



BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacéuticas  
Universidade de São Paulo

Recebido em 23/04  
F. d. L.  
M. L. d. A.

1267694  
25647

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**  
**Área de Análises Clínicas**

**Avaliação dos polimorfismos C677T no gene da MTHFR e  
G1691A no Fator V como possíveis fatores de risco  
associados ao desenvolvimento da doença arterial  
coronariana precoce**

**Silverio Teixeira dos Santos**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:

Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2002

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**  
**Área de Análises Clínicas**

**Avaliação dos polimorfismos C677T no gene da MTHFR e  
G1691A no Fator V como possíveis fatores de risco  
associados ao desenvolvimento da doença arterial  
coronariana precoce**

**Silverio Teixeira dos Santos**

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo  
2002

*17-280*

---

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004863

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S237a Santos, Silverio Teixeira dos  
Avaliação dos polimorfismos C677T no gene da MTHFR e G1691A no fator V como possíveis fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença arterial coronariana precoce / Silverio Teixeira dos Santos. -- São Paulo, 2002.  
89p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico de laboratório : Medicina 2. Doença cardiovascular : Medicina I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756-9 CDD

Silverio Teixeira dos Santos

Avaliação dos polimorfismos C677T no gene da MTHFR e G1691A no Fator V como possíveis fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença arterial coronariana precoce

Comissão Julgadora  
Da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata  
Orientador/presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

São Paulo, 2 de Julho de 2002.

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>03</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>04</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Casuística .....</b>	<b>29</b>
<b>4. Material e métodos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Reagentes .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Equipamentos .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Amostras biológicas .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Determinações bioquímicas .....</b>	<b>32</b>
<b>4.5 Estudo de polimorfismos genéticos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6 Controle de qualidade nas análises bioquímicas e moleculares .....</b>	<b>41</b>
<b>4.7 Análise estatística .....</b>	<b>41</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Determinação de lipídeos plasmáticos .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Determinação da homocisteína plasmática .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Análise do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4 Análise do fator V Leiden (mutação 1691G→A) .....</b>	<b>52</b>
<b>6. Discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>65</b>
<b>8. Referências bibliográficas .....</b>	<b>66</b>
<b>9. Resumo .....</b>	<b>86</b>
<b>10. Summary .....</b>	<b>87</b>
<b>11. Anexos.....</b>	<b>88</b>

---

**Lista de Abreviaturas**

<b>AVC</b>	<b>Acidente vascular cerebral</b>
<b>ASO</b>	<b>Alelico específico</b>
<b>bp</b>	<b>Pares de base</b>
<b>CBS</b>	<b>Cistationina <math>\beta</math>- sintase</b>
<b>cDNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucléico complementar</b>
<b>DAC</b>	<b>Doença arterial coronariana</b>
<b>DCV</b>	<b>Doenças cardiovasculares</b>
<b>DP</b>	<b>Desvio-padrão</b>
<b>GC</b>	<b>Grupo controle</b>
<b>GE</b>	<b>Grupo de estudo</b>
<b>HWE</b>	<b>Equilíbrio de Hardy-Weinberg</b>
<b>Hcy</b>	<b>Homocisteína</b>
<b>IM</b>	<b>Infarto do miocárdio</b>
<b>Kb</b>	<b>quilobase</b>
<b>kDa</b>	<b>quilodalton</b>
<b>5-metilTHF</b>	<b>5-metiltetrahidrofolato</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>MCP-1</b>	<b>Monócito quimioespecífico atrativo - 1</b>
<b><math>\mu</math>M</b>	<b>Micromolar</b>
<b>MS</b>	<b>Metionina sintase</b>
<b>MTHFR</b>	<b>Metilenotetrahidrofolato redutase</b>
<b>PCR</b>	<b>Reação em cadeia pela polimerase</b>
<b><math>\chi^2</math></b>	<b>Qui-quadrado</b>
<b><math>\bar{\chi}</math></b>	<b>média</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são no Brasil e no mundo um grande problema de saúde pública, constituindo a principal causa de morbidade e mortalidade. A comparação das taxas de mortalidade dos principais centros urbanos brasileiros com a de outros países mostrou valores elevados de mortalidade em geral, destacando-se todo o conjunto das doenças cardiovasculares (LOTUFO & LOLIO, 1994). Apesar do declínio das taxas de mortalidade por doenças cardíacas e cerebrovasculares descritas em São Paulo (LOTUFO & LOLIO, 1994; LOTUFO & LOLIO, 1995) e em outras capitais brasileiras, a participação relativa das doenças cardiovasculares (DCV) ainda continua sendo significativa e relevante (LOLIO *et al.*, 1998).

A doença arterial coronariana (DAC) geralmente resulta da aterosclerose, processo que envolve o endotélio, células musculares lisas da parede dos vasos, plaquetas, lipídeos entre outros fatores; sendo uma resposta à lesões por diversos agentes etiológicos que levam à formação do ateroma e placas fibrosas. Esse processo se inicia na infância, têm progressão lenta e silenciosa (figura 1) levando décadas para apresentar as manifestações clínicas (MCGILL, 1963).

A prevalência e a gravidade da doença varia entre indivíduos, grupos étnicos e também com a idade (CORRADO *et al.*, 1988; SCHWARTZ *et al.*, 1991; ROSS *et al.*, 1993).

A lesão aterosclerótica se inicia quando o endotélio sofre injúria por algum meio, como por exemplo, lesão mecânica, hiper-homocisteinemia, imuno-complexos, viroses, infecção bacteriana, entre outros. (RUSSEL, 1993). O endotélio lesado responde de várias formas, incluindo a expressão de uma variedade de citocinas que possuem efeitos locais e sistêmicos, transformando o endotélio no estado protrombótico 1. As citocinas que são quimiotáticas para monócitos (MCP-1) promovem o início da resposta inflamatória (SCHWARTZ *et al.*, 1991).



Figura 1. História natural da aterosclerose humana. A primeira lesão que dá início a aterosclerose é o depósito de lipídeos principalmente colesterol e seus ésteres na camada íntima das grandes artérias elásticas e musculares. Estes eventos têm início na aorta durante a primeira década da vida e nas coronárias durante a segunda década e nas artérias cerebrais somente na terceira década. Adaptado de McGill, 1963.

O endotélio passa então a expressar moléculas de adesão para a ligação dos monócitos, que penetram na camada subendotelial e se transformam em macrófagos. Em resposta a esses estímulos ocorre a captação de lipoproteínas pelos macrófagos cujo acúmulo promove o entumescimento destas células e estas passam então a se chamar "células espumosas". O acúmulo subendotelial de "células espumosas" exerce papel importante no processo inicial da aterosclerose (GERRITY, 1981). Os macrófagos podem fagocitar LDL o suficiente para causar sua ruptura liberando colesterol livre, citocinas e substâncias pró-coagulantes na área acometida da lesão. Este processo leva à formação do ateroma que consiste



de uma massa de células espumosas recoberta por uma cápsula fibrosa que é direcionada ao lúmen vascular pelas células musculares lisas (SCHWARTZ *et al.*, 1992).

A progressão gradual da placa formada pode ser marcada por uma rápida formação de trombose que leva à manifestação de sintomas clínicos tais como angina, infarto do miocárdio (IM) ou acidente vascular cerebral (AVC) (FALK, 1992). A formação do trombo se inicia por episódios de ruptura da placa que expõem o tecido à circulação sanguínea, entrando o sangue circulante em contato com o fator tecidual que induz a coagulação sanguínea e também com o colágeno que promove a ativação das plaquetas. Na maioria das vezes este trombo é lisado, porém o trombo residual remanescente serve como futuro foco para uma nova coagulação (BADIMON *et al.*, 1992) *vide* Fig. 2.

Estudos mostram que mortes súbitas devido ao infarto do miocárdio são causadas por rupturas ou fissuras da placa, particularmente nas margens da cápsula fibrosa, exatamente onde se observa maior concentração de macrófagos, resultando em hemorragia dentro da placa e oclusão da artéria acometida (DAVIES & TOMAS, 1983).

Nas últimas três décadas foram propostos diversos fatores de risco que predis põem a aterosclerose. Dentre os quais se destacam: hipercolesterolemia, tabagismo, sexo masculino, hipertensão arterial, diabetes, idade, sedentarismo, hipertrigliceridemia, hipotireodismo, obesidade, histórico familiar, entre outros (BRUNNER *et al.*, 1972; HULLEY *et al.*, 1980; KANEL *et al.*, 1984; BARRET-CONNOR, 1985; JORDE & WILLIAMS, 1988; ROSENFELD, 1989; KANNEL *et al.*, 1990). A identificação de novos marcadores associados à ocorrência da aterosclerose pode contribuir para descrição de outros possíveis fatores que podem estar envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos dessa doença, possibilitando ações preventivas e sem dúvida em novos procedimentos terapêuticos.

---

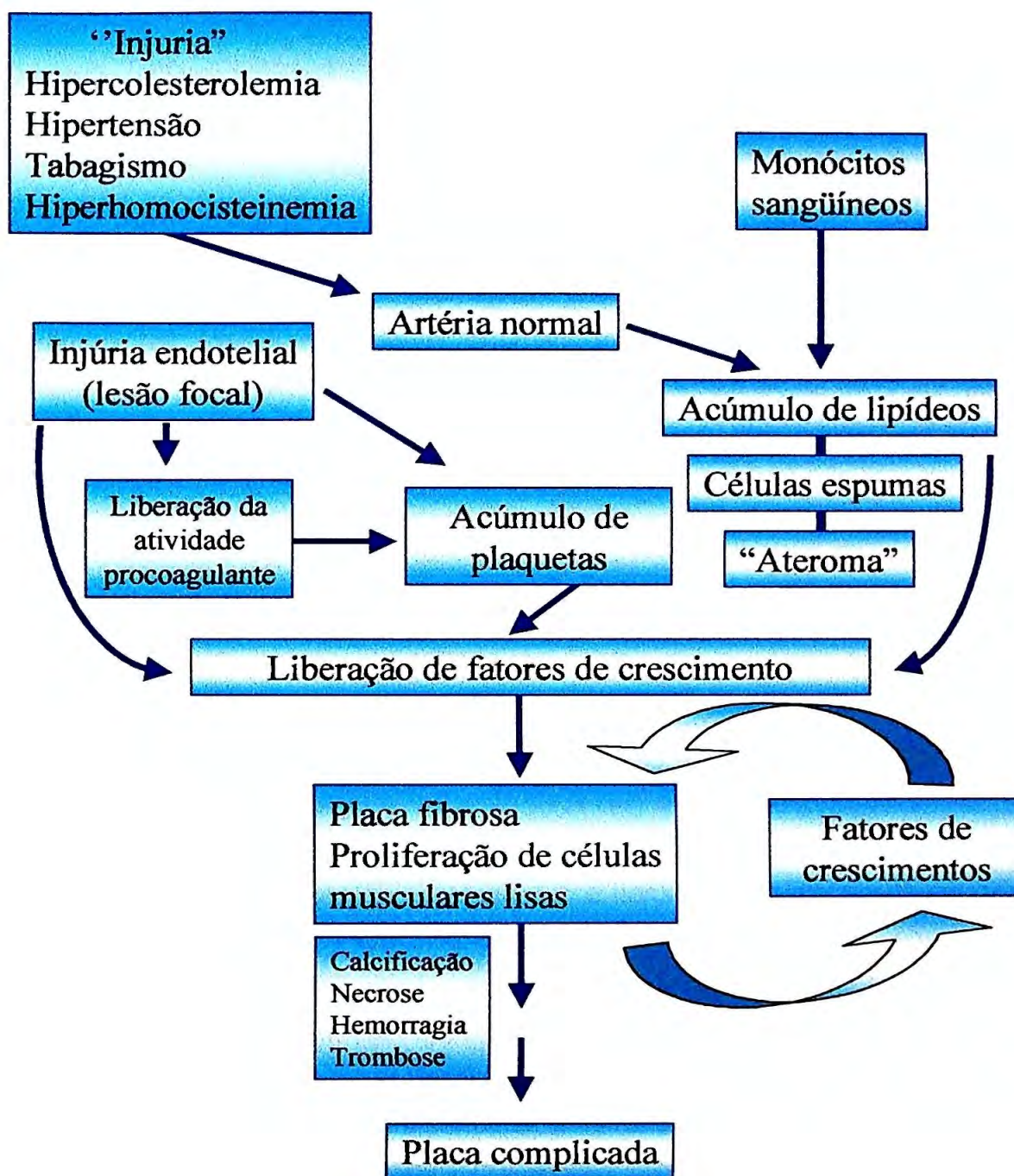


Fig 2. Representação esquemática dos eventos envolvendo a disfunção do endotélio após injúria. Esta disfunção reflete um descontrole entre os fatores envolvidos na função vasomotora, crescimento celular, coagulação ou trombose.

A hiper-homocisteinemia tem sido considerado um fator isolado na predisposição às doenças cardiovasculares (McCULLY, 1969). Estudos clínicos e laboratoriais em pacientes com hiper-homocisteinemia sugerem o envolvimento da elevação de homocisteína na aterosclerose: Primeiro, os pacientes que apresentam hiper-homocisteinemia e homocistinúria têm um aumento da incidência de episódios de DCV prematura, na adolescência e igual na vida adulta. Segundo, as lesões vasculares ocorrem independentemente e de forma disseminada ao longo dos vasos, sugerindo uma associação do aumento da homocisteína circulante com DCV. Baseado nessas observações McCULLY (1975) formulou a teoria da aterosclerose pela hiper-homocisteinemia sugerindo-a como fator de risco causal de DCV na população em geral.

O achado bioquímico de homocistinúria foi descrito pela primeira vez em 1962 em crianças com retardo mental (GERRITSEN *et al.*, 1962; CARSON & NEIL, 1962). Após dois anos, MUDD *et al.* (1985) descreveram que a causa do defeito metabólico era a deficiência de *Cistationina β-sintase*. Posteriormente, foram reconhecidos que defeitos de outras enzimas, incluindo a *metionina sintase* e *5,10 metilenotetrahidrofolato redutase* (MTFHR) que também poderiam causar homocistinúria (FREEDMAN *et al.*, 1972; KUITTINGEN *et al.*, 1997).

Estudos metabólicos demonstram que a homocisteína do organismo não é proveniente dos alimentos, uma vez que não é incorporada nas proteínas, sendo exclusivamente formada como produto intermediário do metabolismo da metionina, (figura 3), através da *metionina adenosil-transferase* (E.C.2.5.1.6). A metionina é convertida para S-adenosilmetionina, que é o principal doador de grupos metilas, importante em numerosos processos metabólicos das células, incluindo a formação de creatinina e metilação de fosfolipídios (MUDD *et al.*, 1995; UELAND, 1982; MATO, 1997). Essas reações são catalisadas por várias metiltransferases que promovem a demetilação da S-adenosilmetionina para S-adenosilhomocisteína, que é o precursor imediato da homocisteína (MUDD *et al.*, 1995).

## METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

9

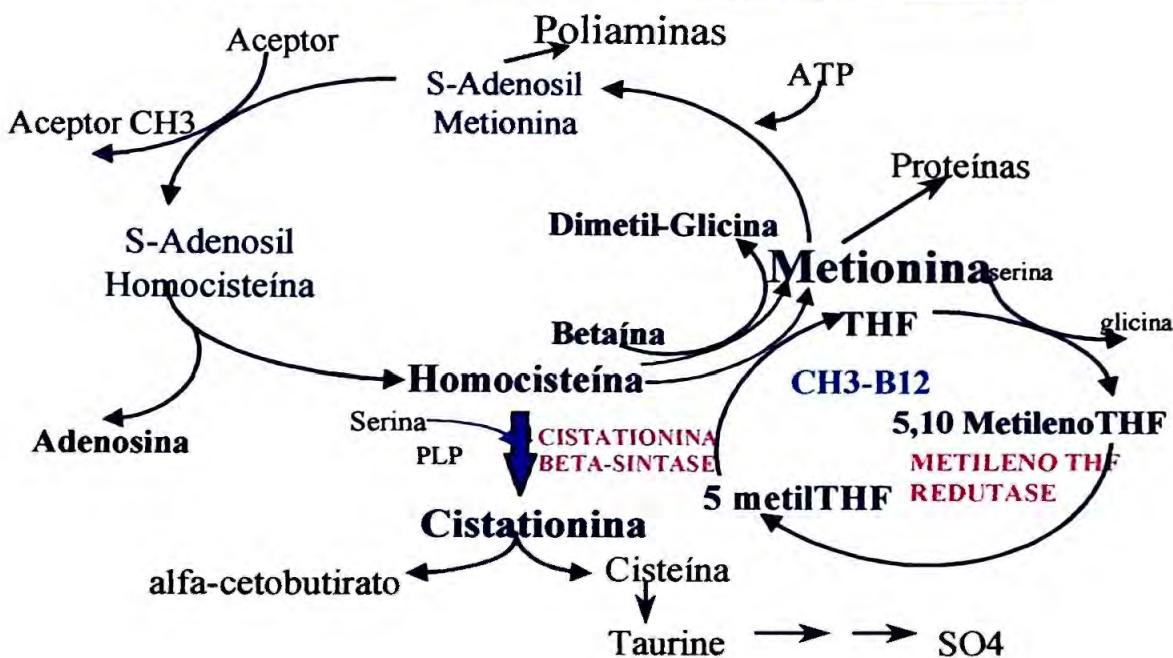


Fig. 3. Metabolismo da Homocisteína. A homocisteína é exclusivamente formada pelo metabolismo intermediário da metionina, uma vez formada ela pode seguir duas vias metabólicas principais: Na Primeira via temos a transulfuração da homocisteína, onde ela é condensada para formar cistationina, na segunda via a homocisteína é metilada para forma metionina que pode ser utilizada na síntese de proteínas.

ATP = trifosfato de adenosina

5-metilTHF = 5-metiltetrahidrofolato

PLP = piridoxal fosfato

5,10 metilenoTHF = 5,10 metilenotetrahidrofolato

SO<sub>4</sub> = Sulfato

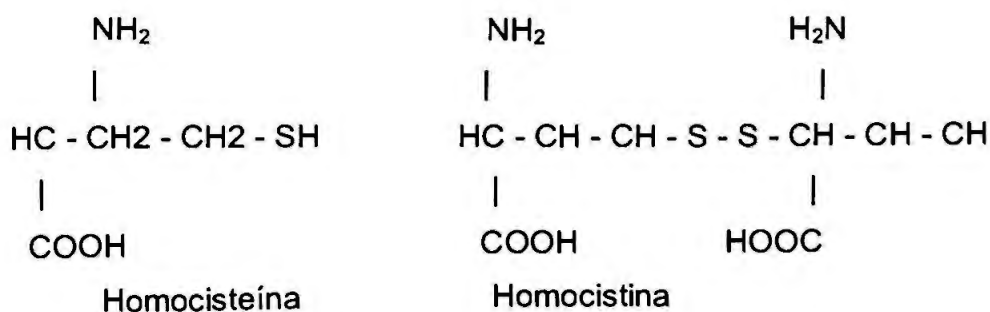
A homocisteína (Hcy) uma vez formada pode ser remetida para metionina ou degradada através da formação de cisteína e sulfatos pela via da transulfuração. A remetilação para metionina ocorre na maior parte dos tecidos sendo catalisada pela enzima metionina sintase (E.C.2.1.1.13). Esta enzima utiliza vitamina B<sub>12</sub> como cofator e o 5-metiltetrahidrofolato como doador de metila; a formação do 5-metiltetrahidrofolato é catalisada pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (E.C.1.1.99.15), que depende da vitamina B12 como cofator, conforme descrito na Fig. 3. A homocisteína também pode ser convertida para metionina pela betaína-homocisteína metiltransferase (E.C.2.1.1.5) usando betaína como doadora de metila. Esta reação ocorre

provavelmente no fígado e possivelmente no rim (MUDD *et al.*, 1995; SUNDEN, 1997).

Duas enzimas dependentes da vitamina B<sub>6</sub> estão envolvidas na via da transsulfuração. A enzima cistationina β-sintase que condensa a homocisteína com serina para formar cistationina, podendo ser posteriormente fragmentada em cisteína e α-cetobutirato pela cistationina γ-liase (E.C.4.4.1.1) (MUDD *et al.*, 1995; FINKELSTEIN, 1990). A cisteína uma vez formada pode ser utilizada na síntese de proteínas ou como precursor do antioxidante glutatona. A transsulfuração da homocisteína para cisteína é irreversível e, portanto, a direciona para o catabolismo pela produção de sulfatos como produto final (MUDD *et al.*, 1995).

Nas condições normais existe um equilíbrio entre a formação de homocisteína e a sua eliminação. Usualmente cerca de 50% da homocisteína formada é remetilada para metionina. Quando ocorre a digestão de proteínas ou excesso de metionina, uma grande proporção é catabolizada via transsulfuração (FINKELSTEIN, 1990; FOWLER, 1997). Além disso, há um aumento da formação de homocisteína devido a este consumo, sendo que a homocisteína assim formada é excretada pelas células, levando ao aumento da concentração no plasma e excreção na urina (UELAND *et al.*, 1993).

A concentração média da homocisteína plasmática é 10μM em adultos (variando de acordo com a metodologia empregada). A homocisteína existe sob várias formas (Fig. 4 e 5), sendo 1% a 3% do total sob a forma reduzida e grande parte está sob a forma oxidada formando ligações de dissulfetos (27%) ou ligadas à albumina (70%) (UELAND., 1995).



**Figura 4.** Fórmula estrutural da homocisteína e homocistina. A homocisteína é um aminoácido com um grupo sulfidril livre (SH), enquanto que a homocistina é um dissulfeto simétrico formado por duas moléculas de homocisteína que sofreram oxidação.

É importante salientar que o termo homocisteína refere-se a um componente químico específico; sendo um aminoácido com grupo sulfidril livre (Fig. 4). Como a homocisteína é pouco estável em água ela freqüentemente sofre oxidação a homocistina (Fig. 4), e o termo homocistinúria se refere à deficiência de cistationina  $\beta$ -sintase como foi originalmente identificada. A forma oxidada se refere à combinação de homocisteína na forma de dissulfetos (Fig. 5). A abreviatura Hcy é usada para homocisteína livre e suas espécies oxidadas. A homocisteína total, abreviadamente tHcy, é um termo metodológico que se refere à concentração da homocisteína obtida após o plasma ter sido tratado com um agente redutor, que converte as formas livres e combinadas na forma de dissulfeto em seu respectivo componente sulfidril.

