264	33,4	13,7	31,0	0,642 ¹

Legenda: ¹: Teste-t.

A análise da frequência do polimorfismo *Xba* I entre os grupos de pacientes e controles é apresentada na Tabela 7. Não se observou diferença com significância estatística (valor-p \leq 0,05) em nenhuma das comparações.

Tabela 7 - Análise da associação entre o polimorfismo *Xba* I no gene da apolipoproteína B e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
X+X-							
Sim	46	45,1	127	48,1	0,605	0,9	0,6 a 1,4
Não	56	54,9	137	51,9		1,0	
Comparação 1							
X+X+	17	30,4	45	32,8	0,737	0,9	0,4 a 1,8
X-X-	39	69,6	92	67,1		1,0	
Comparação 2							
X+X+ e X+X-	63	61,8	172	65,2	0,545	0,9	0,5 a 1,4
X-X-	39	38,2	92	34,8		1,0	
Comparação 3							
X+X+	17	16,7	45	17,1	0,931	1,0	0,5 a 1,9
X-X- e X+X-	85	83,3	219	82,9		1,0	

Legenda: *: Teste Exato de Fisher.

Entre os pacientes com AVCi, 38,2% (39) têm o genótipo X-X-, 45,1% (46) têm o genótipo X+X- e 16,7% (17) apresentam o genótipo X+X+. Já entre os indivíduos do grupo controle, 34,9% (92) não apresentam a mutação, 48,1% (127) apresentaram apenas um alelo mutante e 17,1% (45) eram homozigotos para a mutação. É importante ressaltar que, entre os pacientes, 63 (61,8%) possuem pelo menos um alelo mutante e entre os controles, 172 (65,2%) possuem. As frequências alélicas para esse polimorfismo são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequências alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo *Xba* I.

Alelo	FREQUÊNCIA ALÉLICA				Valor-p	OR	IC95%
	CASOS		CONTROLES				
	n	%	n	%			
X+	80	39,2	217	41,1	0,70	0,9	0,7 a 1,3
X-	124	60,8	311	58,9		1,0	
TOTAL	204	100,0	528	100,0			

Procedendo-se a comparação dos alelos (X+ e X-) entre pacientes e controles para o AVCi, não se observou diferença estatística significativa. O valor de p foi de 0,70 com *odds ratio* de 0,9 e intervalo de confiança correspondente de 0,7 a 1,3.

Para o polimorfismo *Eco RI*, genotiparam-se 47 pacientes de Belo Horizonte, 58 pacientes do Rio de Janeiro e 237 controles. Assim como para o polimorfismo de *I/D* e *Xba I*, problemas ocorreram na amplificação de algumas amostras. Mesmo com exaustivas variações no protocolo, não foi possível amplificar algumas amostras.

A Tabela 9 apresenta a comparação da média da idade para os indivíduos dos grupos de pacientes e controles que foram genotipados para o polimorfismo *Eco RI*. Não se observa diferença com significância estatística nesta comparação, ou seja, a média da idade entre aqueles com e sem AVCi é a mesma. Mulheres corresponderam a 59,0% (62) dos pacientes e 66,7% (158) dos indivíduos do grupo controle, enquanto que os homens a 41,0% (43) dos pacientes e 33,3% (79) dos indivíduos do grupo controle.

Tabela 9 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo *Eco RI* em relação à idade.

Covariável	Situação								Valor-p
	Caso				N	Controle			
	n	Média	Dp	Mediana		Média	Dp	Mediana	
Idade (anos)	105	33,7	12,0	34,0	237	32,7	13,9	30,0	0,497 ¹

Legenda: ¹: Teste-t

A análise da frequência do polimorfismo *Eco RI* entre o grupo de pacientes e o grupo controle é apresentada na Tabela 10. Não se observa diferença com significância estatística (valor-p \leq 0,05) para a Comparação 1 e Comparação 3. No entanto, nota-se diferença significativa quando se avalia a frequência dos genótipo E+E+, entre

pacientes e controles, sugerindo que a ausência desse genótipo está relacionado ao risco de AVCi e que a presença apresenta papel protetor em relação à ocorrência do mesmo evento (OR 1,8; $p=0,02$). Observa-se isso comparando-se pacientes com os genótipos E-E- e E+E- agrupados contra o genótipo E+E+. Para esses dados, a chance de um paciente ter AVCi foi aproximadamente duas vezes maior que um indivíduo do grupo controle com o mesmo genótipo.

Tabela 10 - Análise da associação entre o polimorfismo *Eco R I* no gene da apolipoproteína B e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
E+E-							
Sim	31	29,5	44	18,6	0,024	1,8	1,01 a 3,2
Não	74	70,5	193	81,4		1,0	
Comparação 1							
E-E-	4	5,4	7	3,6	*0,503	1,5	0,4 a 6,0
E+E+	70	94,6	186	96,4		1,0	
Comparação 2							
E-E- e E+E-	35	33,3	51	21,5	0,020	1,8	1,1 a 3,1
E+E+	70	66,7	186	78,5		1,0	
Comparação 3							
E-E-	4	3,8	7	3,0	*0,742	1,3	0,3 a 5,1
E+E- e E+E+	101	96,2	230	97,0		1,0	

Legenda: *: Teste Exato de Fisher.

Entre os pacientes com AVCi, 66,7% (70) têm o genótipo E+E+, 29,5% (31) têm o genótipo E+E- e 3,8% (4) apresentam o genótipo E-E-. Já entre os indivíduos do grupo controle, 78,5% (186) não apresentam a mutação, 18,6% (44) apresentaram apenas um alelo mutante e 3,0% (7) eram homocigotos para a mutação. É importante ressaltar que, entre os pacientes, 35 (33,3%) possuem pelo menos um alelo mutante e entre os controles, 51 (21,5%) possuem. As frequências alélicas para esse polimorfismo são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Frequência alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo *Eco RI*.

Alelo	FREQUÊNCIA ALÉLICA							
	CASOS		CONTROLES			Valor-p	OR	IC95%
	n	%	n	%	n			
E-	39	18,6	58	12,2	0,04	1,6	1,0 a 2,6	
E+	171	81,4	416	87,8		1,0		
TOTAL	210	100,0	474	100,0				

Procedendo-se a comparação dos alelos (E- e E+) entre pacientes e controles para o AVCi, observa-se diferença estatística significativa. O valor de p foi de 0,04 com *odds ratio* de 1,6 e intervalo de confiança correspondente a 1,0-2,6.

A exemplo dos problemas ocorridos na amplificação do DNA de algumas amostras nos outros polimorfismos, para PLA1A2 também ocorreram dificuldades apesar das exaustivas tentativas e variações do protocolo da amplificação. Foi possível genotipar apenas 48 pacientes de Belo Horizonte, 65 pacientes do Rio de Janeiro e 239 controles.

A Tabela 12 apresenta a comparação da média da idade e distribuição de sexo entre os indivíduos do grupo caso e do grupo controle. Não se observa diferença com significância estatística nesta comparação. Mulheres corresponderam a 60,2% (68) dos pacientes e 63,6% (152) dos indivíduos do grupo controle, enquanto que os homens a 39,8% (45) dos pacientes e 36,4% (87) dos indivíduos do grupo controle.

Tabela 12 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para o polimorfismo PLA1/A2 em relação à idade.

Covariável	Situação								Valor-p
	Caso				Controle				
	n	Média	Dp	Mediana	n	Média	Dp	Mediana	
Idade (anos)	113	33,8	11,8	34,0	239	33,2	13,9	30,0	0,711 ¹

Legenda: ¹: Teste-t.

A análise da frequência do polimorfismo PLA1A2 entre o grupo de pacientes e o grupo controle é apresentada na tabela 13. Não se observa diferença com significância estatística (valor-p $\leq 0,05$) em nenhuma das comparações (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise da associação entre o polimorfismo PLA1/A2 no gene da gplIb/IIIa e ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
A1/A2							
Sim	31	27,4	50	20,9	0,175	1,4	0,8 a 2,5
Não	82	72,6	189	79,1			
Comparação 1					*0,195	0,4	0,1 a 2,1
A1/A1	78	95,2	185	97,9			
A2/A2	4	4,8	4	2,1	1,0		
Comparação 2					0,091	0,7	0,4 a 1,1
A1/A1	78	69,1	185	77,4			
A2/A2 e A1/A2	35	30,9	54	22,6	1,0		
Comparação 3					*0,275	2,2	0,4 a 10,5
A2/A2	4	3,5	4	1,7			
A1/A1 e A1/A2	109	96,5	235	98,3	1,0		

Legenda: *Teste Exato de Fisher.

Entre os pacientes com AVCi, 69,1% (78) têm o genótipo A1A1, 27,4% (31) têm o genótipo A1A2 e 3,5% (4) apresentam o genótipo A2A2. Já entre os controles, 77,4% (185) não apresentam a mutação, 20,9% (50) apresentaram apenas um alelo mutante e 1,7% (4) eram homozigotos para a mutação. É importante ressaltar que, entre os pacientes, 35 (31,0%) possuem pelo menos um alelo mutante e entre os controles, 54 (22,6%) possuem. As frequências alélicas para esse polimorfismo são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Frequência alélicas de pacientes e controles para o polimorfismo PLA1/A2

Alelo	FREQUÊNCIA ALÉLICA						
	CASOS		CONTROLES		Valor-p	OR	IC95%
	n	%	n	%			
A2	39	17,3	58	12,1	0,08	1,5	0,9 a 2,4
A1	187	82,7	420	87,9			
TOTAL	226	100,0	478	100,0			

Procedendo-se a comparação dos alelos (A2 e A1) entre pacientes e controles para o AVCi, não se observa diferença estatística significativa. O valor de p foi de 0,08 com *odds ratio* de 1,5 e intervalo de confiança correspondente a 0,9-2,4.

4.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS

A análise da associação entre a presença combinada de alelos e genótipos dos polimorfismos estudados e risco de ocorrência de AVCi foi conduzida somente em relação aos participantes (pacientes e controles) para os quais todos os quatro polimorfismos foram genotipados simultaneamente. Isso se resume a 96 pacientes e 193 indivíduos controles.

A Tabela 15 apresenta a comparação da média da idade entre os indivíduos dos grupos pacientes e controle. Não se observa diferença com significância estatística (valor-p \leq 0,05) nesta comparação, ou seja, a média da idade ou a distribuição em sexo entre aqueles com e sem AVCi não é diferente. Mulheres corresponderam a 59,4% (57) dos pacientes e 65,8% (127) dos indivíduos do grupo controle, enquanto que os homens a 40,6% (39) dos pacientes e 34,2% (66) dos indivíduos do grupo controle.

