

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – ANÁLISES CLÍNICAS

LIDIO GONÇALVES LIMA NETO

**POLIMORFISMO DOS GENES *CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *IL6* E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
O INFARTO DO MIOCÁRDIO EM ADULTOS JOVENS**

Dissertação apresentada ao programa de  
Pós-Graduação em Farmácia - Análises  
Clínicas da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São  
Paulo.

Orientador: Prof. Tit. Mario Hiroyuki  
Hirata

**São Paulo**

**2007**

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

L732p Lima Neto, Lidio Gonçalves  
Polimorfismo dos genes CD14, TLR2, TLR4, IL6 e sua associação  
com o infarto do miocárdio em adultos jovens / Lidio Gonçalves  
Lima Neto. -- São Paulo, 2007.  
84p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Análise clínica : Medicina 2. Biologia molecular 3. DNA :  
Polimorfismo genético I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756-9 CDD

Lidio Gonçalves Lima Neto

**POLIMORFISMO DOS GENES *CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *IL6* E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
O INFARTO DO MIOCÁRDIO EM ADULTOS JOVENS**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, 20 de janeiro de 2007.

"Uma vida não questionada não merece ser vivida"

Platão

## DEDICATÓRIAS

Aos meus pais Emilton e Alaíde. Sei o quanto se esforçaram para ensinar coisas boas para mim. Deram-me todas as condições necessárias para me tornar uma pessoa digna de caráter. Vocês moram no meu coração. É difícil acordar todos os dias e saber que estamos longe.

A minha avó Valdeci e meu avô Lidio, exemplos de bondade e amor ao próximo. Infelizmente meu avô nos deixou em julho/2007, mas o que ficou na lembrança foram os momentos felizes que ele nos proporcionou e que foram muitos.

A minha irmã Alzira, sempre disposta a ajudar em qualquer momento. Foi um exemplo para mim, pois sempre lutou pelos seus objetivos na vida e com certeza foi quem me deu forças para lutar pelos meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, pois além de orientador, foi um grande amigo. Cheguei ao LBMAD-USP com pouco conhecimento na área de biologia molecular, mas o professor teve a paciência de me suportar e deu-me condições e tempo necessário para me adaptar e estudar o que precisava saber. Agradeço do fundo do meu coração e nunca esquecerei a oportunidade que o professor Mario me ofereceu. Quem conhece a sua história sabe o quanto batalhador o professor foi e isso serve de inspiração para sempre continuar a lutando. Quem o conhece, admira-o.

Agradeço a Profa. Assoc. Rosário D. C. Hirata, pois sempre teve paciência para explicar todas as perguntas que eram feitas a ela. Ensinou-me que sempre devemos fazer o melhor possível da gente. Admirada por todos por sua grande inteligência.

Agradeço a todos os meus amigos do LBMAD-USP, em especial ao André, um amigo que sempre me incentivou durante o mestrado e participou de forma decisiva no desenvolvimento desta tese. Agradeço a Vivian e a Carla por também serem grandes amigas.

Agradeço ao Dr. Marcelo Sampaio, médico do Instituto Dante Pazzanese que sempre me apoiou durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Marco Antônio Stephano que me deu apoio importantíssimo na análise estatística dos meus dados, contribuindo assim com o presente trabalho e com o meu conhecimento sobre estatística. Participou de forma decisiva no desenvolvimento desta tese.

Agradeço aos funcionários do bloco 17 da FCF-USP, pessoas muito legais e especiais com quem tive o prazer de conviver durante este tempo.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Quadros.....	iv
Lista de tabela.....	v
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3 CASUÍSTICA.....</b>	<b>14</b>
3.1 Características dos pacientes.....	14
3.2 Critérios de exclusão.....	15
3.3 Características do grupo controle.....	15
3.4 Aspectos Éticos.....	15
3.5 Fatores de risco cardiovascular.....	16
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 Coleta de dados clínicos.....	17
4.2 Avaliação laboratorial.....	18
4.3 Perfil Bioquímico e hematológico.....	18
4.4 Extração e análise de DNA genômico.....	20
4.5 Reação em cadeia pela polimerase.....	21
4.6 Avaliação dos polimorfismos pela RFLP.....	23
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>28</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
6.1 Dados dos indivíduos do estudo.....	29
6.1.1 Hábitos e qualidade de vida.....	30
6.1.2 Fatores de risco.....	31
6.1.3 Parâmetros Bioquímicos e hematológicos.....	31

6.2	Freqüências genotípica dos polimorfismos.....	33
6.3	Análise comparativa entre haplótipos dos polimorfismos.....	37
6.4	Influência dos polimorfismos sobre o perfil inflamatório e hematológico.....	37
6.4.1	Polimorfismo -174G/C IL-6.....	37
6.4.2	Polimorfismo -260 C/T CD14.....	39
6.4.3	Polimorfismo Asp299Gli (A+896G).....	41
6.4.4	Polimorfismo Thr399Ile (C1197T).....	41
6.5	Influência dos polimorfismos sobre o perfil lipídico.....	42
6.5.1	Polimorfismo -174G/C IL-6.....	42
6.5.2	Polimorfismo -260 C/T CD14.....	44
6.5.3	Polimorfismo Asp299Gli (A+896G).....	45
6.5.4	Polimorfismo Thr399Ile (C1197T).....	46
<b>7</b>	<b>– DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
7.1	Hábitos e fatores de risco.....	55
7.2	Valores bioquímicos e hematológicos.....	57
7.3	Genéticos.....	62
7.3.1	CD14.....	62
7.3.2	TLR.....	64
7.3.3	IL-6.....	65
7.4	Limitações.....	66
<b>8</b>	<b>- CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS**

A	Adenosina
APO A1	Apolipoproteína A1
APO B	Apolipoproteína B
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
CD14	Cluster de diferencial 14
CKMB	Enzima creatinofosfoquinase fração miocárdica
C	Controle
DAC	Doença arterial coronária
dL	Decilitros
DNA	Ácido desóxiribonucléico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
G	Guanosina
Gli	Glicina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Intervalo de confiança
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IK- $\beta$	Inibidor do fator nuclear K $\beta$
IL1R	Receptor relacionado à interleucina 1
IL6	Interleucina 6
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
md	Mediana
mg	Miligramas
MMP	Metalomieloprotease
MyD88	Diferenciação mielóide (88)

NaCl	Cloreto de sódio
NFK $\beta$	Fator nuclear K $\beta$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCRus	Proteína C reativa ultra sensível
PDAY	Determinantes patobiológico da aterosclerose em jovens
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	polimorfismo de base unica
Tirap	Proteína adaptadora contendo domínio do receptor interleucina-toll
T4	Tiroxina 4
Thr	Treonina
TLR	Receptores Toll Like
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
TGF- $\beta$	Fator beta de transformação do crescimento
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL	Lipoproteína de baixa densidade

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Modelo esquemático da formação da placa de ateroma.....	3
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de reconhecimento dos ligantes pelo TLR.....	7
<b>Figura 3</b> - Mecanismos de sinalização pelo TLR.....	8
<b>Figura 4</b> - Esquema da localização dos principais polimorfismos do <i>TLR2</i> e <i>4</i> . .....	10
<b>Figura 5.</b> Fotografia do gel de agarose a 1,5%, pos restrição e coloração SNP -260CT <i>CD14</i> .....	25
<b>Figura 6</b> – Fotografia do gel em poliacrilamida a 8% pós restrição e coloração do SNP Asp299Gli do gene <i>TLR4</i> .....	25
<b>Figura 7.</b> Fotografia do gel em poliacrilamida 8%, pós restrição e coloração do SNP Thr399Ile (C+1197T) do gene <i>TLR4</i> .....	26
<b>Figura 8</b> Fotografia do gel em poliacrilamida a 8% pós restrição e coloração do SNP Asp299Gli (A+896G) do gene <i>TL4</i> .....	26
<b>Figura 9.</b> Fotografia do gel de agarose a 1,5%, pos restrição e coloração do SNP -174GC <i>IL6</i> .....	27
<b>Figura 10</b> – Distribuição da frequência genotípica dos SNPs -174G/C <i>IL-6</i> , - 260C/T <i>CD14</i> , Arg753Gln <i>TLR2</i> , Asp299Gli e Thr399Ile <i>TLR4</i> , de IAM e controle.....	36

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR.....	22
<b>Quadro 2</b> – Fragmentos dos produtos de restrição.....	27

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> – Distribuição dos pacientes de acordo com faixas etárias.....	29
<b>Tabela 2</b> – Dados demográficos dos grupos de IAM e controles .....	30
<b>Tabela 3</b> – Hábitos e qualidade de vida nos grupos IAM e controles.....	30
<b>Tabela 4</b> – Fatores de risco no grupos IAM e controles .....	31
<b>Tabela 5</b> – Valor médio de hemácias dos grupos IAM e controles.....	32
<b>Tabela 6</b> – Dados bioquímicos e hematológicos dos grupos IAM e controles.....	33
<b>Tabela 7</b> - Concentração de PCRus dos grupos IAM e controles .....	33
<b>Tabela 8</b> – Equilíbrio de Hardy-weinberg para os polimorfismos estudados....	37
<b>Tabela 9</b> – Efeito do genótipo GG do SNP -174G/C <i>IL-6</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	38
<b>Tabela 10</b> – Efeito do genótipo GC do SNP -174G/C <i>IL-6</i> nos valores de hemácias entre os grupos estudados.....	38
<b>Tabela 11</b> – Efeito do genótipo CC do SNP -174G/C <i>IL-6</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	39
<b>Tabela 12</b> – Efeito do genótipo CC do SNP -269CT <i>CD14</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	40
<b>Tabela 13</b> – Efeito do genótipo CT do SNP -269CT <i>CD14</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	40
<b>Tabela 14</b> – Efeito do genótipo TT do SNP -269CT <i>CD14</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	40
<b>Tabela 15</b> – Efeito do genótipo AA do SNP Asp299Gln <i>TLR4</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	41
<b>Tabela 16</b> – Efeito do genótipo TT do SNP Thr399Ile <i>TLR4</i> no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.....	42
<b>Tabela 17</b> - Efeito do genótipo GG do SNP -174G/C <i>IL-6</i> no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.....	43
<b>Tabela 18</b> - Efeito do genótipo CC do SNP -174G/C <i>IL-6</i> no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.....	43

<b>Tabela 19</b> – Efeito do genótipo CC do SNP -269CT <i>CD14</i> no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados. ....	44
<b>Tabela 20</b> - Efeito do genótipo CT do SNP -269CT <i>CD14</i> no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.....	45
<b>Tabela 21</b> - Efeito do genótipo TT do SNP -269CT <i>CD14</i> no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.....	45
<b>Tabela 22</b> – Efeito do genótipo AA do SNP Asp299Gli (A+896G) no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados. ....	46
<b>Tabela 23</b> – Efeito do genótipo TT do SNP Thr399Ile (C1197T) no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados. ....	47

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a possível associação entre os polimorfismos -260C/T do gene *CD14*, Arg753Gln do gene *TLR2*, Asp299Gln e Thr399Ile do gene *TLR4* e -174G/C do gene *IL6* com o infarto do miocárdio em adultos jovens. Para isso, foi realizado um estudo caso controle, sendo o grupo de estudo constituído por 102 pacientes que tiveram de infarto do miocárdio ( $34,5 \pm 5$  anos) e o grupo controle ( $35,1 \pm 8,7$  anos) por 108 indivíduos sem histórico de doenças cardiovasculares. A genotipagem foi realizada pela PCR-RFLP. Houve ausência de associação entre a distribuição dos genótipos dos SNPs -260C/T do gene *CD14*, Arg753Gln do gene *TLR2*, Asp299Gln e Thr399Ile do gene *TLR4* e -174G/C do gene *IL6* entre os dois grupos estudados ( $p < 0,05$ ). O perfil sérico inflamatório e hematológico relacionou-se com polimorfismo -174G/C *IL-6* do grupo IAM. O genótipo GG relacionou com elevação nas concentrações de PAI-1 ( $p < 0,0001$ ), o genótipo GC com maiores quantidades de hemácias ( $p = 0,02$ ) e o genótipo CC com concentrações elevadas de fibrinogênio ( $p < 0,01$ ) e quantidade aumentada de leucócitos ( $p < 0,05$ ). O genótipo CC do polimorfismo -260C/T *CD14* também mostrou relação com a elevação nas concentrações de PAI-1 ( $0,0001$ ) e o genótipo CT com o de fibrinogênio ( $p < 0,01$ ). O genótipo GG do polimorfismo -174G/C *IL-6* relacionou com elevação nas concentrações de glicose ( $p < 0,05$ ) e o genótipo CC com diminuição nas concentrações de apoA ( $p < 0,01$ ), HDL ( $p < 0,001$ ) e elevação nas de LDL ( $p < 0,05$ ), colesterol total ( $p < 0,05$ ). O genótipo CT do polimorfismo -260C/T *CD14* também relacionou com concentrações elevadas de colesterol total ( $p < 0,0001$ ). Em conclusão, os polimorfismos não estão relacionados com o infarto do miocárdio em jovens, porém os SNPs -260CT *CD14* e -174 *IL-6* parecem estar relacionados com o perfil sérico inflamatório, hematológico e bioquímico de pacientes enfartados.

## ABSTRACT

The objective of this study was to assess the possible association between the polymorphism - 260C/T of the gene CD14, Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gln and Thr399Ile *TLR4* and -174G/C of the gene IL6 with myocardial infarction in young adults. For that a case control study was conducted and the case group was formed by 102 patients who had myocardial infarction, and the control group by 108 individuals without history of cardiovascular disease. The genotyping was performed by PCR-RFLP. There was no association between the distribution of genotypes of SNPs - 260C/T of the gene CD14, Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gln and Thr399Ile *TLR4* and -174G/C of the gene IL6 between the two groups studied ( $p < 0.05$ ). The serum inflammatory blood profile was related with polymorphism - 174G/C IL-6 in the group IAM. The GG genotype was linked with elevated PAI-1 concentrations ( $p < 0.0001$ ), the genotype GC with larger quantities of red blood cells ( $p = 0.02$ ) and CC genotype with high concentrations of fibrinogênio ( $p < 0.01$ ) and leucocytes increased quantity ( $p < 0.05$ ). The CC genotype of polymorphism of -260C/T *CD14* also showed associated with the elevation in PAI-1 concentrations ( $p < 0.0001$ ) and the CT genotype with elevated fibrinogênio concentrations ( $p < 0.01$ ). The GG genotype of the -174G/C *IL-6* polymorphism was related with elevated glucose concentrations ( $p < 0.05$ ) and CC genotype with decrease in the apoA ( $p < 0.01$ ) and HDL ( $p < 0.0001$ ) concentrations and elevation of the LDL ( $p < 0.05$ ), total cholesterol ( $p < 0.05$ ) concentrations. The CT genotype of -260C / T *CD14* polymorphism also was linked with high total cholesterol concentrations ( $p < 0.0001$ ). In conclusion, the polymorphism is not associated with myocardial infarction in young patients, but the -260CT *CD14* and -174 *IL-6* SNPs appear to be related to the serum biochemical, hematological and inflammatory blood profile in patients that had myocardial infarction.



## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares constituem atualmente a principal causa de morte e incapacitação dentre as doenças humanas, correspondendo a aproximadamente um quarto das mortes na população adulta. (OVERMAN, 2005).

No Brasil ocorrem, aproximadamente, 140.000 óbitos por ano devido às doenças cardiovasculares, sendo que 9 de cada 1000 habitantes possuem esta doença ([www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)). A mortalidade hospitalar de pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é de 4,8% no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (SANTOS *et al.*, 2006).

A causa mais comum da doença cardiovascular é a aterosclerose, que é resultado de alterações vasculares que evoluem de forma lenta e progressiva, levando a obstrução parcial ou completa do lúmen da artéria. Nestes casos, freqüentemente ocorre uma deficiência no fluxo sanguíneo para o tecido perfundido (LIBBY *et al.*, 2005 e TOUSOULIS *et al.*, 2005).

