

Isolmar Tadeu Schettert

**Avaliação das variantes genéticas funcionais  
trombogênicas relacionadas ao receptor plaquetário  
P2Y12 e à metaloprotease ADAMTS13 em pacientes  
apresentando doença arterial coronariana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia  
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo**

**2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Schettert, Isolmar Tadeu

Avaliação das variantes genéticas funcionais trombogênicas relacionadas ao receptor plaquetário P2Y12 e à metaloprotease ADAMTS13 em pacientes apresentando doença arterial coronariana / Isolmar Tadeu Schettert. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Receptores purinérgicos P2 2.Metaloproteases 3.Fator de von Willebrand 4.Fatores de risco 5.Polimorfismo genético 6.Coronariopatia

USP/FM/SBD-052/08

---

---

**DEDICATÓRIA**

*“C’est en forgeant qu’on devient forgeron”*

*(no seu ofício, o ferreiro aprende sua arte)*

*Dedico este tese,*

*À minha mãe Margarida*

*Pelo exemplo de força, ternura e fé*

*À minha filha Miranda*

*Minha crença na humanidade*

*Aos meus pacientes*

*Sempre os ajudarei*

---

---

**AGRADECIMENTOS**

*Ao prof Dr. José Eduardo Krieger, pela confiança no meu trabalho e pelo exemplo de vida dedicada à ciência. Entre suas várias qualidades com certeza guardarei duas: o zelo pela ética com a verdade científica e o apreço pelas boas coisas da vida.*

*Ao meu amigo Alexandre Costa Pereira, pelo inestimável apoio, pelos afortunados momentos de poder compartilhar seu intelecto privilegiado e pelos conselhos vida afora.*

*À Marisa, que mora no meu coração, possui o afortunado dom de fazer o bem e com seu brilho inigualável no olhar me ajudou a finalizar esta tese.*

*Ao meu amigo Luis Henrique Gowdak, pela parceria em projetos científicos.*

*À Marcilene, Glória e Noely pela ajuda no laboratório. Saber carregar o piano é realmente para poucos.*

*À Maúde, Silvana e Isabel Cristina que sempre me ajudaram em tudo com um sorriso nos lábios.*

*A todos que trabalham no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor, que bem humorados, nunca deixam a bola cair.*

*Aos meus amigos do grupo de genética. Se “a disciplina é o segredo da felicidade”, nossos encontros semanais acabaram por confirmar esta máxima.*

*Ao grupo de profissionais que compõem o projeto MASS, pela colaboração, dedicação e coragem na iniciativa de realizar ensaios clínicos no Brasil.*

*Aos membros da minha banca de qualificação, prof. Elbio Antonio D´Amico, prof. Expedito Eustáquio Ribeiro da Silva, prof. Dr. Whady Armindo Hueb pelas sugestões ao aprimoramento deste projeto.*

*Aos profissionais que trabalham na comissão de pós-graduação, Eva Malheiros Gomes de Oliveira, Juliana Lattari Sobrinho e Neusa Rodrigues Dini, pelo empenho e carinho dedicado aos pós-graduandos.*

*À Socesp pelo auxílio financeiro para a realização da etapa final desta tese.*

*Ao meu irmão Gustavo, querido companheiro com um coração de ouro.*

*Ao meu amigo Rodrigo Ito, um verdadeiro irmão que me ajudou em momentos realmente muito difíceis.*

*Às minhas amigas Deborah e Ayumi e, pelo apoio constante, bom humor e fé no futuro.*

*Aos meus amigos Roberto Waddington e Luciana Luppi, que compartilharam minha agenda com estímulos ao sucesso.*

*Aos meus amigos e parceiros do Hospital Novo Atibaia, exemplo da boa medicina feita com coragem no interior de São Paulo.*

*À Doucy Douek, minha melhor amiga, que sabe tudo e sempre me ajuda a descobrir o que é realmente viver.*

*À Satguru Babaji Nagaraji pelo seu apoio e amor à humanidade.*

*Ao Brasil, país aonde eu nasci, que realmente nos deixa dúvidas sobre o porque deste destino, mas é um lugar que amo muito.*

*Obrigado*





## **Sumário**

### **Lista de Figuras**

### **Lista de Tabelas**

### **Lista de Siglas**

### **Resumo**

### **Summary**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Doença arterial coronariana, fatores de risco e variantes genéticas da via biológica da hemostasia .....	02
1.2. Ensaios clínicos em doença arterial coronariana crônica .....	07
1.3. Variantes genéticas do receptor plaquetário P2Y12 Haplótipos H1 e H2 .....	10
1.4. Variantes genéticas da ADAMTS13 .....	17
<b>2. OBJETIVO DO ESTUDO</b> .....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. Seleção de pacientes .....	31
3.2. Definição dos tratamentos empregados nos diferentes grupos de pacientes .....	32
3.2.1. Tratamento Clínico .....	32
3.2.2. Tratamento de Intervenção (RCM ou ATC) .....	33

3.2.2.1 Revascularização Miocárdica Percutânea .....	33
3.2.2.2. Revascularização Cirúrgica do Miocárdio .....	34
3.2.3. Critérios Angiográficos após a Intervenção .....	34
3.3. Procedimentos de investigação utilizados	
no seguimento dos pacientes .....	35.
3.3.1 Teste Funcional .....	35
3.3.2. Arteriografia Coronariana .....	36
3.3.3. Avaliação da Angina .....	36
3.3.4. Infarto Agudo do Miocárdio .....	37
3.4. Coleta de dados .....	37
3.5. Extração do DNA genômico- projeto MASS II .....	37
3.6. Determinação dos genótipos do receptor P2Y12 .....	39
3.7. Determinação dos genótipos da ADAMTS13 .....	40
3.8. Análise Estatística .....	44
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 Análise da população de pacientes do projeto MASS II	
4.1.1 População projeto MASS II .....	48
4.1.2. Eventos nos pacientes do projeto MASS II .....	51
4.1.3. Sobrevida livre de morte .....	53
4.1.4 Sobrevida livre de eventos .....	54
4.2. Haplótipos H1 e H2 do receptor P2Y12 nos pacientes do projeto MASS II	
4.2.1. Distribuição dos haplótipos H1 e H2 .....	55
4.2.2. Características clínicas e laboratoriais	

dos pacientes com os haplótipos H1 e H2 .....	56
4.2.3. Genótipos H1 e H2 e eventos na população MASS II .....	58
4.2.3.1. Incidência dos eventos - Haplótipos H1 e H2 .....	58
4.2.3.2. Sobrevida livre de morte – Haplótipos H1 e H2 .....	59
4.2.3.3 Sobrevida livre de eventos - Haplótipos H1 e H2 .....	60
4.2.4. Resumo dos resultados - Haplótipos H1 e H2	
na população MASS II .....	65
4.3 Variantes genéticas C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V)	
da metaloprotease ADAMTS13 nos pacientes do projeto MASS II	
4.3.1 Distribuição das variantes genéticas C1342G(Q448E),	
C1852G(P618A) e C2699T (A900V) .....	66
4.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação .....	67
4.3.3. Características dos pacientes em relação às variantes genéticas	
C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T (A900V) .....	70
4.3.4. Eventos associados com os alelos dos polimorfismos	
C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) .....	72
4.3.5. Análise dos eventos associados com os haplótipos	
dos polimorfismos C1342G e C1852G .....	78
4.3.6. Análise dos eventos associados com as combinações	
alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T .....	81

4.3.7. Análise da sobrevida livre dos eventos morte e morte de causa cardiovascular para a combinação alélica C1342, C1852 e T2699 .....	83
4.3.8. Resumo dos resultados dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) na população MASS II .....	88
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	90
5.1 Considerações gerais .....	91
5.2. Haplótipos H1 e H2 do receptor P2Y12 no MASS II .....	93
5.3. Polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T(A900V) no MASS II .....	96
5.4. Considerações finais .....	105
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	107
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109

---

**LISTAS**

## Lista de Figuras

- Figura 1.1** Receptor P2Y12 e suas interações com as proteínas plaquetárias
- Figura 1.2** Representação da seqüência de aminoácidos do receptor P2Y12
- Figura 1.3** Polimorfismos de aminoácido único identificados no gene do receptor plaquetário P2Y12.
- Figura 1.4** Representação esquemática da proteína Adamts13
- Figura 4.1** Sobrevida livre de morte entre os grupos de tratamento
- Figura 4.2** Probabilidade de Sobrevivência livre de eventos combinados.
- Figura 4.3** Sobrevida livre de Morte entre os pacientes com os haplótipos H1 e H2
- Figura 4.4** Probabilidade de sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 e H2
- Figura 4.5** Probabilidade de sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 ou H2 - tratamento clínico.
- Figura 4.6** Probabilidade de sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 ou H2 - angioplastia transluminal percutânea.
- Figura 4.7** Probabilidade de sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 ou H2 - revascularização cirúrgica do miocárdio
- Figura 4.8** Análise de dupla combinação alélica das variantes gênicas da Adamts13.

- Figura 4.9** Frequência das combinações alélicas formadas pelas variantes alélicas dos polimorfismos da Adamts13.
- Figura 4.10** Curva de sobrevida livre de óbito demonstrando a probabilidade de sobrevida entre os genótipos CC, CT e TT do polimorfismo A900V da Adamts13 na população MASS II.
- Figura 4.11** Curvas de sobrevida livre de óbito por causa cardiovascular entre os genótipos do polimorfismo A900V da Adamts13 na população MASS II.
- Figura 4.12** Curvas de sobrevida livre de óbito por causa cardiovascular entre os genótipos CC e CT+TT do polimorfismo A900V da Adamts13 na população MASS II.
- Figura 4.13** Curva de sobrevida livre de morte para as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.
- Figura 4.14** Curva de sobrevida livre de morte por causa cardiovascular para as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.
- Figura 4.15** Curva de sobrevida livre de eventos combinados para as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.
- Figura 5.1** Representação da mudança de aminoácidos pela presença do polimorfismo C2699T

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.1** Capacidade de agregação plaquetária dos haplótipos H1 e H2
- Tabela 1.2** Capacidade de inibição da produção de AMPc pelo estímulo com diferentes concentrações de ADP (Haplótipo H2).
- Tabela 1.3** Polimorfismos no gene da ADAMTS13 e a frequência do menor alelo em diferentes populações.
- Tabela 1.4** Secreção e atividade enzimática de polimorfismos da ADAMTS13.
- Tabela 4.1** Características da população do projeto MASS II
- Tabela 4.2** Características dos 611 pacientes do projeto MASS II e dos grupos de tratamento
- Tabela 4.3** Características da população MASS II (Haplótipos H1 e H2)
- Tabela 4.4** Incidência de Eventos (Haplótipos H1 e H2)
- Tabela 4.5** Equilíbrio de Hardy-Weinberg (eHW) -C1342G, C1852G e C2699T
- Tabela 4.6** Escore LOD e coeficiente D' para os polimorfismos da ADAMTS13.
- Tabela 4.7** Características dos pacientes (MASS II) em relação aos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.
- Tabela 4.8** Eventos e a associação com os polimorfismos C1348G, C1852G e C2699T.
- Tabela 4.9** Análise da variante 2699T (900V) com eventos morte e morte de causa cardíaca



**Tabela 4.10** Análise da variante T2699 (Val900) em relação aos eventos morte e morte de causa cardíaca e covariáveis

**Tabela 4.11** Análise dos haplótipos formados pelos polimorfismos Q448E e P618A com os eventos.

**Tabela 4.12** Análise da associação das combinações alélicas dos polimorfismos Q448E, P618A e A900V com eventos

**Tabela 4.13** Análise da combinação alélica CCT com os eventos morte e morte cardiovascular no projeto MASS II.

**Tabela 4.14** Eventos morte, morte de causa cardíaca e eventos associados com a combinação alélica CCT e demais co-variáveis.

## Lista de Siglas

<b>A</b>	Adenina
<b>ADAM</b>	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase Protein</i>
<b>ADAMTS13</b>	<i>A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin-1-like domains13</i>
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>Ala</b>	Alanina
<b>AMP-c</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
<b>ATC</b>	Angioplastia Transluminal Coronária
<b>C</b>	Citosina
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CUB</b>	<i>complement, uEGF and bone morphogenesis</i>
<b>DAC</b>	Doença Arterial coronariana
<b>DATASUS</b>	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
<b>E</b>	Ácido Glutâmico
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>eHW</b>	equilíbrio de Hard Weinberg
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>FEVE</b>	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>fvW</b>	fator de von Willebrand
<b>G</b>	Guanina

<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>HAPMAP</b>	<i>International HapMap Project</i>
<b>HC</b>	Hospital das Clínicas
<b>i-ins</b>	intronic insertion
<b>InCor</b>	Instituto do Coração
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>MASS</b>	Medical, Angioplasty, or Surgery Study
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>OMC</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i>
<b>P</b>	Prolina
<b>PTT</b>	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
<b>Q</b>	Glutamina
<b>RCM</b>	Revascularização Cirúrgica do Miocárdio
<b>RGD</b>	Arginine, Glycine, Aspartic acid
<b>RR</b>	Risco Relativo
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>T</b>	TIROSINA
<b>TE</b>	Teste Ergométrico
<b>THR</b>	Terapia de Reposição Hormonal
<b>TMC</b>	Tratamento Clínico Medicamentoso
<b>TSP</b>	trombospodina

<b>UI</b>	Unidade Internacional
<b>V</b>	Valina
<b>Val</b>	Valina
<b>95%IC</b>	Intervalo de Confiança de 95%



Schettert IT. **Avaliação das variantes genéticas funcionais trombogênicas relacionadas ao receptor plaquetário P2Y12 e à metaloprotease ADAMTS13 em pacientes apresentando doença arterial coronariana** [tese]. 151 pg. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008

Variantes genéticas trombogênicas podem aumentar o risco de eventos adversos em pacientes com coronariopatia crônica. Estudos prévios demonstraram que o Haplótipo H2 do gene do receptor P2Y12 apresenta uma maior agregação plaquetária e está associado com a presença de isquemia arterial periférica. A metaloprotease ADAMTS13 é responsável pela clivagem do fator de von Willebrand e recentemente foi associada com doença isquêmica coronariana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das variantes genéticas funcionais trombogênicas dos Haplótipos H1 e H2 do receptor plaquetário P2Y12 e dos polimorfismos C1342G (Q448E), C1852G (P618A) e C2699T (A900V) da metaloprotease ADAMTS13 em 611 pacientes com doença arterial coronariana multiarterial com função ventricular preservada, acompanhados por um período de 05 anos no ensaio clínico do projeto MASS II (Medical, Angioplasty, or Surgery Study II) em relação aos eventos morte, infarto agudo do miocárdio, angina refratária necessitando um novo procedimento e acidente vascular cerebral. Neste estudo, a avaliação dos Haplótipos H1 e H2 nos pacientes do MASS II não encontrou diferença entre estes haplótipos e os eventos estudados. A análise dos polimorfismos da ADAMTS13 não encontrou associação entre os polimorfismos e os eventos estudados, exceto para a variante genética T2699 (Val900) que está

associada com o evento morte (OR: 1,67 95%IC: 1-2,78,  $p= 0,049$ ) e morte por causa cardiovascular (OR: 2,23 95%IC: 1,2-3,94,  $p=0,004$ ) e apresenta uma diminuição na sobrevida livre de morte por causa cardíaca para os portadores do genótipo TT relacionado à este polimorfismo. A análise dos haplótipos e das combinações alélicas destes polimorfismos não apresentou associação com eventos ou com a sobrevida livre dos eventos nestes pacientes.

**Descritores:** Receptores purigernicos P2; Metaloproteases; von Willebrand factor; Fatores de Risco; Polimorfismo Genético; Coronariopatia.





Schettert IT. **Functionally genetic thrombogenic variants related to P2Y12 platelet receptor and metalloprotease ADAMTS13 in coronary disease patients.** [thesis]. 151 pg. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008.

Thrombotic genetic variants could improve the risk of adverse events related to coronary arterial disease (CAD). P2Y12 platelet receptor H2 haplotype showed higher aggregation index and a positive association was described between such genetic variant and peripheral artery disease. ADAMTS13 is a metalloprotease responsible to von Willebrand factor cleavage recently found correlated to CAD. We tested the genetic variants P2Y12 receptor H1 and H2 haplotypes and ADAMTS13 polymorphisms C1342G (Q448E), C1852G (P618A) and C2699T (A900V) in a group of 611 patients enrolled in the Medical, Angioplasty, or Surgery Study II (MASS II), a randomized trial comparing treatments for patients with coronary artery disease (CAD) and preserved left ventricular function in a follow up period of 05 years. The incidence of the end points of death and death from cardiac causes, myocardial infarction, refractory angina requiring revascularization and cerebrovascular accident was determined for P2Y12 H1 and H2 haplotypes and ADAMTS polymorphisms. In our study, we did not disclose any association between H1 or H2 haplotype groups regarding the incidence of any of the studied cardiovascular end-points. The association of ADAMTS13 genotypes and cardiovascular events did not showed any association between C1342G (Q448E), C1852G (P618A) variants and

cardiovascular end points. Our data provide a strong association between T2699 variant and increased risk to death (OR: 1,67 CI: 1-2,78,  $p= 0,049$ ) and cardiac death (OR: 2,23 CI: 1,2-3,94,  $p=0,004$ ) in a population with CAD. The allelic combinations and haplotypes obtained from ADAMTS13 polymorphisms were not associated to cardiac end points and survival differences between MASS II patients.

**Descriptors:** Receptors Purinergic P2; Metalloproteases; von Willebrand factor; Risk Factors; Genetic polymorphism; Coronary Disease.

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

### **1.1. Doença arterial coronariana, fatores de risco e variantes genéticas da via biológica da hemostasia.**

Conforme o relatório “Projeções da Mortalidade Global e Impacto das Doenças de 2002 a 2030”, divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo *Global Burden of Diseases Study* em 2006, a doença arterial coronariana (DAC) é considerada a doença mais freqüente na atual epidemia global de doenças crônicas de natureza não-transmissível. Em 2005, segundo este relatório, a DAC era a causa mais freqüente de morte e incapacidade física entre as doenças não transmissíveis, correspondendo a 17,5 milhões de mortes<sup>1</sup>. A DAC, segundo as projeções da OMS, ainda será a principal causa de morte e uma das três principais causas de incapacidade física nos próximos 20 anos em todo o mundo<sup>1</sup>.

No Brasil, os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde apresentam as doenças isquêmicas do coração como a principal causa de morte entre as doenças do aparelho circulatório, sendo responsável por

86791 mortes em 2004 <sup>2</sup>. Além disso, os dados do DATASUS de 2004 apresentam a DAC como 3ª causa de internações hospitalares no país, responsável por 10,49% do total de internações, o que corresponde a 1163808 pacientes internados com este diagnóstico<sup>3</sup>.

O aumento da prevalência da DAC ocorre nos países desenvolvidos desde 1930-40 e correlaciona-se com o aumento da capacidade diagnóstica, as alterações demográficas e a maior exposição aos fatores de risco envolvidos no desenvolvimento desta doença <sup>4,5</sup>. Os principais fatores de risco epidemiológico para a DAC são o colesterol sérico em níveis elevados, a hipertensão, o tabagismo e o diabetes <sup>5,6</sup>.

Diversos estudos determinaram o peso destes fatores de risco para o desenvolvimento da DAC e os estudos epidemiológicos estimam entre 55% a 75% dos diagnósticos de DAC e dos seus eventos adversos como consequência direta destes fatores <sup>7</sup>.

Apesar da delimitação dos principais fatores de risco para a DAC e da necessidade de medidas de impacto epidemiológico para o controle destes fatores, é perceptível que um percentual significativo de pacientes com esta doença permanece sem a definição de possíveis elementos preditores de risco. Além disto, o aumento na prevalência da DAC, associado à diminuição da mortalidade desta doença conduz ao cenário em que estes fatores de risco associam-se a fatores genéticos de forma distinta nas diferentes apresentações da DAC <sup>8,9</sup>.

Neste contexto, o entendimento da DAC insere-se no modelo de uma doença de natureza complexa, onde múltiplos fatores ambientais e genéticos atuam de maneira sinérgica para o seu desenvolvimento e eventualmente também para os efeitos adversos desta doença<sup>10, 11</sup>.

As evidências do componente genético como um fator de risco para a DAC são observadas em estudos onde a herdabilidade foi avaliada levando-se em conta a ascendência familiar ou a análise de pares de gêmeos<sup>12</sup>.

No estudo de Framingham, a história familiar de doença cardiovascular foi considerada um fator de risco independente dos demais fatores para DAC – com uma razão de chances de 2,6 para homens e 2,3 para mulheres<sup>13</sup>. Outros estudos como o PROCAM<sup>14</sup> e o INTERHEART<sup>15</sup> confirmaram a história familiar como fator de risco.

No estudo de Marenberg e colaboradores<sup>16</sup>, publicado em 1994, pares de gêmeos monozigóticos apresentavam o risco relativo de morte de 8,1 (intervalo de confiança de 95% entre 2,7 e 24,5) quando um dos gêmeos morria de DAC até a idade de 55 anos, enquanto em gêmeos dizigóticos este risco era de 3,8 (IC 95% entre 1,4 e 10,5).

Embora a estimativa da contribuição genética total para o risco de DAC implique em um aumento significativo do risco<sup>12</sup>, a determinação do efeito dos genes contribuintes para a susceptibilidade à DAC e aos seus eventos adversos necessita além da identificação destes genes, a avaliação da variabilidade genética interindividual para a determinação de fatores predisponentes ao risco de eventos adversos.

Os efeitos da variabilidade genética nos pacientes com DAC podem ser refinados e detectados ao considerarmos extremos da distribuição dos grupos de risco – como no caso de pessoas muito jovens ou idosos – ou mesmo ao analisarmos grupos restritos de indivíduos com determinada característica clínica específica – pacientes com DAC fumantes <sup>17</sup>.

Na investigação de possíveis variáveis genéticas que contribuam para o risco da Doença Arterial Coronariana em grupos específicos de pacientes, os estudos de associação genética são instrumentos de investigação exploratórios empregados com o objetivo de testar a frequência de variantes genéticas de diversas vias biológicas envolvidas no aparecimento e na progressão desta doença <sup>12</sup>.

As principais vias biológicas envolvidas na patogênese da DAC – metabolismo das lipoproteínas, integridade endotelial, inflamação arterial e trombose - apresentaram evidências através de estudos de associação genética de diferentes variantes gênicas no aumento de risco desta doença em pacientes portadores de DAC<sup>17</sup>.

Dentre estas vias biológicas, o processo trombótico é relevante no impacto clínico de pacientes com DAC devido aos vários eventos adversos decorrentes da alteração de fatores de risco hemostáticos e diversos estudos já correlacionaram a presença de variantes genéticas de proteínas desta via com eventos adversos da DAC <sup>18-22</sup>.

Em uma meta-análise de 66155 casos e 91307 controles, a variante A1691 do gene do Fator V (variante conhecida como Fator V de Leiden) e a

variante A20210 do gene da protrombina apresentaram respectivamente 1,22 e 1,25 no risco relativo de Infarto do Miocárdio associado à DAC. Ambos os genes estão envolvidos na geração de trombina circulante <sup>18</sup>.

A variante A455 da região promotora do gene do  $\beta$ -Fibrinogênio foi descrita em 1999 em pacientes diabéticos como um fator de risco para doença isquêmica miocárdica <sup>19</sup>. Um estudo recente prospectivo replicando um painel de 85 variantes de várias vias biológicas associadas à CAD em 811 pacientes que apresentaram infarto agudo do miocárdio ou o diagnóstico de angina instável, indicou esta variante como significativamente associada ( $p=0,03$ ) a esta doença<sup>20</sup>.

Além destes polimorfismos implicados na produção de proteínas hemostáticas circulantes, diversas variantes gênicas dos receptores plaquetários apresentam aumento de risco para CAD em grupos específicos de pacientes.

A variante GPIIIa PIA2 do receptor plaquetário Glicoproteína IIb/IIIa (receptor plaquetário do fibrinogênio e do fator de Von Willebrand - complexo  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 CD41/CD61) apresentou em um grupo de fumantes com DAC estável do projeto MASS um risco relativo de 2,2 de eventos adversos (infarto agudo do miocárdio, necessidade de vascularização ou morte)<sup>21</sup>.