Tabela 15 - Comparação entre pacientes e controles genotipados para todos os polimorfismos em relação à idade.

Covariável	Situação								Valor-p
	Caso				Controle				
	n	Média	Dp	Mediana	n	Média	Dp	Mediana	
Idade (anos)	96	35,4	12,8	36,0	193	33,5	13,5	30,0	0,256

Legenda: ¹: Teste-t

As análises relativas aos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e Xba I são apresentados na Tabela 16. Não se observa diferença com significância estatística (valor-p \leq 0,05) para nenhuma das comparações.

Tabela 16 – Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e Xba I e risco para ocorrência de AVCi os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
Comparação 1							
I/I e X-X-	29	30,2	60	31,1	0,789	1,00	0,6 a 1,8
Outros	67	69,8	133	68,9		1,0	
Comparação 2							
I/I e X+X-	14	14,6	36	18,7	0,389	1,0	0,7 a 2,8
Outros	82	85,4	157	81,4		1,3	
Comparação 3							
I/I e X+X+	2	2,1	2	1,0	*0,602	2,0	0,2 a 20,5
Outros	94	97,9	191	99,0		1,0	
Comparação 4							
I/D e X-X-	7	7,3	6	3,1	*0,132	2,5	0,7 a 8,5
Outros	89	92,7	187	96,9		1,0	
Comparação 5							
I/D e X+X-	24	25,0	52	26,9	0,724	1,0	0,6 a 2,0
Outros	72	75,0	141	73,1		1,1	
Comparação 6							
I/D e X+X+	6	6,3	20	10,4	0,250	1,0	0,6 a 5,0
Outros	90	93,8	173	89,6		1,7	
Comparação 7							
D/D e X-X-	0	0,0	1	0,5	*1,000
Outros	96	100,0	192	99,5			
Comparação 8							
D/D e X+X-	5	5,2	3	1,6	*0,122	3,5	0,7 a 18,8
Outros	91	94,8	190	98,5		1,0	
Comparação 9							
D/D e X+X+	9	9,4	13	6,7	0,426	1,4	0,5 a 3,8
Outros	87	90,6	180	93,3		1,0	
Comparação 10							
"D" e "X+"	44	45,8	88	45,6	0,970	1,0	0,6 a 1,7
Outros	52	54,2	105	54,4		1,0	
Comparação 11							
"D" e "X-"	36	37,5	62	32,1	0,363	1,3	0,7 a 2,2
Outros	60	62,5	131	67,9		1,0	
Comparação 12							
"I" e "X-"	74	77,1	154	79,8	0,595	1,0	0,6 a 2,2
Outros	22	22,9	39	20,2		1,2	
Comparação 13							
"I" e "X+"	46	47,9	110	57,0	0,132	1,0	0,9 a 2,5
Outros	50	52,1	83	43,0		1,5	

As análises relativas aos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e *Eco* RI são apresentadas na Tabela 17. Observa-se diferença com significância estatística (valor-p $\leq 0,05$) apenas para as combinações I/I e E+E+, “D” e “E-” e “I” e “E-“. Na comparação 1, por exemplo um paciente que não é I/I e E+E+ tem OR aproximadamente 2 vezes maior para desenvolvimento de AVCi que de um controle.

Tabela 17 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e *Eco* RI e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
Comparação 1							
I/I e E+E+	22	22,9	66	34,2	0,050	1,0	
Outros	74	77,1	127	65,8		1,8	1,0 a 3,2
Comparação 2							
I/I e E+E-	19	19,8	27	14,0	0,204	1,5	0,8 a 3,0
Outros	77	80,2	166	86,0		1,0	
Comparação 3							
I/I e E-E-	4	4,2	5	2,6	*0,486	1,6	0,4 a 7,2
Outros	92	95,8	188	97,4		1,0	
Comparação 4							
I/D e E+E+	26	27,1	67	34,7	0,191	1,0	0,8 a 2,6
Outros	70	72,9	126	65,3		1,4	
Comparação 5							
I/D e E+E-	11	11,5	11	5,7	0,082	2,1	0,8 a 5,6
Outros	85	88,5	182	94,3		1,0	
Comparação 6							
I/D e E-E-	0	0,0	0	0,0
Outros	96	100,0	193	100,0			
Comparação 7							
D/D e E+E+	13	13,5	17	8,8	0,214	1,6	0,7 a 3,7
Outros	83	86,5	176	91,2		1,0	
Comparação 8							
D/D e E+E-	1	1,0	0	0,0	*0,332
Outros	95	99,0	193	100,0			
Comparação 9							
D/D e E-E-	0	0,0	0	0,0
Outros	96	100,0	193	100,0			
Comparação 10							
“D” e “E-”	12	12,5	11	5,7	0,044	2,4	0,9 a 6,0
Outros	84	87,5	182	94,3		1,0	
Comparação 11							
“D” e “E+”	51	53,1	95	49,2	0,532	1,2	0,7 a 2,0
Outros	45	46,9	98	50,8		1,0	
Comparação 12							
“I” e “E-“	34	35,4	43	22,3	0,017	1,9	1,1 a 3,4
Outros	62	64,6	150	77,7		1,0	
Comparação 13							
“I” e “E+“	78	81,2	171	88,6	0,088	1,8	0,9 a 3,7
Outros	18	18,8	22	11,4		1,0	

As análises relativas aos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e PLA1/A2 são apresentadas na Tabela 18. Observa-se diferença com significância estatística apenas para a combinação “I” e “PLA1”. Nela, a OR para pacientes desenvolverem AVCi foi aproximadamente 2 vezes menor que a OR dos controles, para indivíduos com a combinação “I” e “PLA1”.

Tabela 18 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos I/D e PLA1/A2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo.

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
Comparação 1							
I/I e A1A1	32	33,3	78	40,4	0,243	1,0	
Outros	64	66,7	115	59,6		1,4	0,8 a 2,3
Comparação 2							
I/I e A1A2	11	11,5	18	9,3	0,570	1,3	0,5 a 3,0
Outros	85	88,5	175	90,7		1,0	
Comparação 3							
I/I e A2A2	2	2,1	2	1,0	*0,602	2,0	0,2 a 20,5
Outros	94	97,9	191	99,0		1,0	
Comparação 4							
I/D e A1A1	26	27,1	64	33,2	0,293	1,0	
Outros	70	71,9	129	66,8		1,3	0,8 a 2,4
Comparação 5							
I/D e A1A2	9	9,4	14	7,2	0,530	1,3	0,5 a 3,4
Outros	87	90,6	179	92,8		1,0	
Comparação 6							
I/D e A2A2	2	2,1	0	0,0	*0,120
Outros	94	97,9	193	100,0			
Comparação 7							
D/D e A1A1	8	8,3	12	6,2	0,505	1,4	0,5 a 3,8
Outros	88	91,7	181	93,8		1,0	
Comparação 8							
D/D e A1A2	6	6,2	5	2,6	*0,188	2,5	0,7 a 9,8
Outros	90	93,8	188	97,4		1,0	
Comparação 9							
D/D e A2A2	0	0,0	0	0,0
Outros	96	100,0	193	100,0			
Comparação 10							
“D” e “A2”	17	17,7	19	9,8	0,057	2,0	0,9 a 4,2
Outros	79	82,3	174	90,2		1,0	
Comparação 11							
“D” e “A1”	49	51,0	95	49,2	0,771	1,1	0,6 a 1,8
Outros	47	49,0	98	50,8		1,0	
Comparação 12							
“I” e “A1”	78	81,2	174	90,2	0,033	1,0	
Outros	18	18,8	19	9,8		2,1	1,0 a 4,5
Comparação 13							
“I” e “A2”	24	25,0	34	17,6	0,140	1,6	0,8 a 2,9
Outros	72	75,0	159	82,4		1,0	

As análises relativas aos alelos e genótipos dos polimorfismos *Xba* I e *Eco* RI são apresentadas na Tabela 19. Observa-se diferença com significância estatística apenas para a “X-“ e “E-“. Nela a chance (OR) de um paciente que é “X-“ e “E-“ desenvolver AVCi é aproximadamente 2 vezes maior que a chance (OR) de um indivíduo controle.

Tabela 19 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos *Xba* I e *Eco* RI e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso n	%	Controle n	%			
Comparação 1							
X-X- e E+E+	16	16,7	44	22,8	0,226	1,0	
Outros	80	83,3	149	77,2		1,5	0,8 a 2,9
Comparação 2							
X-X- e E+E-	17	17,7	20	10,4	0,078	1,9	0,9 a 4,0
Outros	79	82,3	173	89,6		1,0	
Comparação 3							
X-X- e E-E-	3	3,1	3	1,6	*0,403	2,0	0,3 a 13,0
Outros	93	96,9	190	98,5		1,0	
Comparação 4							
X+X- e E+E+	29	30,2	71	36,8	0,268	0,7	0,4 a 1,3
Outros	67	69,8	122	63,2		1,0	
Comparação 5							
X+X- e E+E-	13	13,5	18	9,3	0,275	1,5	0,7 a 3,5
Outros	83	86,5	175	90,7		1,0	
Comparação 6							
X+X- e E-E-	1	1,0	2	1,0	*1,000	1,0	
Outros	95	99,0	191	99,0	
Comparação 7							
X+X+ e E+E+	16	16,7	35	18,1	0,758	0,9	0,5 a 1,8
Outros	80	83,3	158	91,9		1,0	
Comparação 8							
X+X+ e E+E-	1	1,0	0	0,0	*0,332
Outros	95	99,0	193	100,0			
Comparação 9							
X+X+ e E-E-	0	0,0	0	0,0
Outros	96	100,0	193	100,0			
Comparação 10							
“X+“ e “E-“	15	15,6	20	10,4	0,197	1,6	0,7 a 3,5
Outros	81	84,4	173	89,6		1,0	
Comparação 11							
“X+“ e “E+“	59	61,5	124	64,2	0,643	0,9	0,5 a 1,5
Outros	37	38,5	69	35,8		1,0	
Comparação 12							
“X-“ e “E+“	75	78,1	153	79,3	0,822	0,9	0,5 a 1,8
Outros	21	21,9	40	20,7		1,0	
Comparação 13							
“X-“ e “E-“	34	35,4	43	22,3	0,017	1,9	1,1 a 3,4
Outros	62	64,6	150	77,7		1,0	

As análises relativas aos alelos e genótipos dos polimorfismos *Xba* I e PLA1/A2 são apresentadas na Tabela 20. Observa-se diferença com significância estatística apenas para as combinação X+X- e A1/A1, X+X- e A1/A2, “X+” e “A2”, “X-“ e “A2”. Para as duas primeiras combinações, o risco para ocorrência de AVCi é quase duas vezes maior nos pacientes que nos controles para desenvolvimento de AVCi. Isso acontece em participantes de genótipo “A2” associado tanto a “X+” (comparação 10) como a “X-“ (comparação 12).