A agressão ao endotélio provoca uma resposta inflamatória crônica na parede arterial e esta é a hipótese mais aceita para a etiopatogenia da aterosclerose. Esta resposta inicia-se por alguma forma de lesão do endotélio devido a alterações hemodinâmicas, hipóxia, presença de endotoxinas ou produtos derivados do cigarro, hiperhomocisteinemia, hipercolesterolemia e processos infecciosos (TIONG *et al.*, 2005; GOTLIEB, 2005; HANSON, 2005; MOORE *et al.*, 2006). A lesão do endotélio pela resposta inflamatória crônica local resulta em disfunção endotelial e aumento da permeabilidade e da adesão de monócitos e macrófagos no endotélio vascular. Subseqüentemente, ocorre a deposição de lipoproteínas na camada íntima da artéria,

principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em colesterol e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) bem como suas formas modificadas por oxidação (TIONG *et al.*, 2005). A LDL oxidada é quimiotática para monócitos circulantes, que tem sua adesão aumentada por indução da expressão de moléculas endoteliais de adesão. O acúmulo de LDL oxidado facilita sua captação por macrófagos através de receptores específicos conhecidos como receptores seqüestradores, transformando os macrófagos em células espumosas e favorecendo assim, sua retenção na placa. O resultado deste processo ocasionará a estimulação e liberação de fatores de crescimento que causam a migração de células musculares lisas da camada vascular média para a íntima (Figura 1) (LIBBY, 2005; HANSON, 2005; MILLER *et al* 2007; CROCE *et al*, 2007).

As células do músculo liso produzem uma grande quantidade de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, elastina e vários tipos de proteoglicanas durante o processo inflamatório como mecanismo de reparo do tecido lesado (LIBBY, 2005). O fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e outros fatores de crescimento, incluindo PDGF e fator de crescimento fibroblástico (bFGF), também participam do mecanismo de reparo do tecido lesado. A proliferação e a síntese de matriz implicam em um processo lento e progressivo de crescimento da placa, culminando na estabilização da placa pela formação de uma cápsula fibrosa envolvendo o ateroma. Porém, muitos mediadores produzidos por macrófagos e linfócitos T ativados promovem um efeito desestabilizante na placa (GORAN *et al.*, 2005). O processo de apoptose pode ser ativado por mediadores inflamatórios e este processo é reconhecido como um mecanismo de morte de células espumosas na placa (DEGUCHI *et al* 2006).

A morte celular leva ao descolamento dos lipídeos e amolecimento da camada lipídica. Em adição, durante a inflamação, um importante mecanismo de desintegração da placa é iniciado com degradação da matriz extracelular por colagenases intersticiais (MMP1), estromalinas (MMP3) e gelatinases MMP2 e MMP9 (LIBBY *et al*, 2006; DEGUCHI *et al* 2006).

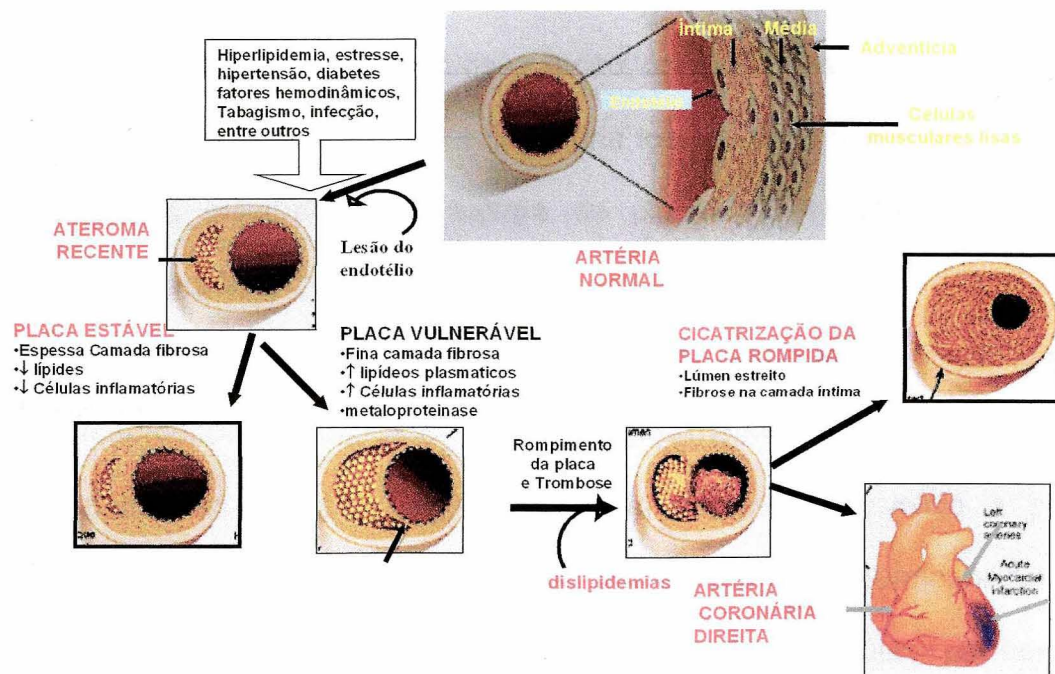


Figura 1. Modelo esquemático da formação da placa de ateroma. Modelo adaptado de LIBBS, 2002.

Quando a placa apresenta uma cápsula espessa torna-se menos propensa a ruptura. As placas fibrosas são clinicamente estáveis e podem ser constituídas ou não de pequena quantidade de lipídeos extracelular (YEGHIAZARIANS *et al.*, 2005). Na artéria coronária muita dessas lesões permanecem clinicamente silenciosas ou podem progredir lentamente para uma angina pectoris estável. Uma placa é considerada

vulnerável (ou imatura) quando apresenta risco de ruptura e são caracterizadas por uma grande quantidade de lipídeos e por uma cápsula fibrosa delgada ou macroscopicamente ausente (YEGHIAZARIANS et al., 2005). A ruptura dessas placas poderá ocasionar uma obstrução parcial ou total do lúmen da artéria através da formação de um coágulo sangüíneo sobre uma placa aterosclerótica no interior de uma das artérias coronárias. Quando ocorre a ruptura da placa, existe exposição de colágeno e fragmentos de tecido conjuntivo da região subendotelial. As plaquetas, células do sangue, se aderem e agregam ao local da ruptura, liberando substâncias que desencadeiam o processo de coagulação, resultando na formação do trombo.

A intensidade da resposta inflamatória local e sistêmica possui um papel muito importante na instabilidade e ruptura da placa (YEGHIAZARIANS et al., 2005; DEGUCHI et al 2006; CROCE et al, 2007).

A resposta inflamatória é resultado de uma lesão tecidual que imediatamente produz fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina. O resultado é um aumento da irrigação sangüínea e em seguida tem início a produção de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia, processo químico pelo qual as células polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o foco da lesão (LIBBY 2002). Estas células por sua vez fagocitam os elementos que estão na origem da inflamação e produzem mais mediadores químicos dentre os quais estão as citocinas (como por exemplo o fator de necrose tumoral e as interleucinas), quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Também as plaquetas e o sistema de coagulação do sangue são ativados visando conter possíveis sangramentos (HANSSON 2001). Cada uma destas

substâncias possui funções e propriedades específicas que se somam ou são reguladas pelas demais, o que se reflete no resultado final do processo.

Esta resposta é comum a vários tipos de tecidos e é mediada por diversas substâncias produzidas pelas células danificadas e células do sistema imune que se encontram eventualmente nas proximidades da lesão. Este processo envolve uma complexa sinalização intra e intercelular que liberará substâncias mediadoras (interleucinas, fatores de crescimento e outros) e tem como início à interação das células inflamatórias (principalmente monócitos/macrófagos) com os seus ligantes (LDL oxidado, proteínas de choque térmico e lipopolissarídeos produzidos por bactérias) mediados por receptores localizados na membrana celular (LI et al., 1993; BARTON et al., 2002). Dentre os principais receptores envolvidos no processo inflamatório estão as proteínas CD14 e TLR (Figura 2). Elas são capazes de interagir com componentes celulares de microorganismos apresentando uma grande importância no reconhecimento a patógenos e no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (SCHUMANN et al., 1994).

O CD14 é uma glicoproteína de 55 kDa que possui diversos ligantes, como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos (LANDMANN et al 1996, BUFLER et al., 1995, e STELTER et al., 2000). Esta glicoproteína é expressa principalmente na superfície de células mielóides (XU, et al. 2001 e OCROCKETT *et a.*, 2001) e tem como principal função a transferência de informações aos TLRs (WANG et al., 1995, KITCHENS et al 2000).

O TLR-4 é uma proteína transmembrana que interage com proteínas de choque térmico, LDL oxidado e lipopolissacarídeos com o auxílio do CD14 desencadeando um processo inflamatório (OHASHI *et al*, 2000; OCROCKETT *et a.*, 2001; ISHIHARA *et al.*,

2004 e TAKENAKA *et al.*, 2004; e GORÄN, 2005). Além do TLR-4, a proteína de membrana TLR-2 também desempenha uma função importante no reconhecimento a substâncias endógenas e exógenas e este receptor foi relacionado como ligante de componentes celulares de bactérias gram-negativas, gram-positivas e alguns vírus (LORENZ *et al.*, 2003 e GOBERT *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado a não especificidade destes receptores a determinados patógenos (SMITH *et al.*, 2003; AMEZIANE *et al.*, 2003 e ZONG-ZE *et al.*, 2005).

É através de sua região externa que os TLRs reconhecem seus ligantes. Este reconhecimento ocorre devido à interação do TLR com outras proteínas de membrana, principalmente com a molécula de CD14 (Figura 2). Os TLRs possuem uma região interna no citoplasma que é homóloga aos receptores relacionados às interleucinas (IL-1Rs), incluindo um domínio conservado de aproximadamente 200 aminoácidos, denominado Toll-IL1R. Além desta estrutura similar, TLRs e IL-1Rs também possuem uma molécula de adaptação em comum, a MyD88 (Figura 3), que também contém um domínio Toll-IL-1R (TAKEDA *et al.*, 2003 e AKIRA, *et al.* 2003).

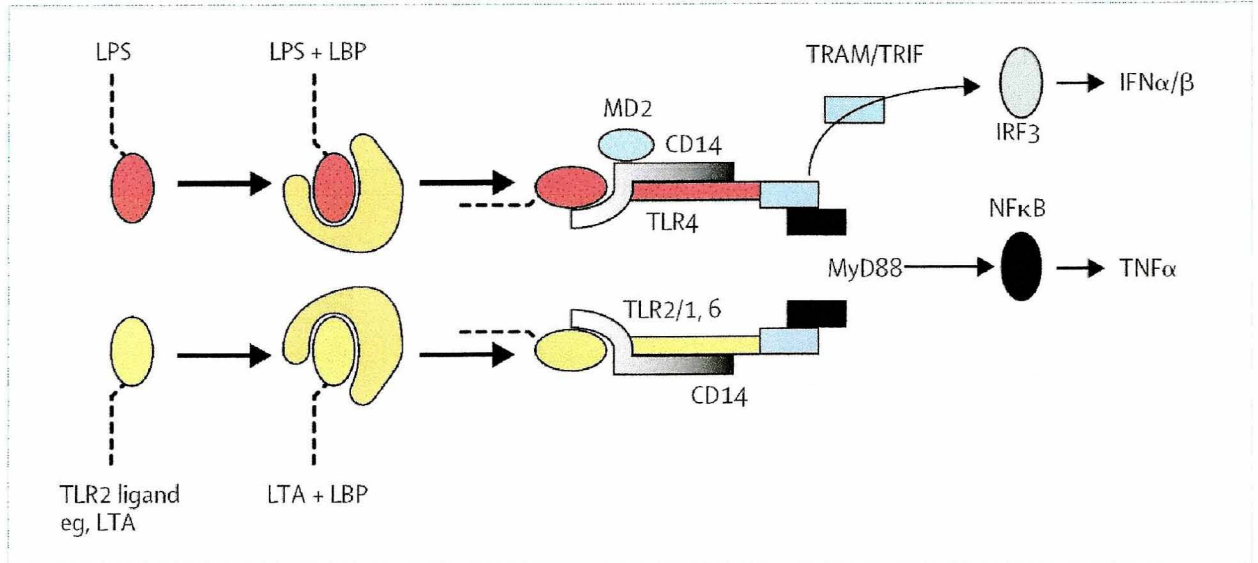


Figura 2. Mecanismos de reconhecimento dos ligantes pelo TLR. Este reconhecimento corre devido à interação do TLR com outras proteínas, principalmente com o CD14. Retirado de SHRODER, 2005.

Uma vez o TLR ativado ocorre produção de moléculas de adaptação e, conseqüentemente, do complexo quinase I $\kappa$ B (IKK). A fosforilação mediada por IKK resulta na ubiquitinação e degradação do I $\kappa$ B e posteriormente, o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) deixará de ser inibido ocorrendo a sua translocação para o núcleo. Este processo permite a expressão de vários genes pró-inflamatórios, como a interleucina-6 (Figura 3), (TAKEDA et al., 2003 e KATHRIN *et al.*, 2004). Existe uma outra via de sinalização do TLR que é a via independente do MyD88. Por esta via ocorre a ativação das proteínas TIRAP/Mal, TRIF e IRF3, que ativa a expressão de genes inflamatórios (KAISHO et al 2006). A interleucina-6 é uma citocina que estimula a resposta de fase aguda do fígado a infecções e ao dano tecidual, incluindo a estimulação da expressão de proteína C reativa, PAI-1 e fibrinogênio (FEY et al., 1990) e também a IL6 está relacionada à diferenciação e ativação de macrófagos, linfócito T e B (CATHERINE et al., 2000). A IL6 não é um gene constitutivo, mas é altamente expressa por várias



células como monócitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e células T (TERRY et al., 2000).

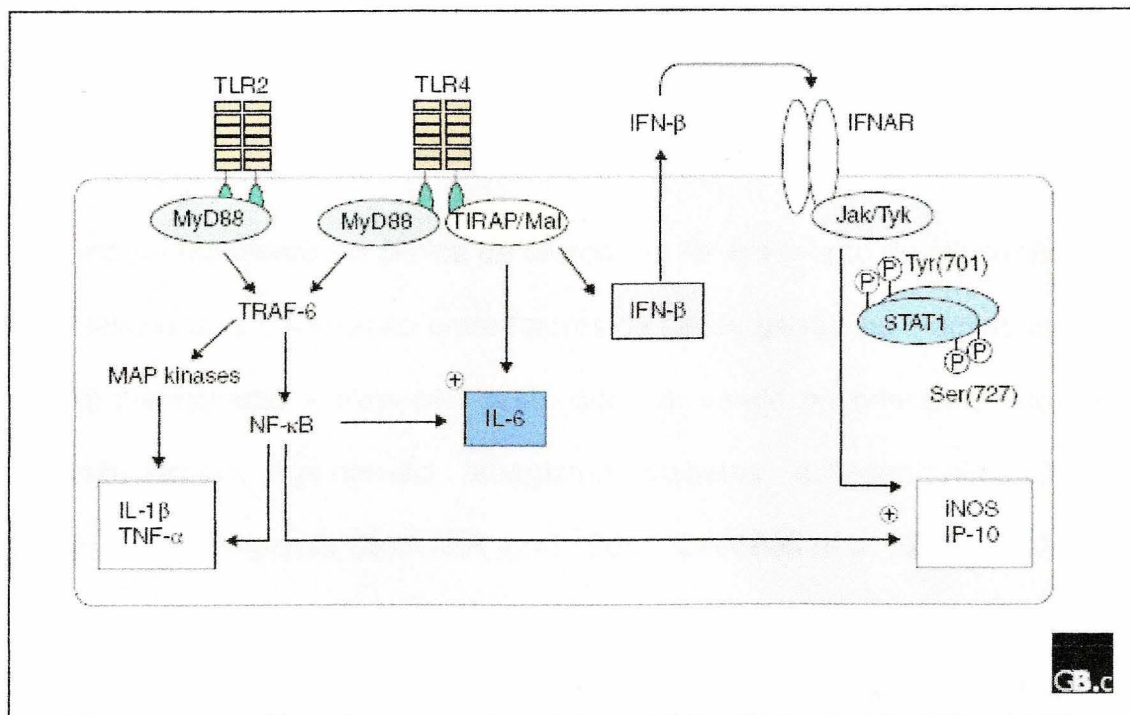


Figura 3. Mecanismos de sinalização por TLR. Duas vias 1. Via dependente de MyD88 e 2. Independente de MyD88. Retirado de ARMANT, 2002.

Os receptores CD14, TLR e a citocina interleucina-6, portanto, estão diretamente envolvidos no processo inflamatório e alterações nos seus genes podem comprometer tanto o reconhecimento dos seus ligantes, quanto à sinalização intra e intercelular necessário para o desenvolvimento deste processo (SCHMITT et al 2002; KOLEC et al 2004; OOSTENBRUG et al 2005; VAN DER GHRAAF et al 2005; CARVALHO et al 2007; TSUBG et al 2007). Diversos estudos descrevem o aumento da expressão dos receptores de membrana TLR e CD14 durante o infarto do miocárdio (FRANZ et al., 1999; XU et al., 2001, EDFELDT et al., 2002 e OZIDOGRU et al., 2007). O aumento da concentração de IL6 no infarto do miocárdio foi estabelecida por vários



estudos e mostraram que este seria um marcador futuro de eventos coronários em indivíduos saudáveis e também relacionado alto índice de mortalidade em pacientes com síndrome coronariana aguda (BIASUCCI et al., 1996; KUCHARZA et al., 2000; RIDKER et al., 2000; LINDMARK et al., 2001; BENNET et al., 2003 e BLAKE et al., 2003).