As variantes dos genes das glicoproteínas plaquetárias GP1BA e GP6 foram analisadas recentemente em 2090 mulheres menopausadas que estavam utilizando ou não Terapia Hormonal de Reposição (THR). No grupo de mulheres recebendo THR, a variante GP1BA-5TT aumentou o Risco Relativo



(RR) em 16% para eventos coronarianos, enquanto aquelas que apresentavam a variante com o alelo C (mulheres com os genótipos TC e CC da GP1BA) reduziram seu risco em 46%. Em relação a variante GP6 13254TT, a THR diminui o RR em 17% para os eventos coronarianos, porém aumentou em 35% para as portadoras do alelo C (genótipos TC e CC da GP6) o risco destes mesmos eventos<sup>22</sup>.

Apesar da complexidade que a interação do processo trombótico realiza com as demais vias biológicas envolvidas na patogênese da DAC, evidências do componente genético interindividual na expressão e função de proteínas desta via descritas recentemente podem ser testadas na sua associação com eventos em pacientes com DAC, auxiliando no manejo clínico destes pacientes<sup>23</sup>.

## **1.2. Ensaios clínicos em doença arterial coronariana crônica.**

Com o intuito de avaliar qual a melhor opção terapêutica para pacientes com DAC estável, diversos ensaios clínicos foram realizados comparando-se os tratamentos de revascularização cirúrgica do miocárdio e angioplastia percutânea coronariana. Entre os principais ensaios nesta categoria citamos como referência: EAST, BARI, CABRI, RITA, GABI, ARTS. Outros ensaios clínicos foram realizados comparando-se estes procedimentos intervencionistas também com a opção de tratamento médico medicamentoso: RITA-2, BARI-2D, COURAGE e MASS II<sup>24, 25, 26, 27, 28</sup>.

Apesar das particularidades inerentes a cada um destes ensaios clínicos, e à exceção do pior prognóstico dos pacientes com diabetes melito, um resultado comum a todos os estudos é a ausência de diferença entre a opção do tratamento e a mortalidade nos pacientes portadores de DAC estável. Quando consideramos como desfecho o evento clínico novo infarto agudo do miocárdio, a opção terapêutica cirúrgica apresentou possíveis vantagens nas taxas destes eventos se comparada às demais, porém estas não foram estatisticamente significativas, porém a melhora sintomatológica foi significativamente influenciada pela modalidade cirúrgica <sup>27</sup>.

Há um consenso na análise destes ensaios clínicos que as três opções terapêuticas foram aprimoradas no decorrer das últimas décadas e o impacto deste aprimoramento resultou na diminuição da mortalidade da DAC <sup>5, 29</sup>.

No decorrer do período de 1980 a 2000, houve um declínio significativo na mortalidade por doença coronariana nos países desenvolvidos <sup>27, 29</sup>. Este cenário, porém não é compartilhado pelas nações em desenvolvimento, havendo um aumento na mortalidade na China e discrepâncias nas taxas ao considerarmos diferentes países na América Latina <sup>30</sup>.

O Brasil apresenta nas regiões Sudeste e Sul uma diminuição da mortalidade por DAC, porém o mesmo fenômeno ainda não foi observado nas regiões Norte e Nordeste <sup>31</sup>.

Os fatores que contribuíram para esta queda na mortalidade foram a identificação e manejo dos principais fatores de risco clássicos e o aprimoramento do tratamento para as pessoas que possuem doença arterial

coronariana diagnosticada. A contribuição de cada um destes componentes para a queda na mortalidade varia conforme o país avaliado, porém podemos considerar entre 23% a 47% deste declínio na mortalidade como resultado da melhora no tratamento e entre 44% a 76% como consequência da diminuição aos fatores de risco <sup>29</sup>.

Mesmo com o cenário de queda na taxa de mortalidade refletido pelos estudos epidemiológicos ou pelos ensaios clínicos descritos neste tópico, os pacientes com DAC continuam apresentando eventos adversos e uma mortalidade significativa (no projeto MASS, a taxa de mortalidade foi de 10,5% ao final de 05 anos, com pessoas entre 35 e 75 anos, 36% destes acima de 65 anos <sup>28</sup>) sugerindo que fatores preditores como novas variantes gênicas podem ser avaliados no seguimento de pacientes com DAC.

Os pacientes do projeto MASS II possuíam como característica uma doença arterial coronária multiarterial, com angina estável e função ventricular preservada. Estas características clínicas tornam este grupo de pacientes homogêneo para a avaliação de genótipos relevantes para eventos clínicos adversos. Desta forma, o objetivo primário do projeto MASS II para definir qual o melhor tratamento para estes pacientes é complementado com o objetivo secundário de análises com variantes genéticas cujo intuito seria aprimorar a avaliação do risco para eventos adversos de um paciente com DAC selecionado do projeto MASS II.

Somente recentemente, a discussão quanto ao estudo de variantes gênicas para DAC está sendo considerada no âmbito da avaliação da

variabilidade genética inter-individual em subgrupos de pacientes com características específicas que possibilitem a delimitação de um fenótipo preciso entre as várias apresentações clínicas da DAC <sup>23</sup>.

Em relação aos pacientes com doença arterial coronariana estável, poucos estudos genéticos foram realizados delimitando estes pacientes como grupo de estudo, cabendo ao projeto MASS II alguns destes resultados em variantes gênicas de elementos da hemostasia<sup>21</sup>. Por considerar os pacientes com DAC apresentando doença arterial coronária de característica multiarterial, com angina estável e função ventricular preservada um grupo de pacientes com características específicas que podem ser exploradas através de estudos de associação gênica, o objetivo desta tese foi avaliar as variantes genéticas do receptor plaquetário P2Y12 e da proteína *A Disintegrin-like And Metalloprotease domain with ThromboSpondin type I motifs 13* (ADAMTS13), clivadora do Fator de von Willebrand.

### **1.3. Variantes genéticas do receptor plaquetário P2Y12: haplótipos H1 e H2**

A ativação plaquetária implica em uma série de mudanças estruturais e funcionais das plaquetas cuja finalidade é uma resposta hemostática apropriada restrita em grande parte ao local que estimulou esta ativação.

Os ativadores plaquetários apresentam características específicas que induzem diversas alterações observadas nas plaquetas <sup>32</sup>:

- Aumento do Cálcio citoplasmático;

- Mudança na Forma Plaquetária;
- Mudança na afinidade de receptores GPIIb/IIIa (esta mudança conformacional expõe sítios para Fibrinogênio e Fator de Von Willebrand, agregando plaquetas ativadas adjacentes);
- Geração de produtos do metabolismo do Ácido Aracdônico;
- Fosforilação de Proteínas Plaquetárias;
- Liberação do conteúdo de grânulos  $\alpha$  , grânulos densos e do material dos lisossomos;
- Expressão na superfície de proteínas dos grânulos  $\alpha$  e grânulos densos.

Um dos mais importantes e primeiro ativador plaquetário descrito in vitro é a Adenosina Difosfato (ADP)<sup>33</sup>. Esta molécula pode ser liberada de hemácias e de grânulos densos de plaquetas ativadas, amplificando a resposta da estimulação plaquetária induzida pelos demais ativadores plaquetários.

O ADP é considerado um fraco ativador fisiológico das plaquetas em contraste com o colágeno em altas concentrações e a trombina, porém sua ação ocorre em diferentes fases da formação do trombo plaquetário através de sinais originados em receptores como o receptor de colágeno, *Glicoproteína Plaquetária VI*, e o receptor para o fator de Von Willebrand, *Glicoproteína Plaquetária Iba*<sup>33</sup>.

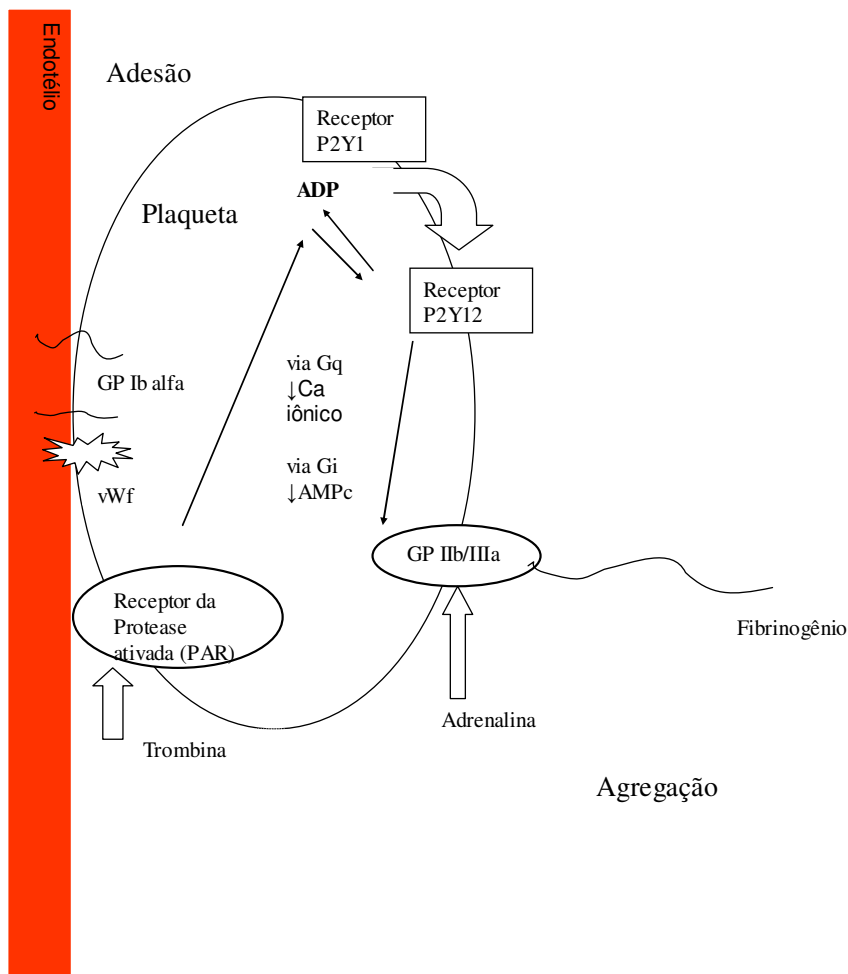
O ADP é essencial à estabilização do trombo plaquetário e ao recrutamento de plaquetas à superfície trombogênica.

O primeiro receptor para ADP identificado nas plaquetas foi um receptor purinérgico P2Y1 descrito por Leon e colaboradores em 1997, que descreveu sua expressão em plaquetas e megacariócitos e a função deste receptor na alteração conformacional plaquetária e na sua agregação após ativação pelo ADP <sup>34</sup>.

O segundo receptor para o ADP nas plaquetas foi descrito em 2001 por Hollopeter e colaboradores, que a partir dos dados referentes à inibição pelo ADP da enzima adenilatociclase via proteína G como ativadora do segundo mensageiro nas plaquetas, determinou que este receptor era um receptor ligado à proteína G (proteínas ligadoras do nucleotídeo guanina). Este receptor foi designado P2Y12 <sup>35</sup>.

Através do receptor P2Y1 ocorre um aumento transitório do Cálcio iônico, enquanto via receptor P2Y12 há uma inibição da adenilato ciclase e conseqüente redução do AMP cíclico (AMPc) <sup>33, 34</sup>. Ambos os receptores exercem suas ações através de proteínas G distintas: Gq para o receptor P2Y1 e Gi para o receptor P2Y12 <sup>36</sup>.

A ativação da via da proteína Gq ligada ao receptor P2Y1 induz à alteração na morfologia plaquetária e na sua agregação, enquanto a via Gi, ligada ao receptor P2Y12, amplifica a resposta da proteína Gq, estabilizando a agregação plaquetária <sup>36, 37</sup>. Outra função do receptor P2Y12 é ativar a integrina GPIIb/IIIa, receptora de fibrinogênio, através de uma via 3-Fosfoinositida Quinase <sup>37</sup> (Figura 1.1).



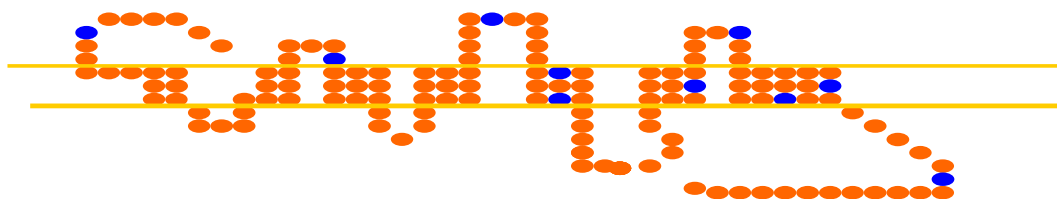
**Figura 1.1.** Receptor P2Y12 e suas interações com as proteínas plaquetárias (GP: glicoproteína; vWf: fator de von Willebrand).

O receptor P2Y12 é o alvo das tienopiridinas, classe de medicamentos que inclui a Ticlodipina e o Clopidogrel, que são amplamente empregados em cardiologia e neurologia no tratamento antiagregante<sup>38</sup>.

O gene codificante do receptor P2Y12 também foi identificado por Hollopeter e colaboradores em 2001, e sua organização é semelhante à de outros genes receptores com domínio trans-membrana, com 2 exons separados por 1 intron<sup>35</sup>.

Este gene está localizado no cromossomo 3 , na região 3q24-25, contendo 1332 pares de base nas regiões exônicas, separados por uma região intrônica de 1700 pares de base. Seu registro no GeneBank é AF313449.

O exon 2 codifica o receptor P2Y12 contendo 342 aminoácidos com 10 resíduos cisteína, sendo 4 resíduos cisteína extracelular nas posições, 5 resíduos cisteína no domínio transmembrana e 01 resíduo intracelular (Figura 1.2). Este receptor está expresso exclusivamente nas plaquetas e no cérebro (amígdalas, núcleo caudado, corpo caloso, hipocampo, substância nigra e tálamo) e sua forma funcional é oligomérica <sup>39</sup>.



**Figura 1.2.** Representação da seqüência de aminoácidos do receptor P2Y12. Os resíduos cisteína aparecem na cor azul.

Recentes alterações descritas na variabilidade genética interindividual deste receptor correlacionaram-se com as variações da concentração de ADP necessárias para produzir uma agregação plaquetária irreversível <sup>40</sup>.

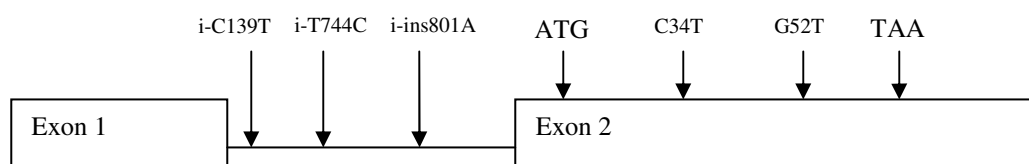
Com os dados obtidos da genotipagem do receptor P2Y12 de 98 homens saudáveis, Fontana e colaboradores<sup>40</sup> observaram quatro



polimorfismos (Figura 1.2) em desequilíbrio de ligação e estabeleceram dois haplótipos:

**H1** - haplótipo com os alelos C139 e T744 após o sítio 5' do intron e o alelo G52 no exon 2. A frequência deste haplótipo na amostra foi de 86%.

**H2** - haplótipo com a presença no intron 01 dos alelos T139 e C744 e a presença de uma inserção, i-ins801A na porção intrônica além do alelo T52 no exon 02. A frequência deste haplótipo foi de 14%.



**Figura 1.3:** Polimorfismos de aminoácido único identificados no gene do receptor plaquetário P2Y12. ATG: início da tradução; TAA: término da tradução.

Correlacionando estes haplótipos com estudos de agregação plaquetária via ADP e dosagem do AMP cíclico plaquetário, este grupo realizou testes funcionais de agregação plaquetária através da detecção da alteração da luz pelo método fotométrico registrado em um agregômetro.

A presença do haplótipo **H2** aumentou a agregação plaquetária em relação ao haplótipo **H1** (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1:** Capacidade de agregação plaquetária dos haplótipos H1e H2, (método fotométrico).

<b>Agregação ao estímulo com ADP</b>	
<b>Haplótipo</b>	<b>(valor médio após 2 coletas distintas)</b>
<b>H1/H1</b>	<b>34,7%</b>
<b>I/H2</b>	<b>67,9%</b>
<b>H2/H2</b>	<b>82,4%</b>

A presença do alelo H2 também diminuía a inibição causada pelo ADP na formação do AMPc detectado por imunoensaio enzimático, o que implica um aumento na agregação plaquetária na presença deste haplótipo (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** Capacidade de inibição da produção de AMPc pelo estímulo com diferentes concentrações de ADP (haplótipo H2)

	<b>% inibição AMPc (1 umol/L ADP)</b>	<b>% inibição AMPc (2 umol/L ADP)</b>	<b>% inibição AMPc (5 umol/L ADP)</b>
<b>Presença de H2 (H1/H2; H2/H2).</b>	13	31	37
<b>Ausência de H2 (H1/H1)</b>	31	39	50

Quando a presença do haplótipo H2 do receptor plaquetário P2Y<sub>12</sub> foi testada em um estudo caso – controle com 184 pacientes portadores de doença arterial periférica, Fontana e colaboradores encontraram na análise multivariada

uma associação positiva para a presença do haplótipo H2 e doença arterial periférica - razão de chances de 2,3 (95%CI: 1,4-3,9) <sup>41</sup>.

A distinção de haplótipos do receptor P2Y12 associados com um estado pró-agregante plaquetário *in vitro*, permite que uma correlação com eventos trombóticos seja avaliada na presença destes haplótipos em pacientes com riscos e eventos trombóticos cardiovasculares previamente definidos.

Convém ressaltar também que vários estudos aumentaram o emprego de medicamentos antiagregantes com especificidade para os receptores P2Y12 (estudos CAPRIE e CURE) <sup>42</sup>. Sua eficácia associada ao uso da aspirina e os diversos efeitos colaterais destes tratamentos necessitam de maiores esclarecimentos quanto à especificidade de ação em razão da variabilidade da reatividade plaquetária. A variabilidade genética interindividual e a associação com estudos *in vitro* e sua correlação com os eventos trombóticos em grupos selecionados de pacientes ajudará na eficácia e adequação do tratamento.

#### **1.4. Variantes genéticas da ADAMTS13**

Nos eventos trombóticos microangiopáticos que acometem principalmente arteríolas e artérias de pequeno calibre, além das plaquetas, o fator de von Willebrand é essencial à formação do trombo arterial <sup>43</sup>.

Este tipo de trombo caracteriza-se por agregados plaquetários, com pouca fibrina e com a presença de diferentes quantidades do fator de Von

Willebrand apresentando características similares às observadas nos trombos arteriais coronarianos <sup>44, 45</sup>.

O fator de Von Willebrand é sintetizado nos megacariócitos e no endotélio. Além do endotélio é armazenado nas plaquetas nos seus grânulos alfa e nos corpúsculos de Weibel-Palade como grandes multímeros (*ultra-large von Willebrand multimers*)<sup>46</sup>.

Os grandes multímeros de Von Willebrand, liberados do endotélio e das plaquetas, apresentam importante atividade biológica ao aderirem à matrix extra-celular e servirem como um ancoradouro para as plaquetas – através dos receptores plaquetários GP Ib  $\alpha$  e GP IIb/IIIa - aderirem e amplificarem a agregação plaquetária sob um fluxo de alto shear stress e liberação de ADP <sup>47</sup>.

O tamanho destes multímeros de Von Willebrand determina a intensidade da agregação plaquetária <sup>44</sup>.

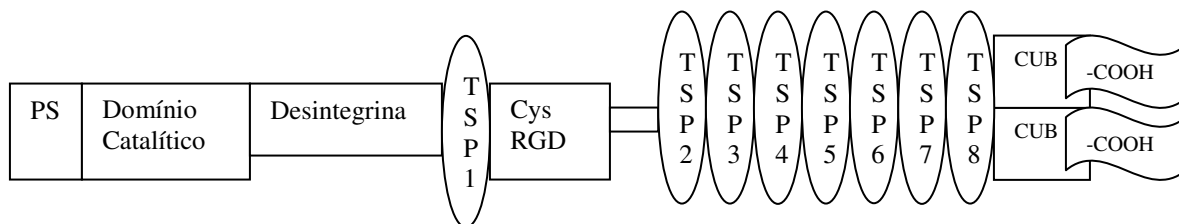
Os grandes multímeros de von Willebrand contendo as plaquetas à semelhança de um rosário estão aderidos ao endotélio em uma extremidade e livres ao fluxo sanguíneo na outra extremidade. Estes multímeros são posteriormente clivados e liberados das células endoteliais em pequenos multímeros sem função hemostática, controlando assim a intensidade da agregação plaquetária e a hemostasia local <sup>44</sup>.

Entre 1994 e 1996, dois grupos de pesquisadores caracterizaram a clivagem do fator de Von Willebrand por uma enzima designada à época como protease clivadora do fator de Von Willebrand <sup>43</sup>.

Recentemente, uma enzima da classe das metaloproteases da família ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase Protein*) foi identificada como a protease responsável pela função de clivar subunidades monoméricas do fator de Von Willebrand <sup>48, 49</sup>.

A protease ADAMTS13 é uma proteína glicosilada de 190 KD e 1427 aminoácidos com especificidade conhecida até o momento exclusivamente para o fator de von Willebrand, cujo sítio de clivagem está no domínio A2 deste fator, na ligação peptídica entre os aminoácidos Tirosina e Metionina (posições 842-843) <sup>50, 51</sup>.

A enzima possui na sua estrutura primária um Peptídeo Sinalizador seguido por um domínio Catalítico e um domínio Desintegrina. Na seqüência, encontra-se a porção Trombospondina-1 (TSP-1) seguida por um domínio rico em resíduos cisteína e uma seqüência RGD (Arginina-Glicina-ácido Aspártico) importante para as interações com as integrinas plaquetárias. Após uma região *Spacer*, encontra-se uma seqüência de Trombospondinas (TSP2-8) que terminam em dois domínios CUB (*complement, uEGF and bone morphogenesis*) apresentando cada um seu respectivo terminal carboxila <sup>51, 52,</sup>



**Figura 1.4:** Representação esquemática da proteína ADAMTS13 (PS: peptídeo sinalizador; TSP: trombospondina; Cys/RGD: domínio cisteína/ Arginina-Glicina-ácido Aspártico; CUB: *complement, uEGF, bone morphogenesis*)

Quando esta metaloprotease está diminuída ou ausente ocorrem trombooses arteriais onde predominam os agregados plaquetários associados com multímeros de Von Willebrand de alto Peso Molecular.

Uma evidência clínica dos efeitos adversos que a diminuição da ADAMTS13 acarreta é observada em pacientes com púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) que apresentam deficiência hereditária ou adquirida desta enzima e cujas principais manifestações são uma consequência da microangiopatia trombótica arterial <sup>43</sup>.

O gene da ADAMTS13 está localizado no cromossomo 9q34, apresentando aproximadamente 37 kb e 29 exons. A análise da expressão da enzima apresenta sua produção exclusivamente pelas células estelares hepáticas <sup>54</sup>.

Três isoformas secundárias à *splicing* alternativo foram detectadas cuja implicação biológica sobre a atividade da enzima não foi modificada. Quatro transcritos alternativos da enzima foram descritos com implicações na clivagem do ator de von Willebrand <sup>50</sup>.

Os estudos de famílias com Púrpura Trombocitopênica Trombótica Hereditária realizados por dois grupos de pesquisadores correlacionaram-se às alterações no gene da ADAMTS13 e às manifestações clínicas trombóticas desta doença.

Em 2001, Levy e colaboradores estudaram 07 famílias e identificaram 12 mutações no gene codificador da ADAMTS13 com implicações na sua atividade e correlação com o fenótipo de trombose microangiopática nos pacientes portadores destas mutações <sup>48</sup>.

Em 2002, Kokame e colaboradores identificaram 03 novas mutações com semelhante correlação clínica corroborada pela atividade enzimática diminuída *in vitro* <sup>55</sup>.

As principais mutações causadoras de alteração na produção ou na atividade da enzima comprometem o domínio rico em cisteína, o domínio trombospondina e o domínio desintegrina na ADAMTS13 <sup>55</sup>.

Atualmente, mais de 50 mutações no gene da ADAMTS13 foram descritas com várias mutações missense caracterizadas como polimorfismos de um único nucleotídeo com significativa freqüência alélica em diferentes populações (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3:** Polimorfismos de aminoácido única consequência de mutações missense no gene da ADAMTS13 e a frequência do menor alelo em diferentes populações.