Tabela 20 - Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos de *Xba* I e PLA1/A2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
Comparação 1							
X-X- e A1/A1	27	28,1	51	26,4	0,759	1,1	0,6 a 2,0
Outros	69	71,9	142	73,6		1,0	
Comparação 2							
X-X- e A1/A2	8	8,3	15	7,8	0,868	1,1	0,4 a 2,8
Outros	88	91,7	178	92,2		1,0	
Comparação 3							
X-X- e A2/A2	1	1,0	1	0,5	*1,000	2,0	0,0 a 74,8
Outros	95	99,0	192	99,5		1,0	
Comparação 4							
X+X- e A1/A1	26	27,1	78	40,4	0,026	1,0	
Outros	70	72,9	115	59,6		1,8	1,0 a 3,2
Comparação 5							
X+X- e A1/A2	14	14,6	12	6,2	0,019	2,6	1,1 a 6,3
Outros	82	85,4	181	93,8		1,0	
Comparação 6							
X+X- e A2/A2	3	3,1	1	0,5	*0,109	6,2	0,6 a 156,6
Outros	93	96,9	192	99,5		1,0	
Comparação 7							
X+X+ e A1/A1	13	13,5	25	13,0	0,889	1,1	0,5 a 2,3
Outros	83	86,5	168	87,0		1,0	
Comparação 8							
X+X+ e A1/A2	4	4,2	10	5,2	*1,000	0,8	0,2 a 2,9
Outros	92	95,8	183	94,8		1,0	
Comparação 9							
X+X+ e A2/A2	0	0,0	0	0,0
Outros	96	100,0	193	100,0			
Comparação 10							
“X+” e “A2”	21	21,9	23	11,9	0,027	2,1	1,0 a 4,2
Outros	75	78,1	170	88,1		1,0	
Comparação 11							
“X+” e “A1”	57	59,4	125	64,8	0,371	0,8	0,5 a 1,4
Outros	39	40,6	68	35,2		1,0	
Comparação 12							
“X-“ e “A2”	26	27,1	29	15,0	0,014	2,1	1,1 a 4,0
Outros	70	72,9	164	85,0		1,0	
Comparação 13							
“X-“ e “A1”	75	78,1	156	80,8	0,589	0,9	0,5 a 1,6
Outros	21	21,9	37	19,2		1,0	

As comparações de combinações para *Eco* RI e PLA1/A2 são apresentadas na Tabela 21. Observa-se diferença com significância estatística para as combinações E+E+ e A1/A1, E+E- e A2/A2, “E-“ e “A1” . Na comparação 1, por exemplo, a chance

de um participante que não é E+E+ e A1/A1 apresentar AVCi foi aproximadamente 2 vezes maior em pacientes do que em controles.

Tabela 21- Análise da associação entre a presença combinada dos alelos e genótipos dos polimorfismos de *Eco RI* e *PLA1/A2* e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
Comparação 1							
E+E+ e A1/A1	38	39,6	116	60,1	0,001	1,0	
Outros	58	60,4	77	39,9		2,3	1,4 a 3,9
Comparação 2							
E+E+ e A1/A2	22	22,9	32	16,6	0,193	1,5	0,8 a 2,9
Outros	74	77,1	161	83,4		1,0	
Comparação 3							
E+E+ e A2/A2	1	1,0	2	1,0	*1,000	1,0	
Outros	95	99,0	191	99,0	
Comparação 4							
E+E- e A1/A1	25	26,0	33	17,1	0,074	1,7	0,9 a 3,2
Outros	71	74,0	160	82,9		1,0	
Comparação 5							
E+E- e A1/A2	3	3,1	5	2,6	*1,000	1,2	0,2 a 6,0
Outros	93	96,9	188	97,4		1,0	
Comparação 6							
E+E- e A2/A2	3	3,1	0	0,0	*0,036
Outros	93	96,9	193	100,0			
Comparação 7							
E-E- e A1/A1	3	3,1	5	2,6	*1,000	1,2	0,2 a 6,0
Outros	93	96,9	188	97,4		1,0	
Comparação 8							
E-E- e A1/A2	1	1,0	0	0,0	*0,332
Outros	95	99,0	193	100,0			
Comparação 9							
E-E- e A2/A2	0	0,0	0	0,0
Outros	96	100,0	193	100,0			
Comparação 10							
"E+" e "A2"	29	30,2	39	20,2	0,059	1,7	0,9 a 3,1
Outros	67	69,8	154	79,8		1,0	
Comparação 11							
"E+" e "A1"	88	91,7	186	96,4	*0,099	0,4	0,1 a 1,3
Outros	8	8,3	7	3,6		1,0	
Comparação 12							
"E-" e "A2"	7	7,3	5	2,6	*0,113	3,0	0,8 a 11,1
Outros	89	92,7	188	97,4		1,0	
Comparação 13							
"E-" e "A1"	32	33,3	43	22,3	0,044	1,7	1,0 a 3,1
Outros	64	66,7	150	77,7		1,0	

As comparações entre três e quatro combinações de alelos ou genótipos são apresentadas na Tabela 22. Observa-se diferença com significância estatística apenas para a combinação “D” e “X-” e “E-“. Na comparação 3, por exemplo, a chance de um paciente que é “D” e “X-“ e “E-“ ter AVCi foi aproximadamente 2,5 vezes a chance de um controle com o mesma combinação.

Tabela 22 - Análise da associação entre a presença combinada de alelos e genótipos dos polimorfismos I/D, Xba I, Eco RI e PLA1/PLA2 e risco para ocorrência de AVCi entre os participantes do estudo

Covariável	Situação				Valor-p	OR	IC95%
	Caso		Controle				
	n	%	n	%			
Comparação 1							
“D” e “X+” e “E-“	8	8,3	10	5,2	0,296	1,7	0,6 a 4,8
Outros	88	91,7	183	94,8		1,0	
Comparação 2							
“D” e “X+” e “E-“ e A2	2	2,1	1	0,5	*0,257	4,1	0,3 a 115,3
Outros	94	97,9	192	99,5		1,0	
Comparação 3							
“D” e “X-” e “E-“	12	12,5	11	5,7	0,044	2,4	0,9 a 6,0
Outros	84	87,5	182	94,3		1,0	
Comparação 4							
“D” e “X-” e “E-“ e A2	3	3,1	1	0,5	*0,109	6,1	0,6 a 156,6
Outros	93	96,9	192	99,5		1,0	
Comparação 5							
“D” e “E-“ e A2	3	3,1	1	0,5	*0,109	6,1	0,6 a 156,6
Outros	93	96,9	192	99,5		1,0	
Comparação 6							
“I” e “X-” e “E+“ e A2	22	22,9	28	14,5	0,075	1,8	0,9 a 3,4
Outros	74	77,1	165	85,5		1,0	
Comparação 7							
“I” e “X-” e “E+“	70	72,9	149	77,2	0,423	0,8	0,4 a 1,5
Outros	26	27,1	44	22,8		1,0	
Comparação 8							
“I” e “X+” e “E+“ e A2	15	15,6	19	9,8	0,151	1,7	0,8 a 3,7
Outros	81	84,4	174	90,2		1,0	
Comparação 9							
“I” e “X+” e “E+“	45	46,9	108	56,0	0,145	0,7	0,4 a 1,2
Outros	51	63,1	85	44,0		1,0	

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Foram avaliados neste estudo pacientes jovens que apresentaram AVCi. Sabendo-se que a idade é um importante fator de risco para a ocorrência de eventos trombóticos, pode-se concluir, que pessoas mais velhas possuem um maior risco de desenvolver processos vaso-oclusivos que pessoas mais jovens (KNIFFIN et al., 1994; HANSSON et al., 1997) devido ,entre outros fatores, às várias alterações por que passa o organismo, como aquelas associadas ao sistema hemostático. Embora menos freqüente em indivíduos jovens, o AVCi pode resultar em morte precoce e em seqüelas que afetam consideravelmente essa parcela sócio-economicamente ativa da sociedade.

Torna-se importante, nesse contexto, estudar polimorfismos que afetam o processo aterosclerótico em pacientes jovens. Um único gene pode ter um efeito idade-dependente sobre o risco de AVCi, uma vez que fatores ambientais e comportamentais podem não ter tido o tempo suficiente para modificar substancialmente o fenótipo (PEZZINI, 2005). É importante destacar que os pacientes do presente estudo não apresentam fatores de risco convencionais em freqüência elevada que possam explicar o desenvolvimento dos eventos trombóticos arteriais, tais como diabetes, hipertensão e síndrome metabólica ou obesidade.

O perfil lipídico convencional, perfil apolipoprotéico e níveis de PCR (avaliados em 93,8% dos pacietes de Belo Horizonte e 51,3% dos indivíduos do grupo controle), apresentados na Tabela 1 (Sabino et al., 2008), mostraram-se significativamente alterados nos pacientes, sugerindo que possam constituir fatores de risco importantes para AVCi em indivíduos jovens da população brasileira.

Uma diferença importante também foi encontrada no perfil apolipoprotéico, caracterizando os pacientes. A apoB, que representa as lipoproteínas consideradas aterogênicas (LDL-C, IDL-C, VLDL), apresentou valores aumentados em relação aos indivíduos do grupo controle. Esses pacientes apresentaram também níveis mais baixos de apoA-I e HDL-C que os indivíduos do grupo controle, com grande diferença significativa. Por serem responsáveis pelo transporte reverso do colesterol e sabendo-se que baixos níveis séricos desses componentes estão relacionados à doença aterosclerótica (WALLDIUS, 2007), essa se constitui em evidência adicional para se explicar o desenvolvimento de AVCi em alguns indivíduos.

Assim como as apolipoproteínas aterogênicas e antiaterogênicas estariam relacionadas ao desenvolvimento de AVCi isoladamente, o índice (apoB/apoA) tem sido descrito como fator de risco importante e evidência adicional para o desenvolvimento de doença aterosclerótica (SNIDERMAN et al., 2006). Os pacientes de Belo Horizonte apresentaram esse índice aumentado em relação aos indivíduos do grupo controle analisados (SABINO et al., 2008). O índice também poderia ser influenciado pela presença dos polimorfismos estudados nesse trabalho, uma vez que seu numerador é formado por valores de apoB. Os primeiros dados sugestivos sobre a relação de (apoB/apoA) com AVCi são descritos por WALLDIUS et al., (2006) e por isso pode-se sugerir aqui a importância de estudos mais aprofundados comparando-se a presença de polimorfismos de apoB com níveis de apoB, apoA e consequentemente do índice apoB/apoA em pacientes com AVCi, principalmente na população brasileira onde os dados são raros.