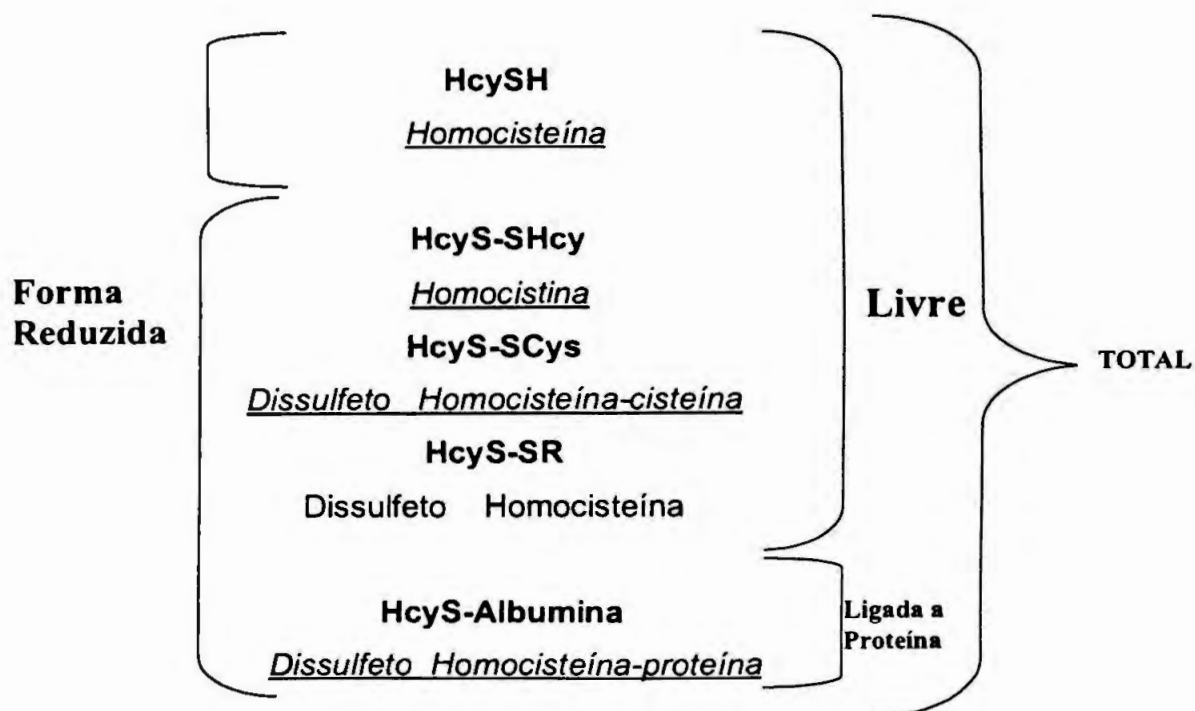


Figura 5. Dentre as várias formas da Homocisteína no sangue, somente uma pequena parte cerca de 1 a 3% está na forma livre de amina com um grupo sulfidril livre, o restante permanece na forma oxidada formando dissulfetos combinados a outros radicais orgânicos incluindo a própria Homocisteína, sendo na sua maior parte combinados a albumina. Fonte: NYGARD *et al.*, 1999.

A hiper-homocisteinemia foi classificada clinicamente em leve (15-30  $\mu\text{M}$ ), intermediária (30-100 $\mu\text{M}$ ) e grave (>100  $\mu\text{M}$ ) (STAMFER & MALINOW, 1994). A pesquisa de homocisteína inicialmente foi baseada em testes qualitativos, com nitroprussiato (CARSON & NEIL, 1962), que detectava a presença do aminoácido na urina, ou com uso de analisadores de aminoácidos desenvolvidos em finais dos anos 50 (STEIN & MOORE, 1953). Em meados da década de 70, esses métodos foram substituídos pela segunda geração de analisadores de aminoácidos, que determinavam o homocisteína-cisteína no plasma ou soro de indivíduos saudáveis. O princípio comum de todos os métodos é o uso de um agente redutor que rompe a ligação entre homocisteína, proteínas e outros tióis, formando assim homocisteína reduzida, que pode ser quantificada diretamente ou após derivatização. A maioria destes ensaios é baseada em técnicas cromatográficas com detecção por fluorescência (UELAND *et al.*, 1993).

WILCKEN & WILCKEN (1976) realizaram o primeiro estudo clínico sustentando a teoria de McCULLY (1975). Eles encontraram em pacientes com angiografia confirmada de doença arterial coronária (DAC) um aumento das concentrações de homocisteína após sobrecarga de metionina quando comparado ao controles. O grupo de estudo era constituído de indivíduos com idade inferior a 50 anos com angiografia confirmada de doença cardíaca isquêmica e que não possuíam fatores de risco conhecidos. Dentre os 25 indivíduos do grupo de estudo, 7 tinham concentrações aumentadas de homocisteína, após ingestão de metionina; foram classificados como heterozigotos para homocistinúria, enquanto apenas 1 dos 22 controles apresentava elevação semelhante.

GENEST *et al.* (1991) introduziram o termo hiper-homocisteinemia familiar, que é esporadicamente escrita como hiperhomocist(e)inemia, este termo no qual tem-se a letra "e" está entre parênteses é usada para designar todas as formas de homocisteína, vide Figura 5 (MUDD *et al.*, 1995).

GENEST *et al.* (1991) estimaram que 14% dos pacientes com DAC possuem hiper-homocisteinemia familiar. Outros dados sugerem uma relação com doenças cerebrovasculares e das artérias periféricas (STAMPFER *et al.*, 1992).

WU *et al.* (1994) encontraram Hiper-homocisteinemia em 12% das 85 famílias com dois ou mais membros afetados por doença tardia das artérias coronarianas.

Os fatores genéticos envolvidos com essa variação dos valores de homocisteína não são conhecidos, assim como não se sabe se a suplementação com vitaminas do complexo B podem ter um efeito protetor por um longo período. Os estudos mostrando que as elevações dos valores basais de homocisteína estão correlacionados e têm ligação entre uma mesma família de pacientes com doenças cardiovasculares e trombose venosa juvenil, sugeriram que a hiper-homocisteinemia moderada pode ser uma doença herdada (FALCON *et al.*, 1994; WU *et al.*, 1994).

FALCON *et al.* (1994) determinaram a prevalência da hiper-homocisteinemia antes e depois da sobrecarga de metionina em 80 pacientes que tinham no mínimo um episódio de tromboembolismo antes dos 40 anos de idade e em 51 controles. De acordo com esse critério, hiper-homocisteinemia foi mostrada em 15 pacientes (18,8%) e em 1 controle (1,9%). O histórico familiar para tromboembolismo venoso foi positivo em 7 de 15 pacientes.

SELHUB *et al.* (1995) concluíram que o aumento da concentração plasmática de homocisteína e a diminuição da concentração de folato e vitamina B6 estão associados com um aumento no risco de estenose da carótida extracranial em idosos.

BOUSHEY *et al.* (1995) e MOTULSKY (1996) concluíram através de uma meta-análise de 27 importantes publicações que a elevação da homocisteína plasmática é um importante fator de risco independente para aterosclerose não associado a hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e tabagismo. Assim como, o valor de colesterol elevado, o risco é de grau crescente, isto é, aumenta na medida em que se elevam as concentrações plasmáticas de homocist(e)ína. Estima-se que 10% dos indivíduos das populações de risco para doença coronária, estão correlacionados com a elevação dos valores de homocisteína (BOUSHEY *et al.*, 1995).

---



DEN HEIJER *et al.* (1996) ao avaliarem a determinação da homocisteína em 269 pacientes diagnosticados com episódios de trombose venosa profunda e 269 indivíduos sadios como controles com compatibilidade de idade e sexo concluíram que o aumento plasmático das concentrações de homocisteína é um fator de risco para o desenvolvimento de trombose venosa profunda em geral.

WELCH & LOSCALZO (1998) ao revisarem os tópicos da homocisteína e aterotrombose, iniciando com as observações clínicas de McCULLY (1969), observaram que estudos prospectivos múltiplos e de casos-controle mostraram que valores moderadamente elevados de homocisteína plasmática constituem um fator independente de risco para doença vascular aterotrombótica. Eles concluíram que não está bem claro se a homocisteína, metabólito ou cofator são primariamente responsáveis pelos efeitos aterogênicos da hiperhomocist(e)inemia *in vivo*. Embora a suplementação vitamínica diminua ou normalize a concentração plasmática de homocist(e)ína na maioria dos casos, estudos clínicos prospectivos e aleatórios são necessários para determinar o efeito da suplementação vitamínica na mortalidade ou morbidade cardiovascular.

Para o entendimento da função da homocisteína na patogênese da aterosclerose, HARKER *et al.* (1974) mostraram que ocorre descamação do endotélio em babuínos perfundidos cronicamente com homocistina. Em voluntários humanos com homocistinúria, eles demonstraram uma sobrevida reduzida e aumento anormal no movimento das plaquetas, aumento de fibrinogênio e plasminogênio. Estas anormalidades foram corrigidas pela diminuição da homocistina plasmática com piridoxina (nos casos responsivos a B6) ou pela administração de dipiridamol (nos casos que não respondiam a B6), mas não pelo uso de anticoagulantes como heparina. A função plaquetária se apresentava normal nesses pacientes e em animais usados como modelo experimental.

FRYER *et al.* (1993) demonstraram que a homocisteína pode induzir a atividade procoagulante do fator tecidual em cultura de células endoteliais.

TSAI *et al.* (1994) examinaram os efeitos da homocisteína sobre o crescimento de células musculares lisas dos vasos e células endoteliais em concentrações similares às aquelas observadas clinicamente. Concentrações de homocisteína inferiores a 0,1 mM causaram um aumento de 25% na taxa de mitose das células, enquanto que a homocisteína a 0,1 mM o efeito observado foi o aumento da taxa de mitose das células musculares lisas da aorta de rato em 4,5 vezes. Em contraste, a homocisteína causa um decréscimo dose-dependente na mitose em células de veias de cordão umbilical humana. A homocisteína estimula o aumento da expressão de mRNA das ciclinas D1 e A em células do músculo liso da aorta de 3 a 15 vezes. Estes compostos exercem importante função na reentrada de células musculares lisas quiescentes no ciclo celular. O efeito da homocisteína em promover o crescimento em células musculares lisas dos vasos, em conjunto com os efeitos inibitórios sobre o crescimento de células endoteliais, a ação da homocisteína na indução da aterosclerose (TSAI *et al.*, 1994).

BRATTSTROM *et al.* (1987) sugeriram que a deficiência de cistationina sintase está envolvida na patofisiologia da aterosclerose, e assim os pacientes com síndrome de Down poderiam estar protegidos contra a aterosclerose. Como foi mostrado por MURDOCH *et al.* (1977), a aterosclerose é rara nos indivíduos com síndrome de Down referindo-se à mesma como um "modelo livre de ateroma". KRAUS *et al.* (1996) demonstraram um aumento de 66% da atividade média da cistationina  $\beta$ -sintase em cultura de fibroblastos obtidos de pacientes com síndrome de Down, quando comparado aos controles, o que pode confirmar a função protetora desta enzima.

A homocistinúria clássica é um raro erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência de cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) gerando um aumento da metionina e homocistina urinária (CAREY *et al.*, 1968). As manifestações clínicas mais importantes envolvem os olhos, sistema nervoso central, sistema ósseo e sistema vascular (ABBOTT *et al.*, 1987). A heterozigose para a deficiência de CBS acomete uma a cada 200 pessoas na população em geral, outros erros inatos do metabolismo também autossômicos recessivos, tais

como, a deficiência de metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), deficiência de metionina sintase e cinco diferentes tipos de defeitos no metabolismo de cobalamina (CbC, CbD, CbE, CbF e CbG) estão também associados com hiper-homocisteinemia e homocistinúria. Enquanto todos estes defeitos são extremamente raros (porque só se expressam quando em homozigose), os correspondentes heterozigotos ou portadores destas desordens são mais freqüentes, mas ainda que, em conjunto não poderiam causar uma freqüência de hiper-homocisteinemia na população.

KANG *et al.* (1988) encontraram uma nova forma de deficiência de MTHFR que é caracterizada pela ausência de anormalidades neurológicas e uma diminuição da atividade enzimática a valores menores do que 50% do normal, e uma termolabilidade distinta da MTHFR sob condições específicas de inativação pelo calor. Estudos em 10 famílias foram consistentes em afirmar que se tratava de uma herança autossômica recessiva, a forma termo-lábil. A atividade residual enzimática era determinada após inativação pelo aquecimento a 46°C da enzima extraída de linfócitos obtidos de indivíduos afetados e não afetados. KANG *et al.* (1991) concluíram que a MTHFR termo-lábil está associada com o desenvolvimento de doença arterial coronariana. A MTHFR termo-lábil estava presente em 17% dos pacientes cardíacos e somente 5% dos controles. Os sintomas clínicos da doença arterial coronariana nos pacientes com MTHFR termo-lábil manifestavam-se aos 57,3 anos e a concentração plasmática média da homocisteína foi de 13,19  $\mu\text{M}$  uma significativa diferença dos valores médios normais de 8,5  $\mu\text{M}$  (KANG *et al.*, 1991).

FROSST *et al.* (1995) identificaram a substituição da citosina (C) por timina (T) na posição 677 da seqüência nucleotídica no cDNA do gene MTHFR conforme descrito previamente por (Goyette *et al.*, 1994). De acordo com a presença ou ausência desta substituição podemos genotipar os indivíduos em homozigoto CC (genótipo selvagem), heterozigoto CT e homozigoto TT (genótipo mutante).

Esta substituição troca o aminoácido alanina para valina na seqüência polipeptídica na posição 222. Este polimorfismo cria um sitio de restrição para a

enzima *Hinf* I o que permitiu analisar a frequência alélica relativa desta mutação nos cromossomos de 114 indivíduos franco-canadenses não selecionados, a frequência desta substituição foi de 0,38. Indivíduos homocigotos ou heterocigotos para a substituição apresentavam uma redução da atividade enzimática e aumento da termolabilidade da enzima específica, isto pode ser constatado através do estudo de extratos de linfócitos obtidos de indivíduos com a mutação (genótipo TT) e a expressão *in vitro* da enzima; utilizando-se do cDNA mutante confirmou-se o efeito desta mutação sobre o aumento da termolabilidade da enzima MTHFR. Indivíduos homocigotos para a substituição (genótipo TT) apresentavam um aumento significativo das concentrações plasmáticas de homocisteína, cerca de 3,5  $\mu$ M a mais que os indivíduos com homocigoto CC (genótipo selvagem).

Como se pode observar na tabela 1, a frequência do alelo T do polimorfismo C677T no gene MTHFR é variável entre diferentes populações. As mais altas frequências foram observadas entre os italianos e colombianos. As menores frequências foram descritas em afro-americanos, índios brasileiros e negros africanos.

Um estudo feito na população judaica revelou uma alta frequência do alelo T (0,477), que foi similar à população colombiana (0,487) (CAMACHO-VANEGAS *et al.*, 1998).

A frequência do alelo T para o polimorfismo C677T da MTHFR varia na Europa entre 24% a 40%, na população japonesa de 26% a 36% e aproximadamente 11% em afro-americanos em que a incidência é bem menor (SCHNEIDER *et al.*, 1998).

No Brasil, temos uma população bastante heterogênea formada por uma mistura complexa de raças, composta de imigrantes da Europa, África, Ásia, assim como grupos indígenas. Dentre os principais grupos étnicos, as frequências de indivíduos com genótipo homocigoto TT do gene da MTHFR segue a tendência mundial sendo maior em caucasianos (10%) que entre negros (1,45%) ou na população indígena (1,2%) (ARRUDA *et al.*, 1998).

---

**Tab. 1. Frequência do alelo T do polimorfismo C677T do gene da MTHFR em diferentes populações.**

População	Frequência alélica (T)	Referências
Franco-canadenses	0,380	Frosst <i>et al.</i> , 1995
Irlanda	0,270	Whitehead <i>et al.</i> , 1995
Holanda	0,260	Van der Put <i>et al.</i> , 1996
Utah Mormons	0,270	Papatreou <i>et al.</i> , 1996
Japão	0,270	Papatreou <i>et al.</i> , 1996
Itália	0,400	De Franchis <i>et al.</i> , 1996
Estados Unidos-população I	0,210	Ou <i>et al.</i> , 1996
Estados Unidos-população II	0,220	Ou <i>et al.</i> , 1996
Inglaterra	0,360	Papatreou <i>et al.</i> , 1996
Estados Unidos-caucasianos	0,350	Stevenson <i>et al.</i> , 1997
Norte da Itália	0,450	Sacchi <i>et al.</i> , 1997
Europa-caucasianos	0,362	Franco <i>et al.</i> , 1998
França	0,360	Mornet <i>et al.</i> , 1998
Reino Unido	0,353	Gudnason <i>et al.</i> , 1998
Sul de Gales	0,320	Clark <i>et al.</i> , 1998
Centro da Europa	0,312	Gudnason <i>et al.</i> , 1998
Sul de Wales	0,320	Clark <i>et al.</i> , 1998
Centro da Europa	0,312	Gudnason <i>et al.</i> , 1998
Alemanha	0,310	Koch <i>et al.</i> , 1998
Amerícanos	0,240	Franco <i>et al.</i> , 1998
Bálticos	0,233	Gudnason <i>et al.</i> , 1998
Brasil-negros	0,200	Arruda <i>et al.</i> , 1998
Brasil-negros	0,120	Franco <i>et al.</i> , 1998
Brasil-índios	0,114	Arruda <i>et al.</i> , 1998
Africanos-negros	0,052	Franco <i>et al.</i> , 1998

Fonte: RADY *et al.*, 1999

SOHDA *et al.* (1997) mostraram que frequências alélicas e genóticas do alelo T estavam significativamente aumentadas em um grupo de pacientes com pré-eclâmpsia. Eles concluíram que o genótipo 677TT do gene MTHFR é um dos fatores genéticos de risco para pré-eclâmpsia.

KLUIJTMANS *et al.* (1996) concluíram que o homocigoto para o genótipo TT está associado com um aumento de três vezes no risco para doença cardiovascular prematura. No mesmo estudo também foi investigada a frequência da mutação 833T.C no gene da enzima cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) em pacientes com DCV. Embora esta mutação seja descrita em 50% dos alelos CBS nos pacientes com deficiência de cistationina  $\beta$ -sintase, ela não foi encontrada em

nenhum dos pacientes com DCV, concluindo que a heterozigose para deficiência de CBS pode não estar envolvida na patofisiologia da doença cardiovascular prematura.

A forma clássica da deficiência de Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é o mais importante erro inato no metabolismo do folato, sendo uma doença extremamente rara com cerca de 35 pacientes descritos (ROSENBLATT, 2001). Embora essa desordem cause o aparecimento de trombose vascular semelhante a que acomete os indivíduos que possuem deficiência de CBS (MUDD *et al.*, 1985), as anormalidades ósseas e oculares características da homocistinúria clássica não são observadas. Os pacientes com deficiência de MTHFR apresentam anomalia vascular similar à encontrada na deficiência de cistationina sintase, o que sustenta a tese que a elevação das concentrações de homocisteína, de qualquer origem seja responsável pelas alterações vasculares (HAAN *et al.*, 1985).

Os pacientes com deficiência de MTHFR apresentam descoordenação, parestesias e distúrbios psiquiátricos, sintomas que desaparecem gradativamente com a administração de ácido fólico e piridoxina (FREEMAN, 1975).

O gene humano da MTHFR foi clonado e seqüenciado, localiza-se na região do braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) (GOYETTE *et al.*, 1998). O clone genômico humano (17Kb) da MTHFR contém uma seqüência de cDNA de 2,2 Kb de comprimento, sendo formado por 11 exons de tamanhos que variam de 102 bp a 432 bp. Os introns possuem tamanhos que se estendem de 250 bp a 4,2 Kb. Uma representação gráfica do gene humano da MTHFR é demonstrada na figura 6. O exon 1 foi definido de acordo com a publicação original do cDNA Humano com base na presença do códon de iniciação da tradução (metionina) (GOYETTE *et al.*, 1994).

Dentre as mutações até o momento descritas que conferem hiperhomocisteinemia se pode citar 12 mutações no gene da cistationina sintase redutase (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119440.html>), 17 outras mutações novas no gene da enzima adenosina metil-transferase

(<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/129077.html>), e aproximadamente 88 mutações no gene da enzima cistationina  $\beta$ -sintase (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119754.html>) e cerca de 26 mutações foram identificadas no gene da MTHFR.



Figura 6. Representação esquemática do gene da MTHFR humano. Os exons estão indicados nas caixas pretas, com a numeração correspondente. As regiões não caracterizadas estão simbolizadas pela linha tracejada. An = sítio de poliadenilação.

Sendo a maioria destas mutações raras e associadas com a deficiência enzimática grave (quando em homozigose), e uma variante associada à deficiência leve (GOYETTE *et al.*, 1994; GOYETTE *et al.*, 1995; FROSST *et al.*, 1995; GOYETTE *et al.*, 1996; GOYETTE *et al.*, 1998; KLUIJTMANS *et al.*, 1998; VAN DER PUT, 1998). Dentre todas estas, a mais importante mutação devido a sua alta freqüência é a C677T MTHFR.

Um outro fator de risco independente que tem sido observado nos estudos avaliando as causas das doenças cardiovasculares são os chamados fatores da coagulação.

A trombose venosa é uma das principais causas de morbidade e de mortalidade principalmente em indivíduos de origem européia.

Eventos trombóticos tendem a ocorrer em certas ocasiões relacionados ao ato cirúrgico, gravidez, utilização de contraceptivos orais ou imobilização, sugerindo que fatores de risco circunstanciais podem ser importantes no desenvolvimento da doença. Cerca de 80 a 90% das causas de tromboses já podem ser identificadas com a ajuda de exames clínicos e laboratoriais complementares. Aproximadamente 50% dos pacientes identificados possuem

defeitos congênitos ou adquiridos nas proteínas da coagulação ou plaquetas, como causa do evento trombótico, vide tabela 2. Toma-se de suma importância a caracterização dos defeitos nestes indivíduos, possibilitando a introdução de terapia antitrombótica para diminuir os riscos de recorrência, determinação do período em que o paciente deve permanecer sob terapia para uma prevenção secundária, e para a triagem de defeitos hereditários entre membros familiares (KAPPLAN, 1998).