<i>Nucleotídeo</i>	<i>Exon</i>	<i>Amino Ácido</i>	<i>Domínio Alterado</i>	<i>Frequência</i>
19C→T (rs340241143)	01	R7W	Peptídeo Sinalizador	10% (Europ.) <sup>48, 55</sup>
1342C→G (rs2301612)	12	Q448E	Rico em Cisteína	19% (Jap.) <sup>48, 55</sup> 43% (Europ.) <sup>48, 55</sup>
1423C→T (rs11575933)	12	P475S	Rico em Cisteína	5% (Jap.) <sup>55</sup>
1852C→G (rs28647808)	16	P618A	<i>Spacer</i>	9%(Americ.,Europ.) <sup>48, 56</sup>
1874G→A (rs36090624)	16	R625H	<i>Spacer</i>	3% (Americ.) <sup>48</sup>
2699C→T (rs685523)	21	A900V	TSP 1-5	10%(Europ, Americ.) <sup>48, 58</sup>
3097G→A (rs28503257)	24	A1033T	TSP 1-7	6% (Europ.) <sup>56, 58</sup>

rs: *reference SNP* - número de registro no banco de dados de polimorfismos do NCBI (dbSNP); TSP: trombospondina; Europ: população europeia, Jap: população japonesa; Americ: população americana; A: Alanina; E: ácido Glutâmico; H: Histidina; P: Prolina; Q: Glutamina; R: Arginina; S: Serina; T: Treonina; V: Valina; W: Triptofano.



Alguns destes polimorfismos do gene da ADAMTS13 descritos em pacientes com Púrpura Trombocitopênica Trombótica foram caracterizados funcionalmente com técnicas de clonagem e no desenvolvimento de proteínas recombinantes<sup>54, 57</sup>. Além disto, a presença de alguns destes polimorfismos tornou-se relevante como preditora de risco para sangramentos em pacientes com Doença de von Willebrand tipo I (doença autossômica dominante onde a susceptibilidade ao sangramento depende de variáveis ambientais)<sup>46</sup>.

Os polimorfismos da ADAMTS13 podem resultar em alterações na secreção e na atividade da proteína enzimática. A secreção da ADAMTS13 é avaliada através de um ensaio de *Western Blot* e da determinação do antígeno ADAMTS13 pelo anticorpo IgG anti-ADAMTS13 obtidos de coelhos e conjugados com peroxidase. A atividade da enzima é medida através do método descrito em 1999 que determina a atividade da ligação de colágeno residual do substrato degradado do fator de von Willebrand<sup>54</sup>. Estes estudos funcionais dos polimorfismos da ADAMTS13 revelaram uma arquitetura genotípica complexa onde se propõe que as várias alterações gênicas herdadas contribuem de forma sinérgica para o desenvolvimento das trombozes observadas na PTT<sup>57, 58</sup>.

Uma investigação funcional da relação entre os polimorfismos e a atividade da ADAMTS13 demonstrou que as variantes G1852 (resulta no aminoácido alanina na posição 618 da proteína) e T2195 (resulta no aminoácido valina na posição 732 da proteína) estavam individualmente associadas com uma diminuição discreta da secreção, porém, quando estes

dois polimorfismos estavam encontravam-se associados no experimento funcional a expressão da ADAMTS13 diminuía acentuadamente <sup>57</sup>.

Em contrapartida, ao se conjugar estes polimorfismos com a variante G1342 (o que acarreta no aminoácido glutamato na proteína) ou com a variante T19 (ocorre a tradução para o aminoácido triptofano na proteína), ocorre uma reversão dos achados anteriores e conseqüente normalização da secreção da ADAMTS13.

Estes dados sugerem que a atividade da ADAMTS13 dentro de um mesmo indivíduo reflete o conjunto de polimorfismos herdados que afetam a secreção ou a atividade específica da enzima.

Diferentes valores da secreção ou da atividade da enzima ADAMTS13 foram descritos na presença de alguns dos polimorfismos mais freqüentes desta enzima (Tabela 1.4) <sup>55, 57, 58</sup>.

**Tabela 1.4.** Valores obtidos para a secreção ou atividade enzimática de polimorfismos da ADAMTS13.

<i>polimorfismo</i>	<i>Secreção da enzima em relação ao normal</i>	<i>Atividade da enzima em relação ao normal</i>
19C- T (R7W)	99%	86%
1342C – G (Q448E)	95%	100%
1423C - T (P475S)	Não foi descrito	5-10%
1852C – G (P618A)	27%	14%
2699C – T (A900V)	Não foi descrito	23%

As implicações das alterações na expressão e na atividade da ADAMTS13 para a proteólise do fator de von Willebrand apresentam um potencial significativo para trombooses arteriais. Em artérias com alterações na sua reologia, como observado em pacientes com aterosclerose, esta condição possibilita um aumento das forças de cisalhamento com conseqüente aumento da interação entre o fator de von Willebrand e as plaquetas, com conseqüente aumento da proteólise deste fator <sup>47</sup>.

As implicações funcionais dos polimorfismos mais freqüentes deste gene tornam relevante a avaliação da presença de alelos, genótipos e haplótipos em pacientes com comprometimento arterial coronariano.

Alguns destes polimorfismos podem apresentar neste contexto efeitos protetores ou implicarem no aumento do risco para eventos adversos relacionados ao processo hemostático.

A necessidade de avaliar polimorfismos da ADAMTS13 freqüentes em diferentes populações e que apresentam alterações funcionais na possível associação com diferentes doenças complexas e que apresentam o componente trombótico no seu desenvolvimento já foi proposto <sup>57</sup>.

Apesar de estudos da associação da ADAMTS13 com eventos adversos cardíacos recentemente publicados <sup>59, 60</sup> sugerirem a importância desta enzima em pacientes coronarianos, estudos genéticos envolvendo variantes genéticas polimórficas da ADAMTS13 ainda não foram descritos.

---

---

## 2. OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é testar a hipótese de que as variantes genéticas funcionais trombogênicas relacionados ao receptor plaquetário P2Y12 e à metaloprotease ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains*) presentes em uma população previamente selecionada apresentando Doença Arterial Coronariana, interferem nos seguintes desfechos cardiovasculares:

- Infarto agudo do miocárdio;
- Mortalidade;
- Necessidade de nova intervenção coronariana devido angina refratária;
- Acidente vascular cerebral;

**Especificamente:**

1. Avaliação dos Haplótipos H1 e H2 do receptor plaquetário P2Y12 no grupo de 611 pacientes seguidos no ensaio clínico do projeto MASS II.
  
2. Avaliação dos Polimorfismos C1342G (Q448E), C1852G (P618A) e C2699T (A900V) da metaloprotease ADAMTS13 no grupo de 611 pacientes no ensaio do projeto MASS II.

---

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo avaliou variantes genéticas funcionais trombogênicas relacionadas ao receptor plaquetário P2Y12 e à protease ADAMTS13 em pacientes selecionados como participantes do projeto MASS II (The Medicine, Angioplasty and Surgery Study II).

O projeto MASS II consiste de um estudo unicêntrico, aleatorizado, prospectivo e multidisciplinar envolvendo pacientes com doença arterial coronariana de característica multiarterial, apresentando angina estável e função ventricular preservada para comparar as seguintes opções terapêuticas: tratamento clínico, revascularização cirúrgica do miocárdio e angioplastia transluminal. O projeto MASS vem sendo desenvolvido no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), envolvendo a Unidade Clínica de Coronariopatia Crônica, o Serviço de Métodos Gráficos, o Laboratório de Pesquisas Clínicas, o Serviço de Hemodinâmica, a Divisão de Cirurgia e o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, com aprovação da Comissão de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 264/94/11.

### 3.1. Seleção de pacientes

A população considerada para a inclusão no projeto MASS II compreende pacientes com DAC multiarterial, portadores de angina estável e/ou isquemia miocárdica esforço-induzido, com diagnóstico estabelecido através de estudo cinecoronariográfico revelador de estenoses coronárias significativas (>70%) em dois ou mais ramos arteriais.

A isquemia miocárdia foi avaliada através de teste de stress ou através de avaliação classificatória funcional da Canadian Cardiovascular Society <sup>61</sup>, sendo considerados pacientes pertencentes às classes II ou III.

As cinecoronariografias foram realizadas no período de no máximo dois meses anteriores ao procedimento escolhido para o tratamento, sendo analisadas por um cardiologista clínico, um cardiologista intervencionista e um cirurgião cardiovascular, havendo necessidade para a aleatorização de uma tríplice concordância para a indicação do tipo de intervenção do miocárdio isquêmico: Angioplastia Transluminal (ATC) ou Revascularização Cirúrgica do Miocárdio (RCM).

Os seguintes critérios para a não-inclusão no estudo foram definidos para os pacientes:

Idade (<35 ou >75 anos); Doenças cardíacas associadas (congenita, valvar, miocárdica, pericárdica); Cinecoronariografia de definição insatisfatória; FEVE < 35% (calculada pela fórmula de Dodge); Aneurisma de ventrículo esquerdo; Revascularização prévia do miocárdio (RCM ou ATC); Angina instável ou infarto agudo do miocárdio nas últimas quatro semanas; Lesão do tronco da artéria



coronária esquerda > 50%; Extensa calcificação de aorta ascendente ou espasmo coronário primário; Acidente vascular encefálico ou ataque isquêmico cerebral transitório nos últimos seis meses; Anatomia coronária inacessível para ATC ou RCM (de acordo com o consenso dos cardiologistas: o clínico, o intervencionista e o cirurgião); Expectativa de vida limitada à doença grave associada (neoplasia, insuficiência renal ou hepática, doenças hematológicas ou discrasias sanguíneas); Gravidez (suspeita, diagnosticada ou planejada); Outras morbidades que contraindicassem ATC ou RCM.

### **3.2. Definição dos tratamentos empregados nos diferentes grupos de pacientes**

Os pacientes participantes do projeto MASS II foram aleatorizados para Tratamento Clínico ou RCM ou ATC.

Todos os pacientes do projeto MASS II foram submetidos à terapêutica medicamentosa com aspirina, nitratos, inibidores da reductase HMG-CoA, inibidores da ECA, betabloqueadores e bloqueadores do canal de cálcio, exceto quando houvesse alguma contra-indicação. Orientação dietética para uma dieta pobre em lipídeos também foi realizada.

#### **3.2.1. Tratamento Clínico**

Os pacientes aleatorizados ao tratamento clínico foram submetidos à terapêutica medicamentosa padronizada e considerada ideal para o tratamento de pacientes coronarianos.

### **3.2.2. Tratamento de Intervenção (RCM ou ATC)**

Os pacientes selecionados para os procedimentos de intervenção foram avaliados maneira equivalente e consecutiva, de acordo com o número de artérias envolvidas, com a localização das lesões coronárias e considerando-se indicações semelhantes para ambos os procedimentos de revascularização do miocárdio.

Os pacientes que foram selecionados para os procedimentos de intervenção (RCM ou ATC) realizaram este procedimento no intervalo de até três semanas considerando-se os pacientes submetidos à ATC ou até 12 semanas no grupo de pacientes submetidos à RCM.

#### **3.2.2.1 Revascularização Miocárdica Percutânea**

A angioplastia transluminal coronária (ATC) foi realizada conforme técnica convencional, incluindo a administração oral de aspirina ou ticlodipina 24 horas anteriores ao procedimento; heparina endovenosa (10000 UI) e nitroglicerina foram infundidas imediatamente antes e durante o procedimento.

Os cardiologistas intervencionistas foram estimulados a intervir em todas as artérias que pudessem estar contribuindo para a isquemia miocárdica e/ou demonstrassem obstrução  $\geq 70\%$ . Além disso, todas as opções técnicas baseadas em cateteres estavam disponíveis, incluindo cateter-balão, stent, “laser”, aterectomia direcional e/ou rotacional, de tal modo que a estratégia foi planejada para permitir a revascularização funcional completa, iniciando pelo tratamento da lesão “culpada”, seguida do tratamento dos outros vasos. Quando necessária, a ATC foi planejada e realizada em mais de uma sessão.

No caso de oclusão aguda do vaso tratado durante a ATC, o cardiologista intervencionista e o cardiologista clínico tinham a opção de indicar a cirurgia de revascularização do miocárdio, de emergência.

Em todos os procedimentos percutâneos havia uma equipe de cirurgia cardíaca disponível para os casos de emergência.

O resultado foi considerado como sucesso quando a obstrução residual foi inferior a 50%, ou foi reduzida em pelo menos 20% do valor inicial.

### **3.2.2.2. Revascularização Cirúrgica do Miocárdio**

A RCM foi realizada utilizando-se técnica cirúrgica padronizada, sob hipotermia e com o uso de solução cardioplégica. O cirurgião cardiovascular foi estimulado a intervir em todas as artérias abordáveis, incluindo aquelas com estenose  $\leq 50\%$ . A estratégia cirúrgica foi determinada pelo cirurgião com o objetivo de obter revascularização miocárdica completa, se tecnicamente viável, com enxertos das veias safenas, utilização das artérias mamárias internas ou mesmo de artérias radial ou gastroepiplóica.

Os pacientes foram submetidos ao procedimento após a definição da estratégia terapêutica cirúrgica, tendo sido medicados com beta-bloqueadores e drogas antiplaquetárias, quando necessário em todo o período peri-operatório.

### **3.2.3. Critérios Angiográficos após a Intervenção**

A revascularização do miocárdio anatomicamente completa foi definida, angiograficamente, como a ausência de lesão coronária residual importante ( $>70\%$ ) em todos os ramos epicárdicos considerados factíveis para receberem o

tratamento através da ATC, ou de acordo com o número de anastomoses distais realizadas em todos os vasos considerados doentes na mesma condição.

### **3.3. Procedimentos de investigação utilizados no seguimento dos pacientes**

Após a aleatorização os pacientes eram avaliados a cada 03 meses no período de um ano e posteriormente a cada 06 meses com a realização de ECG de repouso, coleta de testes laboratoriais e ecocardiografia até o período de 05 anos.

Os óbitos e óbitos de causa cardiovascular foram definidos conforme a causa de morte. As causas de morte cardiovascular apresentam como causa direta de morte o infarto agudo do miocárdio ou a morte súbita.

#### **3.3.1 Teste Funcional**

A avaliação funcional foi realizada através do teste ergométrico (TE) em esteira, de acordo com o protocolo Bruce, modificado em condições basais na seleção do paciente e ao final de cada ano de seguimento até completar o 5º ano após seguimento clínico ou a intervenção. No TE, o nível máximo de alteração do segmento ST foi medido a 80ms do ponto J no eletrocardiograma (ECG), sendo as seguintes respostas consideradas: *não-isquêmica ou negativa* (sem alteração significativa no ECG), *isquêmica ou positiva* (infra-desnivelamento horizontal e/ou descendente do segmento ST maior que 1,0 mm para homens e maior que 2,0 mm para mulheres em 0,08 segundos após o ponto J), e *inconclusiva* (alterações não-interpretáveis por uso de drogas, ritmo de marca-passo ou bloqueio de ramo).

### **3.3.2. Arteriografia Coronariana**

Todos os pacientes foram submetidos à cinecoronariografia na seleção e após procedimento intervencionista em aparelho Philips modelo Integris 3000, incluindo coronariografia e ventriculografia esquerda pela técnica de Sones ou Seldinger, com registro de pelo menos quatro projeções ortogonais para a avaliação da artéria coronária esquerda e duas projeções para a artéria coronária direita, bem como para os enxertos arteriais ou venosos, quando presentes no grupo RCM submetido à cineangiocoronariografia de controle. A fração de ejeção foi calculada pela fórmula proposta por Dodge. Dois observadores experientes quantificaram visualmente as obstruções (considerando significativas aquelas  $\geq 50\%$ ), bem como a presença de circulação colateral.

A classificação das lesões coronárias foi baseada na sua localização, gravidade, extensão e angulação. A doença aterosclerótica coronária multiarterial foi caracterizada quando encontrada estenose  $\geq 50\%$  em mais de uma artéria coronária ou um de seus ramos, considerando-se apenas vasos com diâmetro luminal superior a 1,5 mm.

### **3.3.3. Avaliação da Angina**

A angina foi considerada de acordo com a classificação funcional da *Canadian Cardiovascular Society* e classificada entre I e IV <sup>61</sup>.

A angina foi considerada refratária somente quando os pacientes tratados com terapia anti-isquêmica tripla (betabloqueador e/ou bloqueador de canais de cálcio, nitrato e aspirina) não obtiveram sucesso no alívio/manifestação dos sinais /sintomas.

### **3.3.4. Infarto Agudo do Miocárdio**

O infarto agudo do miocárdio foi definido pelo surgimento de novas ondas Q em pelo menos duas derivações eletrocardiográficas contíguas ou pela apresentação de sintomas compatíveis com infarto agudo do miocárdio, associados à elevação da fração MB da enzima creatinofosfoquinase (CPK) maior que três vezes o limite superior ao normal, não sendo considerado diagnóstico para o grupo ATC quando esta elevação ocorresse dentro de 96 horas após o procedimento de revascularização.

### **3.4. Coleta de dados**

Os dados clínicos, demográficos, laboratoriais e imagenológicos coletados foram: idade, sexo, resultados de angiografias, história de eventos coronarianos prévios, história de hipertensão, grau de severidade da angina, condição de fumante presente ou ausente, uso de medicações, peso, altura, nível sérico de glicose, nível sérico de colesterol total e frações HDL, LDL, VLDL, nível sérico de triglicerídeos, resultados de cateterismo cardíaco, resultados de ecocardiograma.

### **3.5. Extração do DNA genômico - projeto MASS II**

O seguinte protocolo baseado em dados publicados<sup>62</sup> foi utilizado para a extração do DNA genômico: 08 ml de sangue periférico coletado em tubo contendo EDTA (anticoagulante) e transferidos para um tubo de 50ml, onde adiciona-se 1X tampão A até completar 20ml, agita-se a solução e durante

10 minutos esta solução deverá ficar na geladeira, centrifugando-se a seguir a 4°C por 10 minutos a 3000rpm. Descarta-se o sobrenadante, adiciona-se novamente 20ml de tampão A refrigerado à 4°C; em seguida, suspende-se o sedimento leucocitário através de agitação, refrigera-se a 4°C durante 10 minutos e centrifuga-se a 4°C por 10 minutos a 3000rpm. Descarta-se o sobrenadante e após a retirada do excesso de sangue, o sedimento leucocitário é resuspenso em: 3ml de tampão B com 200µl de SDS 10% e 500µl de tampão C com proteinase K (2µl de proteinase K 20mg/ml diluída em 5ml de tampão C).

Para a precipitação do DNA adiciona-se 1ml de solução de cloreto de sódio 6M, mistura-se vigorosamente durante 1 minuto e após uma centrifugação a 4°C por 20 minutos a 3000rpm, transfere-se o sobrenadante para um tubo de 15ml. Neste tudo se adiciona 01 volume de etanol 100% a temperatura ambiente, e aspira-se o DNA precipitado, transferindo-o para um tubo de 1,5ml que já deve conter 1ml de etanol 70% (mantido a -20°C).

As etapas suplementares adaptam o uso do DNA para os ensaios de genotipagem: centrifugar a 4°C por 15 minutos a 13500rpm, descartar o sobrenadante e deixar secar bem o tubo a temperatura ambiente (ideal de um dia para outro); ressuspender o sedimento (DNA) em 1ml de TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Este volume de TE usado vai depender do tamanho do sedimento de DNA. A dosagem é obtida após completa dissolução do DNA 50x em TE 1X e leitura da densidade óptica a 260nm. (Exemplo: 20µl DNA + 980µl TE 1X, após leitura a 260nm = 0.300 X 50 [=diluição de 50X] X 50 [fator do DNA] =

750ng/μl). Para a realização da reação de PCR a concentração adequada foi de 100ng/μl.

### 3.6. Determinação dos genótipos do receptor P2Y12

Para a determinação do genótipo do receptor P2Y12 e dos haplótipos H1 e H2, utilizamos os dados obtidos através da sequência do cDNA do gene P2Y12 cadastrada no *NCBI* com o código de acesso AF313449<sup>35</sup> e a descrição dos polimorfismos previamente identificados e publicados de uma população saudável (i-C139T, i-T744C, i-ins801A, C34T, G52T)<sup>40</sup>. O desequilíbrio de ligação entre estes polimorfismos determina os seguintes haplótipos:

Haplótipo H1 - alelos C139, T744, G52.

Haplótipo H2 - alelos T139, C744, i-ins801A, T52.

Os genótipos determinantes dos haplótipos H1 e H2 do gene do receptor P2Y12 foram identificados na população do projeto MASS II através de análise por enzima de restrição alelo específica utilizando-se como marcador o polimorfismo de base única i-T744C (haplótipo H1: T744 e haplótipo H2: C744) através de reação de polimerase em cadeia utilizando-se os seguintes primers oligonucleotídeos específicos:

- como primer sense:

5-TCACTTATCTCTGGTGAAATAAAAAGATTACGTA-3

- como primer antisense:

5-GTCAGAAATGGCCTGTGTATATATGGTCATGAGTTGGCGTACC-3



A reação de polimerase em cadeia foi realizada com os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação de 05 minutos à 95.8°C, seguida por um período de anealing de 38 ciclos à 95.8°C por 01 minuto, 58.8°C por 01 minuto, 72.8° C por 01 minuto e 07 minutos de extensão à 72.8°C

Após digestão do DNA amplificado pela enzima de restrição RsaI alelo específica os genótipos P2Y12 foram identificados em gel agarose à 2,5% contendo 50 ug/ml de brometo de etídio.

### **3.7. Determinação dos genótipos da ADAMTS13**

Considerando a doença coronariana como doença complexa e considerando a necessidade de se manter o poder estatístico de variantes alélicas da ADAMTS13, utilizamos como critérios de seleção destas variantes a frequência do menor alelo > 5% descrita em diferentes populações e testes funcionais indicadores da alteração na secreção e/ou atividade da ADAMTS13.

Os polimorfismos selecionados foram:

- O polimorfismo da posição 1342 do gene da ADAMTS13 apresentando guanina no lugar de citosina com uma frequência entre 19 e 43% em diferentes populações. Apesar de não haver alteração enzimática causada por este polimorfismo, a sua presença reverte a diminuição da atividade enzimática consequência da presença de outros polimorfismos. Este polimorfismo acarreta na troca do aminoácido glutamina por ácido glutâmico, representado pela abreviação padrão de uma letra como Q448E.

- O polimorfismo da posição 1852 do gene da ADAMTS13 apresentando guanina no lugar de citosina com uma frequência de 10% na população americana e européia. A presença deste polimorfismo está associada a uma diminuição de 86% na atividade enzimática da ADAMTS13 ao clivar o fator de von Willebrand. Este polimorfismo acarreta na troca do aminoácido prolina por alanina e sua representação é P618A.

- O polimorfismo da posição 2699 do gene da ADAMTS13 apresentando tiamina no lugar de citosina com uma frequência entre 5% e 10% na populações americana e européia. A presença deste polimorfismo está associada a uma diminuição de 77% na atividade enzimática da ADAMTS13 ao clivar o fator de von Willebrand. Este polimorfismo acarreta na troca do aminoácido alanina por valina e sua representação é A900V.

A sequência do cDNA do gene da ADAMTS13 descrita está cadastrada no *NCBI* com o código de acesso AF414401<sup>48</sup>. Os genótipos do gene da metaloprotease ADAMTS13 que nos propiciaram o estudo dos polimorfismos C1342G, C1852G, C2699T foram determinados através de análise por enzima de restrição alelo específico.

Os programas abaixo foram utilizados para o desenho dos primers e para a elaboração dos ensaios por enzima de restrição alelo específico:

- GeneFisher<sup>63</sup>, *software* livre desenvolvido na Universidade de Bielefeld (Alemanha). Este programa permitiu a configuração dos primers e as condições da Reação de Polimerase em Cadeia.

- Dcaps<sup>64</sup>, *software* livre desenvolvido na Universidade de Washington (EUA). Este programa foi utilizado também para a configuração dos primers e as condições da reação de Polimerase em Cadeia.

- Restrict<sup>65</sup>, *software* livre desenvolvido na Universidade de Cambridge (Inglaterra). Este programa forneceu uma série de enzimas para que fossem escolhidas as mais adequadas para a determinação dos fragmentos de DNA contendo os alelos específicos dos polimorfismos C1342G, C1852G, C2699T.

- SNP detective<sup>66</sup>, *software* livre desenvolvido na Universidade de São Paulo (Brasil). Este programa utiliza como plataforma de dados os polimorfismos inscritos no banco de dados de polimorfismos de único aminoácido do NCBI (*dbSNP / NCBI*<sup>96</sup>) e permitiu o desenho dos primers, assim como as possíveis enzimas de restrição que foram utilizadas.