Outra característica apresentada pelos pacientes são os níveis elevados de PCR em relação aos indivíduos do grupo controle, como apresentado na Tabela 1. Pela

facilidade de determinação da concentração sérica e melhor correlação clínico-epidemiológica, a PCR é considerada um marcador inflamatório de especial interesse para doenças ateroscleróticas (SANTOS et al., 2003; KOENIG et al., 1999). Os níveis de PCR nos pacientes com AVCi, se mostraram quase duas vezes maiores que em indivíduos do grupo controle, sugerindo a presença de processo inflamatório.

Estudando fatores de risco genéticos para trombose, Sabino et al., (2008) avaliaram a presença de mutações nos genes FVL, MTHFR e protrombina em 93,8% dos pacientes de Belo Horizonte e 51,3% dos indivíduos do grupo controle do presente estudo. Para a mutação G1691A no gene do FVL, 6,1% dos pacientes com trombose arterial apresentaram a mutação contra 0,6% dos indivíduos do grupo controle (odds ratio 9.05, $p= 0.01$). As mutações de G20210A (pacientes= 2,4% e indivíduos controles=0,6%) e C677T (pacientes= 53,3% e indivíduos controle= 53,1%) não apresentaram diferenças significativas entre pacientes e controles. Os resultados apresentados para FVL podem sugerir um estado de hipercoagulabilidade nos pacientes estudados em relação aos controles.

No entanto, nenhum desses fatores de risco apresentados como características dos participantes do estudo pode explicar, por si só, a ocorrência de AVCi, evidenciando uma vez mais o caráter multifatorial da doença.

Sabendo-se que polimorfismos no gene da apoB dificultam a entrada dessas lipoproteínas nas células e, conseqüentemente, o seu metabolismo e homeostase (FORTI, 2007; SINGH, 2004), o estudo dos polimorfismos de *Xba* I, *Eco* RI e I/D poderia explicar, em parte, o aumento dos níveis séricos de apoB, das lipoproteínas aterogênicas, do índice (apoB/apoA) e da conseqüente manifestação clínica do AVCi.

Os pacientes participantes do presente estudo eram oriundos da região sudeste, das proximidades da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais e da cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Quanto aos controles, eram pessoas saudáveis provenientes de Belo Horizonte, obedecidos aos critérios de inclusão e exclusão já descritos anteriormente. Entretanto, este trabalho não avaliou a origem étnica nos grupos estudados, devido principalmente à dificuldade de classificação.

A população brasileira é muito heterogênea, resultado de séculos de relações inter-raciais entre os colonizadores europeus, os escravos africanos e ameríndios nativos. A consequência disso é a categorização imprecisa da origem étnica. O censo brasileiro sugere auto-classificação em cinco categorias: Branco, Preto, Pardo, Indígena ou Amarelo (oriental); Pretos e pardos constituem 45% de toda a população e cerca de 99% da população "não branca". Apesar disso, em um estudo nacional por amostragem domiciliar, apenas 5,4% dos brasileiros declaram a sua cor como preta. No Brasil o conceito de raça encontra-se mais relacionado à cor da pele e aos traços faciais do que à ancestralidade (HERINGER, 2002; RAMALHO et al., 2006).

Sabe-se que a não categorização étnica da população pode mascarar ou hipervalorizar resultados, uma vez que a frequência de polimorfismos ou a apresentação de fatores de risco adquiridos podem ser diferentes para cada etnia. Desta forma, sugere-se como continuidade deste estudo, o conhecimento da frequência dos polimorfismos relacionados à apoB e à GPIIB/IIIA em cada um dos grupos étnicos que compõem a população avaliada.

Outro fator que também pode dificultar o entendimento dos resultados obtidos, constitui-se na origem dos pacientes estudados. Eles, após passarem por um serviço de neurologia e obterem seu diagnóstico, foram encaminhados para acompanhamento

em um centro especializado em Hematologia. Lá, ocorre uma investigação mais detalhada de sua história clínica e fatores predisponentes do evento, uma vez que são pacientes jovens e que não apresentaram, na maioria dos casos, os fatores de riscos adquiridos mais comumente associados à trombose arterial tais como hipertensão, diabetes e tabagismo.

Os pacientes do Rio de Janeiro e de Minas foram selecionados de maneira semelhante e para nenhum polimorfismo avaliado, apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Tabela 2). Assim, resolveu-se analisar os pacientes dessas duas localidades de forma conjunta. Ao se fazer isso, obtêve-se um número maior de indivíduos aumentando-se o poder estatístico. A desvantagem dessa união resume-se ao fato de o grupo controle ser formado apenas por representantes do estado de Minas Gerais. É bem verdade que esses dois estados fazem parte da mesma região brasileira (Região Sudeste), mas considerando-se as possíveis diferenças regionais na composição da população de cada estado, seria mais adequado a confecção de um grupo controle com participantes também do Rio de Janeiro, nas mesmas proporções encontradas nas análises dos pacientes.

A seleção de pacientes jovens com AVCi foi muito difícil em Minas Gerais. Em 2 anos, apenas 48 pacientes que atendiam aos critérios de seleção pré-determinados foram inseridos no estudo, número este pequeno para nosso estudo de polimorfismos raros como *Eco RI* e *PLA1A2*. Para *Eco RI*, por exemplo, apenas 2 pacientes de Minas Gerais apresentaram homozigose para a mutação (E-E-). Em virtude disso, na tentativa de aumentar o poder estatístico e de se analisar um grupo maior de pacientes optou-se por trabalhar também com o DNA extraído dos 65 pacientes provenientes do estado do Rio de Janeiro, gentilmente cedidos pela Dra. Telma Gadelha.

Apesar dos pacientes do Rio de Janeiro terem características muito semelhantes aos de Minas Gerais, para a análise conjunta desses dados, seria ideal que o delineamento experimental para composição desses grupos de pacientes, os critérios de seleção adotados e o local (tipo de serviço médico) de atendimento ao paciente fossem, não só semelhantes, mas únicos em todas as etapas. No Rio de Janeiro os pacientes foram selecionados no período de 1998 a 2006 em laboratórios de hemostasia, com diagnóstico confirmado por exames de imagem. Dados adicionais a respeito dos pacientes do Rio de Janeiro já foram publicados (XAVIER et al., 2008).

Contudo, estudos que incluam uma seleção mais exigente de um maior número de pacientes e controles, ou que levem a dados comparativos de fatores de risco trombofílicos em diferentes regiões brasileiras, seriam de fundamental importância no entendimento da composição genética da população.

Na padronização da técnica de PCR para detecção dos polimorfismos, foram encontradas dificuldades em relação à I/D. Os fragmentos esperados (93 e 84 pares de base) foram observados, mas mesmo após a tentativa de padronização e sucessivas mudanças e variações nos protocolos, bandas inespecíficas foram observadas. Foram feitas então avaliações dos primers utilizados através do software Oligo Analyzer versão 1.2 (http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm). Observou-se então que o oligonucleotídeo senso e o reverso estabeleciam auto anelamento, com energias consideráveis. Isso poderia explicar a presença das bandas e a dificuldade de se obter isoladamente os fragmentos de interesse, conforme apresentado na Figura 4. Considerou-se a possibilidade de se obter um novo par de oligonucleotídeos mais específicos, mas devido à riqueza de bases "C" e "G" na região e a pequena diferença

no tamanho dos fragmentos ($93 - 84 = 9$), não foi possível obter primers compatíveis e que gerassem fragmentos que pudessem ser separados facilmente por eletroforese.

Em um estudo caso-controle com 114 pacientes com DAC e 78 indivíduos controles brasileiros, a frequência alélica do alelo X+ foi de 0,39 e 0,46, respectivamente (SCARTEZINI, 2003). Cavalli et al, (2000) estudando brasileiros, encontraram frequências alélicas de 0,44 e 0,41 para 177 pacientes hipercolesterolêmicos (58 anos de idade média) e 100 indivíduos controle (44 anos de idade média), respectivamente. Nosso estudo encontrou frequências similares de 0,39 nos pacientes com AVCi e 0,41 nos indivíduos do grupo controle.

Para a análise de associação do polimorfismo de *Xba* I, isoladamente, com AVCi não foi observada diferença significativa para nenhuma das comparações. Hansen et al., (1994) observaram um aumento da concentração de níveis de lípidos aterogênicos na presença de pelo menos um alelo mutante de *Xba* I (X+) ou de I/D (D) e relataram níveis ainda maiores na presença dos dois polimorfismos simultaneamente em homozigose. Faz-se, portanto, necessária a análise da combinação para os dois polimorfismos simultaneamente visando verificar a sua relação com AVCi. No entanto, não foi observada associação significativa entre as comparações feitas para I/D e *Xba* I com AVCi.

O polimorfismo de *Xba* I apresentou valores de OR com diferença significativa apenas quando avaliado simultaneamente com PLA1A2 ou *Eco* RI. Apesar disso, os dados sugerem que esta relação se deu principalmente às influências dos polimorfismos PLA1A2 e *Eco* RI para o desenvolvimento de AVCi. Apesar de alguns estudos relacionarem o alelo X+ ao aumento de lípidos aterogênicos, outros relacionam o alelo X- à doença aterosclerótica (HANSEN, 1994; BOEKHOLDT, 2003). Analisando

em conjunto esses resultados e os achados de nosso trabalho é possível sugerir que esse polimorfismo não tenha grande impacto no desenvolvimento de AVCi. Além disso, trata-se de uma mutação silenciosa (BOHN, 1993; TAHRI-DAIZADEH, 2004), resultando em uma apoB normal, o que não alteraria a interação do LDL-C com seu receptor.

Para a análise de associação do polimorfismo de I/D isoladamente com AVCi não foi observada diferença significativa em nenhuma das comparações. Como a presença do alelo D configura a deleção de 3 aminoácidos do peptídeo sinal da apoB, estudos têm comparado a presença desse alelo com níveis lipídicos séricos alterados e o desenvolvimento de aterosclerose (KALLEL, 2006; GARDEMANN, 1998). Autores que descreveram o polimorfismo de I/D em brasileiros, não encontraram diferenças significativas entre grupos de pacientes com doenças cardiovasculares e controles (FORTI, 2003). Apesar disso, duas extensas revisões disponíveis (CHIODINI et al., 2003; BOEKHOLDT et al., 2003) correlacionam o alelo D com doença cardiovascular (DAC). No entanto, nesse estudo, somente quando se procede a análise desse polimorfismo associado a PLA1A2 ou *Eco* RI é que se observa alguma diferença significativa.