**Tabela 2. Principais fatores adquiridos e congênitos associados à trombose**

ADQUIRIDOS	CONGÊNITOS
Cirurgia	<b>Resistência à proteína C ativada, Fator V (Leiden) e outras mutações</b>
Coagulação intravascular disseminada (CIVD)	Deficiência de antitrombina III
Trombose prévia	Deficiência de proteína C
Presença de anticorpos	Deficiência de proteína S
Hiper-homocisteinemia (causas nutricionais)	Hiper-homocisteinemia (causas genéticas)
Antifosfolipídeos (anticoagulantes lúpicos)	Mutação G2021A do gene da trombina
Gravidez	Defeitos na fibrinólise
Uso de contraceptivos orais	
Uso de estrógenos	
Fumo	
Trauma	
Imobilização	
Implantes de válvulas cardíacas	
Neoplasias	

Fonte: MITCHELL & COTRAN, 1999

A coagulação sangüínea não ocorre na circulação normal. Contudo, quando um vaso sangüíneo é rompido e há sangramento forma-se um coágulo e estanca-se o sangramento. A coagulação do sangue é o resultado de uma série de reações químicas, que envolvem, principalmente, um grupo de enzimas plasmáticas específicas, chamadas de fatores da coagulação.



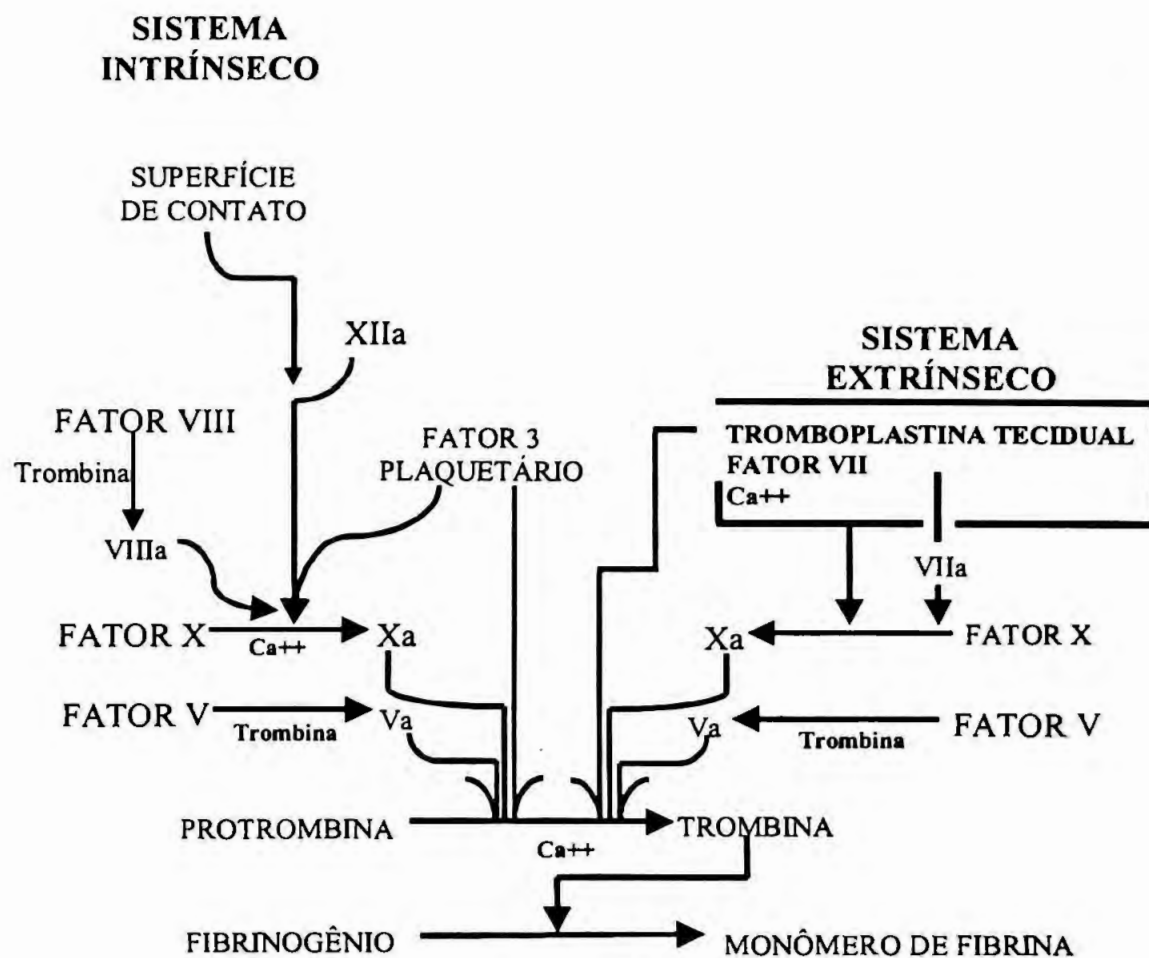


Figura 7. Esquema representativo simplificado da coagulação pelos mecanismos extrínseco e intrínseco. A tromboplastina tecidual e os fosfolípidios dos tecidos ativam o mecanismo extrínseco, enquanto o contato do fator XII e plaquetas com o colágeno da parede vascular ativam o sistema o intrínseco.

A coagulação sanguínea pode ocorrer como resultado de dois mecanismos bioquímicos distintos que são, respectivamente, os mecanismos extrínseco e intrínseco (vide Fig. 7). O mecanismo extrínseco inicia-se quando se têm as rupturas de um ou mais vasos sanguíneos e subsequente exposição do sangue aos tecidos lesados. Dois fatores liberados pelos tecidos lesados, o fator tecidual (tromboplastina tecidual) e os fosfolípidios teciduais, iniciam a reação no plasma

que promove a reação conjunta dos fatores V, VII e X, sob a influência dos íons cálcio para a formação da trombina.

O mecanismo intrínseco é desencadeado pela ativação do fator XII através do contato com as membranas celulares ou subendotélio, o que determina uma série de reações que envolvem os fatores V, VIII, IX, X e XI, bem como os íons cálcio; como produto final tem-se também a ativação da protrombina para trombina. A trombina formada promove a despolimerização do fibrinogênio em filamentos de fibrina, que enredam os glóbulos vermelhos, para formar o coágulo propriamente dito (TRIPPLETT, 2000).

As trombofilias ocorrem em consequência do desequilíbrio no processo de hemostasia, predominando o estado de hipercoagulação em decorrência da deficiência dos inibidores fisiológicos da coagulação ou do sistema fibrinolítico.

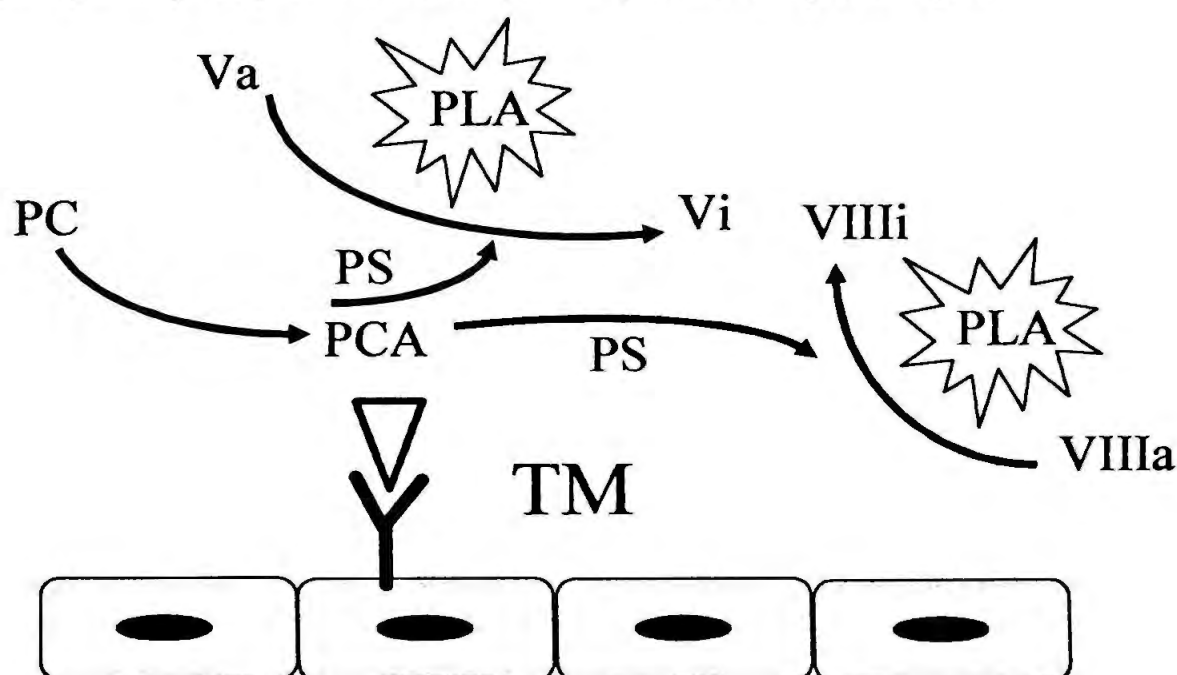
Os inibidores fisiológicos da coagulação (ou anticoagulantes naturais) desempenham papel importante na modulação do processo de coagulação. Estão presentes no plasma e agem de dois modos distintos: 1- como inibidor tipo serina proteases, sendo representados pela antitrombina III e cofator II da heparina; 2 - proteína C, que é uma proteína dependente de vitamina K e também o maior inibidor do sistema pró-coagulante.

A proteína C é uma enzima proteolítica do tipo serina protease sintetizada nos hepatócitos com peso molecular aproximadamente de 56.000 Daltons. Circula sob a forma de pró-enzima inativa (zimogênio) tendo a meia vida plasmática de 6 a 8 h. A proteína C exerce a sua atividade inibitória primária inativando os fatores Va e Vlla, os dois co-fatores necessários à ativação da trombina e do fator Xa. Para realizar essa desativação, a proteína C depende de uma proteína denominada trombomodulina, que se localiza na membrana celular das células endoteliais dos vasos sanguíneos (MARLAR *et al.*, 1982).

A trombomodulina liga-se à trombina induzindo-a clivar a proteína C inativa (mais do que o fibrinogênio-alvo da trombina), convertendo a proteína C inativa na forma ativa. A seguir, a proteína C ativada cliva tanto o fator Vlla da via intrínseca quanto o fator Va da via extrínseca. Ambas as ações inibem a conversão da

protrombina em trombina, a proteína C ativada tem sua atividade inibida pela anti-trombina (TRIPLETT, 2000).

A proteína S livre é sintetizada pelo fígado sendo vitamina K-dependente e atua como cofator para a proteína C ativada, clivando e destruindo quantidades de fatores Va e VIIIa gerados. Deste modo, a função da proteína C é intensificada pela presença de proteína S e fosfolídeos (JOBE, 1998) *vide* Fig. 8.



TM = Trombomodulina  
 ▼ = Trombina  
 PC = Proteína C  
 PS = Proteína S  
 PCA = Proteína C ativada  
 PLA = Plaquetas ativas ou outras células (ex., células endoteliais)  
 Va = Fator V ativado  
 VIIIa = Fator VIII ativado  
 Vi = Fator V inibido  
 VIIIi = V inibido

Fig. 8. Representação esquemática simplificada do mecanismo de inativação dos fatores Va e fator VIIIa por clivagem enzimática pelo complexo Proteína C ativada e Proteína S. Fonte Triplett, 2000

A proteína C ativada também favorece a fibrinólise através da neutralização do inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) (MARLAR *et al.*, 1982).

Recentemente, o conhecimento de defeitos genéticos, tais como, deficiências de proteínas anticoagulantes, como a proteína C, proteína S ou antiprotrombina III, foram encontradas em menos de 10% dos pacientes com

trombose (ALLART *et al.*, 1994; HEIJBOER *et al.*, 1990; MILETICH *et al.*, 1993). A deficiência de proteína C pode ser congênita ou adquirida. A forma congênita é transmitida em caráter autossômico dominante. A probabilidade de identificar um defeito genético em pacientes com trombose mudou drasticamente com a descoberta de uma resistência hereditária a proteína C ativada (RPCA); como um fator de risco para trombose. Em pacientes com trombose, RPCA é encontrada em 20 a 60% dos pacientes e as diferenças nas frequências estão relacionadas aos critérios de seleção dos pacientes e na prevalência da população estudada (GRIFFIN *et al.*, 1993; SVENSSON & DAHLBÄCK, 1994).

BERTINA *et al.* (1994) identificaram uma mutação no gene do fator V como sendo à base da deficiência do cofator da proteína C em uma família com resistência a proteína C ativada (RPCA) e aumento da propensão ao desenvolvimento de trombose. Em dois pacientes classificados como homozigotos para a deficiência do cofator, eles encontraram homozigose para a substituição do nucleotídeo guanina por adenina na posição 1691 no exon 10 do gene do Fator V. Esta mutação leva a uma troca do aminoácido arginina por glicina na posição 506 da seqüência aminoacídica. Eles se referiram a esta mutação como Fator V Leiden. Esta mutação é também conhecida como R506Q, usando a letra que simboliza a troca do aminoácido, sendo também conhecida como 1691G-A de acordo com a substituição que ocorre na seqüência oligonucleotídica. Os autores encontraram que em 64 pacientes com trombose e resistência a Proteína C ativada (selecionados entre 301 pacientes que sofreram pelo menos um episódio de trombose venosa profunda), 56 desses eram portadores da mutação R506Q. Sendo que em 6 pacientes a mutação era homozigótica, e os outros 50 pacientes restantes eram heterozigotos. A heterozigose para a mutação no gene do fator V estava associada com um aumento de 5-10 vezes ao risco de trombose, enquanto que a homozigose está associada com um aumento do risco de 50-100 vezes.

MAJERUS (1994), declarou que de 2 a 4% da população holandesa e 7% da população sueca são portadores do alelo mutante. Uma prevalência similar da mutação é encontrada nos EUA.

No Brasil ARRUDA *et al.* (1995), estudaram 3 grupos de indivíduos compreendendo 2 grupos de trombofílicos totalizando 81 pacientes e um terceiro grupo constituído por 100 controles e observaram grande freqüência do Fator V de Leiden (cerca de 20%) nos pacientes triados com pelo menos um episódio de trombose venosa. A análise dos resultados mostrou que 2% dos controles tinham o alelo 1691A, esta freqüência é similar à encontrada na população holandesa; declarando o autor que o Fator V de Leiden pode ser uma causa freqüente de trombofilia hereditária em diferentes regiões do mundo levando-se em consideração a origem étnica.

**Tabela 3 - Alterações moleculares descritas para o Fator V: número do códon onde há a substituição da base nitrogenada, nucleotídeo e aminoácidos substituídos e os respectivos fenótipos.**

Codon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referências
221	GCC-GTC	Ala-Val	Deficiência do fator V	MURRAY et al, 1995
306	AGG-ACG	Arg-Thr	Trombose	WILLIAMSON et al, 1998
306	cAGG-GGG	Arg-Gly	Trombose	CHAN et al, 1998
485	AGA-AAA	Arg-Lys	↑ risco trombose	HIROSHI et al, 1998
506*	CGA-CAA	Arg-Gln	Trombose	BERTINA et al, 1994
712	gCGA-TGA	Arg-Term	Trombose	LUNGI et al, 1998
1299	CAT-CGT	His-Arg	Trombose	CASTMAN et al, 1997

G = guanina  
C = citosina  
T = timina  
A = adenina  
His = Histidina

Val = valina  
Ala = alanina  
Arg = arginina  
Term = termino da transcrição  
Gln = glicina

Foram descritas pelo menos oito alterações no gene que codifica a síntese do fator V, estas mutações estão relacionadas à substituições de nucleotídeos, originando proteínas mutantes (vide Tab. 3).

A alta prevalência de morbidade e mortalidade em nosso meio devio a doenças cardiovasculares é bem estabelecida. No entanto uma grande percentagem dos indivíduos que são acometidos não apresentam fatores de risco tradicionais para o desenvolvimento de DAC tais como a diabetes, hipertensão, dislipidemias entre outros. Isto no leva a especular que grande parte dos acometidos apresentam

outros fatores que possam influenciar no processo da aterogenese ou episódio agudo de acidente vascular. Com a finalidade de avaliar outros possíveis fatores adicionais que contribuam no desenvolvimento da DAC. , nos propusemos realizar um estudo direcionado para avaliar uma possível interação entre o polimorfismo C677T e Fator V Leiden e o aumento do risco para doença arterial coronariana de inicio precoce. em amostras populacionais de indivíduos jovens caucasóides e negróides brasileiros.

## **2. OBJETIVOS**

2.1. Avaliar a distribuição genotípica e a frequência relativa de alelos para o polimorfismo C677T do gene da MTHFR e do Fator V Leiden em indivíduos caucasianos e negróides.

2.2. Avaliar a influência do polimorfismo C677T do gene da MTHFR sobre o aumento plasmático de homocisteína.

2.3. Avaliar a associação do polimorfismo C677T do gene da MTHFR e do Fator V Leiden como fatores de risco para o desenvolvimento da doença arterial coronariana precoce.

---

### **3. CASUÍSTICA**

#### **3.1 População do estudo**

Entre março de 1999 e junho de 2000, foram selecionados 187 indivíduos (n=187) para a admissão no estudo. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado (Anexo I), o qual foi aprovado pelo comitê de ética local das respectivas instituições, e se encontram subdivididos nos três grupos abaixo citados.

##### **3.1.1 GRUPO CONTROLE 1 (GC1):**

O grupo controle 1 foi constituído de 68 indivíduos caucasianos, sendo 40 do sexo masculino e 28 do sexo feminino, com idade entre 18 a 59 anos saudáveis e normolipidêmicos, segundo o 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias (CONSENSO, 1996), provenientes do Centro de Hematologia de Cascavel, PR., sob a supervisão do Dr. Lourival Teixeira dos Santos. Os dados individuais se encontram no Anexo II.

##### **3.1.3 GRUPO ESTUDO 1 (GE1):**

O grupo de estudo 1 foi constituído de 40 adultos jovens não relacionados, caucasianos, sendo 23 do sexo masculino e 17 do sexo feminino, com idade variando entre 28 e 42 anos, com diagnóstico de aterosclerose e infarto do miocárdio por métodos clínicos e laboratoriais; provenientes do Ambulatório do

---



Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, SP. Os dados individuais estão no Anexo IV.

### **3.1.4 GRUPO ESTUDO 2 (GE2):**

O grupo estudo 2 foi constituído de 62 indivíduos negróides adultos jovens não aparentados sendo 40 do sexo feminino e 22 do sexo masculino, com idade variando entre 20 a 40 anos, sem manifestação clínica de DCV, mas possuíam históricos familiares da doença, sendo que 9 deles possuíam hipertensão, provenientes das comunidades do Mato Grosso do Sul. Os dados individuais estão apresentados no Anexo V.

## **3.2 Parâmetros Clínicos e bioquímicos**

Avaliou-se por questionário e histórico familiar, hábito de fumar e utilização de medicamentos. Determinaram-se também a concentração de colesterol total, triglicérides e homocisteína total.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Reagentes**

Utilizou-se iodeto de Sódio, álcool isopropílico, clorofórmio, cloreto de magnésio, álcool isoamílico, ácido tricloro acético, fosfato de sódio monobásico,

fosfato de sódio dibásico, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, etanol absoluto e azul de bromofenol que foram obtidos da MERCK S.A. (Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O brometo de etídeo, EDTA sódico, Taq DNA polimerase e tampão 10 x concentrado (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM e Tris-HCl 10 mM), solução de dNTPs foram obtidos da Amershan Pharmacia Biotech do Brasil (São Paulo, SP). A enzima de restrição *Hinfl*, agarose ultrapura, marcadores de DNA de 100 bp, Tris-base, ácido bórico ultrapuro, xilenocianol-FF, oligonucleotídeos iniciadores foram adquiridos da Life Technologies do Brasil (São Paulo, SP). O triscaboxi-etil-fosfato e 6-iodoacetamida fluoresceína da Pierce adquiridos da Sinapse (São Paulo, SP).

#### 4.2 Equipamentos

Utilizou-se centrífuga de bancada modelo LS3 adquirida da CELM (Barueri, SP), centrífuga para tubos Eppendorf (E.U.A.), termociclador com tampa térmica (PE-2400 Perkin Elmer EUA), fluxo laminar Veco modelo ULFS-12 (Campinas, SP), Câmara asséptica da Permution (Curitiba, Pr), Cuba horizontal para eletroforese Horizon 11-14 (Life Technologies do Brasil, EUA), Sistema fotográfico Polaroid (Cambridge, EUA), Fonte de eletroforese modelo EPS (200 e 400 mA, 550 V) e Transluminador UV Macrovue da Amershan Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia), Pipeta automáticas da Gilson (Emeryville, CA, EUA), Banho de água modelo 102 da Fanem (São Paulo, SP), Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) da Shimadzu com detector de fluorescência RF 535, sistema de injeção automático Sil-10A e programa de análise, gerenciamento e integração de dados LC-10A, Coluna Lichrosorb 5 µ RP 18250 x 4,6 mm adquirida da Metachem analítica (São Paulo, SP)

### 4.3 Amostras biológicas

Foram coletados em 3 tubos de sangue total venoso, pela manhã, utilizando um sistema de coleta a vácuo, sendo 1 tubo com anticoagulante EDTA 1 mg/ml de sangue, outro tubo com Fluoreto de Sódio 10mg/ml e um tubo sem anticoagulante. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos em centrífuga modelo LS 3 (Celm Ind., Barueri, SP) para obter o soro a ser usado nas determinações do perfil lipídico. As amostras com fluoreto foram utilizadas para determinação da homocisteína e as colhidas com EDTA utilizadas para obtenção de células para extração de DNA.

### 4.4 Determinações Bioquímicas

#### 4.4.1 Determinações de Lípidos e Lipoproteínas

A determinação do colesterol total e triacilgliceróis foram efetuadas em soro utilizando-se métodos enzimáticos colorimétricos (RANDOX, Irlanda) adquiridos no mercado Nacional da Uniscience do Brasil (São Paulo, SP). Pelas fórmulas de Friedewald calcularam-se os valores de colesterol da VLDL e colesterol LDL (FRIEDEWALD *et al.*, 1972).