A principal manifestação clínica da aterosclerose é o infarto do miocárdio. Esta doença está relacionada à interação entre fatores de riscos genéticos e ambientais que determinará a precocidade e evolução desta doença, sendo os principais fatores de riscos as dislipidemias, hipertensão, tabagismo, diabetes, estresse, alterações na coagulação e homocisteinemia (BARTER et al., 2007; DAMANI et al., 2007 e RANJITH et al., 2007).

O gene *CD14* está localizado no cromossomo 5, consiste de 3.900 pb organizados em 2 exons e codificam uma proteína de 375 aminoácidos. A região promotora deste gene tem sido bem caracterizada e sabe-se que o promotor possui um sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1 (ZHANG et al., 1994; HUBACEK et al., 1999). Um dos polimorfismos do *CD14* mais importantes é a substituição de citosina por uma timina (-260C/T) no nucleotídeo 260 da região promotora (BERNARDO et al., 2006). Este polimorfismo está associado a diferenças em resposta inflamatória, aumento de concentrações plasmáticas da forma solúvel do CD14 e um aumento da infecção por *Chlamydia pneumoniae* (ENG et al., 2003 e BERNARDO et al., 2006).

O gene que codifica o TLR4 está localizado no cromossomo 9 e por processamento alternativo que transcreve quatro isoformas de RNA mensageiro (RNAm) e a quantidade de exons varia de 3 a 5 (ROCK, et al., 1999). Um dos

polimorfismos do TLR4 mais importantes é a substituição de adenina por guanina no nucleotídeo +896 que resulta na troca de ácido aspártico por glicina no códon 299, denominado Asp299Gln ou A+896G (TAKEDA *et al.*, 2003; SCHOEDER, *et al.*, 2005). Este polimorfismo, localizado no último exon, altera o domínio extracelular do TLR-4 dificultando o reconhecimento a patógenos, sendo esta associada à alteração da resposta inflamatória (OOSTENBRUG *et al.* 2005; VAN DER GHRAAF *et al.* 2005) e a uma maior susceptibilidade a infecções (HOSHINO *et al.*, 1999 e SCHOEDER *et al.*, 2005). Além deste polimorfismo, outros polimorfismos que alteram o domínio extracelular da proteína, estão relacionados a uma alteração do processo inflamatório e da susceptibilidade a infecções, sendo os mais importantes o polimorfismo Arg753Gln do gene *TLR2* e o polimorfismo Thr399Ile no gene *TLR4* (SCHRODER *et al.*, 2005). Esta se localiza no último exon do *TLR4*, e é resultado da substituição de citosina por timina no nucleotídeo +1197 que resulta na troca de treonina por interleucina no códon 299, denominado Thr399Ile ou C+1197T (Figura 3).

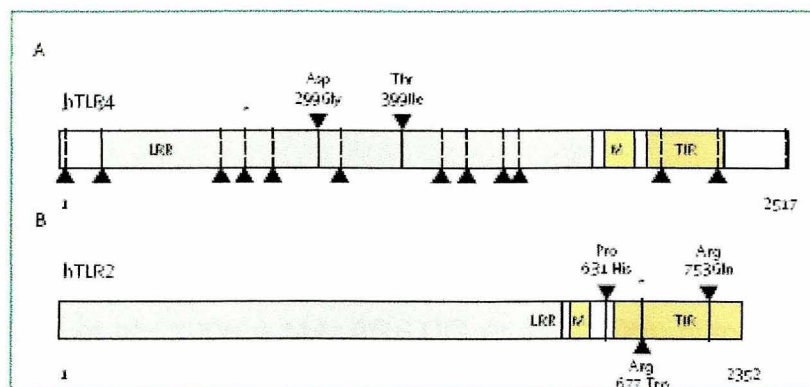


Figura 4. Modelo esquemático da localização dos principais polimorfismos do *TLR2* e 4. Retirado de SCHRODER, 2005.

O gene *IL6* está localizado no cromossomo 7 e possui 11 exons. Um dos polimorfismos da *IL6* mais importantes é a substituição de uma guanina por citosina no nucleotídeo -174 da região promotora (-174G/C) (RAVAGLIA et al., 2005), que está relacionado com alterações na concentração sérica de interleucina-6 (CATHERINE et al 2000 e RAVAGLIA et al., 2005).

Como a inflamação crônica está sendo associada à aterosclerose (WILLERSON et al., 2004), uma alteração no domínio extracelular destas proteínas provavelmente pode estar modificando a resposta inflamatória podendo estar influenciando o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Embora o estudo de Yang, 2003, não demonstrasse haver relação do polimorfismo *TLR4* Asp299Gln com o aumento de risco de infarto do miocárdio, houve uma maior frequência deste polimorfismo nos pacientes em relação aos indivíduos controles (YANG et al., 2003). Entretanto, outro estudo mostrou que homens com ambos os polimorfismos, Asp299Gln e Thr399Ile, têm um aumento no risco de infarto do miocárdio (EDFELDT et al., 2004), sugerindo que novas pesquisas sejam realizadas para avaliar o real impacto destes polimorfismos nas doenças cardiovasculares. Alguns estudos foram realizados para avaliar também a relação dos polimorfismos -260C/T do gene *CD14* e -174G/C do gene *IL6* e o infarto do miocárdio, mas resultados contraditórios foram obtidos (HUBACEK et al., 1999; ARROYO-ESPLIGUERO et al 2005; BERNARDO et al., 2006 e MALARSTIG et al., 2006). Não obstante, ainda não existem estudos sobre a relação destes polimorfismos com o infarto do miocárdio em pacientes abaixo de 40 anos.

A prevalência de doenças cardiovasculares em indivíduos abaixo de 40 anos está entre 2 e 11% dos pacientes com infarto do miocárdio (BARBASH et al., 1995;

ZIMMERMAN et al., 1995; CHOUDLHURY et al., 1999; DOUGHTY et al., 2002; FOURNIER et al., 2004 e PINEDA et al., 2007).

Estudos histopatológicos evidenciaram que em pacientes jovens com IAM às placas ateroscleróticas são constituídas por grande quantidade de células espumosas ricas em lípidos e com pequena quantidade de matriz extracelular e de cálcio (DOLLAR et al., 1991; CHEN et al., 1995). Entretanto, outros estudos revelam a não prevalência de placas ateroscleróticas gordurosas (EUDA et al., 2007), além disso, em relação à avaliação angiográfica, o infarto do miocárdio em jovens apresenta alta taxa de lesões uniarteriais. Este infarto também se caracteriza por estar associado à alta taxa de artérias coronárias angiograficamente normais (BURKARJ et al., 2002), sendo quase um quarto de todos os pacientes jovens sofreram infarto do miocárdio com elevação do segmento ST no eletrocardiograma (SOITIA et al., 2007). Todos esses fatores e a ausência de condições próprias pertinentes à idade avançada sugerem o infarto do miocárdio em jovens como um modelo interessante para o estudo da resposta inflamatório nesta doença.

## 2. OBJETIVOS

- Estudar as frequências genótípicas dos polimorfismos -260C/T *CD14*, Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e -174G/C *IL-6* em indivíduos jovens com infarto do miocárdio e indivíduos controles.
- Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos -260C/T *CD14*, Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e -174G/C *IL-6* com infarto do miocárdio em adultos jovens.
- Avaliar a associação do haplotipo dos genes da *CD14*, *TLR2*, *TLR4* e *IL6* com os parâmetros bioquímicos e inflamatórios.
- Avaliar o efeito dos polimorfismos sobre o perfil sérico inflamatório e hematológico em indivíduos jovens com infarto do miocárdio.
- Avaliar o efeito dos polimorfismos sobre o perfil sérico lipídico em indivíduos jovens com infarto do miocárdio.

### **3 CASUÍSTICA**

#### **3.1 Características dos pacientes**

Foram incluídos 102 pacientes com idade abaixo de 45 anos, de ambos os sexos, que haviam apresentado Infarto agudo do miocárdio (IAM) há pelo menos dois meses antes do início do estudo.

O diagnóstico de IAM foi estabelecido somente quando os três critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde em 1959 (HYPERTENTION, 1959) estivessem presentes simultaneamente: a) clínicos: relato de dor, de localização torácica anterior, em aperto, peso ou queimação, com duração superior a 20 minutos; b) eletrocardiográficos: supradesnivelamento do segmento ST  $\geq$  1mm, a 0,02 segundos após o ponto J e que evolui para formação de onda Q (infarto Q) patológica (duração > 0,03s e amplitude > 3 mm), ou infradesnivelamento do segmento ST e/ou alterações das ondas T que não evoluem para formação de ondas Q patológicas (infarto não Q). Estas alterações eletrocardiográficas deveriam estar presentes em pelo menos duas derivações contíguas do eletrocardiograma convencional, incluindo V7 e V8. c) critérios enzimicos: valores elevados (pelo menos o dobro do valor de referência) da enzima creatinofosfoquinase fração miocárdica, CKMB (CONTI *et al*, 2002).

#### **3.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram qualquer das seguintes condições: 1) insuficiência renal crônica; 2) insuficiência hepática; 3) doenças auto imune; 4) angina instável; 5) distúrbio endócrino ; 6) uso de anticoagulantes orais; 7) hipercolesterolemia familiar conhecida ou presente em

membros da família. Excluíram-se também os pacientes que antes do IAM apresentassem as seguintes cardiopatias: 1) miocardiopatia, incluindo doença de Chagas; 2) valvopatia; 3) doença congênita; 4) pericardiopatia.

### **3.3 Características do grupo controle**

O grupo controle foi constituído por 108 indivíduos jovens de ambos os sexos, que não apresentavam história ou evidencia de doença cardiovascular atual. A doença arterial coronária foi afastada pela realização de um teste ergométrico cujo resultado foi considerado totalmente dentro da normalidade. O grupo controle foi formado por funcionários do departamento de manutenção, trabalhadores que prestam serviço à Instituição, ou acompanhantes de pacientes no hospital Dante Pazzanese de Cardiologia.

### **3.4 Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Os indivíduos do grupo IAM e do grupo controle foram informados de maneira clara sobre os objetivos e importância da pesquisa desenvolvida neste trabalho. No dia da primeira entrevista todos assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, conforme determina a resolução número 196, de 13 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

### 3.5 Fatores de risco cardiovascular

No grupo dos pacientes com infarto abaixo de 45 anos (grupo IAM), os seguintes fatores de risco clássicos para doença arterial coronária foram avaliados: diabetes, hipertensão arterial, tabagismo, dislipidemias e obesidade. Os valores para estabelecimento desses fatores de risco foram:

Hipertensão arterial sistêmica - De acordo com os dados das V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial foram considerados hipertensos os pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva ou que apresentavam história de pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, utilizando-se como referência a média de avaliações em pelo menos três dias diferentes.

Diabetes Mellito - Duas medidas de glicose plasmática de jejum  $\geq 126$  mg/dl em dois dias distintos, ou portadores de sintomas clássicos de diabetes associados à glicemia  $\geq 200$  mg/dl, ou pacientes recebendo terapia com insulina ou hipoglicemiante oral.

Dislipidemias - De acordo com as IV Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Dislipidemias, os seguintes valores foram adotados:

- a) Hipercolesterolemia: colesterol total  $> 240$  mg/dl
- b) LDL colesterol elevado:  $> 160$  mg/dl
- c) HDL colesterol baixo:  $< 40$  mg/dl
- d) Hipertrigliceridemia: triglicérides  $> 150$  mg/dl

História familiar para doença coronária precoce - Pacientes com relato de doença coronária em pais ou irmãos, abaixo dos 55 anos em homens, ou de 65 anos em mulheres.



Tabagismo - Fumantes ativos ou com abstinência de tabaco há menos de três anos antes do IAM foram considerados tabagistas, pois trabalhos populacionais envolvendo mais de 1000 pacientes constataram que três anos após cessar o tabagismo o risco para infarto ou óbito era similar aos do que nunca fumaram (CONTI et al, 2002). Pacientes que nunca fumaram ou fumaram por um período inferior a um mês foram definidos como não tabagistas. Os pacientes foram considerados tabagistas se fumassem pelo menos 5 cigarros/dia.

Obesidade - O critério de obesidade foi adotado com base no índice de massa corpórea para todos os participantes do estudo. O índice de massa corpórea foi calculado dividindo o peso em kilogramas pelo quadrado da altura em metros. Sobrepeso foi definido como índice de massa corpórea (IMC)  $> 25,0 \text{ Kg/m}^2$  e obesidade como  $\text{IMC} > 30,0 \text{ Kg/m}^2$ , para homens e mulheres (EL-ALAWATY et al., 2007).

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 Coleta de dados clínicos**

Os pacientes provenientes da unidade coronária do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia que preenchessem os critérios de inclusão, foram entrevistados após a alta hospitalar. Todos estavam clinicamente estáveis, sem indicação atual para angioplastia ou cirurgia de revascularização e em uso de aspirina. A utilização de medicamentos comuns a pacientes após IAM, como beta-bloqueadores, inibidores da enzima de conversão, estatinas, antagonistas dos canais de cálcio e nitratos ficava a critério do médico de cada paciente.

As informações foram obtidas por meio de anamnese clássica, seguida pela realização de exame físico completo e eletrocardiograma no dia da consulta. A pressão arterial foi medida no braço direito, com o paciente sentado e tranqüilo, em três vezes consecutivas, com intervalos de 5 minutos. O peso foi determinado com roupas leves, sem sapatos, utilizando balança mecânica Filizola modelo 31 e a altura mensurada com um antropômetro de 1,92 m. O índice de massa corpórea foi calculado com base na fórmula: peso dividido pelo quadrado da altura. (ENGELAND et al., 2003).

#### **4.2 Avaliação laboratorial**

A coleta sanguínea foi realizada por punção da veia antecubital, entre 8 h e 9:30 h, após 10 minutos de repouso em posição sentada. Ao todo foram colhidos 4 tubos de sangue periférico, sendo 2 com anticoagulante EDTA de 3,5 mL, um de 5mL contendo Citrato de sódio, e um de 10 mL para os ensaios hematológicos, extração do DNA, coagulação sanguínea e para dosagens bioquímicas respectivamente. Todos os participantes encontravam-se em jejum de 10 a 12 h, período no qual os fumantes foram orientados a não fumar e não ingerirem bebidas alcoólicas até 24 h antes.

#### **4.3. Perfil Bioquímico e hematológico**

Foram analisadas as seguintes variáveis sanguíneas: glicose, uréia/creatinina, hemograma completo com plaquetas, ácido úrico, proteína C reativa, T3, T4, TSH, fibrinogênio, e PAI-1 e perfil lipídico (colesterol total e frações, triglicérides e apoliproteína A1 e B).

A contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas, dosagem de hemoglobina, cálculo do hematócrito, índices hematimétricos, percentual de linfócitos e valor absoluto de linfócitos foram realizadas por métodos automatizados, com leitura no aparelho Counter modelo T.890. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por método manual, através da leitura de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Romanowsky, com corantes May-Grunwald e Giemsa. O ácido úrico, glicose, colesterol (CHOD-PAP), triglicérides (GPO-PAP), HDL-colesterol (HDL-CPLUS) foram determinados pelo método enzimático, automatizado com analisador tipo Hitachi 912 (Roche Diagnostic). As concentrações séricas de colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) e de LDL-c foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). A fórmula só foi aplicável quando o valor de triglicérides fosse menor que 400 mg/dl. Nos casos de triglicérides acima de 400 mg/dl, o LDL foi obtido pelo método do anti-soro policlonal enzimático. As dosagens de apo A1 (apoproteína A1) e apo B (apoproteína B) foram realizadas por métodos imunoturbidimétricos automatizados, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912 (Japão).

Após a colheita da amostra com citrato, o plasma foi separado por centrifugação a 3000 rpm, por 20 min e uma alíquota foi mantida a -20 graus Celsius, para posterior determinação da concentração plasmática do PAI-1. As concentrações de PAI-1 e PCR ultra sensível foram determinadas pelo método imuno-enzimático ELISA (Spectrolyse PAI-1, Biopool, Umea, Sweden), de acordo com o protocolo de instrução fornecido pela empresa. As determinações do fibrinogênio foram realizadas por método de fotometria, protocolado para o aparelho Electra-modelo 1400C.