Num total de 458 participantes saudáveis tunisianos foi descrita uma frequência de 0,26 para o alelo D (KALLEL, 2006). Xu et al. (1990) descreveram 106 pacientes finlandeses saudáveis com frequência alélica de 0,27 para o alelo D. Cavalli et al., (2000) observaram em 177 indivíduos brasileiros brancos com hipercolesterolemia uma frequência alélica de 0,35 para o alelo D. No mesmo estudo, para 100 indivíduos normolipidêmicos o valor encontrado foi 0,32. Salazar et al. (2000) mostraram frequência alélica de 0,32 para pacientes com DAC e 0,36 para o grupo controle, em

pacientes caucasianos brasileiros. No presente estudo, indivíduos controles saudáveis apresentaram valores de 0,29 e pacientes de 0,34.

O polimorfismo de *Eco* RI mostrou associação significativa tanto de forma isolada como conjunta com outros polimorfismos. Os dados sugerem que a presença de um alelo E- seria fator de risco para o desenvolvimento de AVCi. Na Tabela 10, a comparação 2 apresenta valores significantes para desenvolvimento de AVCi ($p=0,020$) com a presença de pelo menos um alelo mutante (E-E- ou E+E-), ao se comparar pacientes e indivíduos controles. Apesar disso, em homozigose (E-E-) não houve diferença significativa ($p=0,742$), quando comparados aos outros genótipos. Isso pode ser explicado pelo fato do genótipo E-E- ser pouco freqüente, com apenas 4 pacientes e 7 indivíduos do grupo controle apresentando este genótipo. Uma amostra maior, possivelmente permitiria-se avaliar melhor a contribuição do alelo E- em homozigose para o desenvolvimento de AVCi. Na mesma tabela, comparando-se heterozigotos e não-heterozigotos também houve diferença significativa, devido, provavelmente, à influência do alelo E- em heterozigose.

Considerando-se de forma combinada os polimorfismos de I/D e *Eco* RI (Tabela 17), mais uma vez o alelo E- mostra-se importante para a significância estatística. Apesar dos alelos I e D isoladamente não demonstrarem associação ao desenvolvimento de AVCi, a presença de pelo menos um alelo E- combinado com qualquer um dos conjuntos "I" ou "D", gerou risco aumentado de AVCi no grupo de pacientes em relação ao grupo controle. Isto sugere que basta apresentar um alelo E-, para haver risco aumentado para AVCi, independentemente de Inserção ou Deleção. Informações adicionais não puderam ser obtidas uma vez que nenhum dos participantes do estudo apresentou simultaneamente os genótipos E-E- e D/D.

Outro resultado interessante é observado na comparação 1 da mesma tabela, onde indivíduos E+E+ e I/I, simultaneamente, que não possuem os alelos mutantes E- e D, apresentam, sugestivamente, uma menor predisposição ($p= 0,050$) para o desenvolvimento de AVCi. Esse achado é condizente com a literatura uma vez que o alelo I não estaria relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CHIODINI, 2003; KALLEL et al, 2008; GARDEMANN et al., 1998).

Considerando-se os polimorfismos de *Xba* I e *Eco* RI simultaneamente (Tabela 19), somente a comparação entre participantes que apresentaram os grupos de alelos "X-" e "E-" simultaneamente apresentou diferença significativa. O risco de um indivíduo com esse genótipo apresentar AVCi foi quase 2 vezes maior em pacientes do que em indivíduos do grupo controle. Trabalhando com haplótipos desses dois polimorfismos em pacientes brasileiros com DAC e controles saudáveis, Scartezini et al., (2003) encontraram valores de $OR=3,76$ e $p=0,052$ para X-/E+. Trabalhando com genótipos, encontraram valores de $OR=6,27$ e $p=0,012$ para pacientes com X-X- e E+E+ simultaneamente em relação aos indivíduos do grupo controle. As freqüências alélicas foram semelhantes às do nosso estudo para pacientes com doença arterial, mas foram levemente discordantes nos indivíduos controle. Pacientes com DAC citados apresentaram freqüência de 0,21 e indivíduos controle 0,22 para E-. Já os pacientes com AVCi do presente estudo apresentaram freqüência de 0,19 e os indivíduos controle 0,12 para o alelo E-; a diferença foi significativa ($OR=1,6$; $p=0,04$), sendo o alelo E- mais presente nos pacientes com AVCi do que no grupo controle. Boekholdt et al., (2003) em sua metanálise encontraram freqüência alélica de 0,20 para E- estudando 1431 indivíduos que compunham somente grupos controle. Os resultados apresentados por Scartezini et al., (2003) e pelo presente estudo foram conflitantes no que diz respeito ao

alelo E- ou ao E+ como indicador de risco para doença cardiovascular na população brasileira.

A presença de PLA1/A2 isoladamente não apresentou associação significativa com o desenvolvimento de AVCi, apesar do alelo A1 (selvagem) ter apresentado sempre freqüências inferiores ao alelo A2 (mutante associado ao risco) em pacientes para todas as comparações, inclusive de freqüência alélica. No entanto, em conjunto com *Eco RI*, a combinação dos genótipos E+E+ e A1/A1 foi mais freqüente em controles. O risco de AVCi foi aproximadamente duas vezes menor nos pacientes do que em indivíduos controles de mesmo genótipo ($p=0,001$). Mais uma vez a ausência do alelo E- sugere uma menor predisposição para o desenvolvimento de AVCi e, dessa vez, associado a um genótipo homozigoto (A1A1) que também tem sido recentemente relatado com menor freqüência em pacientes com AVCi (SAIDI et al., 2008a; SAIDI et al., 2008b) que em pessoas saudáveis. A possibilidade de influência do alelo E- ao risco de AVCi pode ser reforçada ao analisarmos a comparação 4 (Tabela 21). Na análise dos genótipos, a única diferença quanto à comparação anterior (comparação 1) é a presença de um alelo E- e isso faz com que o valor de OR inverta, aumentando a freqüência da combinação dos genótipos E+E- e A1/A1, em pacientes. Apesar do valor de $p>0,05$, a OR agora sugere risco aumentado para pacientes em relação aos indivíduos do grupo controle.

Em pacientes com AVCi foram observadas freqüências significativamente maiores para os genótipos E+E- e A2/A2 simultaneamente do que indivíduos do grupo controle ($p=0,036$). Isso sugere que a presença do alelo E- associado a alelos A2 (mutantes) pode ser um fator adicional ao risco. Maiores evidências sobre essa relação de risco não puderam ser obtidas uma vez que a presença simultânea de E-E- e A2/A2

não foi detectada em nenhum participante do estudo. Da mesma forma, os genótipos (E+E- e A1A2) e (E-E- e A1A2) apresentaram resultados distoantes, provavelmente devido a um número muito pequeno de participantes com essa combinação de genótipos.

Para “E-“ e “A2”, “E-“ e “A1”, as frequências foram maiores em pacientes do que em controles. Apesar disso, somente a combinação “E-“ e “A1” foi significativa ($p=0,044$). A presença de pelo menos um alelo E- sugere mais uma vez risco aumentado para AVCi, mesmo se a combinação contar simultaneamente com o alelo A1 (selvagem). O pequeno número de indivíduos que apresentaram a combinação “E-“ e “A2”, pode ter impossibilitado a observação de valores estatisticamente significantes para essa comparação.

O alelo E- corresponde à perda do sítio para a enzima *Eco* RI e à mudança do aminoácido 4154 (Glu→Lys). A mudança poderia alterar a afinidade da apoB ao seu receptor, causando possíveis alterações de perfil lipídico. Enquanto alguns estudos têm relacionado o alelo E- à doenças cardiovasculares, principalmente as isquêmicas do coração (CHIODINI, 2003), outros não encontraram relação (BOEKHOLDT, 2003). Quanto à alterações de perfil lipídico os resultados são conflitantes (CHIODINI, 2003; TAHRI-DAIZADEH *et al.*, 2004). Um estudo recente, multifatorial de 9157 indivíduos com AVCi e doença cerebrovascular, o genótipo (E-E-) foi associado à redução de 3 a 5 vezes no risco de desenvolvimento de doenças vasculares cerebrais isquêmicos e AVCi. Observou-se também que a presença de pelo menos um alelo E- seria responsável por uma redução de 2% e 5% nos níveis de ApoB e LDL-C, respectivamente (BENN *et al.*, 2007). Assim, devido a resultados controversos, inclusive do presente estudo que sugere o alelo E- como fator de risco para desenvolvimento de

AVCi, há a necessidade de se conduzir estudos complementares para o melhor entendimento do papel do polimorfismo *Eco* RI no desenvolvimento do AVCi.

A substituição de aminoácidos (Leu→Pro) devido à mutação pontual na posição 1565 do gene da GPIIIa (alelo A2) têm sido sugerida como fator de hiperativação plaquetária. Como consequência disso riscos para doenças cardiovasculares vêm sendo atribuídos ao alelo A2 (MCCASLIN et al., 2008; FENG, 2001). Apesar de não apresentar diferença estatística significativa entre pacientes e controles isoladamente, o polimorfismo PLA1A2 apresentou maior frequência quando considerado em conjunto com outros polimorfismos. Com I/D (Tabela 18), a presença simultânea de “A1” e “I” foi significativamente maior nos controles ($p=0,033$) e sugestivamente esse conjunto de genótipos poderia constituir um fator protetor contra o desenvolvimento de AVCi. Já a presença simultânea de “A2” e “D” foi mais freqüente em pacientes ($p=0,057$). Esses dados sugerem que os alelos D e A2 possam constituir fatores de risco para AVCi, necessitando, no entanto, de uma amostra de tamanho mais significativo para uma avaliação mais segura.

Indivíduos do grupo controle, simultaneamente X+X- e PLA1A1, foram mais freqüentes que pacientes com mesmo genótipo ($p=0,026$), sugerindo menor predisposição ao AVCi associada ao alelo A1. No entanto, se considerarmos os genótipos X+X- e A1A2 simultaneamente, a mudança de um alelo A1 para um A2 provoca uma inversão da OR devido à frequências maiores destes genótipos em pacientes em relação aos controles ($p=0,019$). O risco de desenvolvimento de AVCi para os pacientes com genótipo X+X- e A1A2 foi 2,6 vezes maior que para indivíduos do grupo controle com o mesmo genótipo. Evidências adicionais não puderam ser obtidas uma vez que a combinação dos genótipos X+X- e PLA2/A2, apesar de

apresentar uma OR=6,2 e maior frequência em pacientes, não teve significância estatística possivelmente devido ao pequeno tamanho da amostra.