**Princípio da determinação de colesterol:** O colesterol esterificado foi hidrolisado enzimaticamente a colesterol e ácidos graxos livres pela enzima colesterol esterase, o colesterol é oxidado pela enzima colesterol oxidase

formando colestenona e peróxido de oxigênio, o peróxido formado reage com fenol + 4-Aminoantipirina que na presença de peroxidase forma quinoneimina de cor rósea. A absorvância da reação é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra no comprimento de onda (RICHMOND,1973).

**Princípio da determinação de triacilgliceróis:** Os triacilgliceróis são hidrolisados formando glicerol e ácidos graxos livres, o glicerol reage posteriormente com o ATP formando glicerol-3-fosfato, este reage na presença de peróxido de oxigênio e glicerolfosfato-oxidase, obtendo fosfato di-hidroacetona mais peróxido de hidrogênio, o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminofenazona e 4-clorofenol na presença de peroxidase formando quinoneimina de cor rosea, sendo a absorvância da reação diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra no comprimento de onda 500 nm (TRINDER, 1969).

Os parâmetros lipídicos foram analisados de acordo com o 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias -1996 (CONSENSO, 1996) (Tabela 5).

#### **4.4.2 Determinação da homocisteína homocisteína plasmática total**

A homocisteína plasmática total é a soma da homocisteína ligada à albumina e outros compostos orgânicos, esta foi mensurada por cromatografia líquida de alta resolução com detecção por fluorescência Shimadzu (ARAKI & SAKO 1987; CAUSSÉ et al., 1999). A homocisteína plasmática foi quantificada e expressa em micromoles por litro.

#### 4.4.2.1 Preparo da amostra

Para determinação da homocisteína plasmática total, realizou-se a redução da homocisteína total a forma livre com posterior derivatização de acordo com o protocolo de CAUSSÉ et al., (1999), da seguinte forma; a uma alíquota de 100  $\mu$ L de plasma se adiciona 10  $\mu$ L de TCEP (tris-caboxi-etil-fosfato), agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos, após esta etapa adicionou-se 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 10% e centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 minutos, transferiu-se 100  $\mu$ L do sobrenadante para outro tubo adicionando 3  $\mu$ L de NaOH 5 M, 50  $\mu$ L de tampão carbonato (pH 9,5) e 50  $\mu$ L de uma solução de 6-iodoacetamido fluoresceína 1g/L em DMSO. Incubou-se a reação no escuro à temperatura ambiente por uma noite.

Depois de terminada as reações às amostras foram conservadas em congeladores  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes da injeção no HPLC o produto da reação foi diluído uma parte para dez em tampão carbonato 0,1M pH 9,5.

#### 4.4.2.2 Condições de cromatografia de alta resolução

Os seguintes tampões foram utilizados (ARAKI & SAKO 1987): tampão A acetato 0,1 M (pH 4.0 preparado de ácido acético 0,1M e acetato de sódio 0,1M) contendo 2% de metanol (v/v); tampão B 0,1M de tampão fosfato (pH 6,0 ajustado com 0,1M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) contendo 5% de metanol (v/v).

OS tampões foram filtrados através de filtro tipo HA (0,45  $\mu\text{M}$ , Millipore, Bedford, MA, U.S.A.), misturados com metanol e desgasificados para uso. Um gradiente linear através dos solventes A para B é obtido após 15 minutos (0-100%) e foi aplicado um fluxo de 0,5 mL/min.

#### 4.4.2.3 Tratamento do padrão

Para determinação da curva de referencia utilizou-se do padrão de homocistina dissolvido em tampão carbonato (pH 9,5). As concentrações utilizadas foram 8  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 12  $\mu\text{M}$  respectivamente, utilizou-se homocistina ao invés de homocisteína devido a sua maior estabilidade em água. Os padrões sofreram o mesmo tratamento da amostra.

### 4.5 ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

#### 4.5.1 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi obtido de leucócitos presentes no sangue periférico, segundo o método de LOPAREV *et al.* (1991) modificado em nosso laboratório. Trezentos microlitros de sangue total foram adicionados a igual volume de iodeto de sódio à 6 M em tubo de 1,5 mL do tipo eppendorf agitou-se vigorosamente por 30 segundos. A seguir adicionou-se uma mistura de 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se vigorosamente e centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 rpm em uma centrifuga de para tubo tipo eppendorf modelo MC-CV adquirida da CELM (Barueri, SP). O DNA foi isolado da fase aquosa pela precipitação com isopropanol absoluto e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, lavou-se então o precipitado com isopropanol a 37% e centrifugou-se a 10.000 rpm por 5 minutos. Suspendeu-se o precipitado em tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8.0) mantendo-os a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.2 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO DNA GENÔMICO

Para avaliação da integridade do DNA genômico extraído, utilizou-se de 5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA acrescidas de 1  $\mu\text{L}$  de tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol a 30%) que foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose a 1% (SAMBROOK *et al.*, 1989) com tampão TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM). A separação do DNA foi realizada em uma cuba de eletroforese horizontal a 100 volts, por 45 minutos. Após a separação eletroforética, os geis foram imersos em uma cuba contendo brometo de etídeo a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com posterior visibilização em transiluminador sob luz UV (Pharmacia LKB Uppsala, Suécia). Os resultados foram documentados com o sistema fotográfico Polaroid modelo DS 34 (Cambridge, Estados Unidos) utilizando filme instantâneo ASA 3000. O tampão e o gel foram descartados de forma adequada segundo as normas de CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança).

#### 4.5.3 Amplificação da região C677T do gene da MTHFR

A região polimórfica do gene da MTHFR (198 bp) foi amplificada pela PCR, segundo FROSST *et al.* (1995). Utilizou-se 200 ng do DNA genômico, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 200  $\mu\text{M}$  de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,5 unidades de Taq DNA polimerase e 3,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  em um volume total reação de 50  $\mu\text{L}$ . O DNA foi desnaturado inicialmente a temperatura de 96° por 3 minutos e, em seguida, amplificado por 35 ciclos, sendo cada ciclo composto pelas etapas de desnaturação a 95°C por um minuto, hibridação a 60°C por 1 minuto e polimerização a 72°C por 1 minuto, com uma polimerização final a 72°C por 7 minutos.

#### 4.5.3.1 Restrição enzimática dos produtos de amplificação .

Os produtos obtidos na amplificação pela PCR (item 3.5.3) foram submetidos à digestão enzimática da seguinte forma: Em um tubo de 0,5 mL do tipo Eppendorf pipetou-se 10 $\mu$ L de produtos da PCR e acrescentou-se 10 $\mu$ L de uma solução contendo 5 unidades da enzima *Hinfl* (Gibco, Life Technologies do Brasil) e tampão da respectiva enzima *Tris-HCL 100 mM (pH 8,0), MgCl<sub>2</sub> 20 mM e NaCL 50 mM*, e incubou-se em banho de água a 37°C por no mínimo 4 h.

#### 4.5.3.2 Avaliação eletroforética dos produtos de restrição enzimática

Para avaliação dos produtos de digestão enzimática, uma alíquota de 10  $\mu$ L do produto digerido foi acrescida de 2  $\mu$ L de tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol a 30%). Esta mistura foi centrifugada e submetida à separação eletroforética em gel de agarose a 3% (SAMBROOK *et al.*, 1989) utilizando cuba Horizon 11-14 (Gibco BRL, Life Technologies, São Paulo, SP) com tampão TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM, pH 8.0). A separação eletroforética foi realizada a 100 volts, por 45 minutos, utilizando uma fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB Uppsala, Suécia). Após a separação eletroforética, o gel foi imerso em uma cuba contendo brometo de etídeo a 0,5  $\mu$ g/mL e posterior visualização em transiluminador sob luz UV. Os resultados foram documentados com o sistema fotográfico Polaroid modelo DS 34 (Cambridge, Estados Unidos) utilizando filme instantâneo ASA 3000. O tampão e o gel foram descartados de forma adequada segundo as normas de CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança).



#### 4.5.3.3 Identificação dos genótipos do polimorfismo C677T.

Os genótipos para o polimorfismo C677T do gene da MTHFR foram identificados após reação em cadeia pela polimerase (PCR) e mapeamento de restrição do produto da PCR com a enzima *Hinf* I e separação eletroforética (FROSST *et al.*, 1995). Genótipo TT 175 bp e 23 bp, genótipo CC (genótipo selvagem) apresentam somente o fragmento de 198 bp e genótipo CT 198 bp, 175 bp e 23 bp, conforme apresentado na Fig. 9.

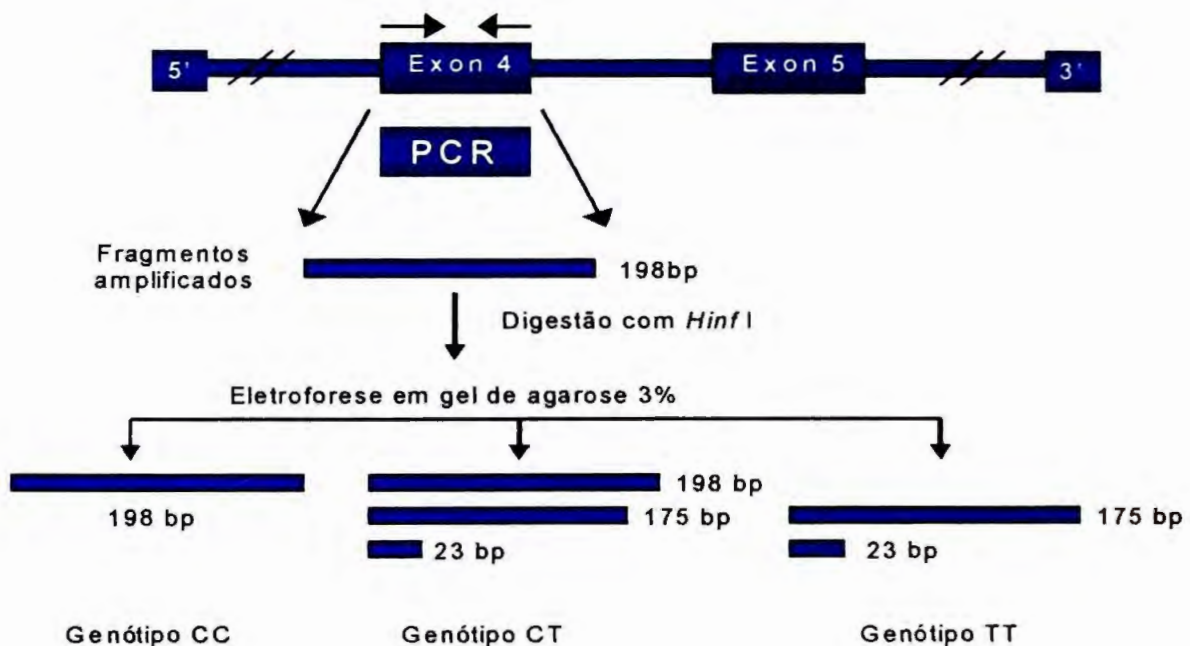


Figura 9. Fluxograma do procedimento da genotipagem da MTHFR. Para identificação do polimorfismo C677T MTHFR amplificou-se um fragmento de 198 bp, o qual foi submetido à restrição enzimática, sendo os indivíduos homocigóticos selvagens (genótipo CC) foram identificados pela presença do fragmento de 198 bp, os heterocigóticos 198, 175 e 23 bp e homocigóticos para a mutação 175 e 23 bp.

#### 4.5.4 Amplificação de fragmento do gene do Fator V

Foi utilizado o método PCR-ASO para a detecção do Fator V de Leiden (LEWANDOSWIKI *et al.*, 1997) e confirmado pela técnica de PCR-RFLP (BERTINA *et al.*, 1994). Na reação pela PCR-ASO para cada amostra de DNA a reação ocorreu em 2 tubos separadamente, onde um iniciador foi adicionado nas duas reações (iniciador sense). Em ambas reações, se utilizou 200 ng do DNA genômico, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador, 200  $\mu$ M das 4 dNTP, 1,5 unidade de Taq DNA polimerase e 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> em uma reação total de 50 $\mu$ L. Reação 1 (iniciador anti-sense nativo + iniciador sense) e reação 2 (iniciador anti-sense mutado + iniciador sense). O DNA foi desnaturado inicialmente a temperatura de 96°C por 3 minutos e, em seguida, amplificado por 35 ciclos, sendo cada ciclo composto pelas etapas de desnaturação a 95°C por um minuto, hibridação a 60° por 1 minuto e polimerização a 72° por 1 minuto, com uma polimerização final a 72°C por 7 minutos.

##### 4.5.4.1 Determinação dos genótipos e alelos do *Fator V de Leiden*

Os genótipos e alelos foram determinados após separação eletroforética dos produtos da PCR em gel de agarose a 1%, o produto de amplificação de 200 bp foi obtido na presença (Fator V Leiden) ou ausência da mutação (genótipo selvagem), como se trata de uma prova alelo-específica só se tem à amplificação do alelo correspondente, de acordo com a Figura 10.

---

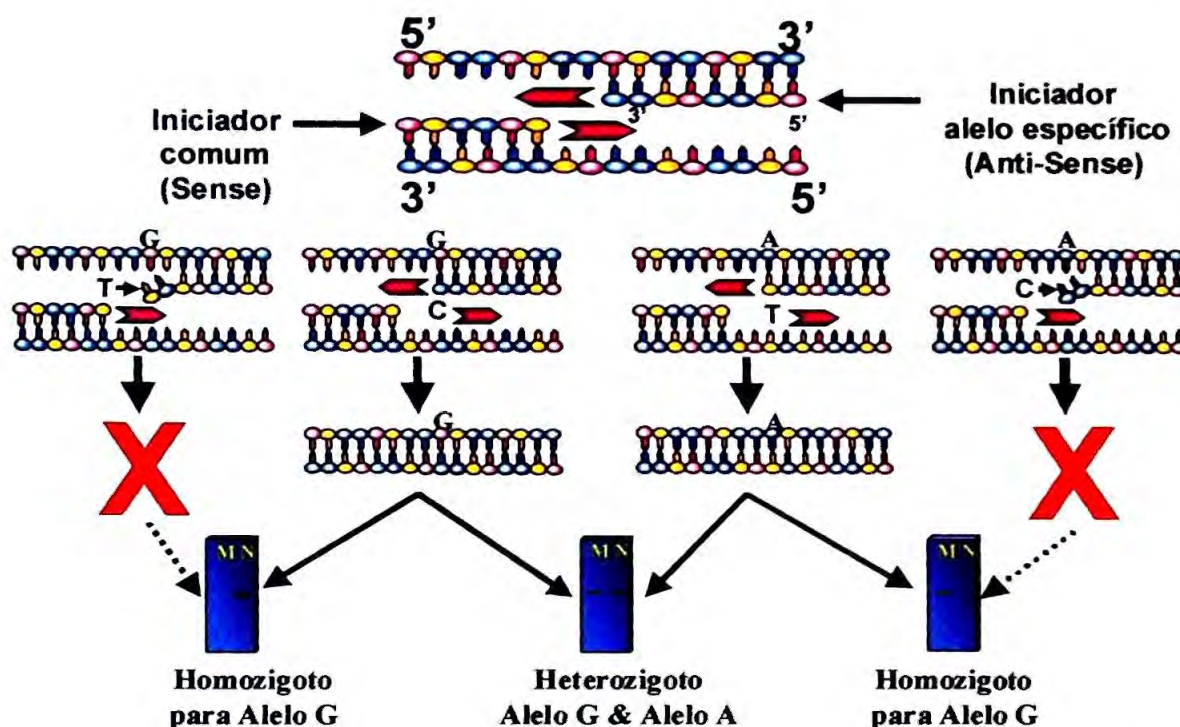


Figura 10. Fluxograma para a identificação do polimorfismo G1691A no Fator V por PCR-ASO. Neste método têm-se iniciadores específicos para os dois alelos correspondentes (G e A). Deste modo à amplificação de um fragmento de 200 bp só acontece quando o iniciador e DNA se complementam na última posição na região 3' da fita de DNA molde.

#### 4.5.4.2 Confirmação dos genótipos G1691A do fator V por PCR-RFLP

Para confirmação dos genótipos do fator Leiden também utilizou-se do método originalmente descrito para este polimorfismo (Bertina et al., 1994), neste método temos a amplificação de um fragmento de DNA de 220 bp, esta região amplificada do exon 10 do gene do fator V possui 2 sítios de restrição para a enzima MnlI exatamente no nucleotídeos 1637 e 1694. Após digestão o alelo selvagem (alelo 1691G), apresenta fragmentos de 116, 67 e 37 bp quando observados em gel de agarose à 2 %. Quando o alelo 1691A está presente perde-se um dos sítios de restrição para esta enzima sendo então identificado pela presença dos fragmentos de 153 e 67bp.

#### **4.6 Controle de Qualidade das análises bioquímicas e moleculares**

A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações bioquímicas foram feitas pela determinação concomitante de espécimes-controle baixo, médio e alto em cada carrossel fornecidos pelo sistema de controle de qualidade da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Foram utilizadas também replicatas em cada ensaio para analisar a reprodutibilidade do equipamento, e calibradores para averiguação da exatidão.

O controle de qualidade das reações de PCR foi realizado com e sem amostra de DNA, ou seja, controle positivo e controle dos reagentes, respectivamente. Para avaliação da reprodutibilidade de PCR, 10% das amostras foram repetidas de forma aleatória.

Para o controle de qualidade da digestão enzimática, foi utilizada amostra de DNA homozigótica e heterozigótica para a restrição (gentilmente doada por Dr. Valter Arruda do Centro de Hematologia de Campinas da UNICAMP e pelo Dr. D. Heinhardt da Divisão de Cardiologia da Universidade de Jena, Alemanha) e a repetição de 10% das amostras aleatoriamente.

O controle da cromatografia de alta resolução foi realizado pelo utilização de padrões e a repetição de 10% das amostras. Dosagens com variação superior a 5% foram desconsideradas.

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se do programa SigStat para Windows, versão 1.0. Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas, a análise foi feita pela observação dos valores mínimos e máximos, cálculo de média e desvio-padrão.

---

A relação entre as frequências gênicas e genóticas (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (BEIQUELMAN, 1995).

Para verificar o desvio das variâncias utilizou se do método de Anova run-test para os dados de distribuição não paramétricos.

O nível de significância considerado para os testes foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. Resultados

### 5.1 Determinação de lipídeos plasmáticos

A Tabela 5 apresenta os resultados das determinações de colesterol e triacilgliceróis com os seus respectivos desvios padrões nos três grupos avaliados. Observou-se que o grupo de enfartados jovens (GE 1) apresentou maior concentração média de colesterol e triacilgliceróis quando comparado ao grupo negroíde e controle ( $p < 0,001$ ).

**Tab. 5. Concentração de colesterol e triacilgliceróis nos três grupos avaliados**

	GC 1	GE 1	GE 2
Colesterol	152 ± 27	221 ± 49 <sup>ab</sup>	167 ± 58
Triacilgliceróis	79 ± 45	200 ± 145 <sup>ab</sup>	87 ± 47 <sup>f</sup>

GC 1 = grupo controle caucasóide; GE 1 = grupo de enfartados jovens e GE 2 = grupo de negroídes. ANOVA ON RANKS <sup>a</sup> $p = 0,001$  (comparado ao controle), <sup>b</sup> $p = 0,001$  (quando comparado do grupo de negroíde).

### 5.2 Determinação da homocisteína plasmática total

A figura 11 ilustra o cromatograma da separação eletroforética por HPLC da homocisteína plasmática total, utilizando a detecção por derivatização com 6-IAF, verifica-se que o tempo de retenção (RT) foi 28,30 minutos que foi padronizada a partir do tempo de retenção do padrão de homocisteína-6IAF, independentemente da maneira que os padrões foram preparados, a saber com e sem TCA. O método pela detecção da fluorescência da homocisteína 6-IAF foi linear na faixa de 2-50  $\mu\text{moles/L}$ .

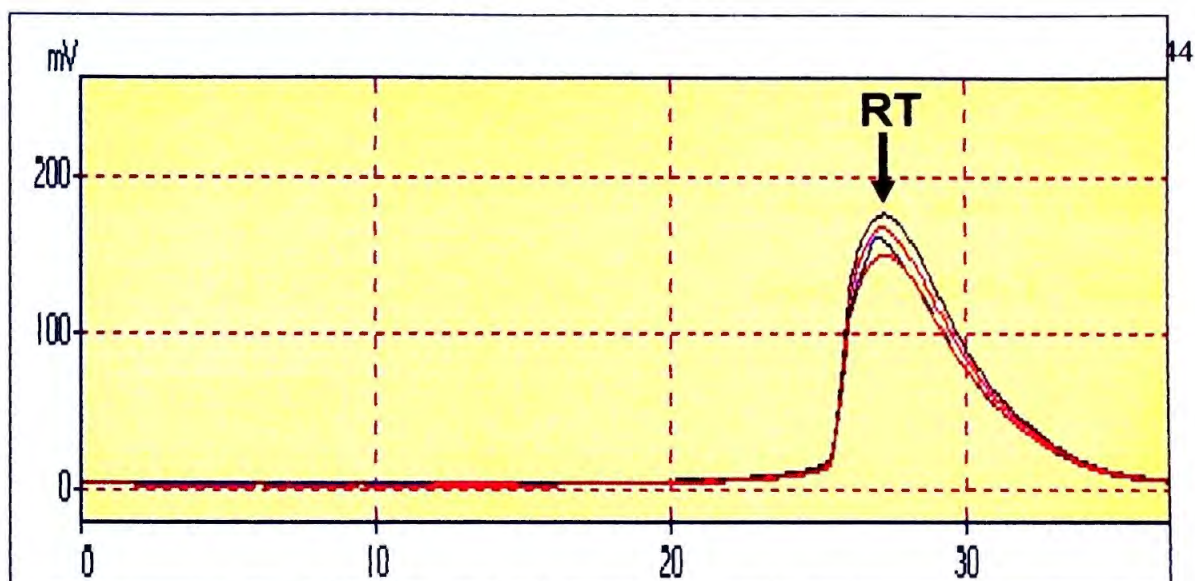


Figura 11. Cromatograma de 6-IAF derivatizada com homocisteína. Padrão de homocisteína (concentração 50 $\mu$ moles/L). RT (tempo de retenção)

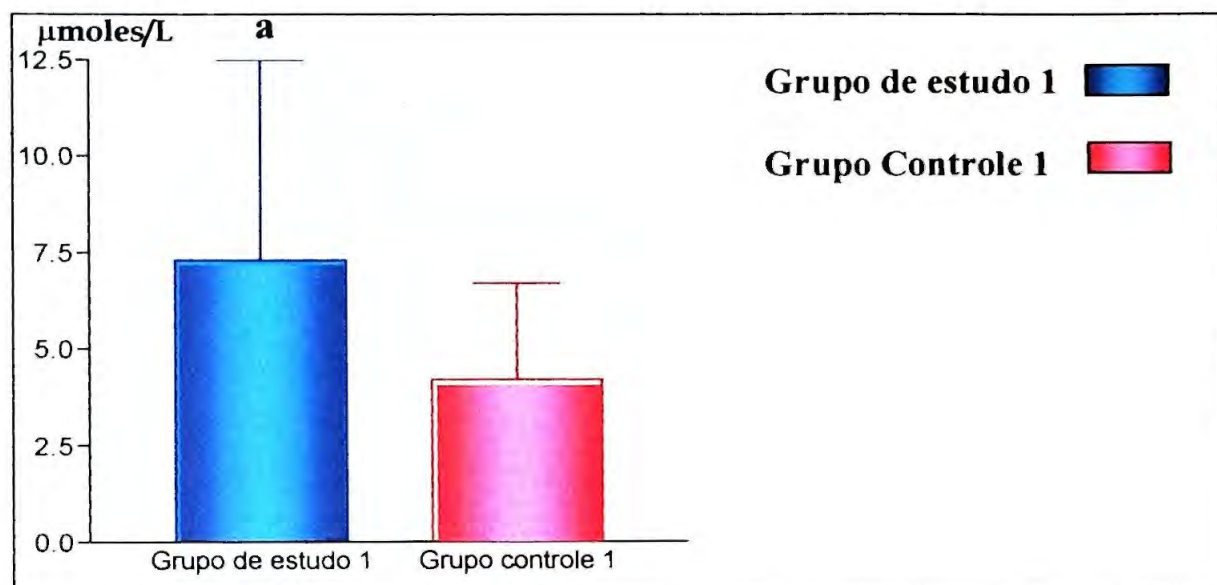
### 5.2.1 Comparação entre as concentrações plasmáticas de homocisteína no grupo de enfartados jovens (GE 1) e controles caucasóides (GC1).