A partir dos dados obtidos com o uso destes softwares, obtivemos os primers e enzimas a serem utilizados nos ensaios das reações alelo específico, conforme a descrição abaixo das reações:

- Polimorfismo C1342G (rs2301612) / (Q448E): os genótipos determinantes deste polimorfismo foram identificados através de reação de polimerase em cadeia utilizando-se os seguintes *primers* oligonucleotídeos específicos:

- como *primer sense*: 5- TGTCACCCCAGTTTACAGA -3

- como *primer antisense*: 5- GGAGGGATAGTAGGCCAA -3

A reação de polimerase em cadeia foi realizada com os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação de 01 minutos à 94°C, seguida por um

período de *annealing* de 29 ciclos à 92°C por 01 minuto, 63,4°C por 01 minuto, 72°C por 01 minuto e 10 minutos de extensão à 72°C. O produto de PCR desta reação apresentou 379 pares de base. Após digestão do DNA amplificado pela enzima de restrição Hpy188I alelo específica os genótipos C ou G foram identificados em gel agarose a 2,5% contendo 50 ug/ml de brometo de etídio.

- Polimorfismo C1852G (rs28647808) / (P618A): os genótipos determinantes deste polimorfismo foram identificados através de reação de polimerase em cadeia utilizando-se os seguintes *primers* oligonucleotídeos específicos:

- como *primer sense*: 5- GAGGAGGATGGGTGCTCAGC -3

- como *primer antisense*: 5- ACCATCCTCCAGGAGGGAGA -3

A reação de polimerase em cadeia foi realizada com os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação de 01 minutos à 94°C, seguida por um período de *annealing* de 29 ciclos à 92°C por 01 minuto, 63,4°C por 01 minuto, 72°C por 01 minuto e 10 minutos de extensão à 72°C. O produto de PCR desta reação apresentou 138 pares de base. Após digestão do DNA amplificado pela enzima de restrição HpyCh4IV alelo específica os genótipos C ou G foram identificados em gel agarose a 3 % contendo 50 ug/ml de brometo de etídio.

- Polimorfismo C2699T (rs685523)/ (A900V): os genótipos determinantes deste polimorfismo foram identificados através de reação de polimerase em cadeia utilizando-se os seguintes *primers* oligonucleotídeos específicos:

- como *primer sense*: 5- CGCCCGCAGGAGACGGAGCACGACCCTGTC -3

- como *primer antisense*: 5- GCCACTTCCTGGTCTCTCTG -3

A reação de polimerase em cadeia foi realizada com os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação de 01 minutos à 94°C, seguida por um período de *annealing* de 29 ciclos à 92°C por 01 minuto, 63,4°C por 01 minuto, 72°C por 01 minuto e 10 minutos de extensão à 72°C. O produto de PCR desta reação apresentou 223 pares de base. Após digestão do DNA amplificado pela enzima de restrição Hha I alelo específica os genótipos C ou T foram identificados em gel agarose a 2,5% contendo 50 ug/ml de brometo de etídio.

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados dos pacientes estão representados e analisados conforme a variável: para as variáveis contínuas, a análise foi feita através do cálculo das médias e desvios-padrão e para as variáveis categóricas calcularam-se as freqüências absolutas e relativas.

As características clínicas e demográficas dos pacientes foram analisadas conforme a presença das variantes genéticas haplotípicas H1 e H2 do gene P2Y12 e os alelos dos polimorfismos C1342G, C1852G, C2699T do gene da ADAMTS13.

As diferenças nestas características clínicas foram analisadas através do emprego do teste t de Student considerando-se as variáveis contínuas e o teste Qui-quadrado para as variáveis categóricas.

A relação entre as variáveis características dos pacientes e os eventos morte, infarto do miocárdio, angina refratária necessitando de revascularização e

acidente vascular cerebral foi avaliada e quando necessário as variáveis foram modeladas utilizando regressão de Cox, com vista à determinação de risco (Hazard Ratio).

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg e os desequilíbrios de ligação dos polimorfismos estudados do gene da ADAMTS13 foram analisados utilizando-se o programa Haploview 4.0 versão para Windows.

A associação das variantes alélicas com os eventos foi testada através do teste de Qui quadrado, sendo determinado para as variantes significativamente associadas a razão de chances e o intervalo de confiança desta associação. No caso da associação de uma variante com um evento, os efeitos das co-variáveis foram estimados através de regressão linear pelo modelo de risco proporcional de Cox, utilizando-se o programa HAPSTAT (Statistical analysis of haplotype-disease association) versão para Windows.

As curvas de sobrevida foram calculadas utilizando-se o método de Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas foram testadas através do teste de logaritmo de escores (log-rank).

As curvas de sobrevida relacionadas às combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G, C2699T e haplótipos da ADAMTS13 foram obtidas utilizando-se o programa Hplus 2.5, versão para Windows.

O risco relativo e a razão de chances foram considerados com 95% do intervalo de confiança e o nível de significância para os testes foi de 5%.

A análise estatística foi realizada com a utilização dos programas Statistical Package for the Social Sciences 13.0 (SPSS) e StatView 5.0 (SAS Institute) ambos em versão para Windows.

---

---

## 4. RESULTADOS



## **4.1 Análise da população de pacientes do projeto MASS II**

### **4.1.1 População projeto MASS II**

Durante um período de 05 anos (maio de 1995 a maio de 2000), o estudo MASS II avaliou 20769 pacientes com diagnóstico clínico de cardiopatia isquêmica submetidos à cinecoronariografia no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Desta população original, 18693 pacientes (90%) refutaram a sua inclusão ou não preencheram os critérios clínicos ou angiográficos determinados pelo estudo. Os principais motivos para a exclusão dos pacientes avaliados foram o comprometimento uniarterial, a presença de angina refratária, a concomitância de doença valvular, a detecção de estenose coronariana abaixo de 70% e o antecedente de intervenção coronariana prévia. Após preencherem os critérios pré-determinados, 2076 pacientes (10%) foram incluídos no estudo MASS II.

A população selecionada apresentava 1465 pacientes que não puderam ser submetidos à aleatorização por restrições inerentes ao protocolo.

Os remanescentes 611 pacientes - 29% da população selecionada; 2,9% da população avaliada - participaram do estudo MASS II e, aleatoriamente, foram distribuídos nos seguintes grupos:

- 203 pacientes (33%) para o tratamento de Revascularização Cirúrgica do Miocárdio;

- 205 pacientes (34%) para o tratamento de Angioplastia Coronariana Transluminal;

- 203 pacientes (33%) para o Tratamento Clínico Medicamentoso.

As características desta população estudada e dos grupos aleatorizados estão listadas na Tabela 4.1, a seguir:

**Tabela 4.1:** Características da população do projeto MASS II.

<i>Características Clínicas Laboratoriais e Angiográficas</i>	<b>Projeto MASS II</b> <b>(n = 611)</b>	<b>Grupo Tratamento Médico</b> <b>(n = 203)</b>	<b>Grupo Angioplastia</b> <b>(n=205)</b>	<b>Grupo Cirurgia</b> <b>(n = 203)</b>	<b>Valor de Significância (p) entre os grupos de tratamento</b>
<b>Variável Clínica</b>					
<i>Idade (anos)</i>	59,7 ±9	59,8 ±9	59,6 ±8	59,6 ±9	0,752
<i>Sexo Masculino (%)</i>	69	69	66,3	72,4	0,412
<i>Fumantes (%)</i>	33,9	36	30,7	35	0,495
<i>Hipertensão (%)</i>	59,7	55,2	61,3	62,6	0,268
<i>Diabetes Melito (%)</i>	31,1	36,9	27,3	29,1	0,08
<i>História de Infarto do Miocárdio (%)</i>	44,2	38,9	51,7	41,9	<b>0,024</b>
<i>Angina Pectoris (%)</i>	80,6	78	78	86	<b>0,006</b>
<i>Índice de Massa Corporal</i>	27 ± 4	27,0 ± 4	27,5 ± 4	26,7 ± 4	0,207
<b>Variável Laboratorial</b>					
<i>Colesterol Total (mg/dl)</i>	223 ± 47	223 ± 44	228 ± 50	218 ± 46	0,926
<i>Colesterol LDL (mg/dl)</i>	147 ± 42	148 ± 40	150 ± 44	143 ± 43	0,752
<i>Colesterol HDL (mg/dl)</i>	37 ± 10	37 ± 9	37 ± 9	37 ± 10	0,916
<i>Triglicérides (mg/dl)</i>	193 ± 116	196 ± 120	201 ± 115	183 ± 110	0,295
<b>Variável Angiográfica</b>					
<i>Biarteriais (%)</i>	41,3	40,9	41,5	41,9	0,980
<i>Triarteriais (%)</i>	58,5	59,1	58,5	58,1	0,980
<i>Fração de Ejeção</i>	67,3 ±8	68 ±7	67 ±8	67 ±9	0,984

#### 4.1.2. Eventos nos pacientes do projeto MASS II

Durante o seguimento dos 611 pacientes do projeto MASS II, 92 pacientes (15%) morreram, sendo que 65 pacientes (10,6%) faleceram por morte de causa cardíaca (infarto agudo do miocárdio). No período de 05 anos do estudo MASS II, 122 pacientes (19,9%), independentemente do grupo ao qual estavam alocados, necessitaram uma nova intervenção (RCM ou ATC), 70 pacientes (11,45%) apresentaram novos infartos agudos do miocárdio e 26 pacientes apresentaram acidentes vasculares cerebrais (4,3%). A escolha da modalidade terapêutica não apresentou diferença quanto aos eventos mortalidade, mortalidade de causa cardíaca, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Estes dados estão apresentados na Tabela 4.2.

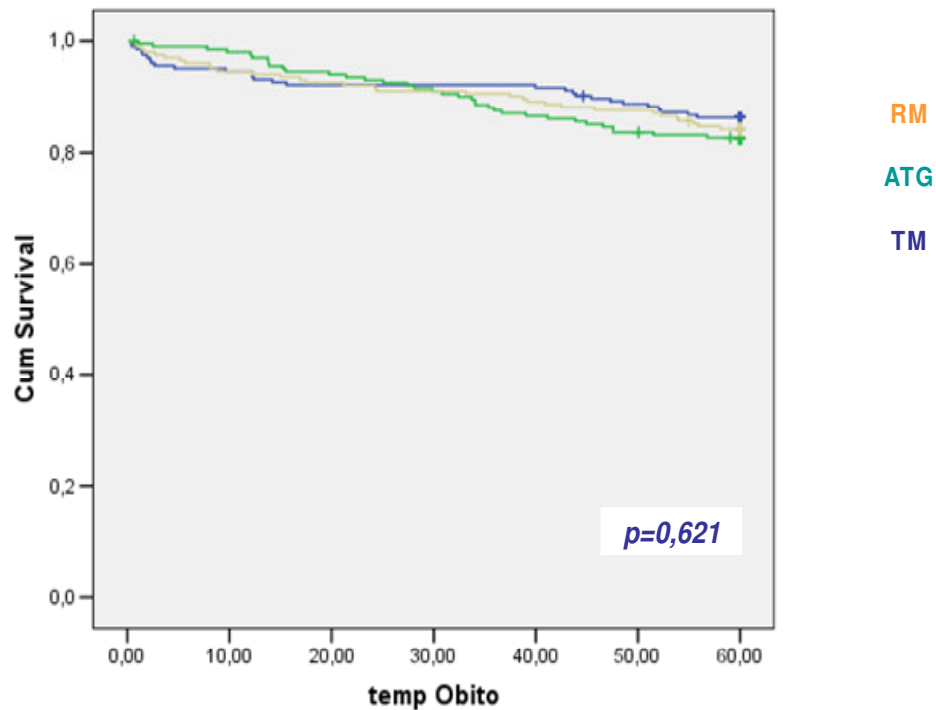
A única diferença significativa observada entre os grupos de tratamento ao longo destes 05 anos ocorreu na frequência de uma nova intervenção, sendo os pacientes alocados no tratamento cirúrgico aqueles que apresentaram uma menor necessidade de intervenções – TABELA 4.2. No grupo clínico, 49 novas intervenções (24,2%) ocorreram, sendo que 31 pacientes necessitaram de um procedimento cirúrgico e 18 pacientes foram submetidos à angioplastia. No grupo submetido à ATC, por sua vez, 19 pacientes necessitaram de um procedimento cirúrgico e 47 pacientes foram submetidos à nova angioplastia, totalizando 66 novas intervenções (32,5%) neste grupo. No grupo cirúrgico 07 pacientes (3,5%) necessitaram uma nova cirurgia de revascularização do miocárdio (dois pacientes) ou uma angioplastia (cinco pacientes).

**TABELA 4.2:** Características dos 611 pacientes do projeto MASS II e dos respectivos grupos de tratamento

<i>Eventos</i>	<b>Projeto MASS II</b>	<b>Grupo Tratamento Médico</b>	<b>Grupo Angioplastia</b>	<b>Grupo Cirurgia</b>	<b>Valor de Significância (p) entre os grupos de tratamento</b>
<i>MORTALIDADE</i>	92 (15%)	33 (16,2%)	33(15,5%)	26(12,8%)	0,824
<i>MORTE DE CAUSA CARDÍACA</i>	65 (10,6%)	25 (12,3%)	24 (11,7%)	16 (7,9%)	0,631
<i>NECESSIDADE DE UMA NOVA INTERVENÇÃO</i>	122 (19,9%)	49 (24,2%)	66 (32,5%)	07 (3,5%)	<b>0,021</b>
<i>INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO</i>	70 (11,45%)	31 (15,3%)	23 (11.2%)	16 (8,3%)	0,785
<i>ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL</i>	26 (4,3%)	07 (3,4%)	07 (3,4%)	12 (5,9%)	0,359

#### 4.1.3 Sobrevida livre de morte

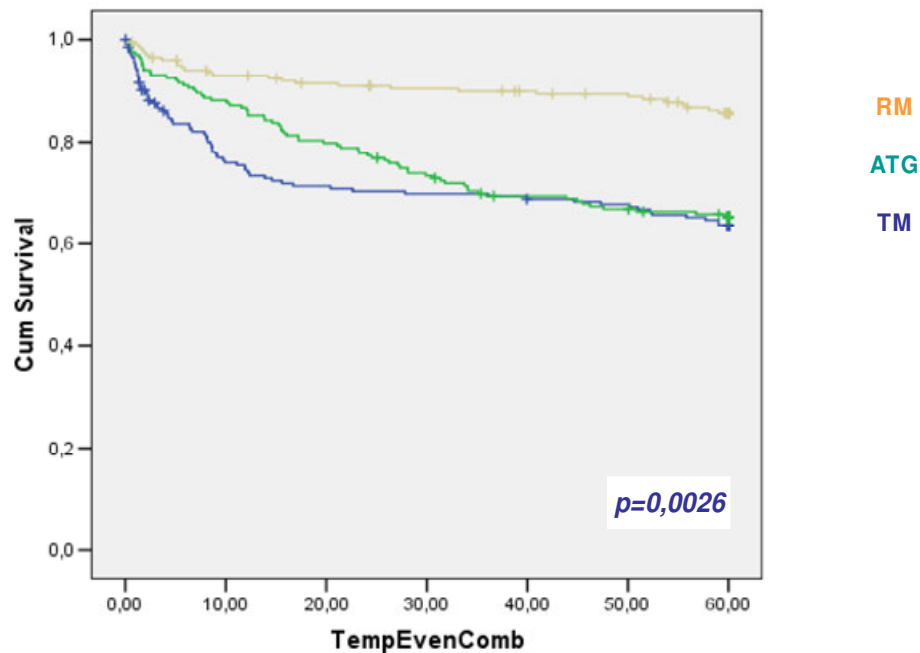
A sobrevida livre de morte dos 611 pacientes selecionados do projeto MASS II durante o período de 05 anos do estudo apresentou-se semelhante entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos e não foi constatado diferença estatisticamente significativo, como observado na FIGURA 4.1.



**FIGURA 4.1** – Sobrevida livre de morte entre os grupos de tratamento. RCM: Revascularização; ATC: Angioplastia; TM: Tratamento Clínico Medicamentoso.

#### 4.1.4 Sobrevida livre de eventos

Os pacientes do grupo tratamento médico apresentaram 89 eventos (43%), enquanto os pacientes do grupo angioplastia apresentaram 113 eventos (55%) e os do grupo cirúrgico apresentaram 30 eventos (15%). A sobrevida livre de eventos apresenta uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,0026$ ), para a combinação de mortalidade geral, mortalidade por causa cardíaca ou angina refratária necessitando uma nova intervenção (FIGURA 4.2).



**FIGURA 4.2** - Probabilidade de Sobrevivência livre de eventos combinados. RCM: Revascularização Cirúrgica ; ATC: Angioplastia; TM: Tratamento Clínico.

## **4.2 Haplótipos H1 e H2 do receptor plaquetário P2Y12 nos pacientes do projeto MASS II.**

### **4.2.1 Distribuição dos haplótipos H1 e H2**

A genotipagem para os haplótipos H1 e H2 dos pacientes do projeto MASS II foi realizada em 540 pacientes. Circunstâncias técnicas – amostra inadequada ou incertezas na averiguação do resultado obtido no gel de agarose – acarretaram na exclusão de 71 pacientes da análise da genotipagem.

Através do ensaio de genotipagem foi possível identificar a presença do haplótipo H2 e estimar a frequência dos haplótipos H1. A presença ou ausência dos alelos constituintes do haplótipo H2 possibilitou a divisão dos pacientes em 03 grupos: H1/H1, H1/H2, H2/H2.

A frequência do haplótipo H1 encontrada foi de 86,9% e a frequência do Haplótipo H2 foi de 13,5%.

A distribuição dos haplótipos H1 e H2 encontrada na população do projeto MASS II está descrita abaixo:

- 410 pacientes (75,9%) apresentavam os haplótipos H1/H1.
- 119 pacientes (22%) apresentavam os haplótipos H1/H2.
- 11 pacientes (02%) apresentavam os haplótipos H2/H2.



#### **4.2.2 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com os haplótipos H1 e H2**

Para avaliar o impacto do haplótipo H2 na população dos pacientes do projeto MASS II e em razão do número reduzido de pacientes H2/H2, os pacientes H1/H2 e H2/H2 foram avaliados em um mesmo grupo.

A distribuição dos haplótipos H1/H1 e H1/H2 + H2/H2 em relação às características clínicas, laboratoriais e do tipo de tratamento dos pacientes do projeto MASS II encontram-se listadas na Tabela 4.3.

Em relação à distribuição das características clínicas e laboratoriais não foi observado diferença estatisticamente significativo entre os pacientes portadores dos haplótipos H1 e H2, exceto para o valor de triglicérides, que estava aumentado nos pacientes portadores do haplótipo H2 ( $p=0,02$ ).

No grupo de pacientes portadores do haplótipo H2, também observamos o Índice de Massa Corpórea em valor acima daquele observado no grupo de pacientes portadores do haplótipo H1; este dado, apesar de não ser estatisticamente significativo ( $p=0,06$ ), pode indicar uma tendência.

**TABELA 4.3:** Características da população MASS II (Haplótipos H1 e H2)

<b>Características Clínicas Laboratoriais e grupo de Tratamento</b>	<b>H1/H1</b>	<b>H1/H2 + H2/H2</b>	<b>Valor de Significância (<i>p</i>)</b>
<i>Número de Pacientes</i>	410	130	
<i>Idade (anos)</i>	60 ± 9	59 ± 10	0,21
<i>Sexo Masculino (%)</i>	68,5	70	0,83
<i>Fumantes (%)</i>	31	33,1	0,89
<i>Hipertensão (%)</i>	60,7	53,1	0,13
<i>Diabetes Melito (%)</i>	31	31,5	0,90
<i>Índice de Massa Corpórea</i>	27,0 ± 4,1	27,8 ± 4,4	0,06
<i>História de Infarto do Miocárdio (%)</i>	24,5	23,7	0,83
<i>Angina Pectoris (%)</i>	87	90,8	0,25
<i>Colesterol Total (mg/dl)</i>	221,1 ± 44,1	224,9 ± 52,7	0,42
<i>Colesterol LDL (mg/dl)</i>	147,5 ± 37,7	147,9 ± 45,2	0,91
<i>Colesterol HDL (mg/dl)</i>	37 ± 10,7	36,2 ± 9,8	0,16
<i>Triglicerídeos (mg/dl)</i>	185,3 ± 109,7	211,9 ± 133,6	<b>0,02</b>
<i>Tratamento Clínico Medicamentoso (%)</i>	32,2	36,9	0,10
<i>Revascularização Cirúrgica do Miocárdio (%)</i>	36,4	26,2	0,10
<i>Angioplastia (%)</i>	31,5	36,9	0,10

### 4.2.3 Genótipos H1 e H2 e eventos na população MASS II

#### 4.2.3.1 Incidência dos eventos - Haplótipos H1 e H2.

No período do estudo do projeto MASS II, a incidência dos eventos morte, infarto agudo do miocárdio, necessidade de nova intervenção e acidente vascular cerebral não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com os haplótipos H1 e H2 (Tabela 4.4).

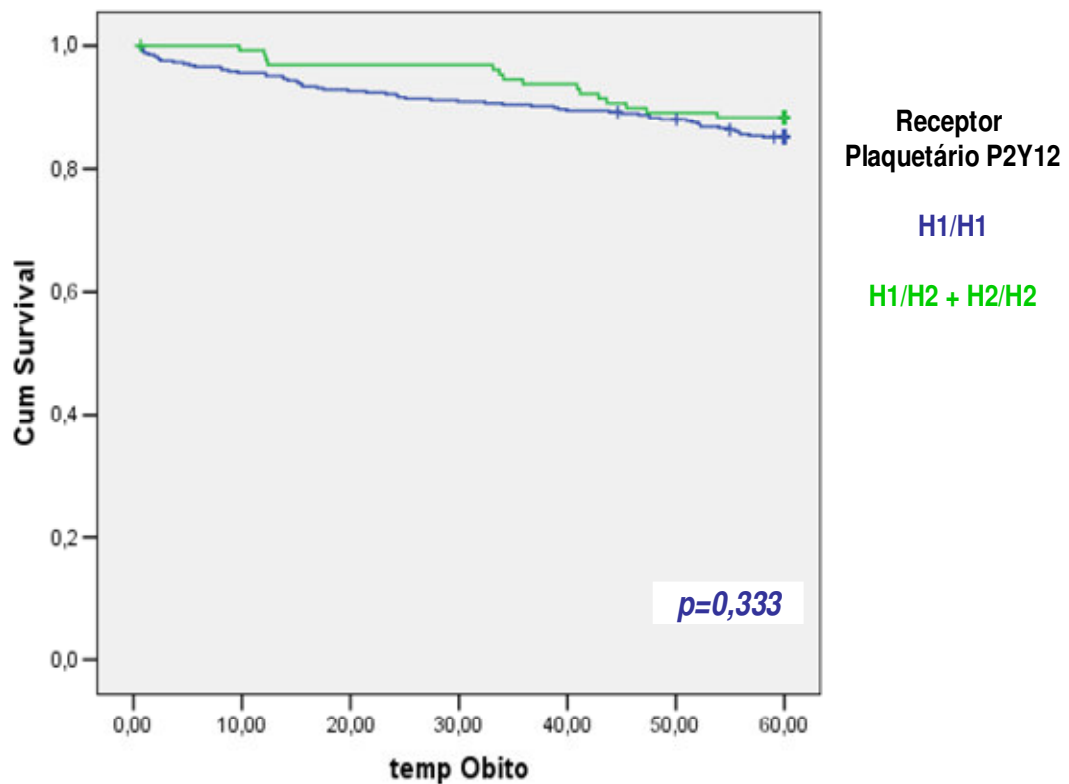
O grupo de 11 pacientes que possuíam somente os alelos do haplótipo H2 (H2/H2) apresentou 01 paciente que faleceu, 01 paciente onde foi diagnosticado um novo infarto agudo do miocárdio e 01 paciente com acidente vascular cerebral no período do estudo. Três pacientes neste grupo necessitaram uma nova intervenção coronariana (RM ou ATC).

**Tabela 4.4:** Incidência de Eventos (Haplótipos H1 e H2)

Eventos		H1/H1	H1/H2 + H2/H2	<i>p</i>
Morte	(76)	61(14,9%)	15(11,5%)	0,34
Infarto do Miocárdio	(42)	34 (8,3%)	08 (6,2%)	0,428
Nova Intervenção	(148)	107 (26,1%)	41 (31,5%)	0,226
Acidente Vascular Cerebral	(21)	18(4,4%)	3 (2,3%)	0,285

#### 4.2.3.2 Sobrevida livre de morte - Haplótipos H1 e H2.

Durante o período de 05 anos do estudo MASS II, a sobrevida livre de morte dos pacientes com os haplótipos H1 e H2 apresentou-se semelhante e não foi constatado diferença estatisticamente significativo, como observado na FIGURA 4.3.