A presença de "A2" foi relacionada a um risco aumentado nos pacientes de nosso estudo que também apresentavam "X+" ou "X-", com valores p de 0,027 e 0,014 respectivamente e OR= 2,1 para as duas situações. Isso sugere que a presença do alelo A2 seria um fator de risco e que o polimorfismo *Xba* I não teria grande impacto nesse resultado.

A frequência alélica para o alelo A2 (Tabela 14) foi maior no grupo de pacientes, 0,17, que no grupo controle 0,12 (p=0,080). Esses resultados foram compatíveis com o valor geral de 0,15 descrito por Santoso et al. (2001) para a população caucasiana e os valores de 0,19 em pacientes com doença cerebrovascular e 0,15 em indivíduos de grupo controle na Alemanha (CARLSSON, 1997).

Estudos adicionais são necessários para avaliar a menor predisposição ao AVCi em portadores do alelo A1, e o provável fator de risco atribuído ao alelo A2. Carlsson et al., (1997) concluíram não haver associação de PLA1A2, mas estudos recentes indicam maior frequência de alelos A2 em pacientes com AVCi e de alelos A1 em indivíduos de grupos controle (SAIDI et al., 2008a; SAIDI et al., 2008b). Além de resultados inconclusivos, não foram encontrados dados sobre a frequência desse polimorfismo na população brasileira, o que justificaria os estudos adicionais.

A Tabela 22 apresenta as frequências de pacientes e controles para 3 ou 4 polimorfismos simultaneamente. Somente o conjunto de genótipos "D" e "X-" e "E-", todos relacionados à apoB, demonstrou diferença significativa com maior frequência em pacientes do que em indivíduos do grupo controle (p=0,044, OR=2,4). Nessa comparação, a amostragem de participantes reduziu consideravelmente, devido às

dificuldades na amplificação do material genético para todas as alterações em conjunto, sendo necessária uma avaliação futura com um número maior de indivíduos para uma interpretação mais segura. Apesar disso, os valores de OR se elevaram consistentemente em relação às comparações de cada polimorfismo isoladamente.

Evidências sugerem que a contribuição direta de um único gene para o AVCi é apenas modesta, inclusive com valores de *odds ratio* e “p” pouco robustos, uma vez que a doença é multifatorial e que os valores se aplicam aos pacientes selecionados em associação com fatores ambientais (HANKEY, 2006; KIM et al., 2003). Os resultados do presente estudo corroboram para a definição de fatores de risco para a aterosclerose e AVCi em pacientes jovens e dão suporte à continuidade dos estudos e investigação, especialmente dos polimorfismos *Eco* RI e PLA1/A2, em um número maior de pacientes. Apesar das limitações do presente estudo (tamanho amostral, ausência no grupo controle de indivíduos oriundos do Rio de Janeiro e a impossibilidade de dosar os níveis dos marcadores do perfil lipídico e apolipoprotéico em todos os participantes), os dados obtidos sugerem uma possível associação entre a presença do alelo E-, níveis elevados de apoB e desenvolvimento de AVCi em pacientes jovens. Embora o papel das alterações do perfil lipídico e apolipoprotéico no desenvolvimento de AVCi não esteja completamente esclarecido, a definição precisa de fatores de risco em pacientes jovens poderia sugerir, especialmente em indivíduos expostos ao risco genético, mudanças relacionadas a dieta e exercícios físicos e, possivelmente, intervenções terapêuticas como o uso de estatinas, no intuito de se evitar o desenvolvimento de eventos trombóticos arteriais como o AVCi.

6 CONCLUSÕES

O alelo mutante E- do polimorfismo *Eco* RI se apresentou como fator de risco, individualmente, para desenvolvimento de AVCi.

A ausência do alelo E- e do alelo A2 simultaneamente foram fortemente associados a uma menor predisposição ao desenvolvimento de AVCi.

Ao se avaliar simultaneamente vários polimorfismos, foram associados como fatores de risco para AVCi as combinações “D” e “E-”, “I” e “E-“, “X-“ e “E-“, X+X- e A1/A2, “X+” e “A2”, “X-“ e “A2”, E+E- e A2/A2, “E-“ e “A1” e, “D” e “X-” e “E-“.

Ao se avaliar simultaneamente vários polimorfismos, foram associados com menor predisposição ao AVCi as combinações E+E+ e A1/A1, X+X- e A1/A1, “I” e “A1” e, I/I e E+E+.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSE, J.A.; BARUA, R.S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 43, n. 10, p.1731-1737, 2004.

BALLANTYNE, C.M.; RAICHLEN, J.S.; CAIN, V.A. Statin therapy alters the relationship between apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol targets in high-risk patients: the MERCURY II (Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin) trial. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 52, n. 8, p. 626-632, 2008.

BANG, O.Y. et al. Improved outcome after atherosclerotic stroke in male smoker. *Journal of the neurological sciences*, v. 260, n. 1-2, p. 43-48, 2007.

BARTER, P.J. et al. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/tencountry panel. *Journal of Internal Medicine*, v. 259, n. 3, p. 247–258, 2006.

BENN, M. et al. Polymorphism in *APOB* Associated with Increased Low-Density Lipoprotein Levels in Both Genders in the General Population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, n. 10, p. 5797–5803. 2005.

BENN, M. Polymorphisms in Apolipoprotein B and Risk of Ischemic Stroke. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 92, n. 9, p. 3611–3617, 2007.

BERNARD, S. Relation between *Xba1* apolipoprotein B gene polymorphism and cardiovascular risk in a type 2 diabetic cohort. *Atherosclerosis*, v. 175, n. 1, p. 177-181, 2004.

BEVAN, S. et al. Genetic Variation in Members of the Leukotriene Biosynthesis Pathway Confer an Increased Risk of Ischemic Stroke. A Replication Study in Two Independent Populations. *Stroke*, v. 39, n. 4, p. 1109-1114, 2008.

BODEN-ALBALA, B. et al. Metabolic Syndrome and Ischemic Stroke Risk. Northern Manhattan Study. *Stroke*, v. 39, n. 1, p. 30-35, 2008.

BOEKHOLDT, S.M. et al. Molecular variation at the apolipoprotein B gene locus in relation to lipids and cardiovascular disease: a systematic meta-analysis. *Human Genetic*, v. 113, p. 417–425, 2003.

BOHN, M et al., *Xba1* polymorphism in DNA at the apolipoprotein B locus is associated with myocardial infarction (MI). *Clinical Genetics*, v. 44. n. 5, p. 241-248, 1993.

BYDLOWSKI, S.P. et al. DNA polymorphisms of apolipoprotein B and AI-CII-AIV genes in a Brazilian population: a preliminary report. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 29, n. 10, p. 1269-1274, 1996.

CALABRÓ, P. et al. Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation*, v. 108, n. 16, p. 1930-1932, 2003.

CALVETE, J.J. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 72, n. 1, p. 1-15, 1994.

CARLSSON, L.E. et al. Polymorphisms of the Human Platelet Antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the Platelet Receptors for Fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GPIb/IX), and Collagen (GPIa/IIa) Are Not Correlated With an Increased Risk for Stroke. *Stroke*, v. 28, n. 7, p. 1392-1395, 1997.

CASAS, J.P. et al. Meta-analysis of Genetic Studies in Ischemic Stroke: Thirty-two Genes Involving Approximately 18000 Cases and 58000 Controls. *Archives of neurology*, v. 61, n. 11, p. 1652-1662, 2004.

CAVALLI, S.A. et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. *Clinica Chimica Acta*, v. 302, p. 189-203, 2000.

CHIODINI, B.D.; BARLERA, S.; FRANZOSI, M.G.; BECEIRO, V.L.; INTRONA, M.; TOGNONI, G. Apo b gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis*, v. 167, n.2, p. 355-366, 2003.

CROWTHER, M.A.; KELTON, J.G. Congenital Thrombophilic States Associated with Venous Thrombosis: A Qualitative Overview and Proposed Classification System. *Annals of Internal Medicine*, v. 138, n. 2, p.128-134, 2003.

CTT Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90_056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, v. 366, n. 9607, p. 1267–1278, 2005.

DE MAAT, M.P.M. Inflammation, thrombosis and atherosclerosis: results of the Glostrup study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 1, n. 5, p. 950–957, 2003.

DEGRABA, T.J. Immunogenetic Susceptibility of Atherosclerotic Stroke: Implications on Current and Future Treatment of Vascular Inflammation. *Stroke*, v. 35, n. 1, p. 2712-2719, 2004.

DUMAN, B.S. et al. Genetic variations of the apolipoprotein B gene in Turkish patients with coronary artery disease. *Annals of Human Biology*, v. 32, n. 5, p. 620-629, 2005.

ENDRES, M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions. *Atherosclerosis Supplements*, n. 7, v. 1, p. 31-35, 2006.

FEINBLOOM, D.; BAUER, K.A. Assessment of Hemostatic Risk Factors in Predicting Arterial Thrombotic Events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 25, n. 10, p. 2043-2053, 2005.

FENG, D. et al. Platelet glycoprotein IIIa P1^A polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation*, v. 104, n. 2, p. 140-144, 2001.

FORTI, N. et al. Alterações Genéticas e Colesterolemia: Recentes Estudos Brasileiros. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 80, n. 5, p. 565-571, 2003.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoprotein B and A-I: cardiovascular risk factor?. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 53, n. 3, p. 276-282, 2007.

FRASER, M.L.; MOK, G.S.; LEE, A.H. Green tea and stroke prevention: Emerging evidence. *Complementary Therapies in Medicine*, v.15, p. 46-53, 2007

GAO, X.; YANG, H.; ZHIPING, T. Association studies of genetic polymorphism, environmental factors and their interaction in ischemic stroke. *Neuroscience letters*, v. 398, n. 3, p. 172-177, 2006.

GARDEMANN, A. et al. Association of the insertion/deletion gene polymorphism of the apolipoprotein B signal peptide with myocardial infarction. *Atherosclerosis*, v. 141, n. 1, p. 167-175, 1998.

GELBER, R. et al. Measures of Obesity and Cardiovascular Risk Among Men and Women. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 52, n. 8, p. 605-615, 2008.

GOLDSTEIN, L.B. et al. Primary Prevention of Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: Cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*, v. 37, n. 6, p. 1583-1633, 2007.