A tabela 6 e figura 12 apresentam os resultados das determinações de homocisteína nos grupos de enfartados jovens (GE 1) e controles (GC 1). As concentrações médias de homocisteína encontradas no grupo de enfartados jovens (GE1) foram significativamente superior quando comparado ao grupo controle ( $7,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$  vs  $4,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ ;  $P= 0,0001$ ).

**Tabela 6. Valor médio e desvio padrão da homocisteína total ( $\mu\text{M}$ ) no grupo de enfartados jovens (GE 1) e controles (GC1).**

	Valor médio da homocisteína plasmática total ( $\mu\text{moles/L}$ )
Grupo de estudo 1 (GE 1) n= 39	$7,3 \pm 5,2^a$
Grupo controle 1 (GC 1) n= 43	$4,2 \pm 2,5$

<sup>a</sup> $P= 0,0001$  ANOVA ON RANKS



**Figura 12. Valores médios em µmoles/L da homocisteína total plasmática nos grupo de enfartados jovens (GE 1) e controles (GC 1). <sup>a</sup>P = 0,0001. ANOVA ON RANKS**

### **5.3 Análise do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR**

A figura 13 apresenta uma fotografia de um gel de agarose à 3%, após separação por eletroforese e coloração com brometo de etídeo dos produtos de amplificação da região polimórfica do gene da MTHFR após digestão com a enzima de restrição *Hinf* I. Na posição 1 e 5 observa-se o padrão de referência de 100 bp. Nas posições 2, 3 e 4 observa-se os fragmentos que caracterizam o genótipo Homozigoto (C/C), heterozigoto (C/T) e homozigoto (T/T), respectivamente.



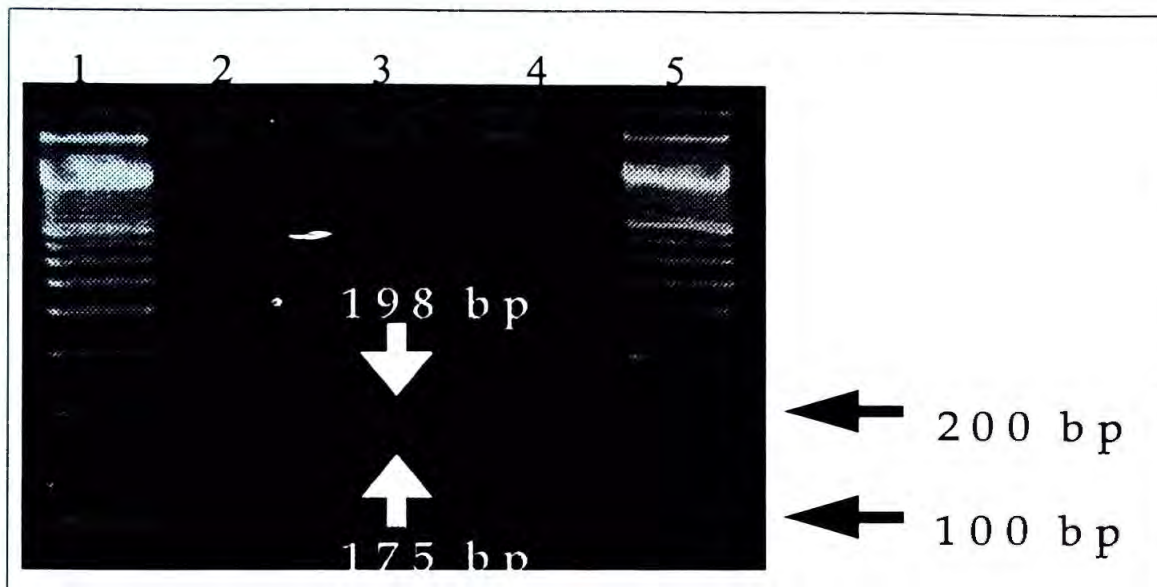


Figura 13. Fotografia de um gel de eletroforese em agarose a 3% corado com brometo de etídeo dos produtos de amplificação após restrição enzimática da região polimórfica C677T do gene da MTHFR. Posição 1 e 5 marcador de 100 bp; Coluna 3 indivíduo heterozigoto (genótipo C/T); posição 2 indivíduo homozigoto para o alelo Selvagem (genótipo CC); coluna 4 indivíduo homozigoto para a substituição (genótipo TT).

### 5.3.1 Avaliação da freqüência do polimorfismo C677T MTHFR

Os resultados da freqüência genotípica para o polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR nos três grupos avaliados, estão dentro do esperado uma vez que estas populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que indica que a amostragem utilizada neste estudo é representativa da população e, portanto permite a comparação entre os grupos.

A freqüência dos genótipos MTHFR no grupo de controles caucasóides (GC 1) foram as seguintes: 40%, 47% e 13% para os genótipos 677CC, 677CT e 677TT MTHFR, respectivamente. Estes resultados equivalem a uma freqüência alélica de 0,635 (C) e 0,365 (T).

No grupo de enfartados jovens (GE 1) a distribuição de genótipos para o polimorfismo 677 MTHFR foram as seguintes: 40%, 50% e 10% para os genótipos

677CC, 677CT e 677TT MTHFR, respectivamente. Tendo este grupo uma freqüência do alelo C e T de 0,65 e 0,35 respectivamente.

O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) avaliou a diferença de distribuição das freqüências entre os grupos mostrando que no grupo de enfartados jovens (GE1) e os controles (GC1) não apresentaram diferença estatisticamente significativamente, no que se refere à distribuição alélica e genotípica (vide tabela 8).

**Tabela 8. Distribuição de genótipos e freqüência relativa de alelos do polimorfismo C677T no gene da MTHFR nos grupos: controles caucasóides (GC 1), enfartados jovens (GE 1) e negróides p(GE 2).**

	Distribuição de genótipos			Freqüência de alelos	
	CC	CT	TT	C	T
GC 1 (n=68)	27 (40%)	32 (47%)	9 (13%)	0,635	0,365
GE 1 (n=39)	16 (40%)	20 (50%)	4 (10%)	0,65	0,35
GE 2 (n=62)	40 (80%)	12 (20%)	-- <sup>a</sup>	0,90	0,10

CC = genótipo 677CC; CT = genótipo 677CT; TT = genótipo 677 TT; GC 1 = Grupo controle 1; GE 1: grupo estudo 1; GE 2 = grupo de negróide 2 ; n = número de indivíduos;  $\chi^2$  = qui-quadrado; gl = grau de liberdade; \*P = <0,001 (quando comparado ao controle).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg  $\Rightarrow$  GC1:  $\chi^2 = 0,21$ ; 1 gl  
 GE1:  $\chi^2 = 0,40$ ; 1 gl  
 GE 2:  $\chi^2 = 0,15$ ; 1 gl

As freqüências do polimorfismo MTHFR encontradas no grupo de negroídes (GE 2) foram menores do que os demais grupos se distribuindo da seguinte forma: 80% e 20 % para os genótipos MTHFR 677CC e 677CT, respectivamente. Não sendo observada a presença de homozigotos para o polimorfismo (genótipo TT).

Na tabela 8 e Fig. 16 pode-se observar que o genótipo TT para o polimorfismo C677T do gene da MTHFR foi estava presente em 13% dos controles comparado a 10% dos pacientes infarto precoce diferença esta não significativa. Observou-se, ainda que o alelo C (alelo selvagem) foi o mais prevalente em ambos os grupos analisados. Adicionalmente pode-se observar que estas freqüências variam de acordo com a etnia. Sendo isto facilmente visualizado quando se compara a freqüência do grupo de negroídes (GE 2) em relação aos demais grupos de ascendência caucasiana (GE 1 e GC 1).

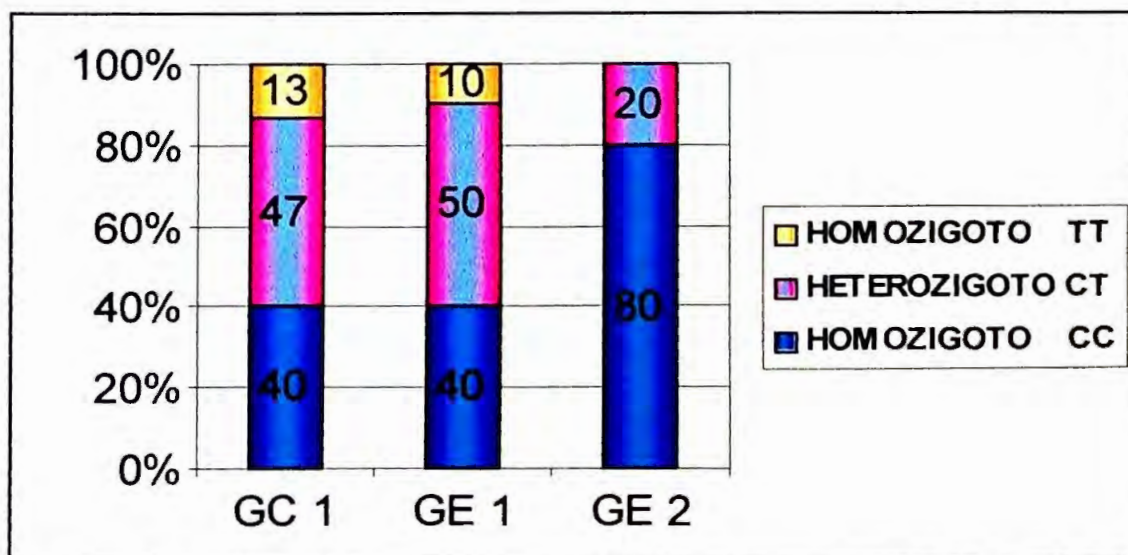


Figura 14. Distribuição genotípica do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR nos grupos: controles caucásicos (GC1), grupo de enfartados jovens (GE1) e negroídes (GE2).

### 5.3.2 Avaliação da associação dos genótipos C677T MTHFR e lipídeos plasmáticos

Avaliou-se os genótipos 677 MTHFR e sua possível associação com o aumento concentração de colesterol e triglicérides plasmáticos.. Na tabela 9 e figura 15 pode-se observar os valores médios de colesterol e triacilgliceróis com seus respectivos desvios padrões, estes valores não apresentam uma diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si.

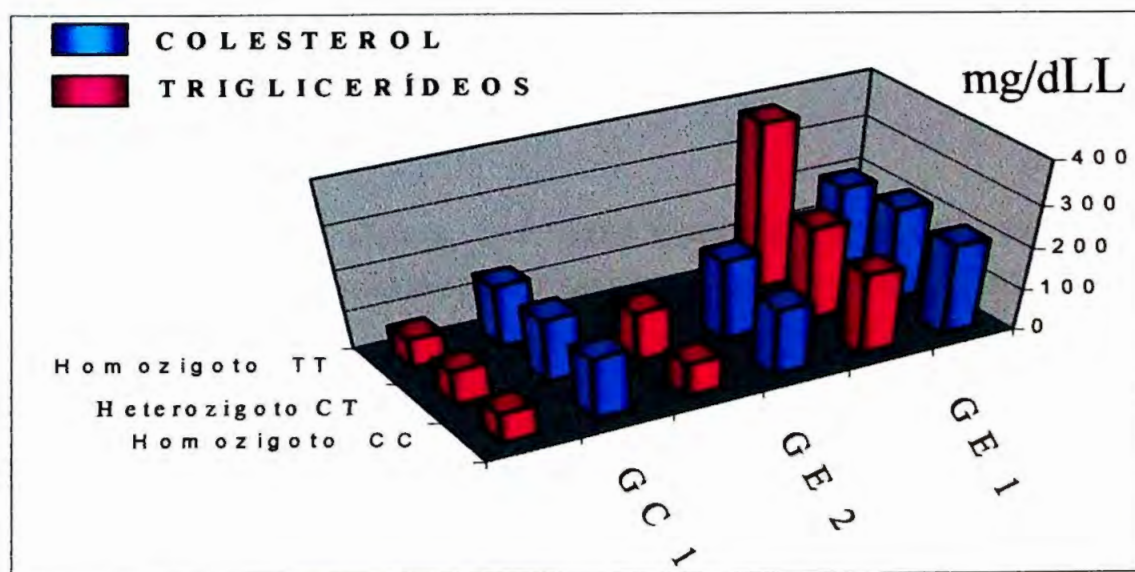


Fig 15. Representação gráfica dos valores de colesterol e triacilgliceróis em função dos genótipos MTHFR.

**Tabela 9. Valores médios e seus respectivos desvios padrões da determinação de colesterol e triacilgliceróis nos três diferentes grupos avaliados, subdivido por genótipos do polimorfismo 677 da metileno tetrahydrofolato redutase.**

	Colesterol	triacilgliceróis
<b>Grupo Controle 1</b>		
Homozigoto CC (n= 27)	151 ± 28	74 ± 38
Heterozigoto CT (n= 32)	154 ± 28	82 ± 49
Homozigoto TT (n= 9)	149 ± 24	71 ± 34
<b>Grupo de estudo 1</b>		
Homozigoto CC (n=16)	218 ± 52	195 ± 102
Heterozigoto CT (n= 20)	225 ± 72	225 ± 151
Homozigoto TT (n= 4)	204 ± 47	387 ± 304
<b>Grupo de estudo 2</b>		
Homozigoto CC (n= 12)	196 ± 31	83 ± 39
Heterozigoto CT (n= 50)	162 ± 41	120 ± 45
Homozigoto TT --	--	--

A avaliação das concentrações de colesterol e triacilgliceróis em relação aos genótipos MTHFR.

Anova on ranks\*

n = número de indivíduos; -- = dado ausente

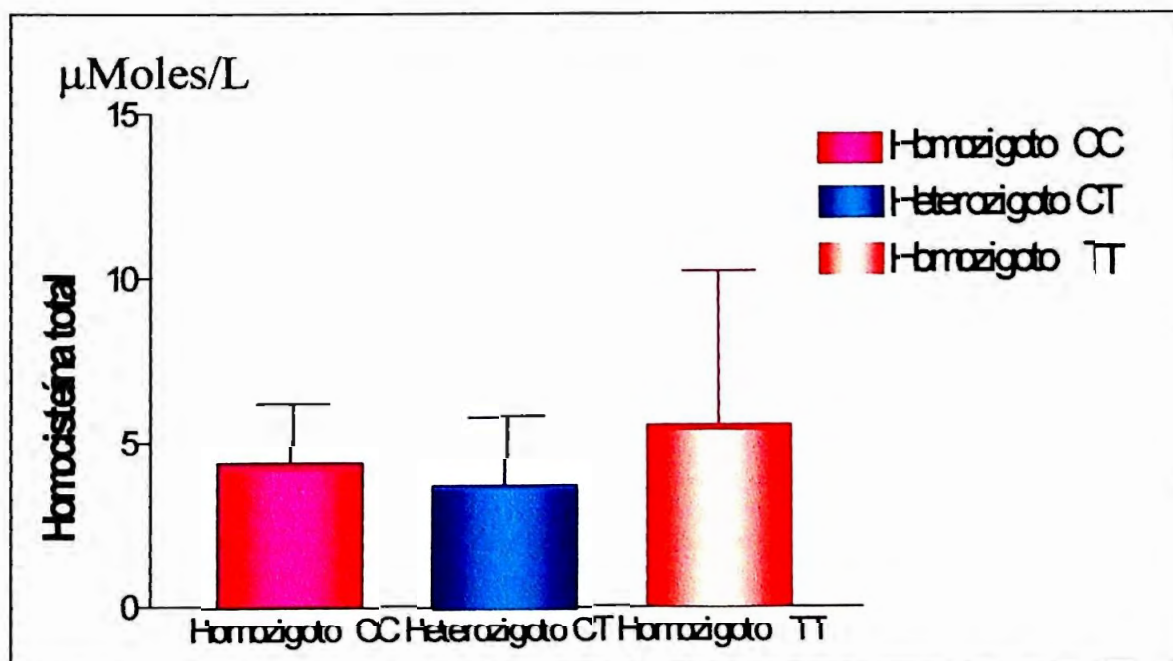
### 5.3.3 Avaliação dos efeitos dos genótipos C677T MTHFR sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína no grupo controle (GC 1).

Na tabela 7 e figura 16 observa-se às concentrações da homocisteína total plasmática em relação dos genótipos do polimorfismo do gene da MTHFR no grupo controle. Indivíduos homozigotos para a substituição (genótipo TT) apresentaram valores médios de homocisteína discretamente superiores em relação aos demais genótipos (genótipos CC e CT), mas estatisticamente não significante ( $p=0,27$ ).

**Tabela 7. Avaliação da correlação entre as concentrações de homocisteína total plasmática e os genótipos C677T MTHFR no grupo controle .**

Genótipo MTHFR	Valor médio de homocisteína (µmoles/L)*
677 CC (n = 17)	4,4 ± 1,8
677 CT (n = 21)	3,7 ± 2,1
677 TT (n = 6)	5,5 ± 4,7

Os genótipos para o polimorfismo C677T MTHFR estão representados por homozigotos para o alelo selvagem (genótipo CC), heterozigotos (genótipo CT) e homozigotos para a substituição (genótipo TT). n = número de indivíduos  
P= 0,27 ANOVA ON RANKS



**Figura. 16. Valores médios em µmoles/L da homocisteína plasmática avaliada no grupo de controles (GC 1) subdividido nos três genótipos 677CC, 677CT e 677TT MTHFR, respectivamente. P= 0,27 ANOVA ON RANKS**

#### 5.4 Análise do Fator V de Leiden (Mutação Q506R)

A figura 17 apresenta uma fotografia de um gel de agarose à 3%, após separação por eletroforese e coloração com brometo de etídeo dos produtos da amplificação alelo específica do exon 10 do gene do Fator V. Nas posições 1 e 8 localizam-se o padrão molecular de referência de 100 bp, nas posições 2 e 3 homozigoto GG, nas linhas 4 e 5 heterozigoto GA e 6,7 homozigoto AA.

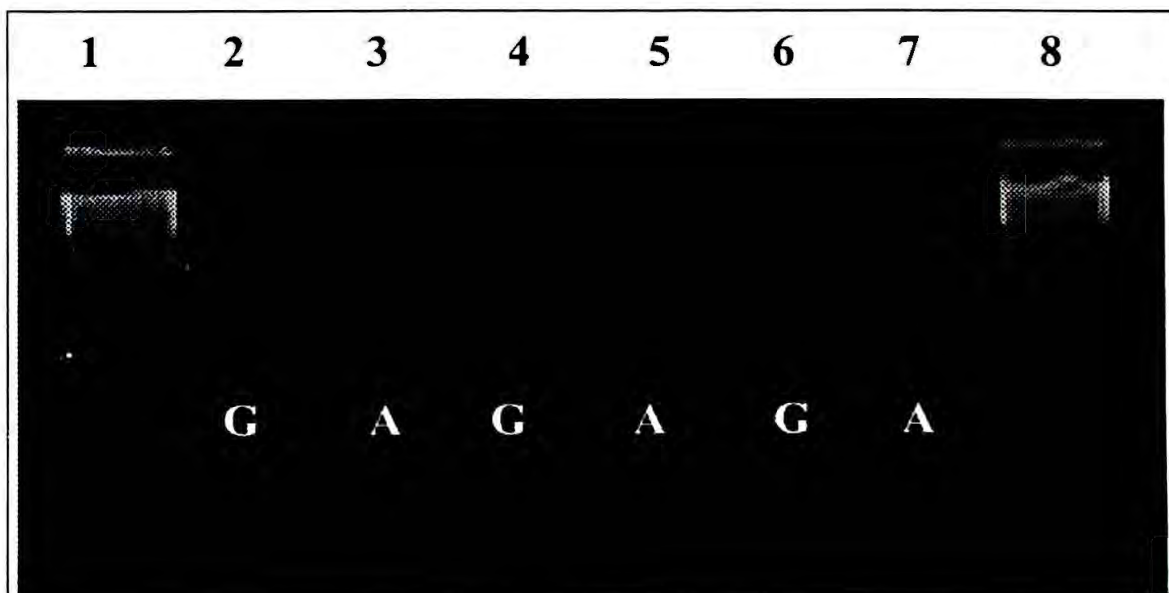


Fig. 17. Fotografia dos produtos de amplificação do exon 10 do Fator V em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. linha 1 e 8 marcador de 100 bp, linhas 2 e 3 homozigoto para o genótipo selvagem (ausência da mutação); linhas 4 e 5 heterozigoto (genótipo GA) e linhas 6 e 7 homozigoto para o genótipo AA.