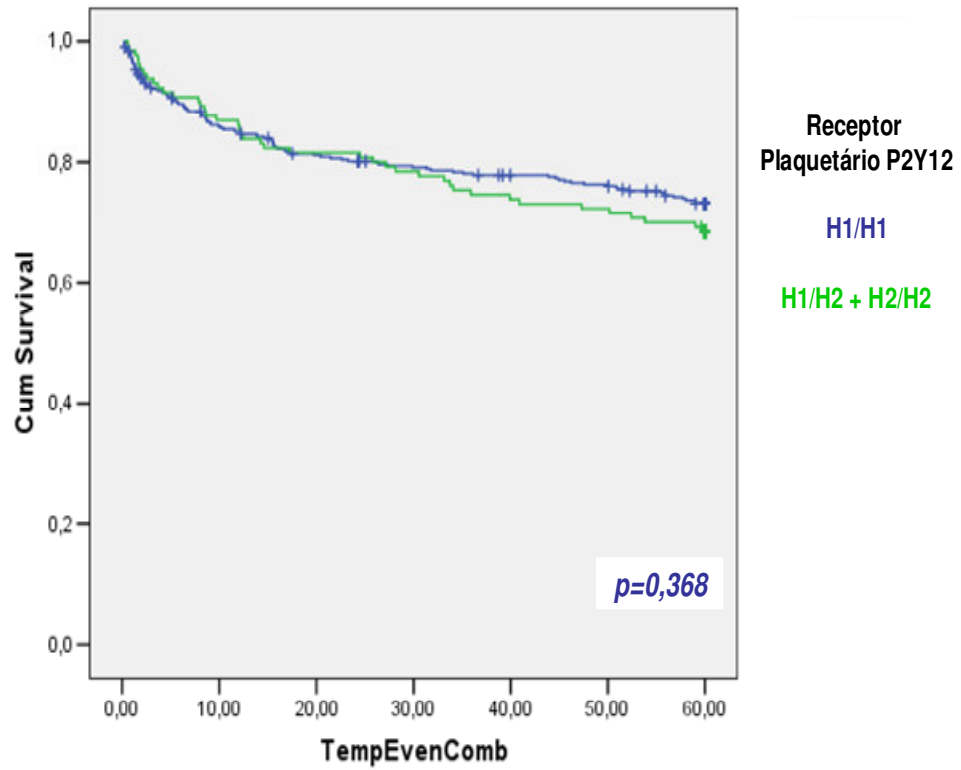
**FIGURA 4.3** Sobrevida livre de Morte entre os pacientes com os haplótipos H1 e H2.

#### **4.2.3.3 Sobrevida livre de eventos nos portadores dos haplótipos H1 e H2.**

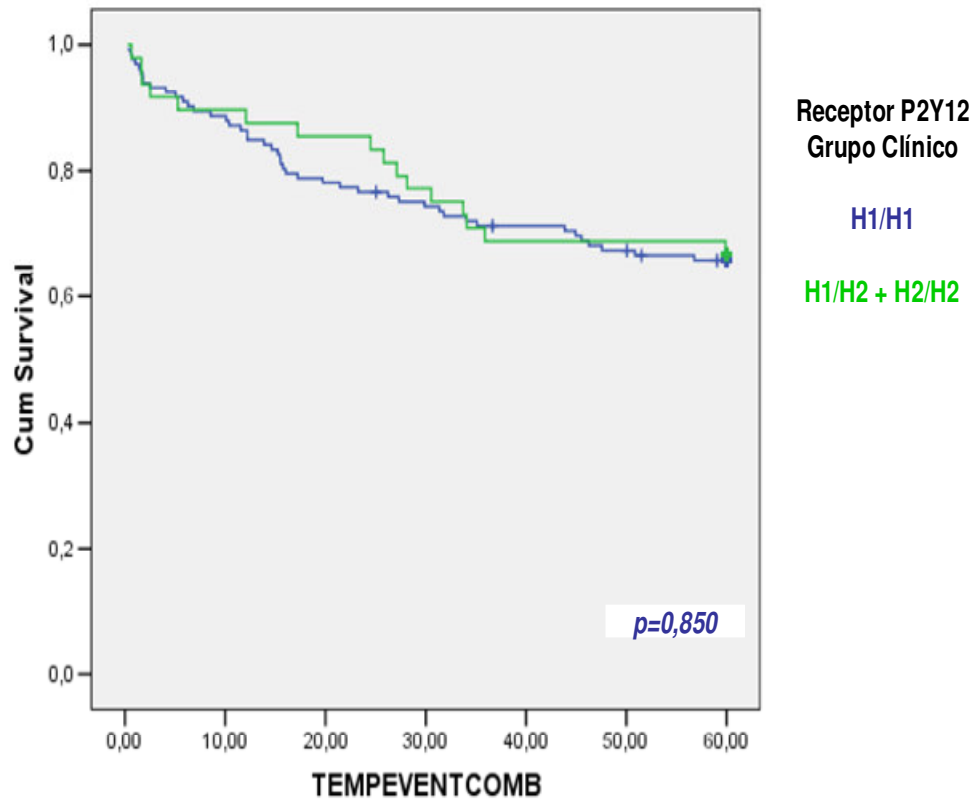
A sobrevida livre dos eventos infarto agudo do miocárdio, angina refratária requerendo uma nova intervenção coronariana e acidente vascular cerebral não apresenta diferença estatisticamente significativo entre os pacientes do projeto MASS II que possuem os haplótipos H1 e H2.

A sobrevida livre dos eventos combinados mortalidade de causa cardíaca, infarto agudo do miocárdio e angina refratária necessitando nova intervenção coronariana não apresenta diferença estatisticamente significativo entre os pacientes que possuem os haplótipos H1 e H2, como observado na FIGURA 4.4.

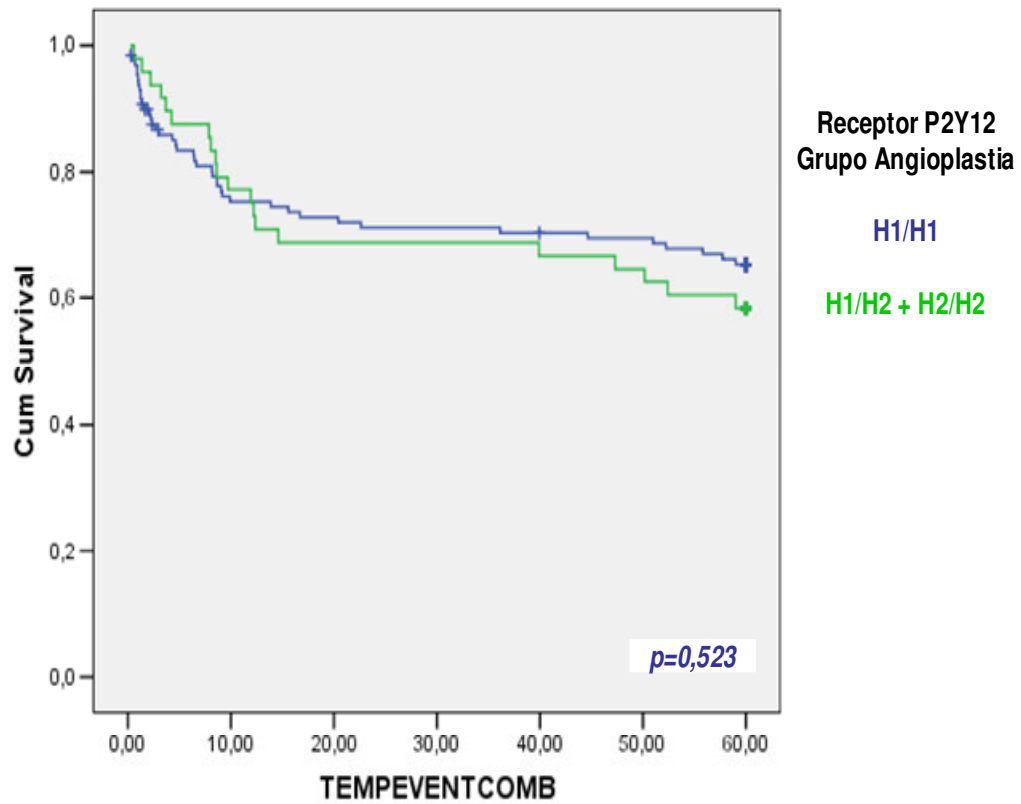
A sobrevida livre dos eventos combinados mortalidade de causa cardíaca, infarto agudo do miocárdio e angina refratária necessitando nova intervenção coronariana não apresenta diferença estatisticamente significativo entre os pacientes que possuem os haplótipos H1 e H2 quando avaliamos o procedimento escolhido para tratamento – tratamento clínico, angioplastia transluminal coronariana ou revascularização cirúrgica do miocárdio - FIGURA 4.5 a 4.7.



**FIGURA 4.4** Probabilidade de Sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 e H2.

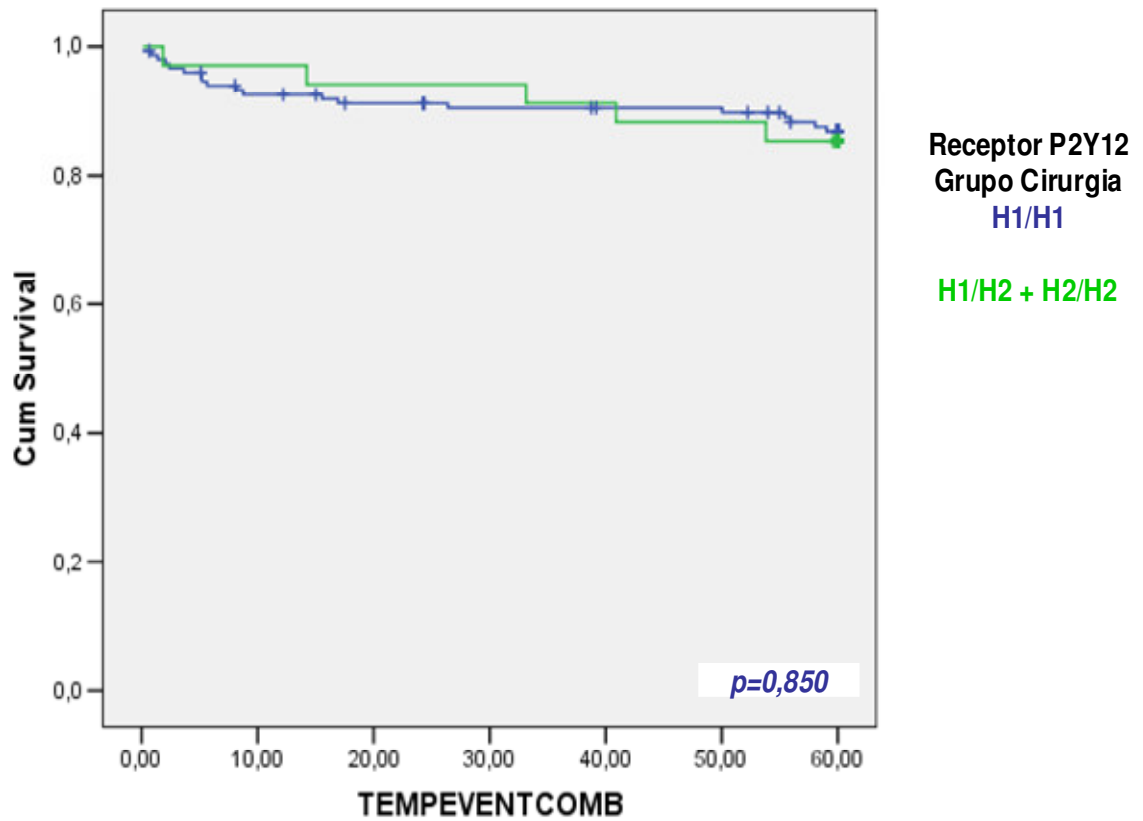


**FIGURA 4.5** Probabilidade de Sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 ou H2 no grupo tratamento clínico.



**FIGURA 4.6** Probabilidade de Sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 ou H2 do grupo tratamento angioplastia transluminal percutânea





**FIGURA 4.7** Probabilidade de Sobrevivência livre de eventos combinados nos pacientes com os haplótipos H1 ou H2 do grupo tratamento revascularização cirúrgica do miocárdio

---

#### **4.2.4 Resumo dos resultados - Haplótipos H1 e H2 na população MASS II**

A análise dos Haplótipos H1 e H2 na população do projeto MASS II apresentou os seguintes resultados relevantes:

- A frequência dos haplótipos na população estudada mostrou-se semelhante àquela descrita em outras populações.
- Não houve associação entre a presença de H1/H1, H1/H2, H2/H2 com hipertensão, diabetes melito, fumo, infarto prévio, índice de massa corpórea e colesterol (Total, LDL, HDL) nos pacientes selecionados no projeto MASS II.
- Houve uma associação estatisticamente significativa entre um maior valor de triglicérides séricos e a presença do haplótipo H2, quando comparado com o haplótipo H1.
- Não houve associação entre a presença de H1/H1, H1/H2, H2/H2 com o número de eventos.
- Não houve associação entre a presença de H1/H1, H1/H2, H2/H2 com os eventos Morte, Infarto Agudo do Miocárdio, Angina refratária necessitando nova Intervenção Coronariana e Acidente Vascular Cerebral.
- A presença dos haplótipos H1 ou H2 não influenciou a sobrevida livre de morte dos pacientes do projeto MASS II.
- A presença dos haplótipos H1 ou H2 não influenciou a sobrevida livre de eventos combinados nos pacientes do projeto MASS II, mesmo considerando-se o grupo de tratamento do paciente.

---

### **4.3 Variantes genéticas C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) da metaloprotease ADAMTS13 nos pacientes do projeto MASS II.**

#### **4.3.1 Distribuição das variantes genéticas C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T (A900V).**

A genotipagem das variantes genéticas C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) dos pacientes do projeto MASS II apresenta os seguintes resultados:

**- C1342G (Q448E):**

A genotipagem foi realizada em 463 pacientes, observando-se 221 pacientes com genótipo CC (47,7%), 190 pacientes com genótipo CG (41 %) e 52 pacientes com genótipo GG (11,2%). Na população genotipada, a frequência do alelo C é de 68,2%, enquanto a frequência do alelo G é de 31,7%.

**- C1852G (P618A):**

A genotipagem foi realizada em 560 pacientes, observando-se 508 pacientes com genótipo CC (90,7%), 51 pacientes com genótipo CG (9,1%) e 01 paciente com genótipo GG (0,2%). Na população genotipada, a frequência do alelo C é de 95%, enquanto a frequência do alelo G é de 4,7%.

**- C2699T(A900V):**

A genotipagem foi realizada em 559 pacientes, observando-se 464 pacientes com genótipo CC (83%), 89 pacientes com genótipo CT (15,9%) e 06 pacientes com genótipo TT (1,07%). Na população genotipada, a frequência do alelo C é de 90,3%, enquanto a frequência do alelo T é de 9,2 %.

### 4.3.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação

Na análise das variantes C1342G, C1852G e C2699T observamos que esta população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme os valores na tabela 4.5:

**TABELA 4.5:** Equilíbrio de Hardy-Weinberg (eHW) - C1342G, C1852G e C2699T.

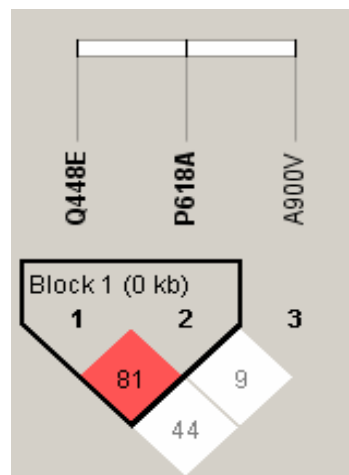
Polimorfismo	Heterozigosidade Observada	Heterozigosidade Prevista	Valor de p (eHW)	Alelo Menor	Freq. do Alelo Menor
<b>C1342G (Q448E)</b>	0,41	0,434	0,2658	G	31,8%
<b>C1852G (P618A)</b>	0,091	0,09	1,0	G	4,7%
<b>C2699T (A900V)</b>	0,159	0,168	0,3573	T	9,2%

A análise através de combinação em duplas variantes alélicas (*pairwise*) evidenciou que as variantes C1342G e C1852G estão em desequilíbrio de ligação constituindo um haplótipo (FIGURA 4.7).

Através desta análise encontramos o escore LOD (logaritmo na base 10 para chance de recombinação homóloga) de 9,91 e o  $D'$  (coeficiente de desequilíbrio de ligação quando dividido pelo seu maior valor) de 0,811 (TABELA 4.6)

**TABELA 4.6:** Escore LOD e coeficiente D' para os polimorfismos da ADAMTS13.

<i>Combinação de Polimorfismos</i>	<i>D'</i>	<i>LOD</i>	<i>r<sup>2</sup></i>
C1342G(Q448E)	0,811	9,91	0,075
C1852G(P618A)			
C1342G(Q448E)	0,448	0,42	0,01
C2699T(P618A)			
C1852G(P618A)	0,09	0,42	0,004
C2699T(A900V)			

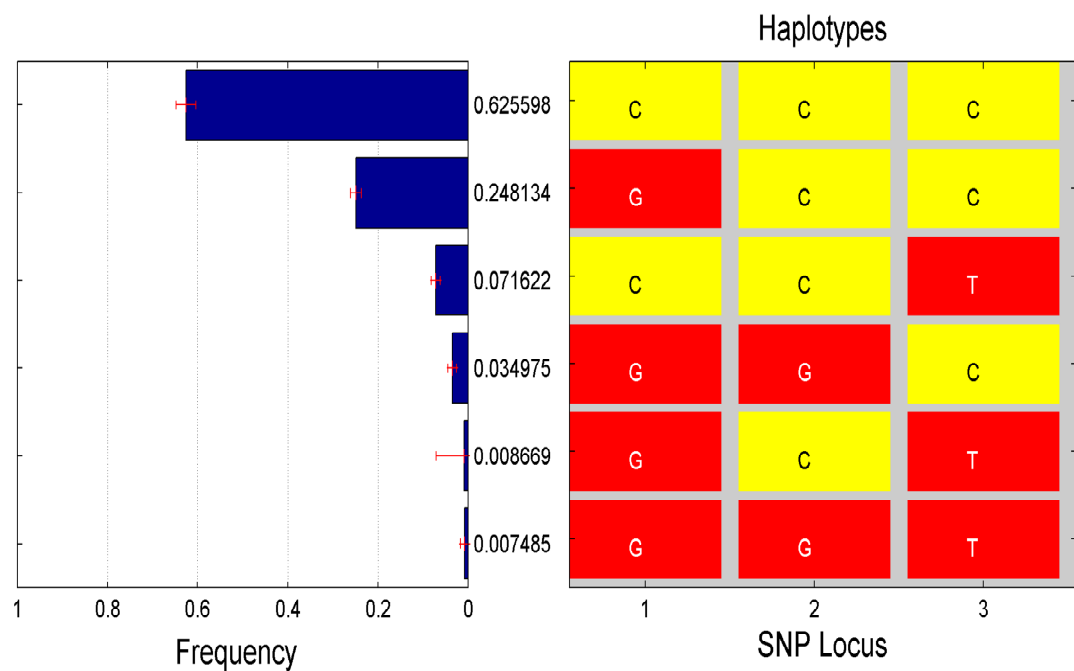


**Figura 4. 8** – Análise de dupla combinação Alélica das variantes gênicas da ADAMTS13. Os polimorfismos C1342G (Q448E) e C1852G (P618A) constituem um haplótipo.

As combinações alélicas que constituem este haplótipo apresentam as seguintes frequências: CC - 67,8% ; GC - 27,5%; GG - 4,2%.

Considerando-se o haplótipo formado pelos polimorfismos C1342G(Q448E) e C1852G(P618A) e todas as possíveis combinações com os alelos do polimorfismo C2699T(A900V), as principais combinações alélicas mais frequentes nesta população são (FIGURA 4.9):

- CCC → 62,5 %
- GCC → 24,8 %
- CCT → 07,1 %
- GGC → 03,4 %



**FIGURA 4.9:** Frequência das combinações alélicas formadas pelas variantes alélicas dos polimorfismos da ADAMTS13.

#### **4.3.3 Características dos pacientes em relação às variantes genéticas C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T (A900V).**

A distribuição das variantes genéticas C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) em relação às características clínicas, laboratoriais e do tipo de tratamento dos pacientes do projeto MASS II encontra-se listada na tabela 4.7.

Para avaliar o impacto dos alelos G do polimorfismo C1852G e do alelo T do polimorfismo C2699T e em razão do número reduzido dos seus respectivos genótipos homocigotos, os pacientes com estes alelos foram agrupados nos genótipos 1852 CG + GG e 2699 CT + TT.

Não houve associação entre as variantes C1342G(Q448E), C1852G(P618A) da ADAMTS13 e as características clínicas, laboratoriais e do tipo do tratamento dos pacientes do projeto MASS II.

Em relação à variante C2699T(A900V), também não se encontrou associação com as principais características clínicas e laboratoriais, exceto para o valor de colesterol total que se encontra em valores significativamente menores na presença do alelo T ( $p=0,02$ ).

**TABELA 4.7.** Características dos pacientes (MASS II) em relação aos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.

	C1342G (Q448E)				C1852G (P618A)			C2699T (A900V)		
	CC	CG	GG	<i>p</i>	CC	CG+GG	<i>p</i>	CC	CT + TT	<i>p</i>
Número de pacientes	221	190	52		508	52		464	95	
Idade (anos)	59	60	59	<i>0,83</i>	59	60	<i>0,37</i>	59,9	57,9	<i>0,51</i>
Sexo Masculino (%)	67,9	68,9	67,31	<i>0,81</i>	68	73	<i>0,34</i>	68%	71,6	<i>0,498</i>
Fumantes (%)	32,1	33,2	40,38	<i>0,69</i>	33,7	28,8	<i>0,45</i>	33,7	30,5	<i>0,550</i>
Hipertensão (%)	57	57,9	69,2	<i>0,14</i>	58,4	61,5	<i>0,22</i>	57,9	62,1	<i>0,447</i>
Diabetes Melito (%)	29	28,4	40,4	<i>0,26</i>	34,6	36,5	<i>0,54</i>	39,7	33,7	<i>0,270</i>
Índice de Massa Corpórea	27± 4	26 ± 4	26± 4	<i>0,42</i>	27± 4	26± 4	<i>0,67</i>	27 ± 4	27± 4	<i>0,964</i>
História de Infarto do Miocárdio (%)	43,4	46,3	51,9	<i>0,42</i>	44,4	53,8	<i>0,09</i>	45,6	44,2	<i>0,808</i>
Colesterol Total (mg/dl)	224 ± 40	217 ± 55	209 ± 45,6	<i>0,07</i>	222± 46	227 ± 64	<i>0,50</i>	<b><u>225 ± 46</u></b>	<b><u>209 ± 50</u></b>	<b><u>0,02</u></b>
Colesterol LDL (mg/dl)	150 ± 39	149 ± 42	131 ± 49,6	<i>0,91</i>	147± 41	141 ± 57	<i>0,34</i>	149 ± 43	136 ± 43	<i>0,07</i>
Colesterol HDL (mg/dl)	37 ± 9	36 ± 10	38 ± 10,3	<i>0,35</i>	37± 10	38± 11	<i>0,62</i>	37 ± 10	36 ± 10	<i>0,415</i>
Triglicerídeos (mg/dl)	192 ± 114	197 ± 109	185 ± 158	<i>0,80</i>	190 ± 110	210 ± 155	<i>0,23</i>	200 ± 149	190 ± 108	<i>0,447</i>
Clínico (%)	<i>33,9</i>	<i>31,1</i>	<i>26,9</i>		<i>33,5</i>	<i>34,6</i>		<i>31,9</i>	<i>35,8</i>	
Cirurgia (%)	<i>35,7</i>	<i>31,6</i>	<i>34,6</i>	<i>0,56</i>	<i>33,5</i>	<i>36,5</i>	<i>0,92</i>	<i>33,8</i>	<i>33,7</i>	<i>0,834</i>
Angioplastia (%)	<i>30,3</i>	<i>37,4</i>	<i>38,5</i>		<i>32,9</i>	<i>28,8</i>		<i>34,1</i>	<i>30,5</i>	



#### **4.3.4. Eventos associados com os alelos dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V).**

Na análise das variantes gênicas da ADAMTS13 nos pacientes do ensaio clínico MASS II, determinou-se as frequências dos alelos nos casos e controles para determinado evento e um teste de Qui Quadrado ( $X^2$ ) foi realizado assim como o valor de significância (p).