#### 4.4 Extração e análise de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação salina desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR et al., 1998). Resumidamente, 0,3 mL das amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram acrescentadas de 1 mL de tampão Tris-1 [Tris-HCl a 10mM (pH 8,0), KCl a 10mM; MgCl<sub>2</sub> a 10mM e EDTA a 2mM] adicionado de Triton X-100 a 2,5% para a lise das hemácias. A seguir centrifugadas a 12 k rpm por 10 minutos e o precipitado lavado por 3 vezes para remoção de Hemoglobina. Os núcleos celulares foram lisados com 1mL de tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10mM, pH 8,0, KCl a 10mM, MgCl<sub>2</sub> a 10mM, EDTA a 2mM pH 8,0 e NaCl 0,4M) adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, seguida da adição de NaCl 5 M homogeneizado e centrifugada durante 5 min a 12000 rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5 min a 12000 rpm, lavado com etanol 70% e ressuspenso em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10mM e EDTA 1mM (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60 mA, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo,

SP). Como referência foi utilizada um marcador de tamanho molecular de DNA de 1000 bp (1Kb) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm utilizando espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 (Beckman, Fullerton, CA, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação  $A_{260nm}/A_{280nm}$  (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

#### **4.5. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

Foram avaliados os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) C260T do gene *CD14*, G2258A. éxon 4 (Arg753Gln), do gene *TLR2*, Asp299Gli (A896G. éxon 2) e Thr399Ile (C1197T, éxon 2) do gene *TLR4* e -174GC do gene *IL6*. A nomenclatura dessas regiões polimórficas está de acordo com a seqüência disponível [número de acesso NM 001040021 (*CD14*), NM 0006 (*IL6*) NM003264 (*TLR2*) e NM\_138554 (*TLR4*)] no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

As regiões polimórficas foram amplificadas pela PCR e os produtos gerados foram utilizados em ensaios de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP).

Os iniciadores foram escolhidos com auxílio do programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA). Para essa finalidade,

utilizou-se a seqüência disponível citada acima. No Quadro 1, estão descritos os iniciadores utilizados na PCR-RFLP.

Quadro 1 – Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR

Polimorfismo	Métodos	Seqüências dos Iniciadores	Tamanho do Produto de PCR
Arg753 (G+2258 <sup>A</sup> )	PCR-RFLP	S 5'GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCGAAG 3' AS 5'CTTCTGAAAAAGCATTCCCACC 3'	243 bp
Thr399Ile (C+1197T)	PCR-RFLP	S 5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGTCA 3' AS 5'AGGAAGTTTTCTGGAAAGAATTGCCAGC 3'	299 bp
Arg753Gln (G+2258A)	PCR-RFLP	S 5'ATGCTGCCATTCTCATTCTTCTGCAGC 3' AS 5'CAGCACCCAGACAAAATTTGAAGTTT3	329 bp
-274G/C <i>IL6</i>	PCR-RFLP	S 5' AGCCTCAATGACGACCTAAGC C 3' AS 5' AATGAGCCTCAGACATCTCCAGT 3'	226pb
-260 C/T <i>CD14</i>	PCR-RFLP	S 5' AACCTAATTCTACCCCCCTTGG 3' AS 5' TCAGAGGCAGCCGAAGAGTT 3'	778pb

As PCR foram otimizadas a partir de um protocolo básico. Inicialmente, mantiveram-se constantes as concentrações dos componentes da reação e o número de ciclos (30 ciclos), e variou-se a temperatura de hibridização dos iniciadores.

A PCR foram utilizados 50 ng de DNA genômico, 200 nmoles/L de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), deoxinucleotídeos (dNTPs), 200 µmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 0,5 a 1 U DNA polimerase e tampão de PCR [Tris-HCl a 75mM (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub> a 2mM, KCl a 50mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20mM] (Biotools, Madrid, Espanha) em um volume final de 25 µL.

As PCR foram realizadas utilizando-se termociclador PTC-200 (M&J Research, Watertown, EUA), sob as seguintes condições: etapa inicial a 95°C por 3min; amplificação por 30 ciclos a 95°C por 1min, variação de temperatura de desnaturação característica de cada SNP por 1min e 72°C por 1min; etapa final a 72°C por 10min. As variações de temperatura de hibridação dos ensaios para cada polimorfismo foram: polimorfismo Arg753Gln (G+2258A) 57, 59, 61.3, 62, 64.4°C, polimorfismo Asp299Gli (A+896G) 51, 53, 55, 57, 59 °C, polimorfismo Thr399Ile (C+1197T) 54, 56.7, 58.6, 61.4, 62.7, 64.8 °C, polimorfismo -174G/C 51, 53, 55, 57 e 59°C e para o polimorfismo -260C/T 52, 54, 56, 58 e 60°C. Para todos os polimorfismos foram escolhidas as temperaturas mais elevadas, pois assim evitasse a formação de produtos inespecíficos. O tamanho dos produtos gerados foi apresentado na Quadro 1.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X e analisados conforme descrito no item 3.3.4. Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

#### **4.6. Avaliação dos polimorfismos pela RFLP**

Os genótipo dos SNPs Arg753Gln (G+2258A) do gene TLR2, Asp299Gli (A+896G), Thr399Ile (C+1197T) do gene TLR4, -174G/C do gene IL6 e -260C/T do gene CD14 foram identificados pela RFLP. Os ensaios de digestão enzimática foram realizados por 3h, em banho de água (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37°C com volume final de reação de 10-20 µL.

Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de poli-acrilamida a 8%, em TBE 1X [(Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2

mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), utilizando o sistema de eletroforese vertical v16-2 (Life Technologies, Gaithersburg, MD). A eletroforese foi realizada com a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP) a 120V, 16mA durante 4 horas. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 50 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para identificar os tamanhos dos fragmentos formados pela restrição enzimática. O gel foi, posteriormente, imerso em solução com brometo de etídio a 10mg/dL (Sigma, St. Louis, IL, EUA) e documentado por meio de sistema de digitalização de imagem (HP Scan Jet 3400C, Hewlett-Packard®, Hong Kong, China).

Digeriu-se o produto da PCR do polimorfismo -260CT *CD14* com enzima *NlaIII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) a 37°C, originando os fragmentos conforme representado na Figura 5. Para o SNP Arg753Gln (G+2258A) foi realizada a digestão com 1 U da enzima *PstI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), a 37°C, gerando fragmentos com tamanhos de 245 e 295bp (Figura 6). Para os produtos da PCR do SNP Thr399Ile (C+1197T), a digestão enzimática foi realizada com 1U da enzima *HincII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) a 37°C e os fragmentos gerados estão representados na figura 7 e os produtos da PCR do SNP Asp299Gli (A+896G) foram digeridos com 1 U da enzima *MboII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) a 37°C, originando os fragmentos de 39 e 204bp conforme o esquema representado na Quadro 2 e mostrado na Figura 8.

Para os produtos gerados pela PCR do SNP -174GC *IL6*, a reação de digestão enzimática realizada foi com 3U da enzima *HaeIII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) a 37°C e os fragmentos gerados estão representado na Figura



9. Na Quadro 2 são apresentados os tamanhos dos fragmentos gerados pela restrição para os SNPs descritos.

Quadro 2 – Fragmentos dos produtos de restrição.

Polimorfismo	Homozigoto comum	Heterozigoto	Homozigoto polimórfico	Produto de PCR íntegro
Arg753 (G+2258A)	131bp	183pb/131pb	183bp	295pb*
Asp299Gli (A+896G)	204bp	39bp/204bp	243bp	243pb**
Thr399Ile (C+1197T)	270bp	270pb/29pb	299bp	299pb***
-274G/C <i>IL6</i>	62pb/164pb	53/62/111/164pb	53/62/111pb	226pb****
-260 C/T <i>CD14</i>	214/282pb	127/155/214/282pb	127/155/214pb	778pb*****

(\*) Digestão enzimática com *PstI*

(\*\*\*\*) Digestão enzimática com *NlaIII*

(\*\*) Digestão enzimática com *MbolI*

(\*\*\*\*) Digestão enzimática com *HaeIII*

(\*\*\*) Digestão enzimática com *HincII*



Figura 5. Fotografia do gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição para o SNP -260CT *CD14*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linhas 2, 5-6 genótipo CC; Linha 3 genótipo CT e Linhas 4 e 8 genótipo TT.

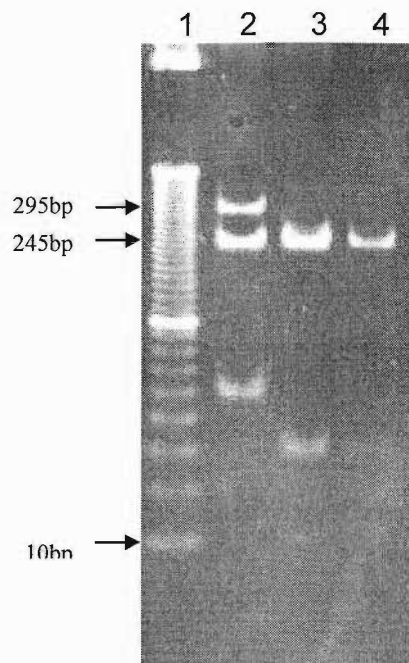


Figura 6. Fotografia do gel de Eletroforese em poliacrilamida a 8% a 125 V por 3h e 30 min. de produtos de restrição do polimorfismo Asp299Gln do gene *TLR4*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp; linhas 2 a 4: produtos de restrição com *MbolI*, amostras dos pacientes.

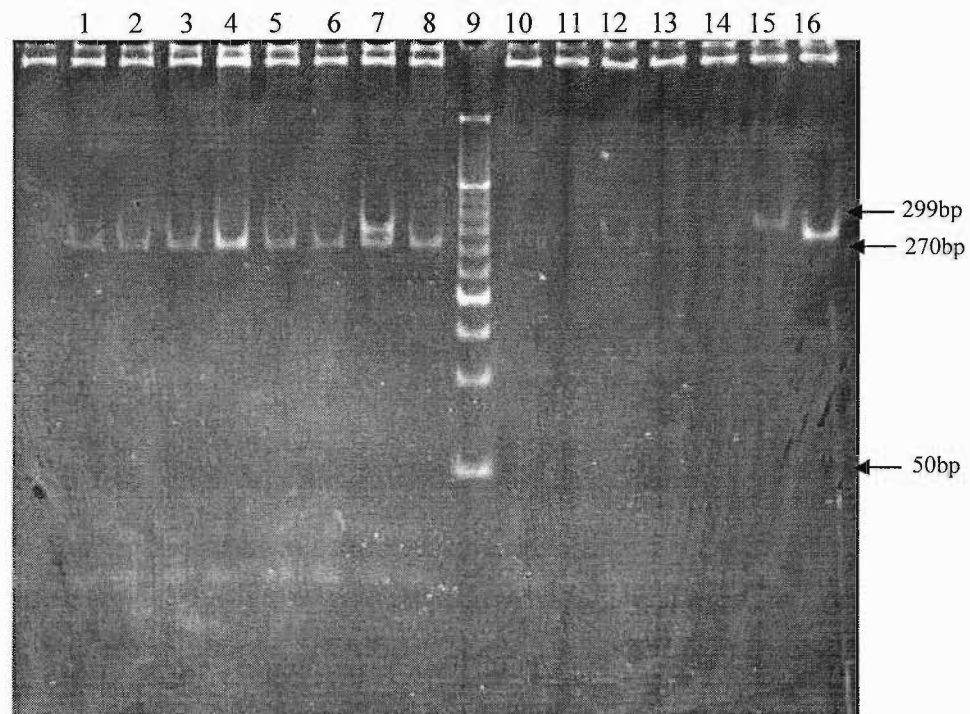


Figura 7. Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídio, dos produtos de restrição do SNP Thr399Ile (C+1197T) do gene *TLR4*. Linha 9: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp. Linhas 2 e 7; 13 a 15 e 17: genótipo CC. Linha 8: genótipo CT. Linha 16: genótipo TT.

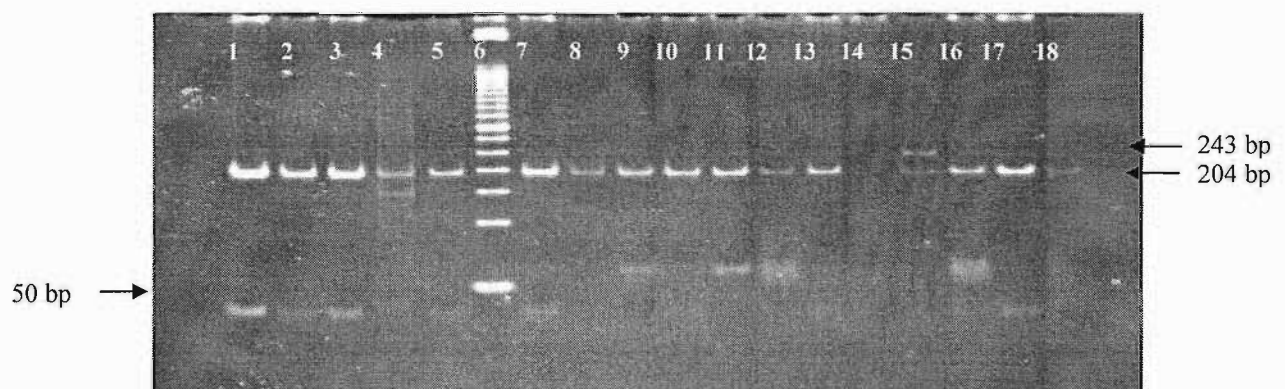


Figura 8. Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição do SNP Asp299Gln (A+896G) do gene *TLR4*. Linha 6: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp. Linhas 1 a 5; 7 a 13 e 16 a 18: genótipo AA. Linha 15: genótipo GA.

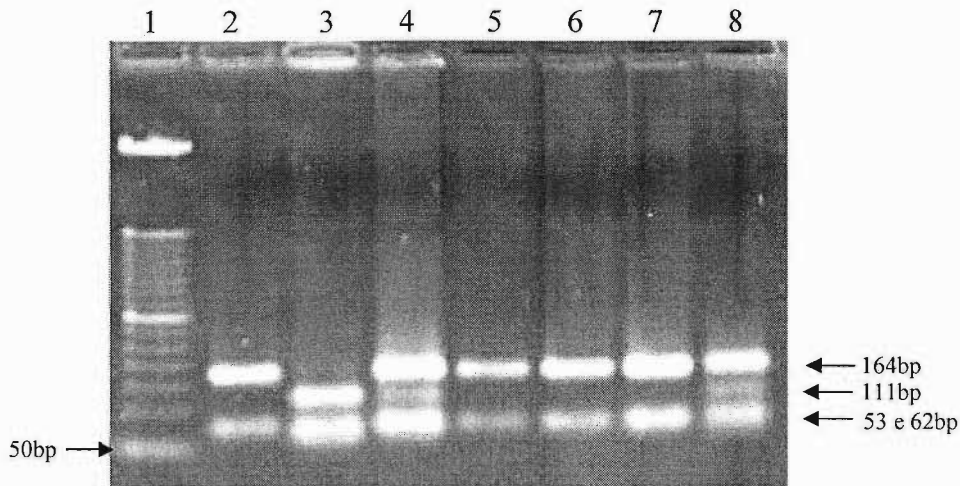


Figura 9. Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição para o SNP -174GC /*IL6*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp. Linhas 2, 5-7 genótipo GG; Linhas 4 e 8 genótipo CC e Linha 3 genótipo GC.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa SigmaStat v.2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Para determinação do tipo de simetria das variáveis quantitativas contínuas foi realizado o teste de simetria de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis com distribuição assimétrica foram utilizados testes não paramétricos, o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar as tendências centrais de duas amostras e o teste de Kruskal-Wallis para comparar mais de duas populações quanto a tendência central dos dados. Para as variáveis com distribuição simétrica foram utilizados testes paramétricos. Estes testes foram utilizados para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos

estudados e avaliar o efeito dos polimorfismos genéticos sobre os testes parâmetros (teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney e teste t de Student). No caso de comparação entre três grupos haplotipos utilizou-se os testes *One Way* ANOVA (variáveis simétricas) e teste de Kruskal-Wallis (variáveis assimétricas). Para comparação múltipla após as análises de variância foram utilizados o teste de Turkey (paramétrico) ou o teste de Dunn (Não paramétrico). Variáveis categóricas foram comparadas por  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) ou Teste Exato de Fisher.

Para as análises, os indivíduos negros foram agrupados com os indivíduos pardos a fim de aumentar o poder estatístico dos testes. Para a mesma finalidade, os genótipos heterozigotos foram agrupados com o genótipo raro para os polimorfismos Asp299Gln e Thr399Ile do gene *TLR4*. A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada usando o programa MS-DOS QBasic V. 1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil). O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados dos indivíduos do estudo

Foram incluídos 210 indivíduos, sendo 102 pacientes com infarto do miocárdio (IAM) e 108 indivíduos controles (C). As idades dos indivíduos do grupo IAM variou entre 17 e 45 anos, média  $34,5 \pm 5$  anos e dos indivíduos do grupo C a idade variou entre 17 e 49 anos, média  $35,1 \pm 8,7$  anos. A distribuição entre os grupos estudados de acordo com a faixa etária foi estatisticamente significativa ( $p = 0,032$ ), Tabela 1.