#### 5.4.1 Avaliação da frequência do polimorfismo G1691A no fator V.

A distribuição dos genótipos do polimorfismo G1691A no grupo controle (GC1) se encontra em equilíbrio de Ward-Weinberg, com 97% e 3% para os genótipos homozigotos selvagens (genótipo GG) e heterozigotos (genótipo GA), respectivamente. Pode-se ainda notar a ausência de indivíduos homozigotos para este polimorfismo.

**Tabela 10. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo G1691A no gene do Fator V nos grupos: controle caucasóide (GC1), enfartados precoces (GE1) e negróides (GE2).**

	Distribuição de genótipos			Frequência de alelos	
	GG	GA	AA	G	A
GC 1 (n=38)	66 (97%)	2 (3%)	--	0,97	0,027
GE 1 (n=39)	38 (95%)	--	2 (5%)	0,95	0,05
GE 2 (n=62)	62 (100%)	--	--	1	--

GG = genótipo 1691GG; GA = genótipo 1691GA; AA = genótipo 1691AA; GC 1 = Grupo de controle ; GE 1 = grupo de estudo 1; GE 2 = grupo de negróides 2; n = número de indivíduos;  $\chi^2$  = qui-quadrado; gl = grau de liberdade.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg  $\Rightarrow$  GC1:  $\chi^2 = 0,21$ ; 1 gl  
GE1:  $\chi^2 = 40$ ; 1 gl



Quando avaliada a frequência desta mutação no grupo de enfartados jovens (GE 1) observou-se as seguintes distribuições genótípicas: 95% e 5% para os genótipos homozigotos selvagem (genótipo GG) e homozigotos mutado (genótipo AA), respectivamente. Adicionalmente não foram detectados heterozigotos para este polimorfismo, não estando então esta população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No grupo de negróides (GE 2) não foi detectada a presença desta mutação.

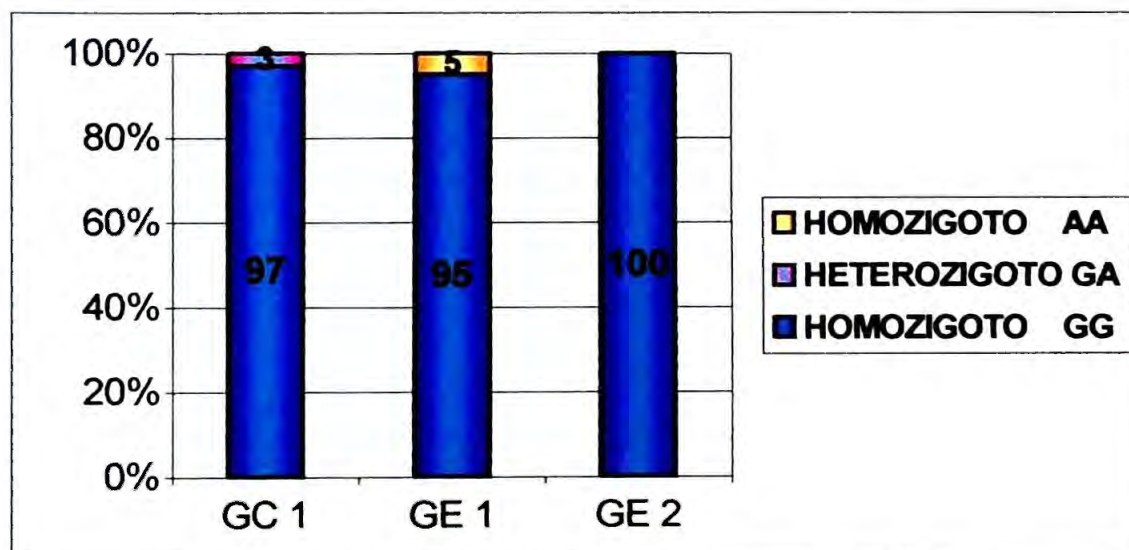


Fig. 18. Frequência dos genótipos do Fator V Leiden nos grupos: controle caucasóide (GC 1), enfartados jovens (GE 1) e negróides (GE 2).

Na tabela 8 e fig. 18 pode-se observar que os resultados da frequência dos genótipos do fator V Leiden. O homozigoto GG para o polimorfismo 1691G→A no gene do Fator V foi o mais prevalente em ambos os grupos. A distribuição dos genótipos não difere entre os grupos avaliados.

#### 5.4.2 Estudo da associação entre os genótipos C677T MTHFR e fator V Leiden no grupo de enfartados jovens (GE 1).

A tabela 11 apresenta os resultados da avaliação de haplotipos do polimorfismo MTHFR e fator V Leiden no grupo de estudo 1. As duas pacientes homocigotas para o fator V Leiden são heterocigotas para o polimorfismo MTHFR.

**Tab. 11. Avaliação de haplotipos entre os polimorfismos MTHFR e fator V Leiden no grupo de estudo 1.**

Genótipo Leiden	Distribuição de genótipos		
	Genótipo MTHFR		
	677CC	677CT	677TT
1691 GG	15 (37,5%)	19 (47,5%)	4 (10%)
1691 GA	--	--	--
1691 AA	--	2 (5%)	--

Os genótipos para o polimorfismo C677T MTHFR estão representados por homocigotos para o alelo selvagem (genótipo CC), heterocigotos (genótipo CT) e homocigotos para a substituição (genótipo TT). Os genótipos o fator V Leiden estão representados por homocigotos para o alelo selvagem (genótipo GG), heterocigotos (genótipo GA) e homocigotos para a mutação (genótipo AA). ausente

## 6. Discussão

O predomínio da causa morte e da morbidade por doenças cardiovasculares pode ser explicado devido a grande diversidade de alterações metabólicas que levam à aterosclerose.

Esta característica denomina-se síndrome plurimetabólica ou de doença poligênica. Portanto, a diversidade do agente etiológico que leva a manifestação clínica é bastante ampla. No Brasil, os altos índices de infarto do Miocárdio em idade precoce são semelhantes ou até superiores aos grandes centros dos países desenvolvidos, sendo este um dos maiores problemas atuais de saúde pública (LOTUFO et al , 1998).

Vários são os fatores que predisõem a doenças cardiovasculares, destacando-se a hipertensão, diabetes, habito de fumar, sedentarismo, hiperhomocisteinemia, estresse, obesidade, e os diversos polimorfismos genéticos, além da predisposição familiar.

Um modelo interessante a ser estudado é o adulto jovem com manifestação da doença arterial coronariana, isolando alguns fatores de risco como a idade, a obesidade e a hipertensão que ocorre em maior proporção na terceira idade, onde inclusive a manifestações de IAM (infarto agudo do miocárdio) é mais comum. Outra abordagem, é o papel da interação genética e ambiental num modelo de alta agressividade e precocidade das manifestações clínicas.

Neste estudo procurou-se verificar dois fatores isolados de risco coronariano, a hiperhomocisteinemia, relacionando com a mutação da enzima Metileno tetrahidrofolato redutase e a provável presença de fator V de Leiden.

A alta freqüência do polimorfismo C677T MTHFR associado ao seu risco potencial sobre o desenvolvimento de DAC, levou inúmeros pesquisadores a avaliar sua distribuição em vários povos do mundo. A falta deste tipo de análise no Brasil nos levou a avaliar a freqüência deste polimorfismo em 3 grupos bem distintos.

A avaliação da frequência do polimorfismo (Tabela 8) no grupo controle caucasóide (GC 1) demonstra uma frequência de 36% do alelo T do polimorfismo MTHFR no grupo de controles avaliados sendo esta frequência similar a da população Franco-Canadense (FROSST *et al.*, 1995), superior a países como o Japão, Holanda e Alemanha (VAN DER PUT *et al.*, 1996; PAPTREOU *et al.*, 1996; KOCK *et al.*, 1998) e inferior a populações com do Norte da Itália, Colômbia e Ásia (SACCHI *et al.*, 1997; CAMACHO & VANEGAS 1998; FRANCO *et al.*, 1998). A população escolhida neste estudo para constituir o grupo controle foi formada na cidade de Cascavel (Parana) região está com forte colonização por indivíduos de origem européia. A frequência do alelo T do polimorfismo 677C→T do gene MTHFR na Europa varia entre 24% a 40%, estando entre as maiores já projetadas para este polimorfismo no mundo.

No presente estudo observou-se no grupo de enfartados jovens (GE 1) uma frequência de 40%, 50% e 10% para os genótipos CC, CT e TT 677 MTHFR, respectivamente. Estes resultados são similares às frequências previamente descritas para este polimorfismo no Brasil por ARRUDA *et al.*, (1998) que avaliaram a frequência do genótipo 677 MTHFR em um grupo selecionado de estudantes e funcionários do hemocentro de Campinas os autores encontraram uma frequência de 35,5%, 54,2% e 10,3% para os genótipos 677 MTHFR CC, CT e TT respectivamente.

Estas frequências são similares aos controles e portanto equivalente aos povos caucasianos. Este grupo foi constituído basicamente por indivíduos de cor Branca e que possuíam em comum o fato de terem tido um primeiro episódio de infarto do miocárdio com idade inferior a 40 anos e apresentarem doença arterial coronariana com uma estenose de no mínimo 70%. Grupo este formado na cidade de São Paulo no Instituto Dante Pazzanezzi de Cardiologia, pode-se observar que apesar de este grupo ser definido e separado por estas características comuns a todos eles o genótipo MTHFR não apresenta uma distribuição preferencial.

A avaliação da frequência de 0,10 para o alelo T do polimorfismo C677T do gene MTHFR no grupo de negróides no presente estudo demonstra a baixa frequência deste polimorfismo em população de origem negróide. Não foi

detectada neste grupo a presença de homozigotos para o genótipo TT. Estas frequências observadas nesse estudo foram similares às previamente descritas em negros americanos por MCANDREW *et al.*, (1996) que mostraram a frequência alélica do polimorfismo C677T em 101 caucasianos e 102 Afro-americanos com as frequências do alelo T de 0,30 e 0,10 em caucasianos e afro-americanos, respectivamente. MCANDREW *et al.*, (1996) não observaram a presença de homozigotos para a substituição. Os dados do presente estudo diferem dos publicados por ARRUDA *et al.*, (1998) que encontraram uma frequência de 0,20 para alelo 677T MTHFR e 1,45% para o genótipo TT MTHFR na população de negróides baianos por eles avaliados, isto se deve provavelmente a penetrância de genes caucasóides nesta população. No presente estudo a população negróide avaliada se trata de uma população homogênea (sem miscigenação), por serem comunidades remanescentes de quilombos que permaneceram por vários anos sem a influência de genes externos; talvez este fato explique porque nossos resultados sejam semelhantes os dados publicados por MCANDREW *et al.*, (1996). Estando este trabalho de acordo com o estudo de FRANCO *et al.*, 1998 que encontrou uma frequência de 0,12 para o alelo 677T MTHFR em negróides brasileiros.

Os negros brasileiros são originários de países do noroeste da África vieram ao Brasil trazidos principalmente da Angola, Congo, Moçambique, Nigéria e Gana e portanto diferem da origem étnica dos negróides americanos (CURTIN, 1969). Todos esses dados em conjunto sugerem que a baixa incidência do polimorfismo MTHFR é uniforme entre as populações negras. Também é interessante notar que o defeito hereditário mais comum para trombose venosa o Fator V de Leiden é incomum entre a população negróide (REES *et al.*, 1995; ARRUDA *et al.*, 1996). Esses dados são também confirmados por este estudo onde não foi encontrada a presença desta mutação no grupo de negróides avaliados (grupo de estudo 2).

A análise estatística dos dados apresentados na tabela 8 não apresenta uma associação positiva da doença arterial coronariana de início precoce (grupo

de estudo 1) com o polimorfismo C677T MTHFR. No entanto quando se comparou o grupo negróides e controle observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ).

Estes dados estão de acordo com os trabalhos de GUTTORMSEN *et al.* (1996), SCHWARTZ *et al.* (1996) Van Bockxmeer *et al.*, (1997) REINHARDT *et al.*, (1998) Fletcher & Kessling (1998) Anderson *et al.*, 2000. Por outro lado, nossos dados diferem dos publicados por KLUIJTMANS *et al.* (1996) que mostraram, uma frequência aumentada deste polimorfismo em 60 pacientes com doença cardiovascular prematura. Estes resultados podem refletir diferenças na origem étnica dos indivíduos avaliados nesta população, membros deste grupo, a categoria da doença estudada, a ingestão de folato alimentar, os critérios de inclusão e exclusão usados, como também diferenças de frequências gênicas interpopulacionais não conhecidas até então. Os casos avaliados neste estudo apresentam somente DAC, os casos descritos por KLUIJTMANS *et al.*, (1996) compreendiam categorias mistas formadas por 10 pacientes com infarto do miocárdio, 32 pacientes com doença vascular cerebral e 18 pacientes com doença vascular periférica. Adicionalmente, excluíram-se os pacientes que apresentavam hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes melito, ao passo que a maioria dos nossos pacientes possui 1 ou mais fatores de risco tradicionais para DAC.

A análise estatística dos dados das concentrações de colesterol e triacilgliceróis em função dos genótipos C677T MTHFR apresentados na tabela 7 e figura 17 não demonstram uma associação positiva. Deste modo os genótipos C677T MTHFR não parecem estar associados com o eventual aumento do risco para o desenvolvimento de DAC associada à interação dos genótipos 677 MTHFR e lipídeos plasmáticos. Até o presente momento na literatura não se conhece trabalhos correlacionando os genótipos 677 MTHFR a uma maior concentração de lipídeos plasmáticos. Observa-se na literatura trabalhos que tentam correlacionar os genótipos MTHFR a genes envolvidos no metabolismo lipídico; tais como, os genes da apo E e apo C3 e avaliando estes genes em relação a fatores de risco tradicionais. A associação entre esses genótipos, lipídeos plasmáticos e DAC tem

se dado de forma controversa. Sendo forte quando avaliada em relação ao genótipo E4 da apo E (OU et al., 1998; LOKTIONOV et al., 1999; GUILLEN et al., 2001; PALLAUD et al., 2001).

O aumento da homocisteína plasmática é considerado um fator de risco independente para doença vascular (REFSUM et al., 1998). Esse aumento pode estar relacionado com um polimorfismo da MTHFR que leva a produção da enzima com alteração de sua atividade, que por sua vez pode levar ao aparecimento de uma doença grave no fechamento do tubo neural, se associado com a deficiência de folato (CUNHA et al., 2002).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram claramente um aumento da homocisteína em indivíduos com infarto precoce com uma média bem superior a dos controles (7,3 uM vs 4,2uM  $p < 0,0001$ ), sugerindo um provável envolvimento desta alteração na precocidade da doença. Muitos trabalhos sugerem que o desenvolvimento da doença cardiovascular entre indivíduos com hiperhomocisteinemia moderada é bastante freqüente (SEHUB et al, BOUSHEY et al, 1995; MONTULSKY , 1996). O mecanismo pela qual a hiperhomocisteinemia poderia causar o desenvolvimento da aterosclerose estaria embasado na teoria da injúria vascular, no entanto, ainda permanece a discussão se realmente é um fator causal de DCV, um marcador de risco ou ambos. Sem dúvida, a grande variação interpopulacional da concentração total de homocisteína nos leva a concluir que é necessário estudar numa população muita bem definida com critérios nutricionais e metabólicos bem estabelecidos. Em nossa população isso particularmente nos dificulta devido à alta heterogenicidade do povo brasileiro constituída de imigrantes da Europa, Ásia, África e também de grupos indígenas.

Um dos polimorfismos que se relaciona com a hiperhomocistenemia é a do gene da 5,10 metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR). Alguns polimorfismos foram descritos neste gene , no entanto, o que mais se relaciona com esta doença metabólicas de forma importante é a C677 T e que ocorre com uma freqüência elevada nos povos caucasianos (RADY et al., 1999).

O polimorfismo C677T MTHFR está implicado da diminuição da atividade da enzima circulante e conseqüente aumento das concentrações da homocisteína circulante (FROSST et al., 1995).

A análise estatística dos dados apresentados na tabela 7 não apresenta uma influência significativa dos genótipos C677T MTHFR sobre as concentrações da homocisteína total plasmática. embora estas diferenças de concentrações entre os genótipos 677 MTHFR não serem estatisticamente significante ( $p= 0,27$ ) elas podem ter grande importância se compararmos com a literatura, onde se pode observar que elevações moderadas da tHcy representam um grande aumento no risco para o desenvolvimento de DAC. Estes dados chamam atenção para o fato de que pequenas elevações das concentrações de homocisteína seriam responsáveis pela injúria vascular e deste modo indivíduos com o genótipo MTHFR 677TT estariam mais predispostos ao desenvolvimento de DAC. Esses dados estão de acordo com o trabalho de RASLOVA et al. (2000) que avaliaram o impacto deste polimorfismo sobre as concentrações de homocisteína em adolescentes eslovacos e não encontraram uma associação positiva no que se refere a genótipos MTHFR e aumento da homocisteína plasmática.

A associação entre os genótipos C677T MTHFR e aumento da homocisteína plasmática tem se dado de forma controversa, a alguns autores tem sugerido que só exista na presença da redução da concentração de folato (JAQUES et al., 1996).

Entre 1992 e 1993, GUTTORMSEN et al., (1996) analisaram 18.043 indivíduos, com idade entre 40 a 67 anos e encontraram 67 casos (0,4%) com concentrações plasmáticas de homocisteína superior ou igual a 40 micromoles/L, comparados aos 329 controles, estes indivíduos apresentavam uma diminuição das concentrações plasmáticas de folato e cobalamina, ingeriam muito pouco suplementos vitamínicos, consumiam muito café e na sua grande maioria eram fumantes compulsivos. O aumento da homocisteína plasmática estava associado na grande maioria dos casos à presença do genótipo 677TT MTHFR. GUTTORMSEN et al. (1996) concluíram que a maior parte dos indivíduos da



população em geral que apresentam hiper-homocisteinemia maior que 40 micromoles/L, isto se deve a presença da mutação C677T combinada com baixo estado nutricional de folato. CUNHA et al., (2002) avaliaram no Brasil o impacto dos polimorfismos C677T e G1298A MTHFR sobre o desenvolvimento de espinha bífida. Em um pequeno subgrupo de crianças homozigotas para o genótipo 1298AA encontrou-se um aumento significativo nas concentrações de homocisteína com diminuição da concentração folato plasmático.

Outro polimorfismo escolhido para fazer parte do presente estudo foi o polimorfismo G1691A no exon 10 do fator V da coagulação, também conhecido como fator V Leiden, de acordo com a cidade onde foi originalmente descrito (BERTINA et al., 1994). Este polimorfismo também apresenta uma alta frequência em povos de origem caucasóide e tem sido implicado em alguns estudos com o desenvolvimento de infarto precoce e possivelmente pode estar interagindo com o polimorfismo C677T MTHFR resultando assim em manifestações trombocíticas graves em populações jovens (TALMON et al., 1997).

A análise no presente estudo do fator V Leiden no grupo controle caucasóides (GC 1) demonstra uma frequência de 2,9 % de portadores heterozigotos para o fator V Leiden. Embora este número de controles seja limitado, esses achados sugerem que a ocorrência desta mutação é alta entre indivíduos da população em geral. A frequência do Fator V Leiden observada no grupo controle caucasóide (GC1) foi similar a da população holandesa (BERTINA et al., 1994) e com o publicado por (ARRUDA et al., 1995) que avaliaram a frequência deste polimorfismo em uma população de ascendência caucasóide no Brasil e observaram uma distribuição de 2% de indivíduos heterozigotos para o fator Leiden.

No grupo de enfartados jovens (GE 1) encontrou-se freqüências de 5% para o Fator Leiden. É interessante notar que esta freqüência se deve somente a presença de duas mulheres homozigotas para o genótipo 1691AA não sendo observada a presença de heterozigotos. Portanto, esta população não apresentou-se em equilíbrio de Hard-Weinberg. Entretanto esses dados despertam grande interesse especialmente devido à baixa freqüência da homozigose para este genótipo. ARRUDA et al., (1995) ao avaliarem as freqüências dos genótipos do Fator V Leiden em trombofílicos no Brasil evidenciaram um aumento da freqüência de heterozigotos mas nenhum homozigoto foi encontrado e também no estudo de Voetsch et al (2000) que realizaram a pesquisa desta mutação em pacientes com AVC isquêmico no Brasil também não detectaram a presença de homozigoto para o fator V Leiden.

Não foi observada a presença deste polimorfismo no grupo de negróides (grupo de estudo 2). Este resultado está de acordo com o esperado pois a presença deste polimorfismo em populações de origem negra é rara.

A análise estatística dos dados apresentados na tabela 10 e figura 20 não apresentam uma associação positiva entre doença arterial coronariana de início precoce e fator V Leiden. A associação entre fator V Leiden e trombose arterial é controversa e têm sido alvo de numerosos estudos (DOGGEN et al., 1998; LONGSTRETH et al., 1998; RIDKER et al., 1999). No entanto, os resultados destes estudos têm sido inconsistentes (Ridker et al., 1995; Rosendaal et al., 1997) e provavelmente se deve ao fato deste aumento do risco ser pouco pronunciado ou presente somente em grupos específicos.

A associação entre fator V e infarto precoce tem se dado em grupos de mulheres com coronárias normais ou pouco alteradas (DUNN et al., 1998) como no presente estudo todos os pacientes com infarto precoce avaliados (grupo de estudo 1) apresentam no mínimo 70% de estenose confirmada por angiografia. Portanto as duas pacientes portadoras homozigotas do fator Leiden apresentavam estenose coronária, fato este que contrasta com a literatura onde o fator V Leiden

tem sido associado com trombose venosa e infarto do miocárdio em mulheres jovens principalmente quando estas possuem as coronárias normais (DUNN et al., 1998). VAN DE WATER *et al.*, (2000) avaliaram a prevalência do fator V Leiden e a variante G20210 da protrombina em mulheres com idade inferior a 50 anos com e sem estenose significativa. Eles encontraram uma associação positiva entre fator V Leiden e a variante da protrombina em pacientes com infarto do miocárdio, sendo esta associação presente somente nas pacientes com artérias coronárias normais ou discretamente lesada. MANSOURATI et al., (2000) também avaliaram a frequência do fator Leiden em pacientes com infarto do miocárdio e angiografia das coronárias normais e encontraram uma frequência estatisticamente significativa ( $p = 0.01$ ).