Na análise da população do projeto MASS II não houve a associação dos alelos C ou G do polimorfismo C1342G(Q448E) e C ou G do polimorfismo C1852G(P618A) com os eventos morte, morte de causa cardiovascular, infarto agudo do miocárdio, necessidade de novo procedimento (Revascularização do Miocárdio ou Angioplastia) e AVC ocorridos no período de seguimento deste ensaio clínico.

Na análise dos alelos C e T do polimorfismo C2699T(A900V) com estes mesmos eventos, encontramos associação significativa somente do alelo 2699T (A900) com morte ( $p=0,048$ ) e morte de causa cardiovascular ( $p=0,0038$ ) e não houve associação estatisticamente significativo destes alelos com os demais eventos selecionados (TABELA 4.8).

**TABELA 4.8:** Eventos e a associação com os polimorfismos C1348G, C1852G e C2699T.

Evento	Polimorfismo	ALELO ASSOCIADO	Frequência Casos	Frequência Controles	X <sup>2</sup>	Valor de p
<i>MORTE</i>	C1348G(Q448E)	C	0,718	0,676	1,002	0,3168
	C1852G (P618A)	C	0,968	0,950	0,956	0,3283
	<b>C2699T(A900V)</b>	<b>T</b>	<b>0,135</b>	<b>0,085</b>	<b>3,877</b>	<b>0,0489</b>
<i>MORTE CARDIOVASCULAR</i>	C1348G(Q448E)	C	0,750	0,675	2,26	0,1328
	C1852G(P618A)	C	0,962	0,951	0,246	0,6196
	<b>C2699T(A900V)</b>	<b>T</b>	<b>0,170</b>	<b>0,084</b>	<b>8,401</b>	<b>0,0038</b>
<i>INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO</i>	C1348G(Q448E)	C	0,775	0,674	3,463	0,0627
	C1852G(P618A)	C	0,955	0,952	0,0090	0,9254
	C2699T(A900V)	C	0,920	0,907	0,185	0,6668
<i>REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO</i>	C1348G(Q448E)	G	0,658	0,684	0,229	0,5325
	C1852G(P618A)	C	0,910	0,955	2,17	0,1407
	C2699T(A900V)	T	0,068	0,094	0,663	0,4155
<i>ANGIOPLASTIA</i>	C1348G(Q448E)	G	0,274	0,322	0,987	0,4291
	C1852G(P618A)	G	0,054	0,046	0,166	0,6841
	C2699T(A900V)	C	0,101	0,092	0,148	0,7002
<i>ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL</i>	C1348G(Q448E)	G	0,264	0,319	0,460	0,4979
	C1852G(P618A)	G	0,045	0,047	0,0040	0,9483
	C2699T(A900V)	T	0,090	0,092	0,0010	0,9742

Em decorrência da significância estatística dos eventos morte e morte por causa cardiovascular associado ao alelo T do polimorfismo C2699T, para estes eventos foram calculados o valor da Razão de Chances (*Odds Ratio*: OR) e o respectivo intervalo de confiança de 95% (95%IC) .

A presença do alelo T2699 aumentou o risco de morte em 67% em relação ao risco inicial desta população para este evento (OR: 1,67; 95%IC: 1-2,78). Este alelo – T2699 - também aumentou o risco de morte por causa cardiovascular (infarto agudo do miocárdio) em 123% em relação ao risco inicial desta população (OR: 2,23; 95%IC:1,2-3,94). (TABELA 4.9).

**TABELA 4.9:** Análise da variante 2699T (900V) com eventos morte e morte cardiovascular (projeto MASS II).

Evento	Variante Gênica	Número de alelos T / Número de alelos C (Casos)	Número de alelos T / Número de alelos C (Controles)	Odds Ratio	Intervalo de Confiança
<b>MORTE</b>	2699T (900V)	21/ 135	82/ 878	1,67	1,0- 2,78
<b>MORTE CARDIO- VASCULAR</b>	2699T (900V)	18/ 88	85/ 925	2,23	1,2- 3,94

Com o intuito de complementar a análise da associação entre o alelo T e os eventos morte e morte de causa cardíaca na população do MASS II levando em conta as principais covariáveis ambientais realizamos a análise desta variante pelo modelo de regressão logística (Tabela 4.10). Neste

modelo observamos que apesar de não haver diferença entre os grupos que possuíam as variantes C2699 e T2699 e as co-variáveis *diabetes melito* e idade (TABELA 4. 10), estas co-variáveis estão associadas à presença deste alelo para o evento morte por causa cardíaca ( $p=0,023$  e  $p=0,002$ , respectivamente).

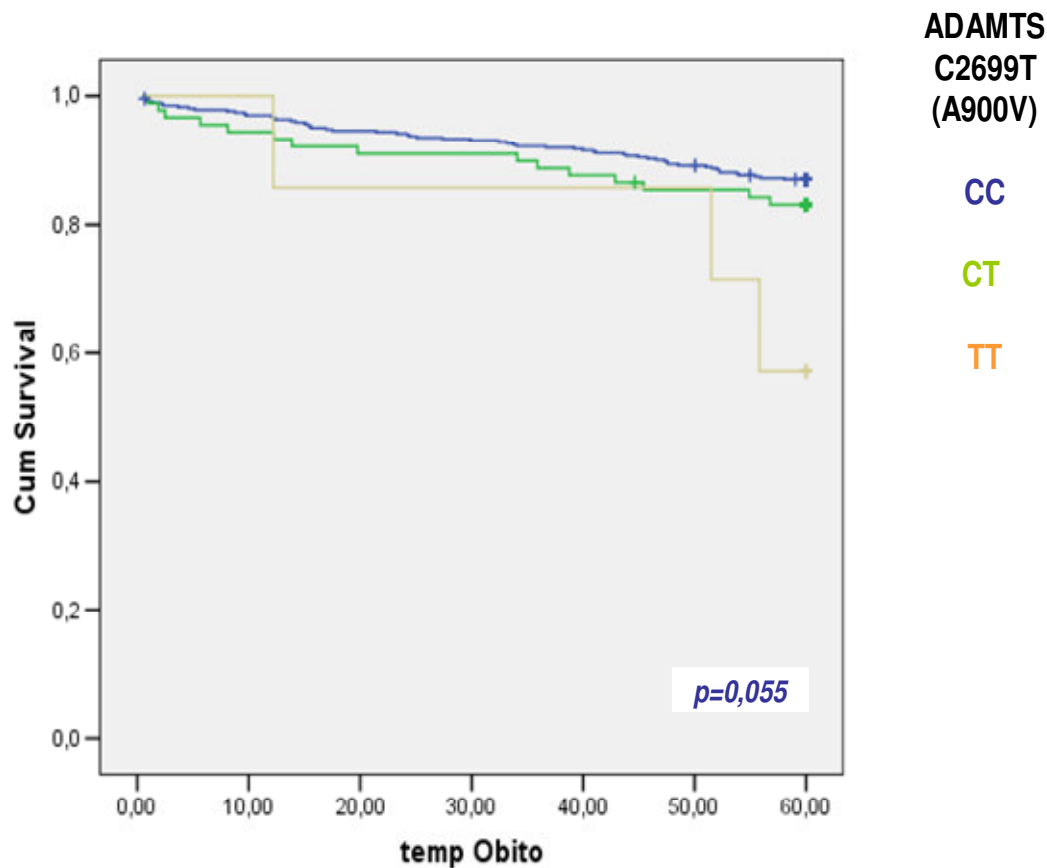
**Tabela 4.10:** Análise da variante T2699 (Val900) em relação aos eventos morte e morte de causa cardíaca e co-variáveis.

<b>Evento (variante T2669)</b>	<b>Estimate</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>Estatística Valor de Z</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>Morte</b>	0,5102	0,2615	1,9513	<b>0,051</b>
<i>Idade</i>	0,5102	0,2615	1,9513	0,004
<i>sexo</i>	-0,2327	0,2529	-0,9200	0,357
<i>diabetes</i>	-0,4331	0,2390	-1,8122	0,070
<i>Hipertrigliceridemia</i>	0,1046	0,0837	1,2493	0,211
<i>Hipercolesterolemia</i>	0,0011	0,0026	0,4211	0,673
<i>Infarto prévio</i>	-0,6522	0,2343	-2,7837	0,054
<i>Fumo</i>	-0,3709	0,2585	-0,6660	0,505
<b>Morte Cardíaca</b>	0,8002	0,2824	2,8332	<b>0,005</b>
<i>Idade</i>	0,066	0,0160	4,1333	0,002
<i>sexo</i>	-0,0837	0,3035	-0,2759	0,782
<i>diabetes</i>	-0,6238	0,2753	-2,2662	0,023
<i>Hipertrigliceridemia</i>	-0,4862	0,3001	-1,6203	0,105
<i>Hipercolesterolemia</i>	0,0012	0,0030	0,3842	0,700
<i>Infarto prévio</i>	-0,4949	0,2695	-1,8367	0,066
<i>Fumo</i>	-0,4862	0,3001	-1,6203	0,105

A análise da sobrevida livre de morte e morte cardiovascular dos genótipos CC, CT e TT do polimorfismo A900V foi então estimada através do método de Kaplan Meyer.

A sobrevida livre de morte dos genótipos do polimorfismo C2699T (A900V) apresentou um valor não significativo estatisticamente ( $p = 0,055$ ),

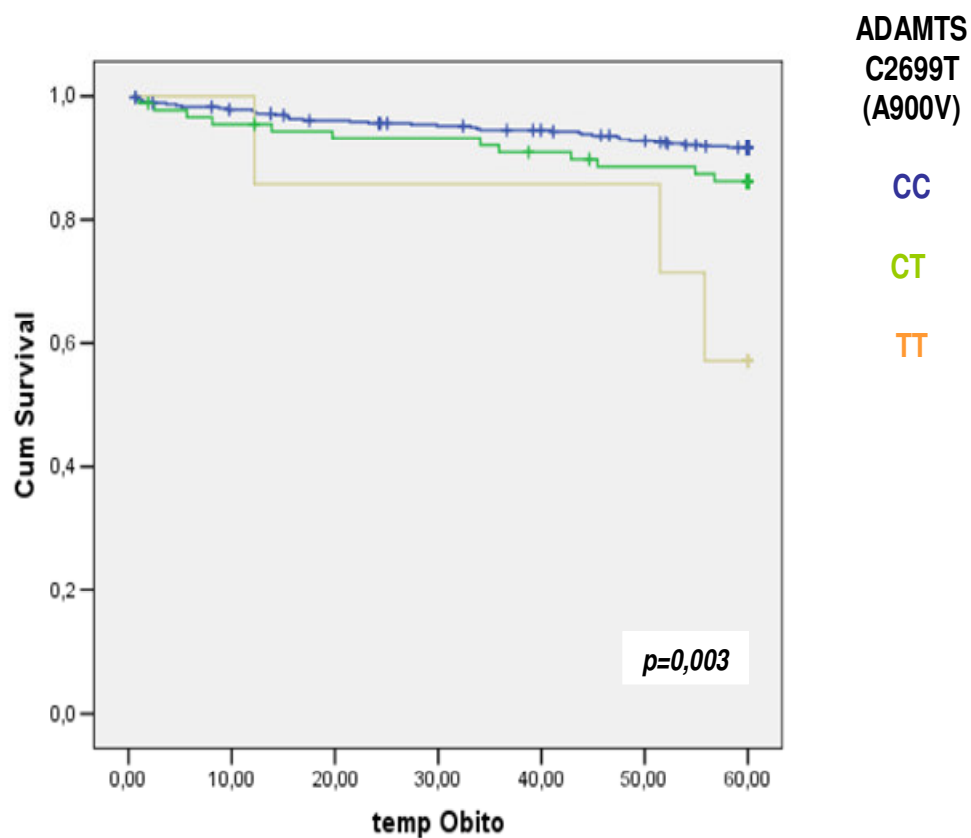
apesar de indicar uma possível tendência do genótipo TT estar associado com uma menor sobrevida (FIGURA 4.10).



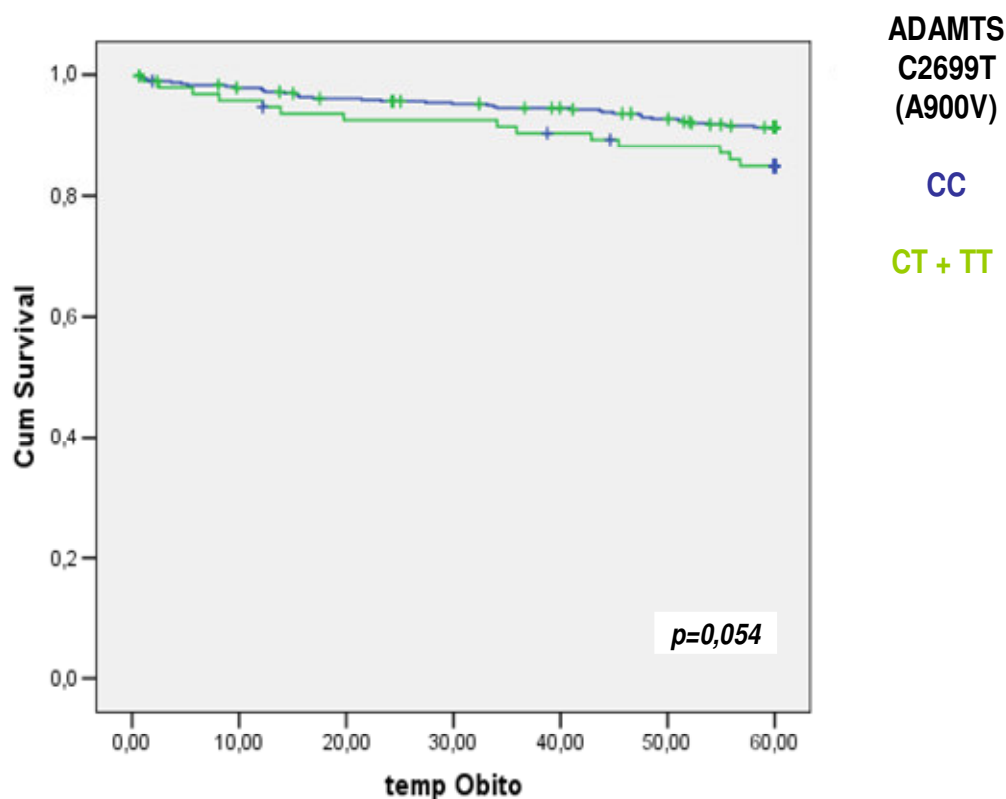
**Figura 4.10:** Curva de sobrevida livre de óbito demonstrando a probabilidade de sobrevida entre os genótipos CC, CT e TT do polimorfismo A900V da ADAMTS13 na população MASS II.

Na análise morte por causa cardiovascular ocorreu significância estatística entre os genótipos TT, CT e CC ( $p=0,003$ ) (FIGURA 4.11). Ao agruparmos os genótipos que possuíam o alelo T, houve uma diminuição da

significância estatística para uma menor probabilidade de sobrevida aos portadores do alelo T ( $p=0,054$ ). (FIGURA 4. 12).



**Figura 4.11:** Curvas de Sobrevida livre de óbito por causa cardiovascular entre os genótipos do polimorfismo A900V da ADAMTS13 na população MASS II.



**Figura 4.12:** Curvas de Sobrevida livre de óbito por causa cardiovascular entre os genótipos CC e CT+TT do polimorfismo A900V da ADAMTS13 na população MASS II.

#### 4.3.5. Análise dos eventos associados com o haplótipos dos polimorfismos C1342G e C1852G.

Na análise da população do projeto MASS II a associação dos haplótipos formados pelos polimorfismos C1342G e C1852G com os eventos morte, morte de causa cardiovascular, infarto agudo do miocárdio, necessidade de novo procedimento (Revascularização do Miocárdio ou Angioplastia) e acidente vascular cerebral ocorridos no período de

seguimento deste ensaio clínico não apresentou valor estatisticamente significativo para nenhum destes eventos. (TABELA 4.11).

Na análise dos haplótipos formado pelos polimorfismos C1342G(Q448E) e C1852G(P618A) da ADAMTS13 nos pacientes do ensaio clínico MASS II, determinou-se as frequências destes haplótipos nos casos e controles para determinado evento e um teste de Qui Quadrado ( $X^2$ ) foi realizado assim como o valor de significância (p).



TABELA 4.11: Análise dos haplótipos formados pelos polimorfismos Q448E e P618A com eventos no projeto MASS II.

Evento	Haplótipo	Freqüência	Freqüência	X <sup>2</sup>	Valor de p
		Casos	Controles		
<i>MORTE</i>	CC	0,283	0,328	1,259	0,2618
	GC	0,251	0,278	0,497	0,481
	GG	0,030	0,043	0,507	0,4766
<i>MORTE CARDIOVASCULAR</i>	CC	0,255	0,329	2,414	0,1202
	GC	0,217	0,280	1,923	0,1655
	GG	0,035	0,042	0,085	0,7707
<i>INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO</i>	CC	0,232	0,329	3,464	0,0627
	GC	0,187	0,282	3,613	0,0573
	GG	0,043	0,041	0,005	0,9462
<i>REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO</i>	CC	0,352	0,319	0,379	0,5381
	GC	0,272	0,275	0,003	0,9571
	GG	0,065	0,039	1,395	0,2376
<i>ANGIOPLASTIA</i>	CC	0,708	0,674	0,625	0,4291
	GC	0,237	0,280	1,036	0,3088
	GG	0,045	0,041	0,044	0,834
<i>ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL</i>	CC	0,706	0,677	0,167	0,6828
	GC	0,249	0,276	0,156	0,693
	GG	0,021	0,042	0,464	0,496

#### **4.3.6. Análise dos eventos associados com as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T(A900V).**

Na análise da população do projeto MASS II, a combinação alélica obtida pelo haplótipo formado pelas variantes 1342C e 1852C e a variante 2699T apresenta uma associação estatisticamente significativo com os eventos morte ( $p= 0,0082$ ) e morte de causa cardiovascular ( $p=0,003$ ). Nesta população, não há uma associação detectada entre as demais combinações alélicas mais freqüentes dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T(A900V) com os eventos morte, morte de causa cardiovascular, infarto agudo do miocárdio, necessidade de novo procedimento (Revascularização do Miocárdio ou Angioplastia) e AVC ocorridos no período de seguimento deste ensaio clínico. (TABELA 4.12).

Em decorrência da significância estatística dos eventos morte e morte por causa cardiovascular associado à combinação alélica CCT dos polimorfismos da ADAMTS13 estudados na população do MASS II para estes eventos foram calculados o valor da Razão de Chances (OR) e o respectivo intervalo de confiança de 95% (95%IC).

A combinação alélica CCT aumentou o risco de morte em 67% em relação ao risco inicial desta população para este evento (OR: 1,67; 95%IC: 1-2,78) e aumentou o risco de morte por causa cardiovascular (infarto agudo do miocárdio) em 100% (OR: 2,085; 95% IC: 1,256 – 3,458) (TABELA 4.13). Estes valores são semelhantes aos obtidos na análise somente com o alelo T (TABELA 4.9).

TABELA 4.12: Associação das combinações alélicas dos polimorfismos Q448E, P618A e A900V com eventos no projeto MASS II.

Evento	Combinação Alélica	Frequência Casos	Frequência Controles	X <sup>2</sup>	Valor de p
<i>MORTE</i>	CCC	0,587	0,602	0,13	0,718
	GCC	0,247	0,272	0,427	0,513
	<b>CCT</b>	<b>0,131</b>	<b>0,069</b>	<b>6,999</b>	<b>0,008</b>
<i>MORTE CARDIOVASCULAR</i>	CCC	0,580	0,602	0,197	0,657
	GCC	0,213	0,274	1,833	0,175
	<b>CCT</b>	<b>0,167</b>	<b>0,069</b>	<b>12,89</b>	<b>0,003</b>
<i>INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO</i>	CCC	0,696	0,592	3,679	0,055
	GCC	0,186	0,275	3,261	0,071
	CCT	0,071	0,079	0,058	0,809
<i>REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO</i>	CCC	0,601	0,586	0,78	0,780
	GCC	0,268	0,274	0,015	0,902
	CCT	0,079	0,061	0,389	0,533
<i>ANGIOPLASTIA</i>	CCC	0,615	0,598	0,132	0,716
	GCC	0,229	0,273	1,121	0,289
	CCT	0,095	0,076	0,576	0,448
<i>ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL</i>	CCC	0,640	0,598	0,31	0,577
	GCC	0,238	0,269	0,211	0,646
	CCT	0,073	0,078	0,017	0,895

**TABELA 4.13:** Análise da combinação alélica CCT dos polimorfismos da ADAMTS13 com os eventos morte e morte cardiovascular no projeto MASS II.

Evento	Combinação Alélica	Casos/ Total	Controles/ Total	Odds Ratio	Intervalo de Confiança
<b>MORTE</b>	CCT	20 (156)	67 (964)	1,675	1,039 – 2,640
<b>MORTE CARDIO- VASCULAR</b>	CCT	18 (106)	69 (1012)	2,085	1,256 – 3,458

#### 4.3.7. Análise da sobrevida livre dos eventos morte e morte de causa cardiovascular para os portadores da combinação alélica C1342, C1852 e T2699.

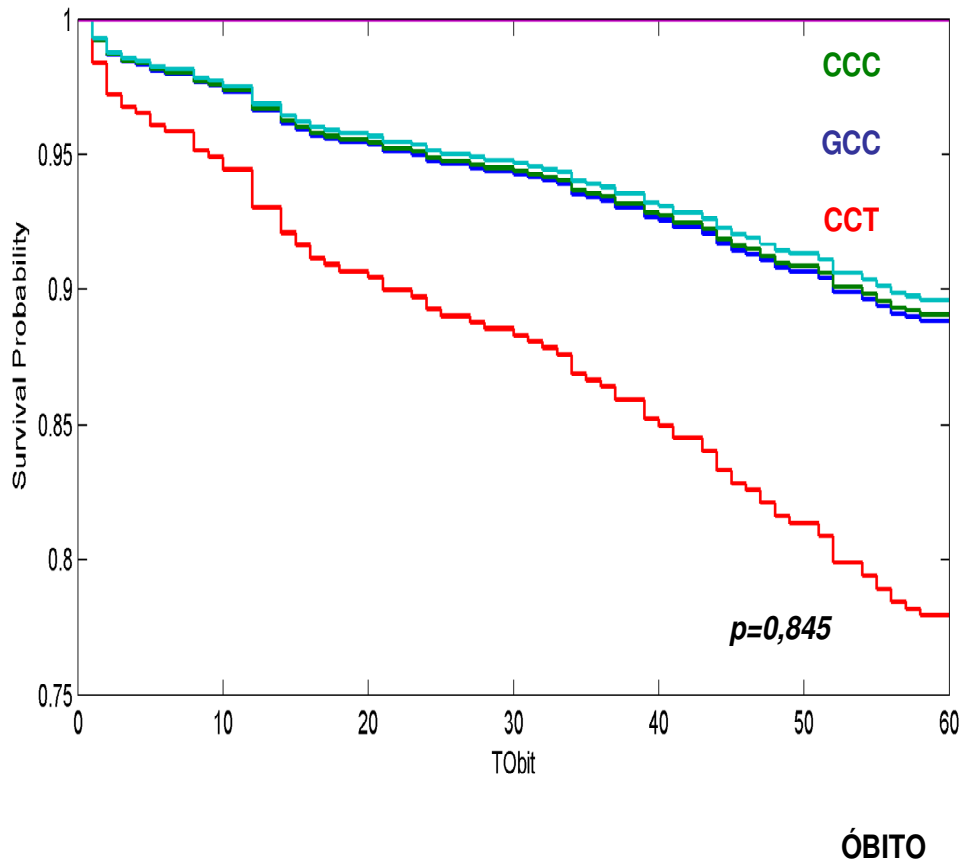
Os pacientes do projeto MASS II que apresentam a combinação alélica CCT constituem 07,1% do total de pacientes deste projeto. A sobrevida livre de morte e morte de causa cardiovascular deste grupo de pacientes com a combinação alélica CCT não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes portadores das demais combinações alélicas da ADAMTS13 freqüentes nesta população ( $p=0,845$  e  $p=0,245$ , respectivamente para morte e morte de causa cardiovascular), (Figura 4.13 e Figura 4.14), (Tabela 4.14).