No grupo IAM, 67 pacientes (67,2%) eram do sexo masculino e no grupo controle 78 indivíduos (73,6%) eram do mesmo sexo e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos,  $p=0,23$ . Em relação à cor, 67 pacientes (65,6%) do grupo IAM eram brancos e 68 indivíduos (65,9%) do grupo controle eram da mesma cor. Pacientes de outras raças corresponderam a 33,8% no grupo IAM e a 28,4% no grupo controle, também não houve diferença significativa entre os grupos estudados,  $p=0,65$ . As distribuições dos pacientes no grupo IAM e no grupo C de acordo com o sexo e com a cor encontra-se no Tabela 2.

**Tabela 1** – Distribuição dos pacientes de acordo com faixas etárias.

Condição	IDADE (Anos)			Total
	$\leq 30$	31-35	$\geq 36$	
IAM	16	30	54	100
C	29	18	50	97
$\chi^2=6,95$ (2gl, $p=0,032^*$ )				

Nota: O valor é indicação da quantidade de indivíduos. Teste de distribuição  $\chi^2$  quadrado\*

**Tabela 2** – Dados demográficos dos grupos de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles (C).

Condição	SEXO			COR		
	Masculino	Feminino	Total	Branco	Outras	Total
IAM	67	35	102	67	31	98
C	78	28	106	68	26	94
	$\chi^2=1,53$ (1gl, p=0,23*)			$\chi^2=0,36$ (gl=1, p=0,65*)		

Nota: O valor é indicação da quantidade de indivíduos. Teste de distribuição  $\chi^2$  quadrado\*

### 6.1.1 Hábitos e qualidade de vida

O grupo de indivíduos controles era formado por indivíduos com prática regular de atividade física (no mínimo 5 vezes por semana com 1 h de duração) e que apresentavam um menor consumo de bebida alcoólica (frequência maior que 2 vezes por semana) que o grupo IAM. O resultado da pesquisa sobre a auto-avaliação da presença de estresse mostrou um contingente maior de “estressados” no grupo IAM (Tabela 3).

**Tabela 3** – Hábitos e qualidade de vida nos grupos de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e indivíduos controles (C).

Condição	Atividade Física			Consumo de bebida alcoólica			Estresse		
	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total
IAM	35	66	101	36	64	100	73	28	101
C	93	7	100	19	77	96	71	29	100
	$\chi^2=82,32$ (gl=1, p<0,001*)			$\chi^2=6,46$ (gl=1, p=0,016*)			$\chi^2=0,04$ (gl=1, p=0,91*)		

Nota: O valor é indicação da quantidade de indivíduos. Teste de distribuição  $\chi^2$ -quadrado\*

### 6.1.2. Fatores de risco

Os pacientes do grupo IAM, em geral, apresentaram fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de doença aterosclerótica. No grupo IAM, o tabagismo esteve presente em 83% dos casos, hipertensão arterial em 52,0%, obesidade em 28,7% e diabetes melito em 13,7%.

Os integrantes do grupo controles apresentaram baixa incidência de fatores de risco, a saber: obesidade 7,2%, tabagismo 7,0%, hipertensão arterial, 1,0%, diabetes melito 0%. Os pacientes do grupo IAM apresentaram peso maior e estatura menor em relação ao grupo C ( $p=0,01$  e  $p<0,001$ , respectivamente) e IMC diferente estatisticamente entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Figura 4.

**Tabela 4** – Fatores de risco nos grupos de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e no grupo controles (C).

Condição	Tabagismo			Hipertensão			IMC			
	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	<25	25-29	>=30	Total
IAM	83	17	100	52	48	100	21	41	25	87
C	7	89	96	1	96	97	49	28	6	83
	$\chi^2=129,09$ (1gl, $p<0,001^*$ )			$\chi^2=79,81$ (1gl, $p<0,001^*$ )			$\chi^2=26,4$ (1gl, $p<0,001^*$ )			

Nota: O valor é indicação da quantidade de indivíduos. Teste de distribuição  $\chi^2$ quadrado\*

### 6.1.3 Parâmetros Bioquímicos e hematológicos.

Em relação à quantidade de hemácias, os pacientes do grupo IAM ( $4,95\pm 0,54$ ) apresentaram maior quantidade em relação ao grupo controle ( $4,80\pm 0,38$ ),  $p=0,038$ .

Em relação ao perfil inflamatório, as concentrações de fibrinogênio tiveram diferença significativa entre os grupos, sendo que os pacientes do grupo IAM



apresentaram maior concentração em relação ao grupo Controle,  $p < 0,0001$ . O mesmo foi evidenciado em relação à concentração de PAI-1 ( $p < 0,0001$ ), quantidade de leucócitos ( $p = 0,0004$ ) e quantidade de plaquetas = 0.0104. Em relação à proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) não houve diferença significativa entre os dois grupos estudados.

Em relação aos lípidos, os pacientes do grupo IAM apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol total maiores que as dos indivíduos do grupo controle,  $p < 0,001$ . As concentrações plasmáticas de LDL-c, VLDLc e triglicérides foram maiores no grupo IAM em relação ao grupo controle,  $p = 0.0005$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$  respectivamente. As concentrações plasmáticas de HDL-c e Apo A1 foram menores no grupo IAM em relação ao grupo Controle ( $p < 0,001$ ).

Os pacientes do grupo IAM apresentaram maiores valores de glicemia de jejum em relação ao grupo controle  $p = 0,0013$ .

**Tabela 5** – Valor médio de hemácias dos grupos de IAM e do grupo controles (C).

	Grupos		$p^*$
	IAM	Controle	
Hemácias (milhões/ml)	4,95±0,54	4,80±0,38	= 0,038

Nota: Valores são apresentados como media  $\pm$  DP dos dados. Teste-*t* de Student\*.

**Tabela 6** – Dados bioquímicos e hematológicos dos grupos de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e indivíduos controles (C).

	Grupos		<i>P</i> *
	Paciente	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	314 (299-330)	259 (248-276)	< 0,0001
PAI-1 (ng/mL)	18,7 (13,2-20,8)	6,5 (4,7-7,2)	< 0,0001
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mL)	6,7 (6,5-7,5)	6,1 (5,6-6,5)	= 0,0004
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	250 (230-272)	225 (218-243)	= 0,0104
Colesterol total (mg/dL)	199 (193-203)	177 (172-190)	= 0,0002
HDL (mg/dL)	43 (40-45)	53 (52-58)	< 0,0001
LDL (mg/dL)	127 (117-132)	106 (95-114)	= 0,0005
VLDL (mg/dL)	28 (23-32)	16 (15-18)	< 0,0001
Triglicérides (mg/dL)	146 (126-175)	79 (74-93)	< 0,0001
Glicemia (mg/dL)	95 (93-99)	91 (88-93)	= 0,0013
ApoA1 (mg/dL)	127 (118-131)	146 (139-151)	< 0,0001
ApoB (mg/dL)	106 (97-112)	84 (77-91)	< 0,0001

Nota: Valores são apresentados como mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney\*

**Tabela 7** - Concentração de PCRus dos grupos IAM e do grupo controles (C).

	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
PCRus (mg/dL)	0,2 (0,1-0,3)	0,1 (0,1-0,2)	= 0,352

Nota: Valores são apresentados como mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney\*

## 6.2 Frequências genóticas dos polimorfismos

As frequências dos genótipos dos polimorfismos -174G/C *IL-6*, -260C/T *CD14*, Asp299Gln *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2* nos grupos IAM e Controles podem ser observados na Figura 8.

O polimorfismo -174G/C *IL-6* teve a seguinte distribuição genotípica no grupo IAM: 44,41% dos pacientes tiveram o genótipo GG, 34,12% tiveram o genótipo GC e 21,18% o genótipo CC e no grupo Controle: 51,09% tiveram o genótipo GG, 30,43% tiveram o genótipo GC e 18,48% com o genótipo CC, essa distribuição não teve diferença significativa entre os grupos estudados,  $p=0,69$ . O polimorfismo -260C/T *CD14* teve a seguinte distribuição genotípica no grupo IAM: 28,77% tiveram o genótipo CC, 46,58% tiveram o genótipo CT e 24,66% com o genótipo TT e no grupo Controle: 31,82% tiveram o genótipo CC, 48,86% tiveram o genótipo CT e 19,32% com o genótipo TT, essa distribuição também não teve diferença significativa entre os grupos estudados,  $p=0,70$ .

Para o polimorfismo Asp299Gln (A+896G) *TLR4* as distribuições genóticas observadas no grupo IAM foi: 92,63% dos pacientes tiveram o genótipo AA e 7,37% tiveram o genótipo AG ou GG e no grupo Controle: 97,80% tiveram o genótipo AA e 2,20% tiveram o genótipo AG ou GG, essa distribuição entre os grupos estudados não teve diferença significativa,  $p=0,52$ . As distribuições genóticas observadas no grupo IAM para o polimorfismo Thr399Ile (C+1197T) *TLR4* foi: 93,75% dos pacientes tiveram o genótipo CC e 6,25% tiveram o genótipo CT ou TT e no grupo Controle: 96,15% tiveram o genótipo CC e 3,85% tiveram o genótipo CT ou TT, essa distribuição entre os grupos

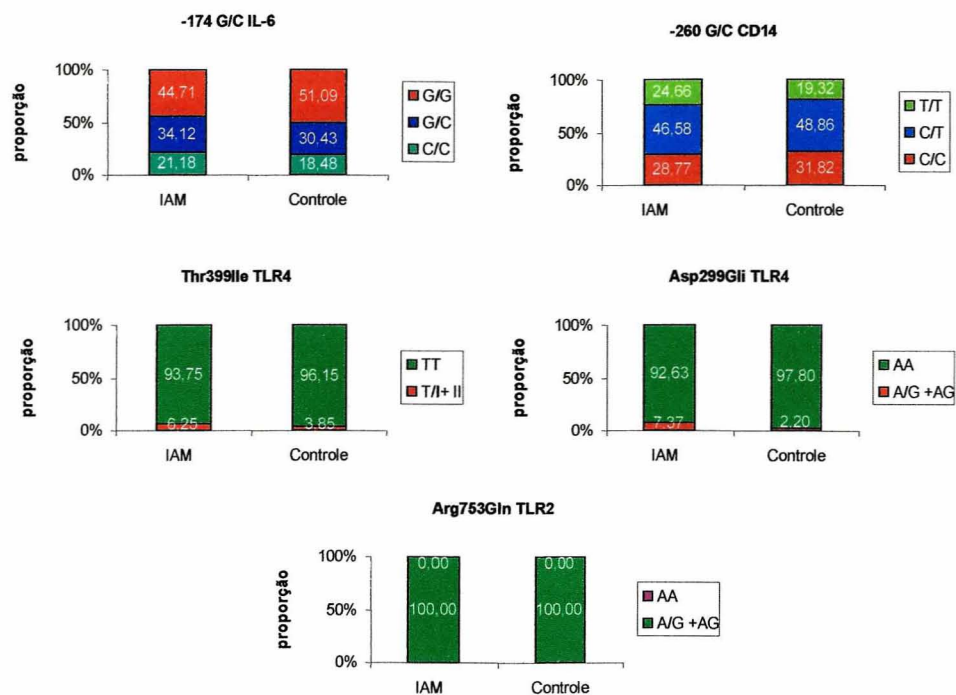
estudados não teve diferença significativa,  $p=0,17$ . Não foi observada nenhuma frequência do genótipo GA ou AA do polimorfismo Arg753Gln nos grupos estudados.

A frequência genotípica dos polimorfismos em relação ao sexo, idade, cor, aos hábitos, qualidade de vida e aos fatores de riscos para doenças cardiovasculares estão apresentados a seguir: Ao analisar o polimorfismo -174G/C *IL-6* de todas as comparações de proporções entre os grupos apenas em relação à quantidade dos indivíduos que se consideraram estressados que houve diferença significativa ( $p=0,035$ ), pois houve uma maior quantidade (24) de pacientes do grupo IAM com o genótipo G/C estressados do que no grupo controle (12),  $p=0,003$ . Para o polimorfismo -260C/T *CD14* houve diferença significativa entre os grupos estudados quando comparado o número de indivíduos do grupo IAM pelo do grupo Controle em relação ao IMC (maior ou maior igual a 25 kg/m<sup>2</sup>),  $p=0,006$ , pois houve uma maior quantidade (12) de pacientes do grupo IAM com o genótipo T/T que estavam com sobrepeso (acima de 25 kg/m<sup>2</sup>), do que no grupo controle (3),  $p=0,004$ .

Ao analisar o polimorfismo Asp299Gln (A+896G) de todas as comparações de proporções entre os grupos apenas em relação à quantidade dos indivíduos que se consideraram estressados que houve diferença significativa ( $p<0,0001$ ), pois houve uma maior quantidade (66) de pacientes do grupo IAM com o genótipo G/C estressados do que no grupo controle (36),  $p<0,0001$ . Para o SNP Thr399Ile (C+1197T) houve diferença significativa entre os grupos estudados quando comparado o número de indivíduos do grupo IAM pelo do grupo CT em relação ao IMC (maior ou maior igual a 25 kg/m<sup>2</sup>),  $p=0,0001$ , pois houve uma maior

quantidade (64) de pacientes do grupo IAM com o genótipo T/T que estavam com sobrepeso (acima de 25 kg/m<sup>2</sup>), do que no grupo controle (32),  $p < 0,0001$ . Também houve diferença significativa entre os grupos estudados em relação ao hábito de praticar exercício,  $p < 0,0001$ , pois houve uma maior quantidade (63) de pacientes do grupo IAM com o genótipo T/T que praticavam exercício do que no grupo controle (7),  $p = 0,0001$ .

**Figura 10** – Distribuição da frequência genotípica dos SNPs -174G/C *IL-6*, -260C/T *CD14*, Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gln *TLR4* e Thr399Ile *TLR4*, de IAM e controle.



Todos SNPs apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos estudados Tabela 8.

**Tabela 8 –** Equilíbrio de Hardy-weinberg para os polimorfismos estudados.

	Grupos	
	IAM	Controle
-174 G/C <i>IL6</i>	p>0,05	p>0,05
-260 C/T <i>CD14</i>	p>0,05	p>0,05
Asp299Gln (A896G)	p>0,05	p>0,05
Thr399Ile (C1197T)	p>0,05	p>0,05
Arg753Gln (G2258)	p>0,05	p>0,05

### 6.3. Análise comparativa entre haplótipos dos polimorfismos

Ao analisar as interações entre os haplótipos dos polimorfismos estudados (-174G/C *IL-6*, -260C/T *CD14*, Asp299Gln *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2*) não se verificou associação entre todos outros haplótipos formados dos polimorfismos quando comparado entre eles (p>0,05).

### 6.4. Influência dos polimorfismos sobre o perfil inflamatório e hematológico

Concentrações de alguns marcadores inflamatórios dos indivíduos incluídos nos grupos IAM e controle foram comparados entre os grupos estudados de acordo com o genótipo.

#### 6.4.1 Polimorfismo -174G/C *IL-6*

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de fibrinogênio, PAI1 e as quantidades de leucócitos e hemácias tiveram diferença significativa entre os pacientes e indivíduos controles,  $p=0,0002$ ,  $p<0,0001$ ,  $p=0,0068$  e  $p=0,024$ , respectivamente. Quando comparado entre os mesmos genótipos observou-se que pacientes com o genótipo -174GG tiveram maiores concentrações de fibrinogênio ( $p<0,05$ ) e maiores concentrações de PAI-1 ( $p<0,0001$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 9. Pacientes com o genótipo -174GC tiveram maiores quantidades de hemácias ( $p=0,02$ ), Tabela 10. E, pacientes com o genótipo -174CC tiveram maiores concentrações de fibrinogênio ( $p<0,01$ ), maiores concentrações de PAI-1 ( $p<0,01$ ) e maiores quantidade de leucócitos ( $p<0,05$ ), Tabela 11.

**Tabela 9** – Efeito do genótipo GG do SNP -174G/C *IL-6* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.

Genótipo GG	Grupos		$p^*$
	IAM	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	299 (273-328)	257 (228-276)	< 0,05
PAI-1 (ng/mL)	20,47 (12,86-26,44)	5,39 (3,32-6,58)	< 0,001

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

**Tabela 10** – Efeito do genótipo GC do SNP -174G/C *IL-6* nos valores de hemácias entre os grupos estudados.

Genótipo GC	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
Hemácias (milhões/ml)	5,00±0,71	4,70±0,36	= 0,02

Nota: Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Teste-*t* de Student\*.