Alguns estudos publicados apresentam uma associação positiva entre Fator V Leiden e DAC, particularmente quando a interação deste polimorfismo e fatores ambientais tem sido formalmente avaliada. Rosendaal et al., 1997 sugerem que o fator V Leiden pode aumentar o risco de infarto miocárdio em mulheres com idade  $\leq 45$  anos de idade, particularmente em um subgrupo de fumantes com fator V Leiden em 88 mulheres jovens com infarto do miocárdio e 388 controles o risco relativo foi de 2,4 (CI, 1.0 a 5,9). Esta variante apresentou um efeito limitado em não fumantes, enquanto que tabagistas apresentaram um grande aumento do risco ao desenvolvimento de DAC. O aumento do risco foi cerca de 32 vezes, quando comparados a não fumantes (Rosendaal et al., 1997). Curiosamente, no presente estudo o grupo com infarto precoce (GE 1) os dois pacientes que apresentam este polimorfismo eram mulheres homozigotas sendo uma fumante e a outra não. O que leva a sugerir que o polimorfismo pode ser um marcador importante da precocidade da doença arterial coronariana de início precoce. No entanto, é necessário um estudo populacional maior para poder avaliar esta relação.

Concluindo podemos inferir que quanto maior o número de marcadores estudados, melhor será a interpretação para

## 7. Conclusões

A homocisteína total está associada a DAC de início precoce nos indivíduos caucasóides brasileiros Avaliados.

O polimorfismo C677T MTHFR não está relacionado com aumento das concentrações de homocisteína nesta população avaliada.

O polimorfismo C677T no gene da enzima Metileno tetrahydrofolato redutase não está relacionado com Doença arterial coronariana nos caucasóides.

A frequência do polimorfismo da C677T no gene da enzima Metileno tetrahydrofolato redutase na população caucasóide brasileira estudada foi semelhante à européia.

A frequência do polimorfismo da C677T no gene da enzima Metileno tetrahydrofolato redutase na população negróide brasileira estudada foi semelhante à americana.

A frequência do fator V Leiden foi 5% no grupo de enfarta jovens.

Não se encontrou o fator V Leiden nos negróides estudados.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABBOT, M. H., FOLSTEIN, S. E., ABBEY, H., PYERITZA, R. E. Psychiatric manifestations of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency, and relationship impairment and vitamin b(6)-responsiveness. **Am. J. Med. Genet.** v.26, p.959-969, 1987.
- ADAMS, M., SMITH, P. D., MARTIN, D., THOMPSON, J. R., LODWICK, D., SAMANI, N. J. Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. **Quart. J. Med.** v.89, p.437-444, 1996.
- ALLART, C. F., BRIËT, E. Familial venous thrombophilia. In: Haemostasis and Thrombosis 3<sup>rd</sup> ed. Bloom, A. I., Forbes, C. D., Thomas, D. P., TUDDENHAM, E. G. D., (eds). Churchill Livingstone. p.1349-1360, 1994.
- ARRUDA, V. R., ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M., COŞTA, F. F., REITSMA, P. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a brazilian population. **Am. J. Hem.** v.49, p.242-243, 1995.
- ARRUDA, V. R., VON ZUBBEN, P. M., CHIAPARINI, L. C., ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M., COSTA, F. F. The mutation Ala677C→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase : A risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb Haemost.** v.7, p.818-824, 1997.
- ARRUDA, V. R., SIQUEIRA, L. H., GONÇALVES, M. S., VON ZUBEN, P. M., SOARES, M. C. P., MENEZES, R., ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M., COSTA, F. Prevalence of the mutation C667→T in the methylene

- tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Amer J med genet.** v.78, p.332-335, 1998.
- BADIMON, L., CHESEBRO, J. H., BADIMON, J. J. Thrombus Formation on Ruptured Atherosclerotic Plaques and Rethrombosis on Evolving Thrombi. **Circulation.** v. 86[supIII]. p.III-74-III-85, 1992.
- BARRET-CONNOR, E. L. Obesity, atherosclerosis, and coronary artery disease. **Ann. Intern. Med.** v. 103, p.1010-1019, 1985.
- BERTINA, R. M., KOELEMAN, B. P., KOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DIRVEN R. J. DE RONDE, H., VAN DER VELDEN, P. A., REITSMA, P. H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature.** v. 369, p.64-67, 1994.
- BOUSHEY CJ, BERESFORD SA, OMENN GS, MOTULSKY AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA.** v.274, p.1049-57. 1995.
- BRATTSTROM, L., ENGLUND, E., BRUN, A. Does Down syndrome support homocysteine theory of arteriosclerosis? **Lancet.** v.1, p.391-392, 1987.
- BROWN, M, S., GOLDSTEIN, J, L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annu. Ver. Biochem.** v.52, p.223-61, 1983.
- BRUNNER, H. R., LARAGH, J. H., BAER, L. NEWTON, M. A., GOODWIN, F. T., KRAKOFF, L. R., BARD, R. H., BUHLER, F. R. Essential hypertension: Renin

- and aldosterone, heart attack and stroke. **N. Engl. J. Med.** v.286, p.441-449, 1972.
- BUTZ, L. W., DU VIGNEAUD V. The formation of homologue of cystine by the composition of methionine with sulfuric acid. **J Biol Chem.** v.99, p.135-142, 1932.
- CAMACHO-VANEGAS, O., GIUSTI, B., RESTREPO, FERNANDEZ. C. M., ABBATE, R., PEPE, G. Frequency of Factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. **Thromb. Haemost.** v.79. p.883-884, 1998.
- CARSON, N. A. J., NEILL, D. W. Metabolic abnormalities detected in survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Arch. Dis. Child.** v.37. p.505-513. 1962.
- CAREY, M. C., DONOVAN, D. E., FITZGERALD, O., McAULEY, F. D. Homocystinuria: a clinical and pathological study of nine subjects in six families. **Am. J. Med.** v.45. p.7-25, 1968.
- CASTAMAN, G., LUNGI, B., MISSIAGLIA, E, BERNARDI, F., RODEGHIERO, F. Phenotypic homozygous activated protein C resistance associated with compound heterozygosity for Arg506Gln (factor V Leiden) and His1299Arg substitutions in factor V. **Br. J. Haematol.** v.99. p.257-261, 1997.
- CHAN, W. P., LEE, C. k., KWONG, Y. L., LAM, C. K., LIANG R., A novel mutation of Arg306 factor V gene in Hong Kong Chinese. **Blood.** v.91. p.1135-1139, 1998.

- CURTIN, P. D. *The Slave Trade: A Census*. Milwaukee: University of Wisconsin Press. 1969.
- DAVIES, M. J., THOMAS, A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. **N. Engl. J. Med.** v.310, p.1137-1140, 1984.
- DAUBNER, S. C., MATTHWES, R. G. Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. **J. Biol. Chem.** v.257, p.140-145, 1982.
- DEN HEIJER, M., KOSTER, T., BLOM, H. J., BOS, G. M. J., BRIET, E., REITSMA, P. H., VANDENBROUCKE, J. P., ROSENDAAL, F. R. Hyperhomocystinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. **New Eng. J. Med.** v.334, p. 759-762, 1996.
- DOGGEN, C. J., CATS, V. M., BERTINA, R. M., ROSENDAAL, F. R. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. **Circulation.** v.97, p.1037-4,1998.
- DUNN, S.T., ROBERTS, C. R., SCHECHTER, E., MOORE, W. E., LEE, ET., EICHNER, J. E. Role of factor V Leiden mutation in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. **Thromb Res.** v. 15, p.91-91998.
- ENGBERSEN, A. M. T., FRANKEN, D. G., BOERS, G. H. J., STEVENS, E. M. B., TRIJBELS, F. J. M., BLOM, H. J. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. **Am. J. Hum. Genet.** v.56, p.142-150, 1995.
-



- FALCON, C. R., CATTANEO, M., PANZERI, D., MARTINELLI, I., MANNUCCI, P. M. High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. **Arteriosclerosis Thromb.** v.14, p.1080-1083, 1994.
- FALK, ERLING. Why do Plaques Rupture. **Circulation.** v. 86:[supplIII]:III-30-III-42, 1992.
- FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals. **J. Nutr, Biochem.** v. 1, p. 228-237, 1990.
- FLETCHER, O., KESSLING, A. M. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? **Hum. Genet.** v.103, p.11-21, 1998.
- FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **J. Inher. Metab. Dis.** v. 20, p.270-285, 1997.
- FREEMAN, J. M., FINKELSTEIN, J. D., MUDD, S. H. Folate responsive homocystinuria and 'schizophrenia': a defect in methylation due to deficient 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity. **N. Engl. J. med.** v.292, p. 491-496, 1975.
- FREEMAN, J. M., FINKELSTEIN, J. D., MUDD, S. H., UHLENDORF, B. W. Homocystinuria presenting as reversible 'schizophrenia': a new defect in methionine metabolism with reduced methylene-tetrahydrofolate-reductase activity. **Pediat. Res.** v.6, p.423, 1972.
- FROSST, P., BLOM, H. J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C. A., MATTHEWS, R. G., BOERS, G. J. H., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS,

- L. A. J., VAN DEN HEUVEL, L. P., ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genet.** v.10, p.111-113, 1995.
- FRYER, R. H., WILSON, B. D., GUBLER, D. B., FITZGERALD, L. A., ROGERS, G. M. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. **Arteriosclerosis Thromb.** v.13, p.1327-1333, 1993.
- FRIEDEWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.** v. 8, p.499-502, 1972.
- GENEST, J. J., JR., MCNAMARA, J. R., UPSON, B., SALEM, D. N., ORDOVAS, J. M., SCHAEFER, E. J., MALINOW, M. R. Prevalence of familial hyperhomocyst(e)inemia in men with premature coronary artery disease. **Arteriosclerosis Thromb.** v.11, p.1129-1136, 1991.
- GERRITY, R. G. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. **Am J Pathol.** v.103, p.181-190, 1981.
- GERRITSEN, T., Vaughn, J. G., Weisman, H. A. The identification of homocysteine in the urine. **Biochem Biophys Res Commun.** v.9, p.493-496, 1962.
- GOYETTE, P., SUMNER, J. S., MILOS, R., DUNCAN, A. M. V., ROSENBLATT, D. S., MATTHEWS, R. G., ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate

reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature Genet.** v.7, p.195-200, 1994.

GOYETTE, P., FROSST, P., ROSENBLATT, D. S., ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.** v.56, p.1052-1059, 1995.

GOYETTE, P., CHRISTENSEN, B., ROSENBLATT, D. S., ROZEN, R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. **Am. J. Hum. Genet.** v. 59, p.1298-1275, 1996.

GOYETTE, P., PAI, A., MILOS, R., FROSST, P., TRAN, P., CHEN, Z., CHAN, M., ROZEN, R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mammalian Genome.** v. 9, p. 652-656, 1998.

GRIFFIN, J. H., EVATT, B., WIDEMAN, C., FERNANDEZ, J. A. Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. **Blood.** v.83, p.1989-1893, 1989.

GUILLEN M, CORELLA D, PORTOLES, GONZALEZ JI, MULET F, SAIZ C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. **Eur. J. Epidemiol.** v.17, p.255-61, 2001

GUTTORMSEN, A. B., UELAND, P. M., NESTHUS, I., NYGARD, O., SCHNEEDE, J., VOLLSET, S. E., REFSUM, H. Determinants and

vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (equal to or greater than 40 micromole/liter): the Hordaland homocysteine study. **J. Clin. Invest.** v.98, p.2174-2183, 1996.

HAAN, E. A., ROGERS, J. G., LEWIS, G. P., ROWE, P. B. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: clinical and biochemical features of a further case. **J. Inherit. Metab. Dis.** v.8, p.53-57, 1985.

HAWORTH, J. C., DILLING, L. A., SURTEES, R. A. H., SEARGEANT, L. E., LUE-SHING, H., COOPER, B. A., ROSENBLATT, D. S. Symptomatic and asymptomatic methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in two adult brothers. **Am. J. Med. Genet.** v.45, p.572-576, 1993.

HEIJBOER, H., BRANDJES D, BÜLLER, H. R., STURK, A., TEM CATE, J. W., Deficiências of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. **N. Engl. J. Med.** v. 323, p.1512-1506, 1990.

HEIJMANS, B. T., GUSSEKLOO, J., KLUFT, C., DROOG, S., LAGAAY, A. M., KNOOK, D. L., WESTENDORP, R. G. J., SLAGBOOM, E. P. Mortality risk in men is associated with a common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR). **Europ. J. Hum. Genet.** v.7, p.197-204, 1999.

HIROSHI, M., ARNUTTI, P., PRAYOONWIWAT, W., NATHALANG, O., SUWANASOPHON, C., KODASEAM, R., HASHIMOTO, S., TAKUBO, T., FUKUI, M., TATSUMI, N. A Polimorphism nt 1628 G→A (R428K) in exon 10 of the coagulation factor V gene may be a risk factor for trombosis in the indigenous Thai population. **Thromb Haemost.** v.80, p.705-706, 1998.

---

HULLEY, S. B. ROSENMAN, R. H., BAWOL, R. D., BRAND, R. J.  
Epidemiology as a guide to clinical decisions, the association between triglyceride and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.** p.1383-1389, 1980.

JACCQUES, P. F., BOSTOM, A. G., WILLIAMS R. R., ELLISON, R. C., ECKFELDT, J. H., ROSENBERG, I. H. SELHUB, J. ROSEN, R.  
Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation.** v.93, p.7-9, 1996.

JOBE, M. I. Mechanisms of coagulation and fibrinolysis. In: Clinical Hematology. Principles, Procedures, Correlations. Edited by: Stiene-Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A., Koepke, J. A., Lippincott, USA, 612-634, 1998.

KANG, S.-S., WONG, P. W. K., BOCK, H.-G. O., HORWITZ, A., GRIX, A.  
Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. **Am. J. Hum. Genet.** v.48, p.546-551, 1991.

KANG, S.-S., WONG, P. W. K., SUSMANO, A., SORA, J., NORUSIS, M., RUGGIE, N.  
Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. **Am. J. Hum. Genet.** v.48, p.536-545, 1991.

KANG, S.-S., ZHOU, J., WONG, P. W. K., KOWALISYN, J., STROKOSCH, G.  
Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of

methylenetetrahydrofolate reductase. **Am. J. Hum. Genet.** v.43, p.414-421, 1988.

KANNEL, W.B., AGOSTINO, R.B., BELANGER, A.J., CAGNON, D.R.: DIABETES, FIBRINOGEN, AND RISK OF CARDIOVASCULAR DISEASE: The Framingham experience. **Am. heart. J.** v.120, p.672-676, 1990.

KANNEL, W.B., MCGEE, D.L., CASTELLI W.P. Labtest perspectives on cigarette smoking and cardiovascular disease: The Framingham Study. **J. Card. Rehabil.** v. 32, p.267-277, 1984.

KAPLAN, H. Syndromes of thrombosis and Hipercoagulability: Congenital and acquired thrombophilias, **Clin. Appl Thrombosis hemostasis** Linppicott-Raven Publishers, philadelphia, 4(1):25-50, 1998.

KLUIJTMANS, L. A. J., VAN DEN HEUVEL, L. P. W. J., BOERS, G. H. J., FROSST, P., STEVENS, E. M. B., VAN OOST, B. A., DEN HEIJER, M., TRIJBELS, F. J. M., ROZEN, R., BLOM, H. J. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. **Am. J. Hum. Genet.** v.58, p.35-41, 1996.

KLUIJTMANS, L. A. J., WENDEL, U., STEVENS, E. M. B., VAN DEN HEUVEL, L. P. W. J., TRIJBELS, F. J. M., BLOM, H. J. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Europ. J. Hum. Genet.** v.6, p.257-265, 1998.

- KVITTINGEN, E. A., SPANGEN, S., LINDEMANS, J., FOWLER, B.  
Methionine synthase deficiency without megaloblastic anaemia. **Europ. J. Pediat.** v.156, p.925-930, 1997.
- LOLIO, C. A., LOTUFO, P. A., LIRA, A. C., ZANETTA, D. M. T., MASSAD, E.  
Tendência da mortalidade da doença isquêmica do coração nas capitais de regiões metropolitanas do Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 64, p.195-199, 1995.
- LONGSTRETH, W. T., ROSENDAAL, R. F., SISCOVICK, D. S., SCHWARTZ, SM., PSATY, B.M., RAGHUNATHAN, T. E., KOEPESELL, T.D., REITSMA, P.H. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). **Stroke.** v.29, p.577-80, 1998.
- LOPAREV, V. N., CARTAS, M. A., MOKEN, C. E., VELPANDI, A., SRIVASANM, A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. **J. Vir. Meth.** v.34, p.105-112. 1991.
- LOTUFO, P. A. Mortalidade precoce por doenças do coração no Brasil. Comparação com outros países. **Arq. Bras. Cardiol.** v.70, p.321-325, 1998.
- LOKTIONOV, A., VORSTER, H., O'NEILL I. K., NELL, T., BINGHAM, S. A., RUNSWICK, S. A., CUMMINGS, J. H. Apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in relation to other risk factors for cardiovascular disease in UK Caucasians and Black South Africans. **Atherosclerosis.** v.145, p.125-35, 1999.
- LUNGUI, B., CASTOLDI, E., MINGOZZI F, BERNARDI, F., CASTAMAN, G. A novel factor V null mutation detected in a thrombophilic patient with Pseudo-

homozygous APC resistance and in asymptomatic unrelated subject. **Blood**. v.92, p.1463-1464, 1998.

MANSOURATI, J. DA COSTA, A. MUNIER, S. MERCIER, B. TARDY, B. FEREC, C. ISAA, K. BLANC, J. J. Prevalence of factor V Leiden in Patients with myocardial infarction and normal coronary angiography. **Thromb. Haemost.** v.83, p.822-5, 2000.

MARLAR, R. A., KLEISS, A. J., GRIFFIN, J. H. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. **Blood**. v.59, p.1067-1072, 1982.

MATO, J. M., ALVAREZ, L., ORTIZ, P., PAJARES, M.A. S-ACENOSYLMETIONINE SYNTHESIS: molecular mechanisms and clinical implications. **Pharmacol. Ther.** v.73, p.265-280, 1997.

MCANDREW, P. E., BRANDT, J. T., PEARL, D. K., PRIOR, T. W. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. **Thromb. Res.** v.83, p.195-198, 1996.

MCCULLY, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am. J. Path.** v.56, p.111-128, 1969.

MCCULLY, K. S. Wilson, R. B. Homocysteine theory of arteriosclerosis. **Atherosclerosis**. v.22, p.215-227, 1975.

MCCULLY, K. S.: Homocysteine theory of arteriosclerosis: Developmente e current status. **Atherosclerosis Rev.** v.11, p.157-246, 1983.



- MCCULLY, K. S. Homocysteine, folate, vitamin B6, and cardiovascular disease. **JAMA**. v.279, p.392-393, 1998.
- McGILL, H. C., GEER, J. C., STRONG, J. P. Natural history of human atherosclerotic lesions. in: SANDLER, M., BOURNE, G. H. eds. *Atherosclerosis and its Origin*. New York: Academic Press. v.18, p.509-526, 1963.
- MILETICH, J. P., PRESCOTT, S. M., WHITE, R., MAJERUS, P. W., BOVIL, E. G. Inherited predisposition to thrombosis. **Cell**. v.72, p.477-480, 1993.
- MORITA, H., TAGUCHI, J., KURIHARA, H., KITAOKA, M., KANEDA, H., KURIHARA, Y., MAEMURA, K., SHINDO, T., MINAMINO, T., OHNO, M., YAMAOKI, K., OGASAWARA, K., AIZAWA, T., SUZUKI, S., YAZAKI, Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. **Circulation**. v.95, p.2032-2036, 1997.
- MORNET, E., MULLER, F., LENVOISE-FURET, A., DELEZOIDE, A.-L., COL, J.-Y., SIMON-BOUY, B., SERRE, J. L. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. **Hum. Genet**. v.100, p.512-514, 1997.
- MOTULSKY, A. G. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. **Am. J. Hum. Genet**. v.58, p.17-20, 1996.
- MUDD, S. H. Vascular disease and homocysteine metabolism. **New Engl. J. Med**. v.313, p.751-753, 1985.

- MUDD SH, SKOVBY F, LEVY HL, PETTIGREW KD, WILCKEN B, PYERITZ RE, ANDRIA G, BOERS GH, BROMBERG IL, CERONE R.. The natural history of homocystinuria due to cystathionina  $\beta$ -sintase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.** v.37, p.1-31, 1985.
- MUDD, S. H., LEVY, H. L. Plasma homocyst(e)ine or homocysteine? **New Eng. J. Med.** v.5, p.333:325, 1995.
- MURDOCH, J. C., RODGER, J. C., RAO, S. S., FLETCHER, C. D., DUNNIGAN, M. G. Down's syndrome: an atheroma-free model. **Brit. Med. J.** v.2, p. 226-228, 1977.
- MURRAY, J., RAND, M. D., EGAN, J. O., MURPHY, S., KIM, H. C., MANN, K. G. Factor V new brunswick: Ala221-to-Val substitution results in reduced cofactor activity. **Blood.** v.86, p.1820-1827, 1995.
- NISHIO, H., LEE, M. J., FUJII, M., KARIO, K., KAYABA, K., SHIMADA, K., MATSUO, M., SUMINO, K. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. **Jpn. J. Hum. Genet.** v.41, p.247-251, 1996.
- NYGARD, O., VOLLSET, S. E., REFSUM, H., BRATTSTRÖM, L., UELAND, P. M. Total homocysteine and cardiovascular disease. **J. Int. Med.** v.246, p.425-454, 1999.
- OU T, YAMAKAWA-KOBAYASHI K, ARINAMI T, AMEMIYA H, FUJIWARA H, KAWATA K, SAITO M, KIKUCHI S, NOGUCHI Y, SUGISHITA Y, HAMAGUCHI H. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E

polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. **Atherosclerosis**. v.137, p.23-8, 1998.