GORELICK, P.B. Stroke prevention therapy beyond antithrombotics: Unifying mechanisms in ischemic stroke pathogenesis and implications for therapy: An invited review. *Stroke*, v. 33, n. 3, p. 862-875, 2002.

GRANT P.J. Is hypercoagulability an issue in arterial thrombosis? Yes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 2, n. 5, p. 690-691, 2004.

GRUNDY, S.M. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. *Circulation*, v. 106, n. 20, p. 2526–2529, 2002.

GRUNDY, S.M. et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 44, n. 3, p. 720-732, 2004.

GUZMAN, E.C.; HIRATA, M.H.; QUINTAO, E.C.; HIRATA, R.D. Association of the apolipoprotein B gene polymorphisms with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, v. 38, n. 8, p. 731-736, 2000.

HAN, T. et al. Apolipoprotein B-100 gene Xba I polymorphism and cholesterol gallstone disease. *Clinical Genetics*. V. 57, n. 4, p. 304-308, 2000.

HANKEY, G.J. Long-term outcome after ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *Cerebrovascular Diseases*, v. 16, n. 1, p. 14-19, 2003.

HANKEY, G. Potential New Risk Factors for Ischemic Stroke: What Is Their Potential?. *Stroke*, v. 37, n. 8, p. 2181-2188, 2006.

HANSEN, P.S. Apolipoprotein B gene polymorphisms in ischemic heart disease and hypercholesterolemia: effects of age and sex. *Clinical Genetics*, v. 45, n. 2, p. 78-83, 1994.

HANSSON, P.O. et al. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. "The study of men born in 1913." *Archives Of Internal Medicine*, v. 157, p. 1665–1670, 1997.

HART, R.G. et al. Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, n. 131, v. 7, p. 492–501, 1999.

HERINGER, R. Desigualdades raciais no Brasil: síntese de indicadores e desafios no campo das políticas públicas. *Cad. Saúde Pública*, v. 18(Supl.), p. 57-65, 2002.

HUMPHRIES, S.E.; MORGAN, L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurology*, v. 3, n. 4, p. 227–236, 2004.

JENNY, N.S. et al. Soluble intracellular adhesion molecule-1 is associated with cardiovascular disease risk and mortality in older adults. *Journal of thrombosis and haemostasis*, v. 4, n. 1, p. 107–113.

JOBE, M.I. Mechanisms of coagulation and fibrinolysis. In: LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; STIENE-MARTIN, E.A.; KOEPKE, J.A. (Ed.) *Clinical hematology: principles procedures correlations*. London: J.B. Lippincott, 1992. p. 579-598.

JOHNSON, H.M. et al. Predictors of carotid intima-media thickness progression in young adults: The bogalusa heart study. *Stroke*, v. 38, n. 3, p. 900-905, 2007.

KAHN, M.J. Hypercoagulability as a cause of stroke in adults. *Southern Medical Journal*, v. 96, n. 4, p. 350-353, 2003.

KALLEL *et al.* Apolipoprotein B Signal Peptide Polymorphism : distribution and influence on lipid parameters in Tunisian Population. *Physiological research*, v. 56, n. 4, p. 411-417.

KIM, R.J.; BECKER, R.C. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: A meta-analysis of published studies. *American heart journal*, v. 146, n. 6, p. 948-957, 2003.

KIMURA, S. Thrombin generation as an acute effect of cigarette smoking. *American Heart Journal*, v. 128, n. 1, p. 7-11, 1994.

KWITEROVICH, P.O. The Antiatherogenic Role of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *The American Journal of Cardiology*, v. 82, n. 9a, p. 13Q–21Q, 1998.

KNIFFIN Jr, W.D. et al. The epidemiology of diagnosed pulmonary embolism and deep venous thrombosis in the elderly. *Archives of Internal Medicine*, v. 54, p. 861–866, 1994.

KOENIG, W. et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men- results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, v. 99, n. 2, p. 237-242, 1999.

LAWES, C. M. M. et al. Blood pressure and stroke: an overview of published reviews. *Stroke*, v. 35, n. 3, p. 776 –785, 2004.

LEE, T.H. et al. Etiologic study of young ischemic stroke in taiwan. *Stroke*, v. 33, n. 8, p. 1950-1955.

LEKAKIS, J. et al. Platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism and acute coronary syndromes. *International Journal of Cardiology*, v. 127, n. 1, p. 46–50, 2008.

LEREN, T.P. et al. Screening for mutations of the apolipoprotein B gene causing hypocholesterolemia. *Human Genetics*, v. 102, n. 1, p. 44–49, 1998.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 868-74, 2002.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*, v.111, n. 25, p. 3481-3488, 2005.

LIMA, L.L. Perfil lipídico e parâmetros hemostáticos em indivíduos submetidos à angiografia coronariana. 2005.103f (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

LOWE, G.D. Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages. *Maturitas*, v. 47, n. 4, p. 259-263, 2004.

LU, J.T.; CREAGER, M.A. The relationship of cigarette smoking to peripheral arterial disease. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, v. 5, n. 4, p. 189-193, 2004.

MARCOVINA, S; PACKARD, C.J. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *Journal of Internal Medicine*, v. 259, n. 5, p. 437–446, 2006.

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

MEHTA, J.L.; SALDEEN, T.G.P.; RAND, KENNETH. Interactive Role of Infection, Inflammation and Traditional Risk Factors in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 31, n. 6, p. 1217-1225, 1998.

MCCASLIN, J. et al. Increased platelet-monocyte aggregation in male claudicants with the PI(A1/A2) polymorphism of Gp IIb/IIIa. *European journal of vascular and endovascular surgery*, n. 36, v. 2, p. 132-137, 2008.

MCGILL, H.C.J. *et al.* Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 72(suppl), p. 1307S–15S, 2000.

MOTA, A.P.L. Avaliação de parâmetros hemostáticos e bioquímicos em pacientes portadores de Doença Arterial Obstrutiva Periférica, diabéticos e não diabéticos. 2005. 101f. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MRC; Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomized controlled trial. *Lancet*, v. 364, n. 9432, p. 1491–1502, 2004.

MURATA, M. Genetic polymorphisms associated with thrombotic disorders in the Japanese population. *Fibrinolysis and Proteolysis*, v. 14, n. 2-3, p. 155-164, 2000.

NAZIMEK-SIEWNIAK, B.; MOCZULSKI, D.; GRZESZCZAK, W. Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*, v. 16, n. 4, p. 271-276, 2002.

NGUYEN, V.H.; MCLAUGHLIN, M.A. Coronary Artery Disease in Women: A Review of Emerging Cardiovascular Risk Factors. *The Mount Sinai journal of medicine*, v. 69, n. 5, p. 338-349, 2002.

OATES, J.A. Fármacos anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão. IN: HARDMAN, J.G.; LIBIRD, L.E. (Ed.). *Goodman & Gilman – as bases farmacológicas da terapêutica*. 9ed. Rio de Janeiro: Mcgraw Hill, 2001. cap. 33, p. 657-678.

O'HALLORAN, A.M. *et al.* The impact of genetic variation in the region of the GPIIIa gene, on PIA2 expression bias and GPIIb/IIIa receptor density in platelets. *British Journal of Haematology*, v. 132, n. 4, p. 494–502, 2006.

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*, v. 149, n. 4, p. 675-680, 2005.

PANDEY, S.N. Haplotype analysis of signal peptide (insertion/deletion) and Xba I polymorphisms of the APOB gene in gallbladder cancer. *Liver International*, v. 27, n. 7, p. 1008-1015, 2007.

PAJUKANTA, P.E. The effects of the apolipoprotein B signal peptide (ins/del) and Xba I polymorphisms on plasma lipid responses to dietary change. *Atherosclerosis*, v. 122, n. 1, p. 1-10, 1996.

PARK, J.H.; KWON, H.M. Association between metabolic syndrome and previous ischemic lesions in patients with intracranial atherosclerotic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 110, n. 3, p. 215-221, 2008.

PEZZINI, A. et al. Cumulative Effect of Predisposing Genotypes and Their Interaction With Modifiable Factors on the Risk of Ischemic Stroke in Young Adults. *Stroke*, v. 36, n. 3, p. 533-539, 2005.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L.A.; GIRALDI, T. The complexity of racial admixture in Brazil: hemoglobin S as an ethnic marker in its population. *Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 28, n. 1, p. 65-70, 2006.

REDÓN, J. et al. Blood pressure and estimated risk of stroke in the elderly population of Spain: the PREV-ICTUS study. *Stroke*, v. 38, n. 4, p. 1167-73, 2007.

REITZ, C. *CRP* Gene Haplotypes, Serum CRP, and Cerebral Small-Vessel Disease: The Rotterdam Scan Study and the MEMO Study. *Stroke*, v. 38, n. 8, p. 2356-2359.

RENGES, H.H.; PEACOCK, R.; DUNNING, A.M.; TALMUD, P.; HUMPHRIES, S.E. Genetic relationship between the 3'-VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: haplotype analysis in individuals of European and south Asian origin. *Ann Hum Genet*, v. 56, n. 1, p. 11-33, 1992.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; SCHMITZ, C.; STAMPFER, M.J.; LINDPAINTNER, K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*, v. 349, p. 385-88, 1997.

RIDKER, P.M.; Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*, v. 109, n. 25 Suppl 1, p. IV-6 –IV-19, 2004.

RIZZO, M. et al. Prediction of cardio- and cerebro-vascular events in patients with subclinical carotid atherosclerosis and low HDL-cholesterol. *Atherosclerosis*, v. 200, n. 2, p. 389-395, 2008.

ROBBINS, Stanley L; COTRAN, Ramzi S.; KUMAR, Vinay; COLLINS, Tucker. *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

ROTHWELL, P.M. et al. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet*, v. 361, n. 9352, p. 361, 2003.

RUBATTU, et.al. A role of TNF-alpha gene variant on juvenile ischemic stroke: a case-control study. *European Journal of Neurology*, v. 12 n. 12, p. 989-993, 2005.

SABINO, A. P. Eventos trombóticos venosos e arteriais: avaliação de fatores genéticos predisponentes em pacientes atendidos em serviço médico especializado em hemostasia. 2005.120f. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

SABINO, A.P.; RIBEIRO, D.D.; CARVALHO, M.G.; CARDOSO, J.; DUSSE, L.M.S.; FERNANDES, A.P. Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in Brazilian young patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 17, n. 4, p. 271-275, 2006.

SABINO, A.P. et al. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) gene and homocysteine levels: a comparison in Brazilian patients with coronary arterial disease, ischemic stroke and peripheral arterial obstructive disease. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2008, in press.