**Tabela 11** – Efeito do genótipo CC do SNP -174G/C *IL-6* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados

Genótipo CC	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	326 (268-380)	249,5 (209-280)	< 0,01
PAI-1 (ng/mL)	19,46 (9,54-24,42)	4,67 (3,13-7,83)	< 0,01
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mL)	6,6 (6,3-8,8)	5,3 (3,7-6,3)	< 0,05

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

#### 6.4.2. Polimorfismo -260 C/T CD14

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de fibrinogênio, PAI1 e as quantidades de leucócitos e plaquetas tiveram diferença significativa entre os IAM e os indivíduos controles,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,03$  e  $p = 0,005$ , respectivamente. A comparação entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo -260CC tiveram maiores concentrações de fibrinogênio ( $p < 0,05$ ), maiores concentrações de PAI-1 ( $p < 0,0001$ ) e maiores quantidade de leucócitos ( $p < 0,05$ ) e plaquetas ( $p < 0,01$ ), Tabela 12. IAM com o genótipo -174CT tiveram maiores concentrações de fibrinogênio



( $p < 0,05$ ) e maiores concentrações de PAI-1 ( $p < 0,01$ ), Tabela 13. IAM com o genótipo -174TT tiveram maiores concentrações de PAI-1 ( $p < 0,01$ ), Tabela 14.

**Tabela 12** – Efeito do genótipo CC do SNP -269CT *CD14* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.

Genótipo CC	Grupos		<i>P</i> *
	IAM	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	299 (265-345)	261,5 (227-280)	< 0,05
PAI-1 (ng/mL)	17,97 (12,86-24,42)	5,55 (3,27-7,53)	< 0,001
Leucócitos ( $10^3$ /mL)	6,7 (6,3-7,9)	5,8 (5,3-6,7)	< 0,05
Plaquetas ( $10^3$ / $\mu$ L)	297 (227-355)	219,5 (196-249)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

**Tabela 13** – Efeito do genótipo CT do SNP -269CT *CD14* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.

Genótipo CT	Grupos		<i>P</i> *
	IAM	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	304,5 (245-357)	248 (220-268)	< 0,01
PAI-1 (ng/mL)	14,63 (8,81-22,82)	7,03 (4,16-10,14)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

**Tabela 14** – Efeito do genótipo TT do SNP -269CT *CD14* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.

Genótipo TT	Grupos		P*
	IAM	Controle	
PAI-1 (ng/mL)	11,24 (7,68-24,54)	4,70 (2,82-6,51)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

#### 6.4.3 Polimorfismo Asp299Gln (A+896G)

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de fibrinogênio, PAI1 e as quantidades de leucócitos e plaquetas tiveram diferença significativa entre os grupos IAM e o grupo controle,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,004$  e  $p = 0,008$ , respectivamente. A comparação entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo AA tiveram maiores concentrações de fibrinogênio ( $p < 0,001$ ), maiores concentrações de PAI-1 ( $p < 0,001$ ) e maiores quantidades de leucócitos ( $p < 0,01$ ) e plaquetas ( $p < 0,01$ ), Tabela 15, Não sendo evidenciada nenhuma associação em relação aos portadores do genótipo AG+GG.

**Tabela 15** – Efeito do genótipo AA do SNP Asp299Gli *TLR4* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.

Genótipo A/A	Grupos		P*
	IAM	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	312,50 (275-340)	259,00 (230-275)	< 0,0001
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	314,0 (264-353)	257,5 (219-283)	< 0,01
PAI-1 (ng/mL)	18,80 (13,20-24,02)	6,51,3,88-8,53)	< 0,0001
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mL)	6,75 (6,25-7,24)	6,10 (5,3-6,34)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

#### 6.4.4. Polimorfismo Thr399Ile (C1197T)

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de fibrinogênio, PAI1 e as quantidades de leucócitos tiveram diferença significativa entre os pacientes e os indivíduos controles,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  e  $p = 0,004$ , respectivamente. A comparação entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo TT tiveram maiores concentrações de fibrinogênio ( $p < 0,001$ ), maiores concentrações de PAI-1 ( $p < 0,001$ ) e maiores quantidade de leucócitos ( $p < 0,01$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 16, Não sendo evidenciada nenhuma associação em relação aos portadores do genótipo TI+II.

**Tabela 16** – Efeito do genótipo TT do SNP Thr399Ile *TLR4* no perfil sérico inflamatório entre os grupos estudados.

Genótipo TT	Grupos		P*
	IAM	Controle	
Fibrinogênio (mg/dL)	312,50 (275-340)	259,00 (230-275)	< 0,0001
PAI-1 (ng/mL)	18,34 (13,80-24,02)	6,49 (3,27-8,53)	< 0,0001
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mL)	6,7 (6,2-7,5)	6,1 (5,3-6,8)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

### 6.5. Influência dos polimorfismos sobre o perfil lipídico.

Concentrações de alguns marcadores lipídicos foram comparados entre os grupos estudados de acordo com o genótipo.

#### 6.5.1 Polimorfismo -174G/C *IL-6*

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de colesterol total, HDL, LDL, ApoA, ApoB e Glicose tiveram diferença significativa entre os IAM e indivíduos controles,  $p=0,004$ ,  $p<0,0001$ ,  $p=0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  e  $p<0,001$ , respectivamente. Quando comparado entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo GG tiveram menores concentrações de HDL ( $p<0,01$ ) e ApoA1 ( $p<0,05$ ) e maiores concentrações de ApoB ( $p<0,01$ ) e Glicose ( $p<0,05$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 17. E, pacientes com o genótipo CC tiveram menores concentrações de HDL ( $p<0,0001$ ) e ApoA1 ( $p<0,0001$ ) e maiores concentrações de colesterol total ( $p<0,05$ ), LDL ( $p<0,05$ ) e ApoB ( $p<0,01$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 18.

**Tabela 17** - Efeito do genótipo GG do SNP -174G/C *IL-6* no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo GG	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
Glicemia (mg/dL)	95 (93-99)	92 (87-94)	< 0,05
ApoA1 (mg/dL)	131 (120-134)	146 (136-158)	< 0,05
ApoB (mg/dL)	109 (94-119)	89 (77-97)	< 0,01
HDL (mg/dL)	43 (39-45)	53 (52-59)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

**Tabela 18** - Efeito do genótipo CC do SNP -174G/C *IL-6* no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo CC	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
Colesterol total (mg/dL)	215 (181-235)	173 (133-203)	< 0,05
HDL (mg/dL)	44 (37-50)	61 (49-71)	< 0,001
ApoA1 (mg/dL)	126,5 (105-132)	163 (135-175)	< 0,001
ApoB (mg/dL)	102,5 (96-118)	80 (56-87)	< 0,01
LDL (mg/dL)	136 (101-146)	94 (62-105)	< 0,05

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

### 6.5.2 Polimorfismo -260 C/T *CD14*

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de colesterol total, HDL, ApoA, ApoB e Glicose tiveram diferença significativa entre os IAM e controles,  $p=0,01$ ,  $p<0,0001$ ,  $p=0,005$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  e  $p=0,02$ , respectivamente. Quando

comparado entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo CC tiveram menores concentrações de HDL ( $p < 0,0001$ ) e ApoA1 ( $p < 0,0001$ ) e maiores concentrações de ApoB ( $p < 0,001$ ) e Glicose ( $p < 0,05$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 19, IAM portadores do genótipo CT tiveram maiores concentrações de colesterol total ( $p < 0,01$ ) e ApoB ( $p < 0,01$ ), Tabela 20. E, IAM portadores do genótipo TT tiveram menores concentrações de HDL ( $p < 0,01$ ) e ApoA1 ( $p < 0,01$ ), Tabela 21.

**Tabela 19** – Efeito do genótipo CC do SNP -269CT *CD14* no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo CC	Grupos		$p^*$
	IAM	Controle	
HDL (mg/dL)	43 (36-49)	57 (51-66)	< 0,001
Glicemia (mg/dL)	98 (93-109)	92,5 (86-95)	< 0,05
ApoA1 (mg/dL)	122 (107-134)	149 (143-164)	< 0,001
ApoB (mg/dL)	119 (98-133)	86 (76-96)	< 0,001

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

**Tabela 20** - Efeito do genótipo CT do SNP -269CT *CD14* no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo CT	Grupos		$p^*$
	IAM	Controle	
Colesterol total (mg/dL)	214 (188-245)	179,5 (159-203)	< 0,01
ApoB (mg/dL)	108 (91-118)	87 (78-99)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

**Tabela 21** - Efeito do genótipo TT do SNP -269CT *CD14* no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo TT	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
HDL (mg/dL)	39 (34-47)	52 (47-75)	< 0,01
ApoA1 (mg/dL)	110 (95-132)	132 (126-178)	< 0,01

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

### 6.5.3 Polimorfismo Asp299Gln (A+896G)

Dentre os marcadores estudados, as concentrações de HDL, LDL, VLDL, triglicérides, ApoA1 e glicose tiveram diferença significativa entre os IAM e controles,  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0025$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  e  $p = 0,004$ , respectivamente. Quando comparado entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo AA tiveram menores concentrações de HDL ( $p < 0,001$ ) e ApoA1 ( $p < 0,001$ ) e maiores concentrações de LDL ( $p < 0,01$ ), VLDL ( $p < 0,001$ ), triglicérides ( $p < 0,0001$ ) e glicose ( $p < 0,001$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 22.

**Tabela 22** – Efeito do genótipo AA do SNP Asp299Gli (A+896G) no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo AA	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
HDL (mg/dL)	43 (35-50)	53 (51-65)	< 0,001
LDL (mg/dL)	126,5 (117-132)	106 (95-114)	< 0,01
VLDL (mg/dL)	28 (23-32)	16 (15-18)	< 0,001
Triglicérides (mg/dL)	155,5 (126-175)	79 (74-93)	< 0,0001
ApoA1 (mg/dL)	127 (107-134)	147 (142-160)	< 0,001
Glicemia (mg/dL)	95 (93-109)	91 (86-95)	< 0,001

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

#### 6.5.4 Polimorfismo Thr399Ile (C1197T)

As concentrações de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicérides, ApoA1, ApoB e glicose tiveram diferença significativa entre os IAM e controles,  $p=0,001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p=0,0015$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$  e  $p=0,003$ , respectivamente. Quando comparado entre os mesmos genótipos observou-se que IAM com o genótipo TT tiveram menores concentrações de HDL ( $p<0,001$ ) e ApoA1 ( $p<0,001$ ) e maiores concentrações de colesterol total ( $p<0,001$ ), LDL ( $p<0,001$ ), VLDL ( $p<0,001$ ), apoB ( $p<0,001$ ), triglicérides ( $p<0,001$ ) e glicose ( $p<0,001$ ) em relação ao mesmo genótipo do grupo controle, Tabela 23.



**Tabela 23** – Efeito do genótipo TT do SNP Thr399Ile (C1197T) no perfil sérico lipídico entre os grupos estudados.

Genótipo TT	Grupos		<i>p</i> *
	IAM	Controle	
Colesterol total (mg/dL)	202 (175-232)	177,0 (152-198)	< 0,001
HDL (mg/dL)	43 (34-51)	53 (49-62)	< 0,001
LDL (mg/dL)	129 (115-132)	105 (97-112)	< 0,001
VLDL (mg/dL)	27 (22-35)	16 (13-18)	< 0,001
Triglicérides (mg/dL)	145 (123-172)	78 (72-90)	< 0,001
ApoA1 (mg/dL)	127 (107-134)	146 (143-159)	< 0,001
ApoB (mg/dL)	105 (90-115)	84 (78-95)	< 0,001
Glicemia (mg/dL)	95 (90-106)	90 (85-94)	< 0,001

Nota: Valores da mediana e intervalo de confiança: md (IC). Teste de comparação múltipla de Dunn's \*

## 7 – DISCUSSÃO

A escolha do grupo de estudo deste trabalho vem da argumentação que os fatores clássicos de risco para as doenças cardiovasculares influenciam de forma mais significantes na idade acima da escolhida, assim como do aumento de casos de enfartados jovens que tem crescido de forma significativa. Outro questionamento que nos levou a esta escolha foi o fato de que provavelmente fatores genéticos poderiam estar associados à ocorrência desta doença de forma mais precoce.

Houve uma maior proporção do sexo masculino (65,7%) no grupo IAM, sendo esta proporção comum na maioria das publicações sobre IAM em jovens (SOITIA et al., 2007; EUDA et al., 2007). Apesar da grande miscigenação racial existente em nosso país houve uma maior prevalência de brancos (68%) no grupo IAM.

## 7.1 Hábitos e fatores de riscos

Os hábitos dos indivíduos dos grupos estudados foram identificados através de um questionário e os resultados observados foram os esperados, pois os hábitos estão diretamente relacionados aos fatores de riscos clássicos do infarto do miocárdio (FRASER et al., 1992). Indivíduos que praticavam exercício físico foram mais freqüentes no grupo controle do que no grupo IAM, já em relação ao consumo de bebida alcoólica, pacientes do grupo IAM tiveram maior freqüência em relação ao grupo CT. O mesmo não foi observado para as pessoas que se consideravam estressadas, pois não houve diferença significativa entre os grupos.

Alguns fatores de riscos clássicos para o infarto do miocárdio foram estudados e, em relação ao tabagismo, houve uma freqüência de 83% no grupo IAM, sendo este resultado similar à observada na maioria dos estudos, pois o tabagismo é um dos principais fatores de riscos em adultos jovens (ADAMS et al., 2007; HURLE et al., 2007). Em relação à hipertensão arterial, foi observada uma freqüência de 52% de pacientes hipertensos no grupo IAM. Conti et al relataram resultados similares aos encontrados neste trabalho, sugerindo que a hipertensão arterial possa ser fator de risco relevante para a população jovem brasileira (CONTI et al., 2002). Em relação ao IMC, pacientes com sobrepeso e obesos foram mais freqüentes no grupo IAM, sendo este resultado esperado, pois o IMC está relacionado com o infarto do miocárdio em jovens (ISSER et al., 2002).

## 7.2 Valores bioquímicos e hematológicos

Em relação ao perfil sérico inflamatório e hematológico, foi observado neste estudo que o grupo IAM apresentou concentrações e valores mais elevados de PAI-1, fibrinogênio, leucócitos, plaquetas e hemácias do que o grupo controle. O mesmo não foi observado em relação a concentrações de PCRus.

PAI-1 elevado foi considerado em muitos trabalhos fator de risco para doença coronária e para IAM, especialmente em pacientes jovens (SOEKI et al., 2003; EL MENYAR et al., 2006).

O fibrinogênio, além de ser fator de risco para doença coronária, está associado com os tradicionais fatores de risco cardiovascular, sugerindo que o aumento do mesmo pode ser o mecanismo pelo quais tais fatores exerçam seu papel. Alguns estudos correlacionaram o aumento do fibrinogênio com o tabagismo, pois cerca de 50% dos tabagistas com doença arterial coronária apresentavam concentrações elevadas de fibrinogênio plasmático (HUMPHRIES et al., 1995; COLLEN et al., 1999). A Quantidade mais elevados de plaquetas no grupo IAM também foram observados por outros estudos (BARRABES et al., 2007; YILMAZ et al., 2007). Estes resultados enfatizam que os pacientes do grupo IAM estivessem sob risco trombótico aumentado, pois apresentavam aumento das concentrações plasmáticas de PAI-1, fibrinogênio e plaquetas favorecendo a ocorrência de trombose e/ou vasoespasmos coronários (TENG et al., 1994).

Quantidades mais elevadas de leucócitos no grupo IAM é um dado bastante interessante, pois pode estar relacionado com positividade para alguns agentes infecciosos. Vários trabalhos descrevem a importância de agentes infecciosos na ruptura da placa de ateroma, dentre os agentes infecciosos os principais são

*Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* (OHASHI *et al*, 2000; JITSUIKI *et al.*, 2006; MUSSA *al.*, 2006). Concentrações de PCRus não foi significativa entre os grupos, contrariando a maioria dos estudos com infarto do miocárdio. Este resultado pode estar relacionado à presença de atletas no grupo controle, pois alguns trabalhos identificam o aumento da quantidade de PCRus em atletas (KADOGLOU *et al*, 2007). Um resultado interessante e não encontrado em outros estudos é a quantidade elevada de hemácias no grupo IAM em relação ao grupo CT ( $p=0,038$ ). Este resultado pode estar relacionado com a necessidade das células do coração em obter oxigênio, pois ocorre uma diminuição do fluxo sanguíneo ao coração ocasionado pela obstrução do lúmen da artéria e como resposta, o organismo deve produzir mais hemácias.