Ao analisarmos a sobrevida livre de eventos combinados - morte cardiovascular, infarto agudo do miocárdio e necessidade de novo

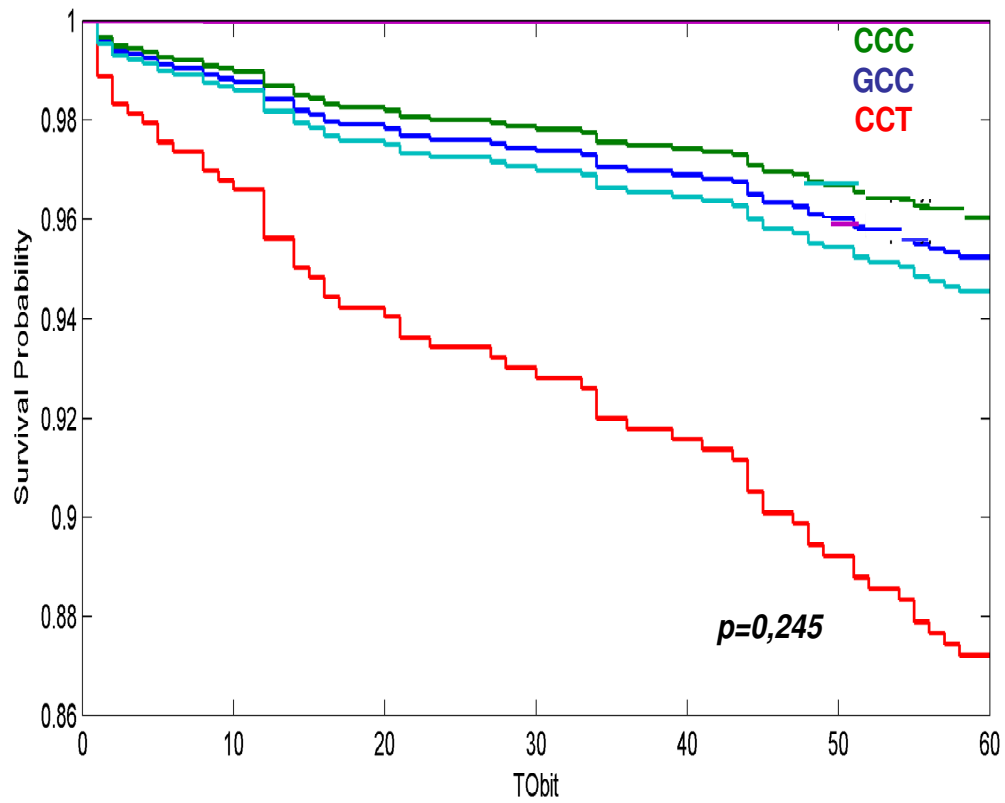
procedimento intervencionista – observamos que a presença da combinação alélica CCT não apresentou diferença estatisticamente significativa da sobrevida livre de eventos combinados das demais combinações alélicas dos polimorfismos da ADAMTS13 estudados na população do projeto MASS II. ( $p=0,857$ ). (Figura 4.15) (Tabela 4.14).

**TABELA 4.14:** Eventos morte, morte de causa cardíaca e eventos associados com a combinação alélica CCT e demais co-variáveis.

Evento	Erro Padrão	Determinação de Riscos (Hazard Ratio)	Intervalo De Confiança	Escore Z	Valor de $p$
<b>Morte</b>	3,811	2,11	0,00 – 36,93	0,20	0,845
<i>sexo</i>	0,760	0,89	0,2 – 3,97	- 0,15	0,8828
<i>diabetes</i>	0,778	0,53	0,12 – 2,45	-0,81	0,4188
<i>Hipertrigliceridemia</i>	0,634	0,60	0,17 – 2,08	-0,80	0,4232
<i>Hipercolesterolemia</i>	0,003	1,00	1,00 – 1,00	-0,06	0,9505
<i>Fumo</i>	0,852	0,70	0,13 – 3,73	-0,41	0,6785
<b>Morte Cardíaca</b>	0,887	2,80	0,49 – 15,94	1,16	0,245
<i>sexo</i>	0,401	1,05	0,46 – 2,40	0,10	0,9166
<i>diabetes</i>	0,401	0,39	0,18 – 0,86	-2,33	0,0197
<i>Hipertrigliceridemia</i>	0,002	1,00	1,00 – 1,00	-0,05	0,9638
<i>Hipercolesterolemia</i>	0,004	1,00	0,99 – 1,01	0,39	0,6952
<i>Fumo</i>	0,341	0,66	0,34 – 1,28	-1,24	0,2149
<b>Combinados</b>	1,620	1,34	0,06 – 32,06	0,18	0,857
<i>sexo</i>	0,190	1,00	0,69 – 1,44	-0,03	0,9790
<i>diabetes</i>	0,217	0,66	0,43 – 1,01	-1,92	0,0551
<i>Hipertrigliceridemia</i>	0,225	1,11	0,71 – 1,73	0,46	0,6428
<i>Hipercolesterolemia</i>	0,002	1,00	1,00 – 1,01	0,37	0,7166
<i>Fumo</i>	0,199	0,82	0,55 – 1,20	-1,03	0,3053

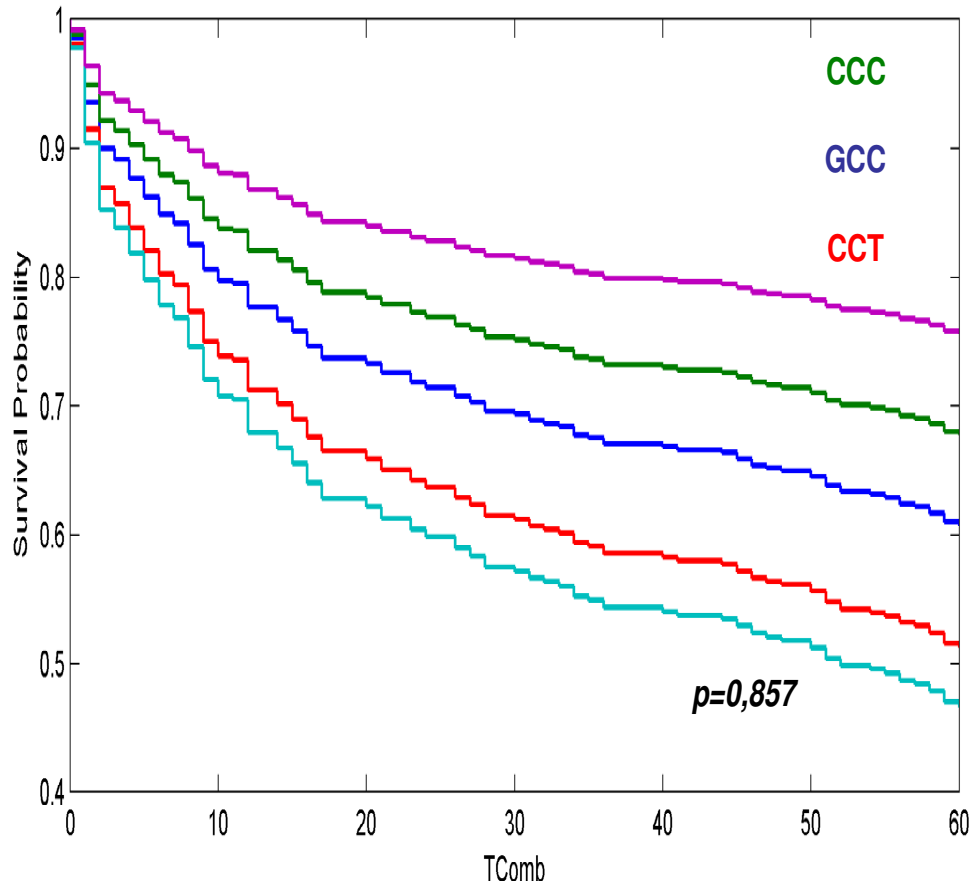


**Figura 4.13** Curva de sobrevida livre de morte para as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.



### ÓBITO CARDIOVASCULAR

**Figura 4.14** Curva de sobrevida livre de morte por causa cardiovascular para as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.



**EVENTOS COMBINADOS**

Figura 4.15 Curva de sobrevida livre de eventos combinados para as combinações alélicas dos polimorfismos C1342G, C1852G e C2699T.



#### **4.3.8. Resumo dos resultados dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) na população MASS II**

A análise dos C1342G(Q448E), C1852G(P618A), C2699T(A900V) na população do projeto MASS II apresentou os seguintes resultados relevantes:

- A frequência dos polimorfismos na população estudada mostrou-se semelhante à da em outras populações, principalmente caucasiana.
- Os polimorfismos C1342G e C1852G estão em desequilíbrio de ligação e constituem um haplótipo no gene da ADAMTS13.
- Ocorreu associação entre o alelo T do polimorfismo C2699T e o risco de morte e morte por causa cardiovascular e a razão de chances desta associação mostrou um aumento do risco em 67% para o evento morte e em 123% para o evento morte por causa cardiovascular.
- Na análise com as covariáveis, o alelo T2699 manteve sua associação para morte de causa cardiovascular, porém a idade e o diabetes melito também estão associados com este evento na presença deste alelo.
- A análise da sobrevida livre de morte por causa cardiovascular dos genótipos CC, CT e TT do polimorfismo C2699T apresentou uma probabilidade de sobrevida livre deste evento menor para os pacientes que possuíam o genótipo TT ( $p=0,03$ ). Apesar de não haver uma diferença estatisticamente significativa na sobrevida livre de óbito e óbito de causa cardiovascular para os portadores do alelo T, os valores de significância obtidos sugerem uma possível tendência na diminuição da sobrevida destes pacientes ( $p=0,054$ ).

- Os haplótipos formados pela combinação dos polimorfismos C1342G e C1852G não estão associados com os eventos morte, morte de causa cardiovascular, necessidade de intervenção coronariana e acidente vascular cerebral.
- A combinação alélica CCT obtida das variantes C1342, C1852 e T2699, apresenta uma associação estatisticamente significativa para os eventos morte e morte por causa cardiovascular, refletindo a presença do alelo T; esta associação, porém, não apresentou uma associação com estes eventos quando analisado com as co-variáveis desta população e não influenciou na sobrevida livre para os eventos estudados.



### **5.1 Considerações gerais**

A doença arterial coronariana é uma doença complexa onde múltiplos genes interagem com diversos fatores ambientais e diferentes manifestações clínicas como o infarto agudo do miocárdio ou a angina estável crônica são verificadas<sup>66</sup>. A caracterização genética e molecular da doença arterial coronariana se aprimora para a identificação de possíveis genes e proteínas que estariam direta ou indiretamente envolvidos nesta doença e os objetivos da incorporação da tecnologia genômica são múltiplos: identificação de indivíduos ou famílias com maior risco de desenvolverem esta doença, desenvolvimento de novos tratamentos e adequação de protocolos com o uso adequado de medicamentos específicos<sup>67</sup>.

Na identificação de indivíduos com doença coronariana que apresentam marcadores genéticos que diminuem ou aumentam o risco para eventos adversos, estudos de associação envolvendo genes selecionados ou plataformas com milhares de genes, a caracterização fenotípica dos

pacientes permite adequar o contexto destes genes em manifestações clínicas específicas, como na doença arterial coronariana crônica estável<sup>12, 17, 68</sup>.

O manuseio da doença coronariana estável ainda é uma área controversa e apesar da mortalidade nesta doença equiparar-se entre os diversos tratamentos disponíveis<sup>27</sup>, não há um consenso entre médicos sobre a morbidade associada e maiores informações são necessárias provenientes de ensaios clínicos para uma clara definição terapêutica<sup>69, 70</sup>.

O ensaio clínico realizado pelo projeto MASS II caracterizou-se pela coesão de dados relacionados ao pacientes com doença coronariana crônica estável.

O resultado do projeto MASS II, assim como outros realizados posteriormente, sobre a mortalidade, não apresentando diferença entre os pacientes que foram submetidos ao tratamento clínico, à angioplastia ou à cirurgia de revascularização, implica no questionamento de quais fatores de risco estariam envolvidos na mortalidade e na morbidade destes pacientes, visto neste grupo de 611 pacientes haver ocorrido um percentual significativo de morte – 92 pacientes (15%) – e morte por causa cardiovascular – 65 pacientes (10,6%). A idade pode ser sugerido como um destes fatores de risco para mortalidade, pois 33 pacientes que faleceram entraram no estudo acima de 65 anos. Os demais fatores, porém, não apresentaram evidências de risco.

Neste contexto, a avaliação de marcadores de risco envolvendo variantes genéticas trombogênicas tornou-se objeto do estudo desta tese.

Nesta discussão abordaremos os resultados obtidos com a análise das variantes do receptor plaquetário P2Y<sub>12</sub> e da metaloprotease ADAMTS13 em pacientes com doença coronariana crônica estável em tópicos distintos.

## **5.2. Haplótipos H1 e H2 do receptor plaquetário P2Y<sub>12</sub> na população do projeto MASS II**

Na ativação plaquetária, o receptor P2Y<sub>12</sub> atua no recrutamento de outras plaquetas ao local da lesão após sua adesão ao fator de von Willebrand e ao colágeno e no aumento da ativação plaquetária por outros agonistas como a trombina e o tromboxano A<sub>2</sub> <sup>71</sup>.

A ação do receptor P2Y<sub>12</sub> no processo de agregação plaquetária ocorre após sua ligação à proteína Gi, quando este complexo possibilita a amplificação e agregação induzida pelo ADP e outros agonistas <sup>71, 72, 73</sup>.

A importância deste receptor (alvo das tienopiridinas, amplamente utilizadas na prática da cardiologia <sup>74, 75, 76</sup>), deve ser considerada mediante a relevância clínica da variabilidade interindividual para este receptor como observado nos trabalhos de Fontana e col. <sup>40</sup>.

A associação entre os polimorfismos do receptor P2Y<sub>12</sub> e a doença arterial periférica descrito por este pesquisador realçou o interesse em avaliar estes polimorfismos como moduladores de risco de eventos nas doenças cardiovasculares.

Vários estudos avaliaram o papel dos polimorfismos plaquetários em modular a incidência de eventos cardiovasculares em pacientes com doença arterial trombotica e doença coronariana multiarterial<sup>21, 22, 23, 77</sup>.

Nesta tese os resultados obtidos da análise dos haplótipos H1 e H2 do receptor plaquetário P2Y12 em pacientes com doença arterial coronariana estável não demonstraram evidências para uma associação entre estes haplótipos e eventos adversos.

A ausência de evidência da associação genética no nosso estudo, em aparente contraste com os estudos previamente relatados onde a associação do haplótipo H2 ocorreu com doença arterial periférica, deve ser interpretada com as seguintes considerações:

- O desenho do nosso estudo foi criado para responder a questão específica se este marcador genético poderia prever eventos cardiovasculares em uma população com doença arterial coronariana. Neste sentido é de suma importância o grupo de pacientes do projeto MASS II apresentar doença arterial coronariana multiarterial, pois as características clínicas deste grupo o tornam coeso para análises de marcadores genéticos.

- Os processos biológicos que acarretam em doença arterial coronariana e doença arterial periférica são ambos relacionados à aterogênese e trombogênese, onde as plaquetas desempenham um papel fundamental, porém características locais e epidemiológicas são distintas entre estas doenças<sup>78</sup>.

Embora nossa análise não possa excluir um efeito marginal do haplótipo H1/H2 em modular o risco dos eventos cardiovasculares nesta

população, nosso estudo apresenta poder estatístico suficiente para afastar uma forte associação entre este marcador genético e eventos cardiovasculares na nossa população.

Uma ressalva quanto ao nosso estudo é o poder de detecção específico do risco em pacientes com o haplótipo H2/H2, podendo este grupo apresentar um maior risco para eventos cardiovasculares.

O fato de pacientes com o haplótipo H2 possuírem maiores níveis de triglicérides também não foi descrito e pode ser explorado em estudos futuros.

Este trabalho foi o primeiro a explorar o papel dos haplótipos H1 e H2 do receptor P2Y<sub>12</sub> e incidência de eventos cardiovasculares em uma população com doença arterial coronariana multiarterial <sup>79</sup>.

Recentemente, um estudo tipo caso-controle utilizando uma abordagem idêntica à descrita nesta tese, explorou a presença dos haplótipos H1 e H2 em pacientes com doença arterial coronariana detectada ao exame de coronariografia por cateterização e demonstrou uma associação positiva entre a presença do haplótipo H2 e CAD ( $p = 0.03$ , OR = 1.36, 95%CI = 1.02-1.82) <sup>80</sup>.

A disparidade entre os resultados decorre de diferenças quanto ao desenho do estudo e ao tipo de população estudada. A associação entre CAD e H2 necessita ser confirmada posteriormente em novos estudos com outros grupos populacionais.



Nossos resultados não fornecem evidências de uma associação entre estes marcadores genéticos e um aumento do risco de eventos cardiovasculares adversos nesta população.

Apesar dos nossos resultados e de outros publicados explorando a variabilidade genotípica do receptor plaquetário P2Y<sub>12</sub> e o uso de tienopiridinas<sup>81, 82</sup> não demonstrarem papel significativo da presença da variante genética H2 deste receptor, dada sua importância em pacientes com doença coronariana, estudos envolvendo estas variantes genéticas podem ainda ser realizados ao considerarmos a doença coronariana no contexto de uma doença complexa com várias interações genéticas e ambientais.

### **5.3. Polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T(A900V) da ADAMTS13 na população do projeto MASS II.**

A exposição do colágeno da região do subendotélio desencadeia a formação de pontes entre esta região e as plaquetas através do fator de von Willebrand, desencadeando o início do processo hemostático e desempenhando um papel imprescindível na formação do tampão hemostático plaquetário<sup>83</sup>.

O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica formada por uma série de multímeros com peso molecular entre 500 a 20000 kDa, apresentando subunidades polipeptídicas de aproximadamente 250 kDa ligados por pontes dissulfídicas. As células endoteliais sintetizam estes

grandes polímeros multiméricos do fator von Willebrand e os fragmentos menores de 140 – 170 kDa são liberados após a clivagem proteolítica da ligação entre os aminoácidos tirosina e metionina na posição 842-843 da glicoproteína multimérica liberada pelo endotélio. Na hemostasia, somente os polímeros de alto peso molecular liberados pelo endotélio são funcionais e fazem sua ligação com os receptores plaquetários GP Ib-IX, permitindo o alinhamento das plaquetas ao longo da sua dimensão, enquanto os produtos da clivagem são inativos nesta função e são liberados no plasma <sup>46, 47, 83</sup>.

A modulação do tamanho multimérico do polímero é realizada pela metaloprotease ADAMTS13, que cliva este polímero no seu domínio A2, reduzindo a resposta hemostática da formação do tampão plaquetário <sup>84, 85, 86</sup>. A deficiência desta metaloprotease aumenta a agregação plaquetária induzida pelo fator de von Willebrand <sup>44, 87, 88</sup>.

O trombo formado pela deficiência de ADAMTS13 é constituído pelo próprio fator de von Willebrand, plaquetas e pouca fibrina<sup>44</sup> e é a principal causa inerente às manifestações clínicas associadas à esta deficiência. Este achado histológico também foi observado em trombos obtidos na aspiração intra-coronariana de pacientes infartados <sup>45</sup>.

A relevância do fator de von Willebrand neste contexto foi explorada em estudos de associação como um fator de risco para doença isquêmica cardíaca <sup>89, 90</sup>, onde encontrou-se uma associação positiva entre seus valores e o risco de eventos, porém havia diferenças metodológicas e do momento da coleta nestes estudos. Há também a falta de dados publicados com a reprodutibilidade desta associação na doença coronariana.

Estudos genéticos de polimorfismos do fator de von Willebrand não encontraram associação entre estes polimorfismos e aumento do risco para infarto do miocárdio <sup>91</sup>.

Recentemente, a metaloprotease ADAMTS13 foi investigada através da sua dosagem enzimática por ensaio tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) como possível fator de risco que aumentaria a susceptibilidade aos eventos cardiovasculares em dois estudos clínicos.

No estudo de Kaikita e colaboradores <sup>59</sup> a metaloprotease ADAMTS 13 foi analisada em pacientes com infarto agudo do miocárdio e valores abaixo do normal foram encontrados em pacientes recém-infartados.

Em contraste com este achado, no estudo recém-publicado de Chan e colaboradores <sup>60</sup> com 560 pacientes, esta enzima foi avaliada após 06 meses do episódio do primeiro infarto encontrando-se um aumento do risco para infarto agudo do miocárdio (OR: 1,5 96% CI: 1.06 – 2,12) associado ao aumento desta enzima.

As razões para esta discrepância de resultados podem estar em questões metodológicas – principalmente o momento da coleta da enzima - e nas possíveis alterações do fator de von Willebrand e da ADAMTS13 em pacientes coronarianos , como demonstrado pelo estudo de HE e colaboradores<sup>92</sup> ao verificar que o aumento dos níveis do fator de von Willebrand em pacientes coronarianos crônicos não está associado à diminuição da ADAMTS13, correlacionando-se o fvW somente com a idade.

Neste contexto, apesar da associação da ADAMTS13 com CAD, as respostas às contradições encontradas nos ensaios clínicos podem ser

aprimoradas com a análise das variantes genéticas funcionais da ADAMTS13 e sua correlação com eventos adversos<sup>57, 93</sup>.

Nos estudos de Plaimauer e col.<sup>57</sup> que serviram de orientação para a seleção de 02 variantes genéticas da ADAMTS13 nesta tese, estas variantes polimórficas em seu conjunto de combinações no experimento clonal influenciaram a diminuição da produção ou a atividade da enzima ou recuperaram a atividade previamente diminuída conforme o conjunto de variantes avaliado. Assim, a variabilidade de expressão dos polimorfismos genéticos, suas combinações alélicas e seus haplótipos acarretariam na diminuição ou aumento da expressão ou da atividade enzimática que propiciam à protease ADAMTS13 exercer seu papel biológico de controlar a formação de um trombo.

Estudos genéticos da ADAMTS13 foram publicados somente para avaliar a susceptibilidade ao sangramento em pacientes apresentando doença de von Willebrand<sup>46</sup> e estudos semelhantes desta metaloprotease ainda não foram realizados em pacientes com doença coronariana.

Nesta tese, os polimorfismos da ADAMTS 13 foram selecionados baseados em estudos funcionais e na distribuição populacional dos diferentes polimorfismos já descritos. As variantes selecionadas apresentam distribuição em populações caucasianas, negróides e asiáticas, conforme observado nos estudos publicados ou nos dados obtidos do HapMap<sup>94</sup>. A variante C1342G(Q448E) apresenta uma frequência elevada em todas as populações estudadas enquanto os demais polimorfismos C1852G(P618A), C2699T(A900V) apresentam uma distribuição semelhante à encontrada na

pesquisa desenvolvida nesta tese (frequência do menor alelo de 4,7% para as variante G1852 e 9,2% para as variante T2699).

As variantes C1342G(Q448E) e C1852G(P618A) já foram caracterizadas funcionalmente e apresentam, respectivamente, um efeito biológico nulo quanto à expressão ou atividade da enzima (C1342G(Q448E)) ou um efeito negativo, diminuindo a expressão e a atividade da enzima (C1852G(P618A)). O efeito deste último polimorfismo, porém é revertido quando ele está associado com a variante C1342G(Q448E).

Neste estudo, a população do projeto MASS apresentava estes dois polimorfismos em desequilíbrio de ligação, o que não havia sido relatado na literatura. Este desequilíbrio de ligação implica na formação de um haplótipo que sugere a ausência de associação com os eventos cardiovasculares e morte, pois mesmo que a presença da variante G do polimorfismo C1852G(P618A) tenha ocorrido em 5% da população, os seus efeitos funcionais negativos poderiam ser inócuos pela presença da variante C do polimorfismo C1342G(Q448E) recuperar a atividade da enzima.

Estes dados podem explicar os resultados obtidos nesta tese quanto à avaliação destes polimorfismos e a ausência de associação com os eventos morte, infarto agudo do miocárdio, necessidade de novo procedimento de intervenção coronariana e acidente vascular cerebral.

A mesma explicação pode ser dada na avaliação das combinações haplotípicas destes polimorfismos onde não encontramos evidência de risco para os eventos os eventos adversos estudados.