SABINO, A.P. et al. ApoB/ApoA-I ratio in young patients with ischemic cerebral stroke or peripheral arterial disease. *Translational Research*, v. 152, n. 3, p. 113-118, 2008.

SACCO, R.L. et al. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: A statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association council on stroke: Co-sponsored by the council on cardiovascular radiology and intervention: The american academy of neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*, v. 37, n. 2, p.577-617, 2006.

SAIDI, S, et al. Association of human platelet alloantigen 1 through 5 polymorphisms with ischemic stroke. *Cerebrovascular Diseases*. v. 25, n. 1-2, p. 81-86, 2008.

SAIDI, S. et al. Polymorphisms of the human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-4 in ischemic stroke. *American Journal of Hematology*, v. 83, n. 7, p. 570-573, 2008.

SALAZAR, L.A. et al. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 300, n. 1-2, p. 139-149, 2000.

SANTOS, W.B. et al. Proteína-C-Reativa e Doença Cardiovascular. As Bases da Evidência Científica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 80, n. 4, p. 452-456, 2003.

SANTOSO, S. Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. *Transfus Clin Biol*, v. 8, n. 3, p. 261-266, 2001.

SCARTEZINI, M. et al. The X-X-/E+E+ genotype of the *XbaI/EcoRI* polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, n. 3, p. 369-375, 2003.

SINGH, K.M. et al. Apolipoprotein B-100 Xba I gene polymorphism in gallbladder cancer. *Human Genetics*, v. 114, n. 3, p. 280-283, 2004.

SNIDERMAN, A.D. et al. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. *Lancet*, v. 361, n. 9359, p. 777-780, 2003.

SNIDERMAN, A. et al. Errors that result from using the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *Journal of internal medicine*, v. 259, n. 5, p. 455-461, 2006.

SOARES, A.L. Alterações hemostáticas no Diabetes mellitus tipo 2 enfoque no mecanismo da anticoagulação natural. 2004. 105 f. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

TAHRI-DAIZADEH, N. Exploration of multilocus effects in a highly polymorphic gene, the apolipoprotein (APOB) gene, in relation to plasma apoB levels. *Annals of Human Genetics*, v. 68, n. 5, p. 405-418, 2004.

TONK, M.; HAAN, J. A review of genetic causes of ischemic and hemorrhagic stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 257, n. 1-2, p. 273-279, 2007.

VOETSCH, B.; LOSCALZO, J.; Genetic Determinants of Arterial Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 24, n. 2, p. 216-229, 2004.

WALLDIUS, G.; AASTVEIT, A.H.; JUNGNER, I. Stroke mortality and the apoB/apoA-I ratio: results of the AMORIS prospective study. *Journal of Internal Medicine* v. 259, n. 3, p. 259-266, 2006.

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. *Journal of internal medicine*, v. 259, n. 5, p. 493-519, 2006.

WALLDIUS, G; JUNGNER, I. Apolipoprotein A-I versus HDL cholesterol in the prediction of risk for myocardial infarction and stroke. *Current opinion in cardiology*, v. 22, n. 4, p. 359-367, 2007.

WEISS, E.J.; BRAY, P.F.; TAYBACK, M.; SCHULMAN, S.P.; KICKLER, T.S.; BECKER, L.C.; WEISS, J.L.; GERSTENBLITH, G.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *New England Journal of Medicine*, v. 334, n. 17, p. 1090-1094, 1996.

WILLIAMS, M.S.; BRAY, P. F. Genetics of Arterial Prothrombotic Risk States. *Experimental biology and medicine*, v. 226, n. 5, p. 409-419, 2001.

WORLD HEALTH REPORT 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland:World Health Organization, 2002, disponível em <http://www.who.int/whr/2002>. acesso em <05/2006>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.2004. Acesso em: 25/2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention of Cardiovascular Disease: Pocket Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk. Geneva, 2007. 20p.

XAVIER, S.G. et al. Low prevalence of the JAK2V617F in patients with ischemic stroke or cerebral venous thrombosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 19, n. 5, p. 468-469, 2008.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PAQUINI, R. Hematologia- Fundamentos e prática- Cap. 84-85, p. 879-896.- SP. Atheneu, 2001, 1081p.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, v. 414, p. 782-787, 2001.

ANEXO A

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

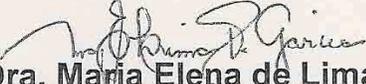
Parecer nº. ETIC 0216/06

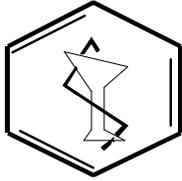
Interessado (a): Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Depto de Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, ad referendum, no dia 19 de dezembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado "**Trombose Venosa: relação com genótipos do sistema ABO e mutações que predisõem à trombofilia.**"_ bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Banco de Amostras do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

ANEXO B

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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

BANCO DE DADOS E DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DESTINADO AO ESTUDO DE PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS RELACIONADOS A DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TROMBÓTICAS

Prezado Sr.(a),

Você é convidado a participar de uma pesquisa projetada para criar um grande banco de dados e amostras biológicas (soro, plasma e DNA genômico) contendo informações genéticas, bioquímicas e hematológicas. O propósito de banco de dados será reunir informações e amostras para possíveis investigações futuras de outros marcadores e polimorfismos (alterações hereditárias) que possam ser de interesse para maior compreensão de doenças, principalmente as multifatoriais.

O armazenamento destas amostras permitirá o desenvolvimento de métodos diagnósticos adequados, além de reduzir o árduo trabalho na obtenção de amostras de outros pacientes, levando então à redução de custos envolvidos na coleta do sangue.

Deve-se ressaltar que uma melhor caracterização das alterações presentes em tais doenças orientará o médico para uma melhor condução do tratamento.

É possível que você não venha a se beneficiar diretamente dos resultados deste banco, mas certamente sua participação contribuirá para o maior entendimento dessas doenças na população em geral, além de beneficiar pacientes futuros.

A sua participação é voluntária. Você pode escolher não participar, não havendo qualquer problema no seu tratamento e assistência recebida pelo seu médico.

Se você quiser participar, deverá autorizar a coleta de três tubos de sangue (5 mL em cada), sendo essa coleta realizada por pessoal treinado utilizando material descartável de boa qualidade.

Todas as informações e amostras serão codificadas de modo que sua identidade seja preservada. A ligação entre amostra e identificação permanecerá disponível apenas aos pesquisadores responsáveis pelo Banco de Dados e Amostras Biológicas.

Qualquer dúvida sobre sua participação no estudo, por favor, entre em contato pelo telefone (31) 3499-6902 com os responsáveis Prof^a Dra. Ana Paula Salles Moura

Fernandes, Prof^a Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse, Prof^a Dra. Maria das Graças Carvalho e Prof^a Dra. Marinez Oliveira Souza.

Eu li as informações presentes neste termo de consentimento e concordo com a participação no estudo permitindo o armazenamento de dados e amostras biológicas coletados.

De acordo: _____

(Assinatura)

Nome:

Data: ___/___/___

ANEXO C**UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

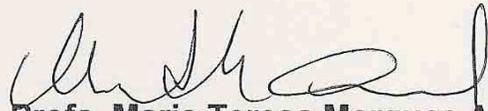
Parecer nº. ETIC 486/07

Interessado(a): Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 5 de dezembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo de polimorfismos de potencial interesse em doenças arteriais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO D**CÓDIGO DE LETRAS DE AMINOÁCIDOS**

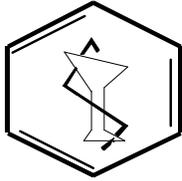
Ala – Alanina - A

Glu – Ácido Glutâmico - E

Leu – Leucina - L

Lys – Lisina - K

Pro – Prolina - P

APÊNDICE A

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

**Ficha Clínica**

Projeto: “Eventos trombóticos venosos e arteriais: Avaliação de fatores genéticos predisponentes em pacientes atendidos em serviço médico especializado em hemostasia

Protocolo: _____

Data: _____

Identificação:

Nome: _____

Data de nascimento : _____ Sexo: M ___ F ___ Naturalidade: _____

Endereço: Rua(Avenida): _____ N° _____

Bairro: _____

Cidade: _____

Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Trombofilias

Fenômeno Tromboembólico
Data
Local de ocorrência
Idade
Fenômeno espontaneo

Fatores adquiridos associados	
Trombose arterial	
Hipercolesterolemia	Tabagismo
Diabetes miellitus	Obesidade
Hipertensão	ICC ou FA
Trombose Venosa	
Imobilização	Gravidez
Cirurgia	Puerpério
Neoplasia	HPN

Uso de estrógeno	D.mieloproliferativa	
Sepse	D. autoimune	
Quimioterapia	Tramismo	
Outros		
Trombose Recorrente	Sim	Não
Novos Locais		
Recorrecia em uso de Anticoagulante	Sim	Não

Diagnostico	
Tempo de Protrombina	Fator VIII
PTTa	Fator IX
Anti-trombina	Fator XI
Proteína S	Fator XII
Proteína C	Plasminogênio
Resistência a proteina C	PAI-1
Fator V Leiden	tPA
Mutante do fator II	FAN
MTHFR	Perfil lipídico
Homocisteína	Função Hepática
Vitamina B12	Função Renal
Ácido Fólico	Hemograma
Anticoagulante lúpico	VDRL
ACL Ig G	Fibrinogênio
ACL Ig M	Eltrof. de Hemoglobina
ACL Ig A	
História Familiar	

APÊNDICE B - Protocolos para preparação de reagentes utilizados na eletroforese

TBE 5X	
Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M pH: 8,0	20 ml
Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL

TBE 1X	
TBE 5X	200 mL
Água destilada	1800 mL

SOLUÇÃO PARA GEL DE POLIACRILAMIDA 6%	
Acrilamida	58 g
Bisacrilamida	2,0 g
TBE 5X	200 ml
Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL

SOLUÇÃO PARA GEL DE POLIACRILAMIDA 8%	
Acrilamida	77,3 g
Bisacrilamida	2,6 g
TBE 5X	200 ml
Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL

APS 10%	
Persulfato de amônio	30 g
Água	300 mL

TAMPÃO DE AMOSTRA 2X	
Ficoll 400	12,5 g
Azul de bromofenol	0,05 g
Xilenocianol	0,05 g
TBE 5X	75 mL

Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL
SOLUÇÃO FIXADORA	
Etanol PA	5 mL
Ácido acético glacial	250 µL
Água destilada	45 mL
SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA	
Nitrato de prata	0,15 g
Água destilada	50 mL
SOLUÇÃO REVELADORA	
Hidróxido de sódio	1,5 g
Formaldeído	150 µL
Água destilada	50 mL

q.s.p.: quantidade suficiente para