Em relação ao metabolismo de lípidos, os resultados deste estudo mostraram valores mais elevados de Colesterol total, LDL-c, triglicérides, apo B e valores mais inferiores de HDL-c e apo A no grupo IAM em relação ao grupo controle. O colesterol total é considerado um fator de risco para infarto do miocárdio bastante importante (SHEKELLE *et al.*, 1981). Sendo que o IMC, o consumo de bebida alcoólica e a atividade física estão diretamente relacionados com concentração de colesterol. Alguns estudos mostraram que a maioria dos pacientes jovens com IAM apresentava LDL-c alto, correlacionando os valores com a gravidade da aterosclerose (FALSETTI *et al.*, 1968; HEINLE *et al.*, 1969; SHEKELLE 1981; BARTER *et al.*, 2007. A apo B plasmática, que reflete o número de partículas de VLDL e LDL no plasma, parece ser o melhor preditor de extensão da DAC (LAMARCHE *et al.*, 2006). A ocorrência de concentrações elevadas de triglicérides neste estudo está de acordo com vários trabalhos da literatura (BENFANTI *et al.*, 1989; GAETA *et al.*, 2007). É possível que a hipertrigliceridemia tenha papel importante na gênese do IAM em jovens. Triglicérides

podem atuar diretamente na parede arterial, propiciando a formação de lesões ateroscleróticas e influenciar o metabolismo e a composição das LDL (LDL densas e pequenas estão freqüentemente associadas à hipertrigliceridemia).

Valores baixos de HDL-c constituem fator de risco preponderante no IAM em jovens, principalmente quando associados a hipertrigliceridemia (BARTER et al., 2007). Valores baixos de HDL-c e de apolipoproteína AI e AII plasmáticos contribuem fortemente para a discriminação entre jovens com e sem IAM, o que foi confirmado em nossa casuística. Valores elevados de glicose foram encontrados em nosso estudo contribuindo ainda mais para confirmar a importância desta variável no desenvolvimento do infarto (VINOKUT et al., 2007).

Quando se decidiu estudar pacientes jovens com IAM, a proposição inicial era que constituíssem grupo com número reduzido de fatores de risco convencionais para DAC, pois a maioria deles é tempo dependente. Entretanto, os dados deste trabalho e os da literatura apontam para significativa presença de fatores de risco, sugerindo que o IAM em jovens seja manifestação precoce de processo aterosclerótico. A presença significativa de fatores de risco clássicos no grupo IAM tais como hipertensão, tabagismo, concentrações elevadas de glicemia, aliado a um perfil inflamatório, hematológico e lipídico alterados sugere fortemente uma síndrome pluri metabólica.

### **7.3 Aspéctos Genéticos**

Nenhuma trabalho anterior estudou a relação destes polimorfismos -260CT CD14, Asp299Gli TLR4, Thr399ThrIle TLR, -174GC IL6 com o infarto do miocárdio em jovens. Um grupo de adultos jovens com IAM foi utilizado para avaliar a influência de

fatores genéticos, pois os fatores de risco clássicos tiveram menos tempo para atuar nesse grupo tornando os estudos genéticos mais consistentes.

### 7.3.1 CD14

A distribuição genotípica observada do polimorfismo -260C/T *CD14*, no grupo IAM e no grupo CT foi similar às observadas em alguns estudos (ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005; BERNARDO et al., 2006), mas diferente de outros (HUBACEK et al., 1999; KONDO et al., 2003; KRUGER et al., 2005). Hubacek et al., 1999, relacionaram o genótipo TT com o infarto do miocárdio, no entanto, outros trabalhos não encontraram o mesmo resultado, pois as distribuições dos genótipos entre os grupos IAM e Controle não foram significativos (ZEE et al., 2001; KOENIG et al., 2002; NAUCK et al., 2002; ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005; BERNARDO et al., 2006). Este estudo também não observou diferença significativa entre os grupos estudados, mostrando que a frequência dos genótipos em IAM jovens e a sua distribuição em relação ao grupo controle é similar às observadas em pacientes com idade mais avançada.

Em relação aos marcadores inflamatórios, Bernado et al., 2006 encontraram relação entre o genótipo TT do polimorfismo -260CT *CD14* com aumento de concentrações de PCRus em pacientes com infarto do miocárdio, o mesmo não foi observado neste estudo, provavelmente devido a inclusão de atletas no grupo controle e/ou em pacientes jovens essa diferença se torna mais sensível (MARCELL et al., 2005; DE LEMOS et al., 2007).

Quantidade aumentada de leucócitos relacionou com o infarto do miocárdio e quando o grupos IAM e controles com os mesmos genótipos do polimorfismo -260CT *CD14* foram comparados pôde-se observar que apenas para os IAM com o genótipo CC houve diferença significatinte em relação a quantidade de leucócitos mostrando que este genótipo parece exercer papel importante na resposta de ativação na síntese destas células e/ou o genótipo CC pode estar relacionado com aumento de infecções (KOENIG et al., 2002). O aumento de concentrações de PAI-1 no grupo IAM em relação ao grupo controle associando com o genótipo CC ( $p < 0,001$ ), porém parece que os hábitos e os fatores de riscos, principalmente o tabagismo, está influenciando esta diferença, pois além deste genótipo, os outros também influenciam nessas concentrações ( $p < 0,01$ ). Quantidades de plaquetas também se associou com o genótipo CC, mostrando que além dos fatores de riscos clássicos, este genótipo (CC - 260CT *CD14*) possui um papel importante na homeostase sanguínea.

Concentrações diminuídas de HDL-c e ApoA1 e aumentadas de ApoB foram relacionadas com o polimorfismo -260CT *CD14*, porém dois genótipos apresentaram associação com esta diferença, sendo os genótipo CC ( $p < 0,001$ ) e CT ( $p < 0,01$ ) associados com HDLc e ApoA e os genótipos CC ( $p < 0,001$ ) e CT ( $p < 0,01$ ) com concentrações de ApoB, identificando que outros fatores podem estar relacionados com estas concentrações. Concentração elevada de glicose foram associadas com o genótipo CC e outro polimorfismo -159CT do mesmo gene *CD14* associou-se com resistência a insulina mostrando que este gene pode estar envolvido com predisposição a diabetes tipo 2 (FERNANDEZ-REAL et al., 2002). Concentrações elevadas de colesterol total foi relacionado com o genótipo CT enfatizando a

importância deste polimorfismo no perfil lipídico. Outros trabalhos relacionaram concentrações de triglicérides com este genótipo (SHIN et al., 2005).

### 7.3.2 TLR

A distribuição genotípica do polimorfismo Asp299Gln (A+896G) *TLR4* (IAM: 93,1%; C: 98,2%) encontrada no presente estudo foi similar às observadas em suecos (EDFELT et al., 2004), alemães (NEBEL et al., 2007), norte americanos (KOLEK et al., 2004) e em franceses (AMEZIANE et al 2003) e para o polimorfismo Thr399Ile (C1197T) *TLR4* a distribuição genotípica foi similar às observadas em norte americanos (KIECHL et al., 2002), alemães (KOCH et al., 2006) e em suecos (EDFELDT et al., 2004). Nenhuma estudo evidenciou a relação entre estes polimorfismos com o infarto do miocárdio e no presente estudo também não evidenciou tais associações, porém para se confirmar estes resultados é necessário um estudo com um número maior de IAM e controles jovens devido a baixa frequência destes polimorfismos. Para o polimorfismo Arg753Gln (G2258A) do gene *TLR2*, o alelo raro A não foi encontrado na população estudada, mostrando a baixa frequência deste polimorfismo, tais como apresentada por outros estudos (FOLWACZNY et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2004; DÜZGÜN et al., 2007). Não obstante, alguns estudos encontraram frequência do alelo A (HAMANN et al., 2004; OGUS et al., 2004). HAMANN et al., 2004, relacionaram o polimorfismo Arg753Gln com o risco de re-estenose da coronária.

AMEZIANE et al, 2003, observou uma maior frequência do genótipo Asp/Gln do polimorfismo Asp299Gln em controles (13,35%) em relação a pacientes IAM (7,7%),  $p=0,054$ . No presente estudo foi observado uma maior frequência no grupo IAM



(7,37%) do que no grupo controle (2,2%), porém não significante esta diferença,  $p=0.17$ . Embora alguns trabalhos possam ter encontrados distribuições diferentes, a maioria foi similar à encontrada neste estudo, logo, a frequência destes polimorfismos em enfartados e controles jovens é próximo à encontrada em pacientes com idade avançada. No entanto, trabalhos com uma casuística maior precisam ser realizados para se confirmar esta baixa frequência de forma mais precisa.

KIECHL et al., 2002, relacionaram o polimorfismo Asp299Gli com diminuição nas concentrações de alguns marcadores inflamatórios, tais como fibrinogênio e proteína C reativa. No presente pode-se evidenciar relação entre os marcadores, fibrinogênio, PAI1, plaquetas, leucócitos e o polimorfismo Asp299Gli *TLR4* e para o polimorfismo Thr399Ile *TLR4* apenas a quantidade de plaquetas não foi significativa. O alelo G do polimorfismo Asp299Gli associou-se com diminuição de concentrações de fibrinogênio, ( $p<0,001$ ) e redução de eventos coronarianos agudos (AMEZIANE et al 2003). Este resultado enfatiza a participação do gene TLR no processo inflamatório e no processo de coagulação, porém para se confirmar a influência dos polimorfismos é necessário trabalhos com casuística maior.

Pacientes com o alelo raro para o polimorfismo Asp299Gli tiveram concentrações de PCRus menor que os não portadores deste alelo (KOLEK et al., 2004). No entanto, nenhuma relação foi encontrada no presente estudo, provavelmente, devido critérios de seleção do grupo controle, pois atletas possuem concentrações de PCRus mais elevada que o normal (MARCEL et al., 2005; de LEMOS et al., 2007).

Os valores dos lipídios na maioria dos parâmetros estudados foram relacionados com os polimorfismos Asp299Gln e Thr399Ile *TLR4*. Porém, estes resultados podem estar relacionados com a baixa frequência encontrada, sugerindo que novos estudos possam ser realizados com um número maior de pacientes e controles para avaliar a verdadeira relação entre estes polimorfismos e o perfil lipídico de pacientes jovens que tiveram infarto do miocárdio.

### 7.3.3 IL6

A frequência do polimorfismo -174G/C *IL-6*, a distribuição genotípica observada no grupo IAM e no grupo controle no presente estudo foi similar às observadas em alguns estudos (NAUCK et al., 2002; ORTLEPP et al., 2005), porém vários trabalhos encontraram resultados diferentes (GEORGES et al., 2001; HUMPHRIES et al., 2001; FLEX et al., 2002; ANTONICELLI et al., 2005; RAURAMAA et al., 2007), relacionando o genótipo CC+CG com o infarto do miocárdio. No presente estudo não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados, mostrando que a frequência dos genótipos em pacientes jovens e a sua distribuição em relação ao grupo controle parece não ser similar às observadas em pacientes com idade mais avançada.

Em relação ao perfil sérico inflamatório e hematológico de indivíduos jovens com infarto do miocárdio, as concentrações de fibrinogênio e PAI-1 foram relacionadas com os genótipos GG e CC, mostrando que este polimorfismo pode não estar relacionado a esses marcadores. No entanto, quantidades elevadas de leucócitos que foram relacionadas ao infarto do miocárdio em jovens foram influenciadas pelo genótipo CC, além do presente estudo, ORTLEPP et al., 2003 também observaram

esta relação em fumantes saudáveis. A quantidade de hemácias foi significativamente maior em IAM do que nos controles, sendo que esta diferença está relacionada com o genótipo CT. De todos os polimorfismos estudados, apenas este genótipo CT -174 *IL6* é que foi relacionado com aumento de hemácias em enfartados, mostrando a possível relação deste polimorfismo do gene *IL6*.

O perfil lipídico sérico dos indivíduos jovens com infarto do miocárdio, o genótipo GG do polimorfismo -174G/C *IL-6* relacionou-se com concentrações elevadas de glicose. Portadores deste genótipo GG associou-se com diminuição da sensibilidade a insulina em diabéticos (CARDELLINI et al., 2005; BAMOULID et al., 2006).

O genótipo CC, neste estudo, associou-se com concentrações diminuídas de apoA e HDL-c e aumentadas de LDL-c, colesterol total. Este resultado contribui para comprovar a relação deste genótipo com valores elevados dos lipídios de alguns marcadores, este genótipo também já tinha sido relacionado com obesidade e ganho de peso (WERNSTEDT et al., 2004; KLIPSTEIN-GROBUSCH ET AL., 2006).

#### **7.4 Limitações**

O número restrito de pacientes pode ter influenciado a ausência de associação entre polimorfismos genéticos e IAM, principalmente em relação aos polimorfismos do *TLR4* devido a sua baixa frequência. Outra limitação foi a diferença existente entre os grupos IAM e controle do ponto de vista de hábitos de vida.

## 8 - CONCLUSÕES

Os polimorfismos Arg753Gln do *TLR2*, Asp299Gln, Thr399Ile do *TLR4*, -260C/T do *CD14* e -174G/C do *IL-6* não se associaram com ocorrência de infarto do miocárdio em adultos jovens.

A distribuição das freqüências genóticas dos polimorfismos nos indivíduos jovens que tiveram infarto do miocárdio e indivíduos controles foram similares às observadas em outros estudos.

Os polimorfismos -260CG *CD14* e -174GC *IL6* tiveram associação tanto em relação aos perfis inflamatório e hematológico quanto ao perfil lipídico de pacientes jovens que tiveram infarto do miocárdio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEZIANE, N., T. BEILLAT, P. VERPILLAT, S. CHOLLET-MARTIN, M. C. AUMONT, P. SEKNADJI, M. LAMOTTE, D. LEBRET, V. OLLIVIER, D. DE PROST. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. **Arterioscler. Thromb Vasc Biol.** 23:e61, 2003.

ARBOUR, N. C., E. LORENZ, B. C. SCHUTTE, J. ZABNER, J. N. KLINE, M. JONES, K. FREES, J. L. WATT, D. A. SCHWARTZ. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nat. Genet.** 25:187. 2000.

ARROYO-ESPLIGUEROA R., EL-SHARNOUBYA K., VAZQUEZ-REYA E., KALIDASB K., JEFFERYB S., KASKIA J.C. CD14 C(-260)T promoter polymorphism and prevalence of acute coronary syndromes. **International Journal of Cardiology** 98 (2005) 307– 312.

BARTER P., GOTTO A.M., LA ROSA, J.C., MORONI, J., SZAREK M., GRUND S.M., KASTELEIN J.J., BITTNER, V., FRUCHART J.C. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med.** 2007 Sep 27;357(13):1301-10.

BARTON G.M, MEDZHITOV R. Toll-like receptors and their ligants. **Curr Top Microbial Immunol.** 2002; 270:81-92.

BLAKE G.J., RIDKER P.M. C-Reactive Protein and Other Inflammatory Risk Markers in Acute Coronary Syndromes. **Journal of the American College of Cardiology.** 2003. v.41:37–42.

BENNET A.M., PRINCE J.A., FEI G., LYRENÄS L, HUANG Y, WIMAN B, FROSTEGÅRD J, DE FAIRE U. Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. **Atherosclerosis** 171 (2003) 359–367.

BERENSON GS, WATTIGNEY WA, TRACY RE, NEWMAN WP 3rd, SRINIVASAN SR, WEBBER LS, DALFERES ER Jr, STRONG JP. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). **Am J Cardiol** 1992;70(9):851-8.

BERNARDO E., ANGIOLILLO D.J., RAMÍREZ C., CAVALLARI U., TRABETTI E., SABATÉ M., HERNÁNDEZ R., MORENO R., ESCANED J., ALFONSO F., BAÑUELOS C., COSTA M.A., BASS T.A., PIGNATTI P.F., MACAYA C., AND FERNANDEZ-ORTIZ A., Influence of the CD14 C260T Promoter Polymorphism on C-Reactive Protein Levels in Patients With Coronary Artery Disease. **Am J Cardiol.** 2006;98:1182–1184.

BIASUCCI L.M, VITELLI A, LIUZZO G, ALTAMURA S, CALIGIURI G, MONACO C, REBUZZI A.G, CILIBERTO G, MASERI A. Elevated Levels of Interleukin-6 in Unstable Angina. **Circulation**. 1996. Sep 1;94(5):874-7.

BUFLER P., STIEGLER G., SCHUCHMANN M., HESS S., KRAGER C., STELTER F., ECKERSKORN C., SCHÄTT C., ENGELMANN H., Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants, **Eur. J. Immunol**. 25 (1995) 604–610.