Em relação ao polimorfismo C2699T(A900V) da ADAMTS13 estudado nesta tese o único ensaio funcional descrito na literatura apresenta a variante T2699 como implicada na diminuição da atividade clivadora do fator de von Willebrand da ADAMTS13 quando realizado estudo funcional in vitro com células HEK293 e método de ligação ao colágeno do substrato da enzima<sup>58</sup>.

Na nossa amostra, o alelo T2699 estava presente em 9,2% dos pacientes com coronariopatia crônica e não encontrava-se em desequilíbrio de ligação com os demais polimorfismos.

Na análise da presença deste alelo associado com os eventos em estudo no projeto MASS II, encontramos uma associação positiva entre a presença do alelo T e morte. A razão de chances observado apresenta um aumento de risco significativo de 67% para o evento morte (OR: 1,67 95%CI: 1,0 - 2,78) e de 123% (OR: 2,23, 95%CI: 1,2 - 3,94) para morte por causa cardiovascular. A morte por causa cardiovascular neste grupo de pacientes é aquela proveniente diretamente de infarto agudo do miocárdio fatal.

Apesar da ausência de diferença para estes eventos conforme o tipo de tratamento escolhido, a idade pode ser um fator preditivo significativo ao considerarmos o projeto MASS II e a associação com o alelo T2699 nos eventos morte e morte de causa cardiovascular com esta covariável seria esperada neste grupo de pacientes. Estudos prévios sugerem um aumento nos níveis do fator de von Willebrand em pessoas com doença coronariana conforme a idade, e os resultados desta tese podem corroborar a presença da variante 2699T com esta situação de risco, ou indicar um possível viés.

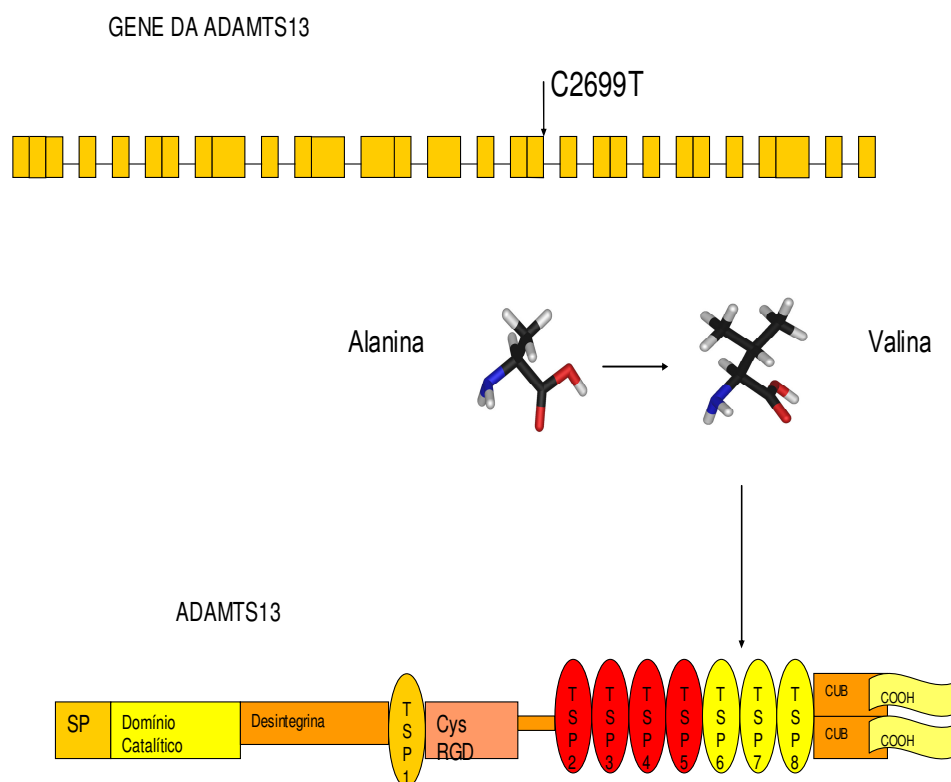
O diabetes melito no projeto MASS II <sup>28</sup> não esteve associado com maior mortalidade e este resultado no ajuste de co-variáveis para os pacientes que apresentavam o alelo T motivo de investigação a ser explorada. Não há associação descrita entre a ADAMTS13 e diabetes melito.

Embora a ADAMTS13 apresente especificidade somente para o fator de von Willebrand e aumenta o risco de trombozes quando alterada <sup>44</sup>, considerar suas variantes genéticas simplesmente como um marcador de risco, sem conexão biológica, pode ser plausível; também a possibilidade de haver vieses de confundimento com proteínas ou características clínicas que não foram analisadas nesta tese deve ser levada em consideração.

A variante C2699 esteve associada com um maior valor de colesterol quando comparada com a variante T2699. Na literatura, não há relato de associação semelhante e caso novos dados não demonstrarem conexão biológica, pode ser considerada casual. A covariável colesterol não apresentou influência na associação entre o alelo 2699T e os eventos morte e morte de causa cardiovascular

A mutação deste polimorfismo, com a troca de citosina por timina, acarreta na troca do aminoácido alanina por valina na posição 900 da proteína (Figura 5.1). A valina é um aminoácido hidrofóbico, enquanto a alanina apresenta um índice hidropático menor. O sítio afetado com esta mutação é o domínio trombospondina que não exerce a principal função catalítica da enzima (o principal domínio responsável por esta função *in vitro* é o domínio rico em cisteína da proteína), porém este domínio, por analogia

com os demais domínios trombospondinas da família ADAMTS, está implicado no acoplamento desta proteína ao endotélio<sup>95</sup>. A ADAMTS13 não possui, até o momento, estrutura cristalográfica descrita que permita a realização de análises desta mutação nas funções biológicas desta enzima.



**Figura 5.1.** Representação da mudança de aminoácidos pela presença do polimorfismo C2699T.

Como há a possibilidade de não encontrarmos plausibilidade biológica para esta associação, sua presença não pode ser descartada



como um marcador de risco nesta população para o evento morte por causa cardiovascular, podendo ser explorado como tal ou indicar novos estudos exploratórios gênicos para definir genes associados herdados concomitantemente.

A análise por genótipos apresenta um menor poder estatístico se comparado à análise por alelos, pois ocorre uma diminuição à metade das variáveis em estudo. Neste sentido, a avaliação dos genótipos deste polimorfismo não demonstrou evidência de risco para o evento morte, mas a presença do genótipo TT mostrou-se significativamente associada a uma diminuição do tempo de sobrevida dos pacientes que morreram de causa cardiovascular ( $p=0,003$ ), mantendo esta tendência ao considerarmos os pacientes portadores do alelo T (TT e CT,  $p=0,054$ ), necessitando porém da reprodutibilidade destes dados em um número maior de pacientes.

Na análise dos haplótipos e das combinações alélicas dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T (A900V) da ADAMTS13 não evidenciou a associação com os eventos estudados, exceto para a combinação alélica CCT com os eventos morte (OR: 1,6. 95%CI 1,03-2,64) e morte por causa cardiovascular. (OR: 2,08. 95%CI: 1,25 – 3,45). Na análise usando um modelo de risco proporcional de Cox esta associação não manteve sua significância estatística. Esta combinação alélica também não mostrou diferença significativa na sobrevida livre dos eventos estudados nesta tese em relação às demais combinações alélicas. A diferença entre estes resultados pode dever-se aos métodos de análise empregados. Inicialmente estes dados sugerem o alelo T como potencialmente associado

a eventos, devendo-se considerar também que a frequência do alelo T encontrada nesta população é de 9,2% e a frequência da combinação CCT é de 7,1%, podendo indicar a necessidade de um maior número de pacientes coronarianos com a combinação CCT para uma nova análise da sobrevida livre de morte.

#### **5.4 Considerações Finais**

Apesar das evidências obtidas de estudos com famílias e gêmeos quanto ao componente genético hereditário como fator de risco para doenças cardíacas coronarianas e dos numerosos genes descritos em diferentes estudos casos-controles, poucos genes foram caracterizados como fatores de risco se considerarmos a falta de reprodutibilidade e o viés de publicação para associações positivas<sup>20</sup>.

Neste sentido, os dados apresentados nesta tese indicam que os resultados dos haplótipos H1 e H2 em pacientes coronarianos não implicam na sua utilização no manejo clínico de pacientes coronarianos em relação a eventos adversos. Dada a importância do receptor P2Y12 e seu amplo uso clínico, as informações aqui geradas ainda poderão ser aprimoradas, por exemplo, no uso das tienopiridinas ou novos medicamentos direcionados a este receptor.

Em relação a ADAMTS13, a presença da variante T2699 (Val900) associada ao risco de morte e morte cardiovascular em pacientes

coronarianos deverá ser corroborada com a sua reprodutibilidade em outros estudos.

Mediante a complexidade do manejo clínico da DAC, estas informações genéticas de susceptibilidade aos eventos poderão ser incorporadas junto aos fatores ambientais na criação de algoritmos de risco clínico que visam o aprimoramento do tratamento dos pacientes coronarianos.



Os dados apresentados nesta tese permitem-nos concluir que no estudo dos haplótipos H1 e H2 do receptor plaquetário P2Y12 e dos polimorfismos C1342G(Q448E), C1852G(P618A) e C2699T(A900V) da metaloprotease ADAMTS13 dos pacientes com doença coronariana crônica estável do projeto MASS II não se encontra diferença entre estas variantes genéticas e os eventos estudados, exceto para a variante T2699 (V900) que está associada com o evento morte e morte por causa cardiovascular, com o aumento do risco para estes eventos e uma diminuição na sobrevida livre de morte por causa cardíaca para os portadores do genótipo TT relacionado à este polimorfismo. A análise dos haplótipos e das combinações alélicas destes polimorfismos não apresenta associação com os eventos e não interfere na sobrevida livre dos eventos nestes pacientes, apesar da presença do alelo T na combinação CCT indicar uma possível associação com o evento morte de causa cardiovascular.

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MATHERS CD, LONCAR D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 2006;3(11):e442.

2-[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=24421](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421).  
(último acesso em 02 de janeiro de 2008).

3 – DATASUS/ Min. Saúde/2004.

4- WILSON PW, D'AGOSTINO RB, LEVY D, BELANGER AM, SILBERSHATZ H, KANNEL WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 1998;97:1837-47.

5- UNAL B, CRITCHLEY JA, CAPEWELL S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. Circulation 2004;109:1101-7.

6- LLOYD-JONES DM, WILSON PW, LARSON MG, ET AL. Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. Am J Cardiol 2004; 94:20-4.

7- BEAGLEHOLE R, MAGNUS P. The search for new risk factors for coronary heart disease: occupational therapy for epidemiologists? Int J Epidemiol 2002; 31:1117-1122.

- 8- NAGHAVI M, LIBBY P, FALK E, ET AL. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003; 108:1664-72.
- 9- NAGHAVI M, LIBBY P, FALK E, ET AL. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003; 108:1772-8.
- 10- CLAYTON D, MCKEIGUE PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet*. 2001;358:1356-1360.
- 11 MERIKANGAS KR, LOW NC, HARDY J. Understanding sources of complexity in chronic diseases--the importance of integration of genetics and epidemiology. *Int J Epidemiol* 2006; 35:590-592.
- 12- WATKINS H, FARRALL M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet*. 2006 ; 7:163-173.
- 13- LLOYD-JONES DM, NAM BH, D'AGOSTINO RB SR E COL. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA*. 2004; 291:2204-2211.



14- ASSMANN G, CULLEN P, SCHULTE H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. Eur Heart J 1998;19 Suppl A:A2-11.

15- LANAS F, AVEZUM A, BAUTISTA LE, DIAZ R, LUNA M, ISLAM S, YUSUF S. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the Interheart Latin American study. Circulation. 2007; 115: 1067-74.

16- MARENBERG ME, RISCH N, BERKMAN LF, FLODERUS B, DE FAIRE U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. N Engl J Med. 1994 ; 330: 1041-6.

17- TOPOL EJ, SMITH J, PLOW EF, WANG QK. Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease. Hum Mol Genet. 2006;15: 117-123.

18- YE YE Z, LIU EH, HIGGINS JP, KEAVNEY BD, LOWE GD, COLLINS R, DANESH J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. Lancet. 2006; 367: 651-658.

19- BOEKHOLDT SM, BIJSTERVELD NR, MOONS AH, LEVI M, BULLER HR, PETERS RJ. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins

and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation*. 2001;104: 3063-8.

20- MORGAN TM, KRUMHOLZ HM, LIFTON RP, SPERTUS JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA*. 2007; 297: 1551-61.

21 - LOPES NH, PEREIRA AC, HUEB W, SOARES PR, LANZ JR, GERSH BJ, DE OLIVEIRA S, CESAR LA, RAMIRES JF, KRIEGER JE. Effect of glycoprotein IIIa PIA2 polymorphism on outcome of patients with stable coronary artery disease and effect of smoking. *Am J Cardiol*. 2004 ; 93: 1469-1472.

22- BRAY PF, HOWARD TD, VITTINGHOFF E, SANE DC, HERRINGTON DM. Effect of genetic variations in platelet glycoproteins Ibalpha and VI on the risk for coronary heart disease events in postmenopausal women taking hormone therapy. *Blood*. 2007; 109: 1862-1869.

23. ARNETT DK, BAIRD AE, BARKLEY RA, ET AL. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007;115: 2878-2901.

24- FREEMAN AM, ABBOTT JD, JACOBS AK, ET AL. Marked improvements in outcomes of contemporary percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus. *J Interv Cardiol* 2006;19: 475-482.

25- CLELAND JG, COLETTA AP, CLARK AL. Clinical trials update from the American College of Cardiology 2007: ALPHA, EVEREST, FUSION II, VALIDD, PARR-2, REMODEL, SPICE, COURAGE, COACH, REMADHE, pro-BNP for the evaluation of dyspnoea and THIS-diet. *Eur J Heart Fail* 2007;9: 740-745.

26- SRINIVAS VS, BROOKS MM, DETRE KM, ET AL. Contemporary percutaneous coronary intervention versus balloon angioplasty for multivessel coronary artery disease: a comparison of the National Heart, Lung and Blood Institute Dynamic Registry and the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) study. *Circulation* 2002;106: 1627-1633.

27- KING, S. B., 3RD, Five-year follow-up of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS-II): prologue to COURAGE. *Circulation*, 2007; 115: 1064-1066.

28- Hueb W, Lopes NH, Gersh BJ, et al. Five-year follow-up of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS II): a randomized controlled clinical trial

of 3 therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease. *Circulation* 2007;115: 1082-1089.

29- FORD ES, AJANI UA, CROFT JB, ET AL. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med* 2007;356: 2388-298.

30- CRITCHLEY, J.LIU, J.ZHAO, D.WEI, W.CAPEWELL, S. Explaining the increase in coronary heart disease mortality in Beijing between 1984 and 1999. *Circulation* 2004; 110: 1236-44.

31- LOTUFO PA, Why Brazil does not have an epidemic of chronic diseases: some answers from cardiovascular diseases. *Sao Paulo Med J* 2005, 123: 47-48.

32- YEE DL, BRAY PF. Clinical and functional consequences of platelet membrane glycoprotein polymorphisms. *Semin Thromb Hemost.* 2004 ;30: 591-600.

33- DORSAM RT, KUNAPULI SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest.* 2004 ;113: 340-345.

- 34- LEON C, HECHLER B, VIAL C, LERAY C, CAZENAVE JP, GACHET C. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.* 1997;403: 26-30.
- 35- HOLLOPETER G, JANTZEN HM, VINCENT D, ET AL. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202-207.
- 36- ANDRE P, DELANEY SM, LAROCCA T, ET AL. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003;112 :398-406.
- 37- LEON C, ALEX M, KLOCKE A, ET AL. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood* 2004;103: 594-600.
- 38- PATRONO C, COLLIER B, FITZGERALD GA, HIRSH J, ROTH G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126: 234S-264S.
- 39- SAVI P, ZACHAYUS JL, DELESQUE-TOUCHARD N, ET AL. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 11069-11074.

- 40- FONTANA P, DUPONT A, GANDRILLE S, ET AL. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003;108: 989-995.
- 41- FONTANA P, GAUSSEM P, AIACH M, FIESSINGER JN, EMMERICH J, RENY JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation* 2003;108: 2971-2973.
- 42- SAVI P, HERBERT JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 174-183.
- 43- MOAKE JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002;347(8):589-600.
- 44- CHAUHAN AK, MOTTO DG, LAMB CB, ET al. Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13. *J Exp Med* 2006;203: 767-776.
- 45- HOSHIBA, Y, HATAKEYAMA, K, TANABE, T. Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost*, 2006, 4: 114-120.

46- BOWEN DJ, COLLINS PW. Insights into von Willebrand factor proteolysis: clinical implications. *Br J Haematol* 2006;133: 457-467.

47- SIEDLECKI, C. A. LESTINI, B. J. KOTTKE-MARCHANT, K. K. EPPELL, S. J. WILSON, D. L. MARCHANT, R. E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996; 88: 2939-2950.

48- LEVY GG, NICHOLS WC, LIAN EC, ET AL. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001;413: 488-494.

49- FUJIKAWA K, SUZUKI H, MCMULLEN B, CHUNG D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 2001;98: 1662-1666.

50- PLAIMAUER B, ZIMMERMANN K, VOLKEL D, ET AL. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 2002;100: 3626-3632.

51- KOKAME K, MIYATA T. Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2004;41: 34-40.

52- ZHENG X, CHUNG D, TAKAYAMA TK, MAJERUS EM, SADLER JE,

FUJIKAWA K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001;276: 41059-41063.

53- ZANARDELLI S, CRAWLEY JT, CHION CK, LAM JK, PRESTON RJ, LANE DA. ADAMTS13 substrate recognition of von Willebrand factor A2 domain. *J Biol Chem* 2006;281: 1555-1563.

54- PLAIMAUER B, SCHEIFLINGER F. Expression and characterization of recombinant human ADAMTS-13. *Semin Hematol* 2004;41: 24-33.

55- KOKAME K, MATSUMOTO M, SOEJIMA K, ET AL. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 11902-11907.

56- DONADELLI R, BANTERLA F, GALBUSERA M, ET AL. In-vitro and in-vivo consequences of mutations in the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 2006;96:454-464.

57- PLAIMAUER B, FUHRMANN J, MOHR G, SHEIFLINGER F et al. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. *Blood*



2006;107: 118-25.

58- PEYVANDI F, LAVORETANO S, CANCIANI M, MANUCCI PM. Modulation of the von Willebrand Factor Cleaving Protease (ADAMTS-13) activity by polymorphisms in the ADAMTS-13 gene. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; 1 supplement 1 july. Abstract number P0325.

59- KAIKITA, K. SOEJIMA, K. MATSUKAWA, M. NAKAGAKI, T. OGAWA, H. Reduced von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in acute myocardial infarction. J Thromb Haemost, 2006; 4: 2490-3.

60- CHION CK, DOGGEN CJ, CRAWLEY JT, LANE DA, ROSENDAAL FR. ADAMTS13 and von Willebrand factor and the risk of myocardial infarction in men. Blood 2007;109(5):1998-2000.

61- SANGAREDDI V, CHOCKALINGAM A, GNANA VELU G, SUBRAMANIAM T, JAGANNATHAN V, ELANGO VAN S. Canadian Cardiovascular Society classification of effort angina: an angiographic correlation. Coron Artery Dis. 2004; 15: 111-114.

62- SAUER S, LECHNER D, BERLIN K, ET AL. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res 2000;28: E13.

63 - R. GIEGERICH, F. MEYER, C. SCHLEIERMACHER, *GeneFisher* - Software Support for the Detection of Postulated Genes", Proceedings of the Fourth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, AAAI Press 2002. disponível no endereço eletrônico <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher>.

64- NEFF MM, TURK E AND KALISHMAN M. Web-based Primer Design for Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Trends in Genetics 2002, 18 613-615, disponível no endereço <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>

65- ALAN BLEASBY, Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SB, UK, disponível no endereço <http://bioweb.pasteur.fr/docs/EMBOSS/restrict.html>

66- LOPES PA, Instituto do Coração, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, disponível no endereço eletrônico: <http://172.24.196.23.-jeryes-cgi-snp-pesquisa.pl.url>.

66 - NABEL EG. Cardiovascular disease. N Engl J Med 2003;349(1):60-72.

67- WANG Q. Molecular genetics of coronary artery disease. Curr Opin Cardiol 2005;20(3):182-188.

68 - SAMANI NJ, ERDMANN J, HALL AS, ET AL. Genomewide association analysis of coronary artery disease. N Engl J Med 2007;357(5):443-53

69- YUSUF S, FALLEN E, HARRINGTON RA, GUYTON RA. Clinical decisions. Management of stable coronary disease. N Engl J Med 2007;357(17):1762-1766.

70- CHENG S, JARCHO J. Clinical decisions. Management of stable coronary disease--polling results. N Engl J Med 2007;357(24):e28

71- GACHET C. ADP receptors of platelets and their inhibition. Thromb Haemost 2001;86: 222-32.

72- CONLEY PB, DELANEY SM. Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor in thrombosis. Curr Opin Hematol 2003;10 : 333-338.

73- REMIJN JA, WU YP, JENINGA EH, ET AL. Role of ADP receptor P2Y<sub>12</sub> in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22 : 686-91.

74- A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet 1996;348: 1329-1339.

75- MITKA M. Results of CURE trial for acute coronary syndrome. Jama 2001;285: 1828-9.

76- BHATT DL, BERTRAND ME, BERGER PB, ET AL. Meta-analysis of randomized and registry comparisons of ticlopidine with clopidogrel after stenting. *J Am Coll Cardiol* 2002;39: 9-14.

77- VOETSCH B, LOSCALZO J. Genetic Determinants of Arterial Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 216-229.

78- HIRSCH AT, CRIQUI MH, TREAT-JACOBSON D, ET AL. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *Jama* 2001;286: 1317-1324.

79- SCHETTERT, IT, PEREIRA, AC, LOPES, NH, HUEB, WA, KRIEGER, JE. Association between platelet P2Y12 haplotype and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease. *Thromb Research* 2006; 118, 679-683.

80- CAVALLARI U, TRABETTI E, MALERBA G, ET AL. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease. *BMC Med Genet* 2007;8:59.

81- ANGIOLILLO, D. J. FERNANDEZ-ORTIZ, A. BERNARDO, E. ET AL. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Research* 2005; 116, 491-497.

82- CUISSET, T. FRERE, C. QUILICI, J. ET AL. Role of the T744C polymorphism of the P2Y12 gene on platelet response to a 600-mg loading dose of clopidogrel in 597 patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Thromb Research* 2007; 120: 893-899.

83- RUGGERI, ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal Thromb. Haemostasis* 2003, 1: 1335-1342.

84- DENT, JA, BERKOWITZ, SD, WARE, J. ET AL Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1990, 87: 6306-6310.

85- DONG, JF, MOAKE, JL, NOLASCO, L AT AL. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002, 100: 4033-4039.

86- LOPES, JA, DONG, JF. Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 on endothelial cells. *Seminars in hematology*, 2004, 41: 15-23.

87- MOTTO, DG, CHAUHAN, AK, ZHU, G. ET AL. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *Journal Clinical Investigation*, 2005, 115: 2752-2761.

88- ANDRE P, DENIS J, WARE S ET AL. Plateles adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood*, 2000, 96: 3322-3328.

89- WHINCUP, PH, DANESH, J, WALKER, M ET AL. von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis, *Eur. Heart Journal*, 2002, 23: 1764-1770.

90- MARTINELLI, I. von Willebrand factor and factor VIII as risk factors for arterial and venous thrombosis, *Seminars in Hematol*, 2005, 42:49-55.

91- DI BITONDO, R, CAMERON, CL, DALY, ME. The -1185 A/G and -1051 G/A dimorphisms in the von Willebrand factor gene promoter and risk of myocardial infarction. *British Journal of Haematology*, 2001, 115: 701-706.

92- HE, S, CAO, H, MAGNUSSON, GM et el Are increased levels of von Willebrand factor in chronic coronary heart disease caused by decrease in von Willebrand factor cleaving protease activity? A study by an immunoassay with antibody against intact bond 842Tyr-843Met of the von Willebrand factor protein. *Thrombosis Research* 2001, 103: 241-248.

93- LEVY, GG, MOTTO, DG, GINSBURG, D. ADAMTS13 turns 3, *Blood*, 2005, 106: 11-17.

94- <http://hapmap.org/>

95- NICHOLSON AC, MALIK SB, LOGSDON JM, JR., VAN MEIR EG.  
Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of  
phylogeny and gene organization. *BMC Evol Biol* 2005;5(1):11

96- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>