BURKARJ F, SALSMANN L. Angiografic findings in porinfarction patients under the age of 35. **Metabolism** 2002; 51(6 Suppl 1): 56-60.

CARVALHO A, MARQUES A, MACIEL P, RODRIGUES F. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: A novel method applied to the analysis of the Portuguese population. **Mol Cell Probes**. 2007; 30.

CATHERINE F. TERRY‡, VALERIE LOUKACIŞ, AND FIONA R. GreenCooperative Influence of Genetic Polymorphisms on Interleukin 6Transcriptional RegulationVol. 275, No. 24, Issue of June 16, pp. 18138–18144, 2000

CHEN L, CHESTER M, KASKI JC. Clinical factors and angiographic features associated with premature coronary artery disease. **Chest** 1995;108(2):364-9.

COLLEN D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thromb Haemost** 1999; 82(2):259-70. Review.

CONTI RA, SOLIMENE MC, DA LUZ PL, BENJO AM, LEMOS NETO PA, RAMIRES JA. Comparação entre homens e mulheres jovens com infarto agudo do miocárdio. **Arq Bras Cardiol** 2002;79(5):510-25.

CROCE K, LIBBY P. Interwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. **Curr Bras Cardiol**. 2002; 79(5):510-25.

DATASUS – Banco de dados. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/cg1/tabeci.exe>. Acesso em 26 de maio de 2007.

DAMANI S.B, TOPOL E.J. Future Use of Genomics in Coronary Artery Disease. **Journal of the American College of Cardiology**. 2007. v.50, 20.

DEGUCHI J.O, AIKAWA M, TUNG C.H, AIKAWA E, KIM D.E, NTZIACHISTOS V, WEISSLEDER R, LIBBY P. inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. **Circulation**. 2006; 114(1): 55-62.

DE LEMOS E.T., REIS F., BAPTISTA S., PINTO R., SEPODES B., VALA H., ROHA-PEREIRA P., SILVA A.S., TEXEIRA F. Exercise training is associated with improved

levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. **Méd Sci Monit.** 2007 Aug;13(8):BR168-74.

DOLLAR AL, KRAGEL AH, FERNICOLA DJ, WACLAWIW MA, ROBERTS WC. Composition of atherosclerotic plaques in coronary arteries in women less than 40 years of age with fatal coronary artery disease and implications for plaque reversibility. **Am J Cardiol** 1991;67(15):1223-7.

EDFELDT, K., A. M. BENNET, P. ERIKSSON, J. FROSTEGARD, B. WIMAN, A. HAMSTEN, G. K. HANSSON, U. FAIRE UD, Z. Q. YAN. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. **Eur. Heart J.** 25:1447, 2004.

EDFELT K, SWEDENBROG J, HANSSON G.K., YAN Z.Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesion: a possible pathway for plaque activation. **Circulation.** 2002; 105: 1158-61.

ENGELAND A., BJORGE T., SELMER RM., et al. Height and body mass index in relation to total mortality. **Epidemiology** 2003; 14:293–9.

EL-HALAWATY S., RIZK A., KAMAL M., ABOULHASSAN M., AL-SAWAH H., NOAH O., AL-INANY H. Clinical significance of serum concentration of anti-Müllerian hormone in obese women with polycystic ovary syndrome. **Reprod Biomed Online.** 2007 Nov;15(5):495-9.

EL MENYAR A.A, ALTAMIMI O.M., GOMAA, M.M., FAWZY, Z., RAHMAN, MOA M.O.A. BENER A. The effect of high plasma levels of angiotensin-converting enzyme (ACE) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) on the reperfusion after thrombolytic therapy in patients presented with acute myocardial infarction. **J. Thromb Thrombolysis.** 2006; 21(3): 235-40.

FALSETTI HL, SCHNATZ JD, GREENE DG, BUNNELL IL. Lipid and carbohydrate studies in coronary artery disease. **Circulation** 1968;37(2):184-91.

FAROUQUE HM, MEREDITH IT. The assessment of endothelial function in humans. **Coron Artery Dis** 2001;12(6):445-54. Review.

FRIEDEWALD, W. T; LEVY, R.I; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, 18:499-502, 1972.

GLOVER MU, KUBER MT, WARREN SE, VIEWEG WV. Myocardial infarction before age 36: risk factor and arteriographic analysis. **Am J Cardiol** 1982; 49(7):1600-3.

GOTLEIB A.I. Atherosclerosis and acute coronary syndromes. **Cardiovascular pathology.** 2005; 14:181-4.

HEINLE RA, LEVY RI, FREDERICKSON DS, GORLIN R. Lipid and carbohydrate abnormalities in patients with angiographically documented coronary artery disease. **Am J Cardiol** 1969;24(2):178-86.

HOSHINO, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira, Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. **J. Immunol.** 162: 3749–3752, (1999).

HUBACEK J., PITHA J., STANEK V., POLEDNE R. C(2260)3T Polymorphism in the Promoter of the CD14 Monocyte Receptor Gene as a Risk Factor for Myocardial Infarction. **Circulation.** 1999;99:3218-3220.

HUMPHRIES SE, YE S, TALMUD P, BARA L, WILHELMSEN L, TIRET L. European Atherosclerosis Research Study: genotype at the fibrinogen locus (G-455-A beta-gene) is associated with differences in plasma fibrinogen levels in young men and women from different regions in Europe. Evidence for gender-genotype-environment interaction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1995;15(1):96-104.

HYPERTENSION and coronary heart disease: classification and criteria for epidemiological studies. **World Health Organ Tech Rep Ser** 1959;58(168):1-28.

IV Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Volume 88, Suplemento I, Abril 2007.

JITSUIKI, K. YAMANE, K. NAKAJIMA, M. NAKANISHI, S. TASAKI, N. WATANABE4, H. KURIHARA, H. KOHNO, N. Association of Chlamydia pneumoniae infection and carotid intima-media wall thickness in Japanese americans. **Circ J.** Jul; v. 70(7) p. 815-819, 2006.

KADOGLOU N.P.E., ILIADIS F. AND LIAPIS C.D. Exercise and Carotid Atherosclerosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg.** 2007.

KIECHL, S., E. LORENZ, M. REINDL, C. J. WIEDERMANN, F. OBERHOLLENZER, E. BONORA, J. WILLEIT, D. A. SCHWARTZ. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. **N. Engl. J. Med.** 347:185, 2002.

KITCHENS, R.L., Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. **Chem Immunol.** 2000; 74:61-82.

KOLEK M.J. CARLQUIST J.F. MUHLERSTEIN J.B, WHITING B.M, HHORNE B.H., BAIR T.L. ANDETSON, J.L. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. **AM Heart J.** 2004. 148(6): 1034-40.



KUCHARZA E.J, WILKB T. Dynamics of serum interleukin-6 level in patients with acute myocardial infarction. **European Journal of Internal Medicine**. 2000. 253–6.

LAMARCHE B, MOORJANI S, LUPIEN PJ, ET AL: Apolipoprotein AI and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*. **Circulation** 1996; 94:273-278.

LAMARCHE B, MOORJANI S, LUPIEN PJ, ET AL: Apolipoprotein AI and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*. **Circulation** 1996; 94:273-278.

LANDMANN R., LUDWIG C., OBRIST R., OBRECHT J.P., Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages, *J. Cell. Biochem*.47 (1991) 317–329.

LANDMANN R., REBER A.M., SANSANO S., ZIMMERLI W., Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock, *J. Infect. Dis*. 173 (1996) 661–668.

LIBBY P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. **Am J Cardiol**. 20; 88(12A):3N-8N, 2001.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**. 420:868 2002.

LINDMARK E, DIDERHOLM E, WALLENTIN L, SIEGBAHN A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. **JAMA** 2001; 286:2107– 13.

LORENZ E., MIRA J.P., FREES K.L AND SCHWARTZ D.A., Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. **Arch. Intern. Med**. 162: 1028–1032, 2002.

LOTUFO P.A. Epidemiologia da doença cardiovascular no Brasil. História, situação atual e proposta de modelo teórico. **Re. Doc. Cardiol. Estado de São Paulo**, 1996,5:541-7

MALARSTIG A., WALLENTIN L., SIEGBAHN A., Genetic variation in the interleukin-6 gene in relation to risk and outcomes in acute coronary. **Syndrome Thrombosis Research**. 2006.

MARCELL T. J., MCAULEY K.A., TRAUSTADOTTIR T., REAVEN P.D. Exercise training is not associated with improved levels of C-reactive protein or adiponectin. **Metabolism Clinical and Experimental**. 2005; 533– 541.

MEDZHITOV and C. Janeway, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. **Trends Microbiol**. 8: 452–456, 2000.

- MEDZHITOV, Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.** 1: 135–145, 2001.
- MILLER D.T, RIDKER, P.M, LIBBY P, KWIATKOWSKI D.J. Atherosclerosis: the path from genomics to therapeutics. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 17;49(15): 1589-99.
- MOORE K.J, FREEMAN M.W., Scavenger receptors in atherosclerosis. **Arterioscler Tromb Vasc Bio.** 2006; 26: 1702-11.
- MUSSA, F. F. CHAI, H. WANG, X. YAO, Q. LUMSDEN, A. B. CHEN, C. Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update. **J Vasc Surg.** v. 43(6), p. 1301-1307, 2006
- OOSTENBRUSG L.E, DRENTH J.P, DE JONG D.J, NOLTE I.M, OOSTEROM E, VAN DER STEEGE G, KLEIBERRUKER J.H, JANSEN P.L, Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.** 2005; 11(6): 567-75.
- OVERMAN, V.P. American Heart Association. **Int Dent Hyg.** v.3, n. 4, p. 222, 2005.
- PINEDA J, MARIN, F., ROLDAN, V., VALENCIA, L., MARCO, P., SOBORB, F., Premature myocardial infarction: clinical profile and angiografic findings. **Internationasl Journal of Cardiology.** 2007.
- RANJITH N., PEGORARO R.J., NAIDOO D.P., ESTERHUIZEN T.M. **Metabolic syndrome in young Asian Indian patients with myocardial infarction.** Cardiovascular Journal of Africa. 2007. v.18.
- RIDKER PM, RIFAI N, STAMPFER MJ, HENNEKENS CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation.** 2000;101:1767– 72.
- ROCK F.L., HARDIMAN, G., TIMANS J.C., KASTELEIN, R.A., BAZAN, J.F., A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proc. Natl, Acad. Sci.** 1999; 95:588-93.
- ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl. J. Med.** 340:115, 1999.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and criopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v.44, n.8, p.1748-1750, 1998.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SANTOS dos E.S., MINUZZO L., PEREIRA, M.P., CASTILHO M.T.C., PALACIO M.A.G., RAMOS, R.F., TIMERMAN, A., PIEGAS, L.S., Registro de síndrome

coronariana aguda em um centro de emergência em cardiologia. **Arq Brás Cardiol.** 2006. 87:597-602.

SATOH, M., SHIMODA, Y., MAESAWA C., AKATSU T., ISHIKAWA Y., MINAMI Y., HIRAMORI K., NAKAMURA M., Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure. **International journal of Cardiology.** 2006; 109:226-34.

SCHRODER N.W.J., SCHUMANN, R. Single nucleotided polymorphism of toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. **Lancet Infect Dis.** 2005; 5: 156-64.

SHEKELLE RB, SHRYOCK AM, PAUL O, LEPPER M, STAMLER J, LIU S, RAYNOR WJ JR. Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric study. **N Engl J Med** 1981;304(2):65-70.

SHEKELLE RB, SHRYOCK AM, PAUL O, LEPPER M, STAMLER J, LIU S, RAYNOR WJ JR. Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric study. **N Engl J Med** 1981;304(2):65-70.

SHERWIN R., LEWIS C., RUSSEL R.P. Role of blood cholesterol in atherosclerosis and coronary heart disease. **Md Med J.** 1986; 35(4); 248-50.

SHERWIN, R., LEWIS, C., RUSSEL, R.P., Role of blood cholesterol in atherosclerosis and coronary heart disease. **Md med J.** 1986; 35(4); 248-50.

SIOTIA A.K., CHESTERMAN W., Acute myocardial infarction in young patients: the culprit is not always a rupture atherosclerotic plaque. **Int j Clin Pract.** 2007; 10:1-3.

SOEKI T., TAMUREA Y., FUKUDA N., ITO S., Plasma and platelet plasminigen activator inhibitor in patients with acute myocardial infarction. **Jnp Circ J.**, 2000; 64: 547-53.

STARY HC, CHANDLER AB, GLAGOV S, GUYTON JR, INSULL W Jr, ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation** 1994;89(5):2462-78. Review..

STELTER, F. Structure/Fuction relation ships of CD14. **Chem Immunol.** 2000; 74:25-41.

TAKEDA K., AKIRA, K. and S. Toll-like Receptors. **Immunol.** 2003; 21: 335-76.

TAPPING R, TOBIAS P. Soluble CD14-mediate cellular response to lipopolysaccharide. **Chem Immunol** 2000;74:108 –121.

TENG JK, LIN LJ, TSAI LM, KWAN CM, CHEN JH. Acute myocardial infarction in young and very old Chinese adults: clinical characteristics and therapeutic implications. *Int J Cardiol* 1994;44(1):29-36.

TIONG A.Y., BRIEGER, D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J*. 2005; 150:11-18.

TOUSOULIS, D.; CHARAKIDA, M.; STEFANADIS, C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart*, v.92, p.441-4, 2005.

TSUNG A., McCOY, S.L., KLUNE, J.R., GELLER D.A., BILLIAR T.R., HEFENEIDER, S.H., A novel inhibitor peptide of Toll-like-receptor signaling limits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators and enhances survival in mice. *Shock*. 2007; 27(4): 364-9.

TUZCU EM, KAPADIA SR, TUTAR E, ZIADA KM, HOBBS RE, MCCARTHY PM, YOUNG JB, NISSEN SE. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001;103(22):2705-10.

TZAGOURNIS M, SEIDENSTICKER JF, HAMWI GJ. Serum insulin, carbohydrate, and lipid abnormalities in patients with premature coronary heart disease. *Ann Intern Med* 1967;67(1):42-7.

UEDA, Y., OKADA, K., OGASAWARA, N., OYABU, J., HIRAYAMA, A., KODAMA, K., Acute myocardial infarction with disrupted yellow plaque in young patients below 50 years old. *Journal of Interventional Cardiology*. 2007; 20:1787-81

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*.

VAN DER GRAAF, C., KULLBERG, B.J., JOOSTEN, L., VERVER-JANSEN, T., JACOBS, L., VAN DER MEER, J.W., NETEA, M.G. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine*. 2005; 30(5): 264-8.

VINOKUR V., LEIBOWITZ, G., GRINBERG, L., ELIASHAR, R., BERENSHEIN, E., CHEVITON, M. Diabetes and the heart: could the diabetic myocardium be protected by preconditioning?. *Redox Rep*. 2007; 12(6):246-56.

WANG P.Y., KITCHENS R.L., Munford R.S., Bacterial lipopolysaccharide binds to CD14 in low-density domains of the monocyte-macrophage plasma membrane, *J. Inflamm*. 47 (1995) 126–137.

WILLERSON, J. T., RIDKER P. M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109://2. 2004.

XU XH, SHAH PK, FAURE E, EQUILS O THOMAS L, FISHBEIN MC, LUTHRINER D, XU XP, RAJAVASHISTH TB, YANO J, KAUL S, ARDINI M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. **Circulation**. 104; 3103-3108, 2001.

YANG R.B., MARK M.R., GURNEY A.L., GODOWSKI P.J., Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll like receptor 2, **J. Immunol**. 163 (1999) 639–643.

YEGHIAZARIANS, Y., BRAUBSTEIN, J.B., ASKARI, A., STONE, P.H. unstable angina pectoris. **N Engl Journ Med**. 2005; 342 (2): 111-4.

YILMAZ MB., CIHAN G., GURAY Y., GURAY U., KISACIK H., SASMAZ H., KORKMAZ S. J Thromb Thrombolysis. Role of mean platelet volume in triagging acute coronary. **Syndromes**. 2007.

ZIMMERMAN FH, CAMERON A, FISHER LD, NG G. Myocardial infarction in young adults: angiographic characterization, risk factors and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). **J Am Coll Cardiol** 1995;26(3):654-61.



## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 75/2006

São Paulo, 26 de maio de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).  
Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata  
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que em face da delegação atribuída pelo Inciso VI.5 da Resolução 340 de 8/7/04 o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 22 de maio de 2006, **APROVOU** o projeto "Participação de polimorfismos do gene TLR2 e 4 no infarto do miocárdio em adultos jovens" (Protocolo CEP nº 370) apresentado por vossa senhoria e, consoante o mesmo dispositivo encaminhamos à CONEP a Folha de Rosto e o Parecer Consubstanciado.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa da FCF/USP