OWEN, E. P., HUMAN, L., CAROLISSEN, A. A., HARLEY, E. H., ODENDAAL, H. J. Hyperhomocysteinemia a risk factor for abruptio placentae. **J. Inherit. Metab. Dis.** v.20, p.359-362, 1997.

PALLAUD C, SASS C, ZANNAD F, SIEST G, VISVIKIS S. APOC3, CETP, fibrinogen, and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the Stanislas cohort). **Clin. Genet.** v.59, p.316-24, 2001.

Rady, P. L., Tying S. K., Hudnall, SD, Vargas T., Kellner LH., Nitowsky H., Matalon, R. K. ethylenetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C667T and A1289C in the Ashkenazi Jewish Population. **Am. J. Med. Genet.** v.86, p.380-384, 1999.

Raslova K, Bederova A, Gasparovic J, Blazicek P, Smolkova B. Effect of diet and 677 C→T 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on plasma homocyst(e)ine concentrations in slovak adolescent population. **Physiol. Res.** v. 49, p 651-8, 2000.

REES, D. C. COX, M. CLEGG, J. B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet.** v. 346, p.1133-34, 1995.

RIDKER, P. M., HENNEKENS, C. H., MILETICH, J. P. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in large cohort of US men. **Circulation.** v.99, p.999-04. 1999.

ROSENBLATT, DAVID S. Methylene tetrahydrofolate reductase. **Clin. Invest. Med.** v. 24, p. 54-5, 2001.

ROSENDAAL, F.R., KOSTER, T., VANDENBROUCKE, J.P., REITSMA, P.H. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood.** v. 85, p1504-8, 1995.

ROSENDAAL, F. R., SISCOVICK, D. S., SCHWARTZ, S. M., BEVERLY, R. K., PSATY, B. M., LONGSTREAN, W. T., RAGHUNATHAN, T. E., KOEPSEEL, T. D., REITSMA, P. H. Factor V Leiden (Resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. **Blood.** v.89, p.2817-2831, 1997.

ROSENFELD, L. Lipoprotein analysis. Early methods in the diagnosis of atherosclerosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v.36, p.1101-1110, 1989.

ROSS, RUSSEL. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990 s. **Nature.** v.362, p.801-809, 1993.

SACCHI, E., TAGLIABE, L. DUCA, F., MANNUCCI, P. M. High frequency of the C667T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in northern Italy. **Lancet.** v.83, p.963-964, 1997.

SAMBROOK, j., FRITSCH, F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P.E10-E14.

SCHNEIDER, J. A., REES, D. C., LIU, Y.-T., CLEGG, J. B. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. **Am. J. Hum. Genet.** v.62, p.1258-1260, 1998.

SCHWARTZ, C. J., VALENTE, A. J., SPRAGUE, E. A., KELLEY, J. L., NEREM, R. M. The Pathogenesis of Atherosclerosis: An Overview. *Clin. Cardiol.* v.14, p.1-16, 1991.

SCHWARTZ, S. M., SISCOVICK, D. S., MALINOW, M. R., ROSENDAAL, F. R., BEVERLY, R. K., HESS, D. L., PSATY, B. M., LONGSTRETH, W. T., JR., KOEPEL, T. D., RAGHUNATHAN, T. E., REITSMA, P. H. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation.* v.96, p.412-417, 1996.

SELHUB, J., JACQUES, P. F., BOSTOM, A. G., D'AGOSTINO, R. B., WILSON, P. W. F., BELANGER, A. J., O'LEARY, D. H., WOLF, P. A., SCHAEFER, E. J., ROSENBERG, I. H. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *New Eng. J. Med.* v.332, p.286-291, 1995.

SOHDA, S., ARINAMI, T., HAMADA, H., YAMADA, N., HAMAGUCHI, H., KUBO, T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J. Med. Genet.* v.34, p.525-526, 1997.

STAMPFER, M. J., MALINOW, M. R. Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? *New Eng. J. Med.* v.332, p.328-329, 1995.

STAMPFER, M. J., MALINOW, R., WILLETT, W. C., NEWCOMER, L. M., ET AL. A Prospective Study of plasma Homocyst(e)ine and Risk of Myocardial infarction in US Physicians. *JAMA.* p.268, p.877-881, 1992.

- STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M., BOERS, G. H. J., BLOM, H. J., TRIJBELS, J. M. F., ESKES, T. K. A. B. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. **Lancet**. v. 339, p. 1122-1123, 1992.
- STEVENSON, R. E., SCHWARTZ, C. E., DU, Y.-Z., ADAMS, M. J., JR. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks. **Am. J. Hum. Genet.** v. 60, p. 229-230, 1997.
- SUNDEN, S. L. F., RENDUCHINTALA, M. S., PARK, E. I., MIKLASZ, S. D., GARROW, T.A. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues e chromossomal localization of the human gene. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 345, p.171-174, 1997.
- SVENSSON, P. J., DAHLBÄCK, B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. **N. Engl. J. Med.** v.330, p.517-521, 1994.
- TALMON, T., SCHARF, J., MAYER, E., LANIR, N., MILLER, B., BRENNER, B. Retinal arterial occlusion in a child with factor V Leiden and thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase mutations. **Am. J. Ophthalm.** v.124, p.689-691, 1997.
- TSAI, J.-C., PERRELLA, M. A., YOSHIZUMI, M., HSIEH, C.-M., HABER, E., SCHLEGEL, R., LEE, M.E. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.91, p.6369-6373, 1994.
-

- UELAND, P. M. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and s-adenosylhomocysteine hydrolase. **Pharmacol Rev.** v. 34, p223-253, 1982.
- UELAND, P. M. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. **Clin. Chem.** v.41, p.340-342, 1995.
- UELAND, P. M., REFSUM, H., STABLER, S.P., MALINOW, M. R., ANDERSON, A., ALLEN, R. H. Total hmcysteine in plasma or serum. Methods and clinical applications. **Clin. Chem.** v.39, p.1764-1779, 1993.
- VAN DE WATER, N. S., FRENCH, J. K., LUND, M., HYDE, T. A., WHITE, H. D., BROWETT, P. J. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin variant G20210A in patients age <50 years with no significant stenoses at angiography three to four weeks after myocardial infarction. **J. Am Coll. Cardiol.** v. 36, p.717-22, 2000.
- WELCH, G. N., LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **New Engl. J. med.** v.78, p.313-316, 1998.
- WILCKEN, D. E., WILCKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease: a possible role for methionine metabolism. **J. Clin. Invest.** v. 57, p.1079-1082,1976.
- WILLIANSOM, D., BROWN, K., LUDDINGTON, R., BAGLIN, C., BAGLIN, T. Factor V Cambridge: a new mutation (arg306→thr) associated with resistance to activatec protein C. **Blood.** v. 91, p.1140-1144, 1998.
- VOETSCH, B., DAMASCENO, B. P., CAMARGO, E. C., MASSARO, A., BACHESCHI, L.A., SCAFF, M., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., ARRUDA,

V.R. INHERITED THROMBOPHILIA AS A RISK FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF ISCHEMIC STROKE IN YOUNG ADULTS. **Thromb Haemost.** v.83, p.229-33, 2000.

WOUTERS, M. G. A. J., BOERS, G. H. J., BLOM, H. J., et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. **Fertil. Steril.** v.60, p.820-825, 1993.

WU, L. L., WU, J., HUNT, S. C., JAMES, B. C., VINCENT, G. M., WILLIAMS, R. R., HOPKINS, P. N. Plasma homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease. **Clin. Chem.** v.40, p.552-561, 1994.



## Resumo

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de morte no Brasil. Dentre os fatores de risco, a hiperhomocisteinemia representa um fator isolado que pode interagir com polimorfismos genéticos potencializando seu risco.

No presente estudo avaliou-se em três grupos distintos a associação entre hiperhomocisteinemia e os polimorfismos C677T MTHFR e G1691A no fator V sobre o desenvolvimento de DAC de início precoce.

A homocisteína plasmática estava significativamente aumentada nos pacientes jovens quando comparada aos controles (7,3 uM vs 4,2uM  $P < 0,0001$ ). Não variando em função dos genótipos C677T MTHFR ( $P = 0,27$ ).

A frequência do polimorfismo C677T MTHFR foi similar nos controles e pacientes com DAC precoce. O homozigoto 1691AA para o fator V estava presente em 5% dos pacientes.

Em conclusão aos nossos dados a homocisteína plasmática está associada com o desenvolvimento de DAC, mas o efeito dos polimorfismos é aparentemente limitado.

---

## Summary

The coronary arterial disease (CAD) is the main cause of death in Brazil. Among the risk factors the hyperhomocysteinemia represents an isolated factor, which can interact with genetic polymorphism potentiating its risk.

In the present study we evaluated in three distinct groups the association between hyperhomocysteinemia and polymorphisms C677T MTHFR and G1691A in factor V on the development of DAC of precocious beginning.

The homocysteine plasmatic was significantly magnified in the young patients when compared with the controls (7,3  $\mu\text{M}$  versus 4,2  $\mu\text{M}$   $P < 0.0001$ ), not varying in function of genotype C677T MTHFR ( $P = 0,27$ ). The frequency of polymorphism C677T MTHFR was similar in the controls and patients with precocious CAD. The homozygote 1691AA for factor V was present in 5% of the patients with infarction precocious.

IN CONCLUSION TO OUR DATA the homocysteine plasmatic is associated with the CAD development, but the effect of polymorphisms apparently is limited.

---

## ANEXO I

## TERMO DE CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO

Eu,

portador(a) da cédula de identidade - R.G. nº \_\_\_\_\_, Sexo \_\_\_\_\_, nascido(a) em \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, e residente à \_\_\_\_\_ (rua/avenida/prça) nº \_\_\_\_\_ compl.: \_\_\_\_\_, cidade de \_\_\_\_\_,

aceito participar, como doador voluntário no estudo de alterações presentes no meu DNA, realizado pelo laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Fui esclarecido de que este trabalho consistirá de uma entrevista, de um exame físico completo e da coleta de uma amostra do meu sangue por profissionais legalmente habilitados.

Os exames realizados, o transporte do material até São Paulo e toda ou qualquer despesa ficará por conta do grupo de pesquisa, sendo o doador isento de quaisquer despesas.

- 1) Fica garantido ao doador que os dados obtidos no estudo serão divulgados ou publicados de forma anônima, sendo utilizadas apenas as iniciais do nome; bem como, o direito à esclarecimentos e informações, quando o doador assim solicitar, a qualquer momento da pesquisa.
- 2) O doador não receberá qualquer tipo de pagamento por sua participação.
- 3) Fica garantido ao doador a desistência do protocolo a qualquer momento da pesquisa bem como a solicitação de informações a respeito de seus dados.

Obs: Em caso de qualquer dúvida ou problema, favor entrar em contato com Silverio Teixeira dos Santos, através do tel: (11) 3818-3634.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2.000

Assinatura do doador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

**ANEXO II. Resultados dos analíticos, genótipos do polimorfismo 677C→T no gene da MTHFR, dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos controles.**

Ident	Nome	Sexo	Idade	Peso	Altura	IMC	P/A	CT	HDL-C	LDL-C	TRI	FATOR V	MTHFR
1	MCM	f	24	52	1,55	22	110/60	164	40,6	103,2	100,8	G/G	C/C
2	SSF	f	25	75	1,6	29	120/80	119	30,3	77,7	54,4	G/G	C/T
3	SCB	f	21	58	1,68	21	120/80	173	40,3	122,4	53,8	G/G	C/T
4	OLGF	m	32	76	1,72	26	120/80	116	40,3	66,3	49,3	G/G	C/T
5	MEBS	f	30	50	1,6	20	110/80	121	36,8	7,5	37,6	G/G	C/C
6	RT	m	18	80	1,77	26	120/80	218	46,7	147,5	117,8	G/G	C/T
7	KAL	f	21	68	1,74	22	110/70	174	48,5	110,8	74,9	G/A	C/T
8	RRS	m	25	53	1,55	22	110/70	114	32,6	73	39,4	G/G	C/C
9	PA	f	24	52	1,7	18	110/70	137	39,0	82	80,8	G/G	C/C
10	ARJ	f	28	53	1,67	19	120/80	121	38,4	74,3	41,3	G/G	C/C
11	EDA	f	46	61	1,68	22	110/80	146	40,8	89,2	79,8	G/G	C/C
12	VL	f	23	73	1,7	25	120/80	199	49,9	134,1	74,2	G/G	C/C
13	JF	m	41	70	1,78	22	120/80	158	33,9	106,8	85,0	G/G	T/T
14	LOF	f	35	61	1,73	20	110/70	148	40,9	99,2	37,3	G/G	T/T
15	DMC	f	36	57	1,6	22	90/60	178	35,1	127,2	76,5	G/G	C/C
16	ALR	f	22	57	1,7	20	110/60	156	37,9	87	67,7	G/G	C/T
17	CRDL	m	26	60	1,68	21	110/70	105	30,3	66,9	36,6	G/G	T/T
18	EMT	m	25	68	1,6	27	120/80	170	40,1	112,9	86,4	G/G	C/T
19	VAL	m	29	65	1,68	23	120/80	139	36,9	84,2	91,5	G/G	C/T
20	LRB	m	39	96	1,73	32	120/80	167	35,0	103,4	140,6	G/G	C/T
21	CDS	m	24	65	1,75	21	120/80	144	33,0	65,6	225,5	G/G	C/T
22	NMF	m	25	60	1,63	23	110/70	161	37,6	110,7	64,5	G/G	C/C
23	ETN	m	49	68	1,75	22	160/100	170	41,3	87,8	205,3	G/G	C/C
24	AS	m	41	64	1,6	25	120/70	176	39,1	102,1	172,8	G/G	C/T
25	VJP	m	41	70	1,74	23	110/60	144	40,6	90,2	68	G/G	C/C
26	MLAQ	f	52	65	1,58	26	140/100	146	40,8	89,2	79,8	G/G	T/T
27	JRV	m	26	70	1,68	25	120/80	151	42,0	98,6	51,2	G/G	C/T
28	RGS	m	20	55	1,72	19	140/80	184	47,6	119,6	83,8	G/G	T/T
29	PPV	m	45	100	1,84	30	130/80	116	40,3	66,3	49,3	G/G	C/T
30	DG	f	45	64	1,6	25	120/80	139	36,9	84,2	91,5	G/G	C/C
31	CAO	m	20	60	1,78	19	110/70	169	50,0	110,1	44,9	G/G	C/C
32	SR	M	45	90	1,76	29	120/80	166	49,2	108,3	41,6	G/G	C/T
33	ACRO	F	21	52	1,7	18	100/70	109	37,9	63,3	36,6	G/G	C/C
34	WFN	M	26	91	1,8	28	120/80	170	40,1	112,9	86,4	G/G	C/C
35	EAB	M	43	85	1,77	27	130/90	190	38,8	123,3	138,9	G/G	C/C
36	JPL	M	54	84	1,72	28	120/80	191	44,0	127,7	98,7	G/G	C/T
37	MBB	F	25	52	1,65	19	100/70	148	40,9	99,2	37,3	G/G	C/C
38	RLG	M	45	74	1,75	24	120/80	178	35,1	127,2	76,5	G/G	C/T
39	VGC	M	20	77	1,73	26	110/60	156	37,9	87	67,7	G/G	C/T
41	PC	m	34	85	1,61	33	140/80	134	37,2	87,7	47,2	G/G	C/C
42	VRC	F	29	65	1,65	24	110/70	119	30,3	77,7	54,4	G/G	C/C
43	JFF	m	47	64	1,62	24	110/60	141	35,6	96,1	47,4	G/G	C/T
44	NRZA	f	46	59	1,7	20	120/80	155	55,0	88,8	57,2	G/G	C/T
45	MFS	f	32	63	1,6	25	110/80	183	49,5	124,3	46,4	G/G	C/T
46	SO	f	28	70	1,71	24	110/70	156	37,9	87	67,7	G/A	C/T
47	ECN	M	21	80	1,77	26	130/80	135	47,0	72	79,4	G/G	C/C
48	MBP	M	25	63	1,73	21	130/80	105	30,3	66,9	36,6	G/G	C/T
49	ERC	m	28	78	1,72	26	120/90	121	38,4	74,3	41,3	G/G	T/T
50	CRD	m	22	70	1,72	24	110/60	113	27,3	79,7	28,3	G/G	C/T
51	PHD	M	35	77	1,8	24	120/90	179	44,5	117,2	85,0	G/G	C/C
52	IF	f	31	76	1,63	29	140/80	176	38,1	121	85,0	G/G	C/C
53	VRM	m	27	60	1,58	24	140/90	109	37,5	62	46,4	G/G	C/T
54	PRP	m	39	70	1,6	27	120/80	114	32,6	73	39,4	G/G	C/C
55	HMM	m	22	105	1,65	39	140/90	140	26,7	82,6	153,6	G/G	C/T
56	JCR	m	37	80	1,71	27	120/90	160	50,0	91,6	93,3	G/G	C/T
57	ABMS	f	59	72	1,6	28	130/90	170	41,3	87,8	205,3	G/G	C/T
58	MCCB	f	34	69	1,62	26	100/60	147	35,3	100,7	55,5	G/G	C/T
59	EGP	F	32	64	1,67	23	120/80	122	38,9	73,1	51,2	G/G	C/T
60	JCC	m	36	120	1,82	36	120/80	104	29,8	65,4	41,6	G/G	C/C
61	ATOF	f	57	56	1,67	20	110/70	144	33,0	65,6	225,5	G/G	C/T
62	ICJ	f	31	62	1,65	23	120/80	151	42,0	98,6	51,2	G/G	T/T
63	NAL	m	23	58	1,73	19	130/90	199	42,0	135,7	107,9	G/G	T/C
64	NNR	f	58	64	1,65	24	120/80	175	41,0	122,4	59,9	G/G	C/C
65	VMM	f	45	61	1,68	22	120/70	179	44,5	117,2	85,0	G/G	C/T
66	FBLM	m	20	70	1,74	23	120/90	199	49,9	134,1	74,2	G/G	C/C
67	FJVC	m	21	69	1,7	24	120/80	158	33,9	106,8	85,0	G/G	T/T
68	VM	m	28	72	1,69	25	120/70	148	40,9	99,2	37,3	G/G	C/T

**ANEXO IV. Resultados dos analíticos, genótipos do polimorfismo 677C→T no gene da MTHFR, dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos com enfarto precoce (GE 1).**

IDENT	NOME	IDADE	CT	TRI	HAS	TABA	DM	FATOR V	MTHFR
1	LLS	28	179	81	+	Fu	-	G/G	C/T
2	APS	38	142	64	+	nFu	-	G/G	T/T
3	MAS	32	164	120	-	Fu	-	G/G	C/T
4	ACS	37	265	297	+	nFu	+	G/G	C/T
5	MVS	34	218	76	+	Fu	-	G/G	C/T
6	LSS	37	213	120	-	Fu	-	G/G	C/T
7	JCMO	35	204	99	+	nFu	-	G/G	C/T
8	BJS	33	245	57	-	Fu	-	G/G	C/C
9	NS	38	155	108	+	nFu	-	G/G	C/T
10	AJLC	39	226	342	-	Fu	-	G/G	C/C
11	JSB	36	142	66	+	Fu	-	G/G	C/T
12	GM	34	166	150	+	Fu	-	G/G	C/C
13	TQ	33	247	710	+	Fu	-	G/G	T/T
14	IMG	40	207	62	+	Fu	-	G/G	C/T
15	EAS	37	226	165	+	Fu	-	G/G	C/T
16	ASM	40	231	343	-	Fu	-	G/G	C/T
17	ASC	36	217	180	-	Fu	-	G/G	C/T
18	JHOC	33	291	271	-	Fu	-	G/G	C/T
19	RRV	37	134	61	-	Fu	-	G/G	C/C
20	IMS	35	219	259	-	Fu	+	A/A	C/T
21	RCA	33	300	253	+	Fu	-	G/G	C/C
22	LSS	36	255	102	+	nFu	-	G/G	C/C
23	ALGM	28	159	49	-	Fu	-	G/G	C/C
24	MT	34	245	250	-	Fu	-	G/G	C/C
25	JME	31	224	98	+	Fu	-	G/G	C/T
26	MJO	36	331	99	+	Fu	-	A/A	C/C
27	JCS	34	233	537	+	Fu	-	G/G	T/T
28	CBN	38	278	338	+	Fu	-	G/G	C/T
29	CRC	39	173	154	-	Fu	-	G/G	C/C
30	IRO	34	195	171	+	Fu	-	G/G	T/T
31	NRLJ	38	272	458	-	Fu	-	G/G	C/C
32	AJC	31	260	245	+	nFu	-	G/G	C/C
33	JJFC	41	238	343	-	Fu	-	G/G	C/C
34	MCC	42	283	193	-	nFu	-	G/G	C/T
35	ZJN	39	173	288	+	Fu	-	G/G	C/T
36	EJ	37	168	119	-	Fu	-	G/G	C/C
38	JCC	40	249	249	-	nFu	-	G/G	C/T
39	OG	39	198	110	+	Fu	-	G/G	C/C
40	MAL	39	300	103	+	Fu	-	G/G	C/T

CT= Colesterol total, TG = triacilgliceróis, HAS = Hipertensão, DM = Diabete melito, tabagismo

**ANEXO V. Resultados dos analíticos, genótipos do polimorfismo 677C→T no gene MTHFR, dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos negróides.**

IDENT	INC.	IO.	SEXO	TABU	PA	IMC	CT	CHDL	CLDL	TG	Fator V	MTHFR
37	ALS	20	F	NFu	106/64	21,9	108,8	37,5	62	46,4	G/G	C/C
149	ASS	20	M	NFu	124/63	21,5	170,3	37,6	124,1	43,4	G/G	C/C
38	IBM	21	F	NFu	103/63	23,7	113,5	32,6	73	39,4	G/G	C/C
44	LAT	21	F	NFu	117/84	22,5	122,2	38,9	73,1	51,2	G/G	C/C
74	MMPC	21	F	NFu	127/75	20,9	172,5	41,5	117,3	68,5	G/G	C/C
39	OBS	22	M	NFu	112/75	21,5	140	26,7	82,6	153,6	G/G	C/C
62	NJCM	22	F	NFu	120/73	21,1	204,3	53,5	126,4	122,1	G/G	C/C
23	IBM	23	F	NFu	110/70	23,9	134,3	37,2	87,7	47,2	G/G	C/C
29	CAS	23	F	NFu	123/84	23,9	183,1	49,5	124,3	46,4	G/G	C/C
148	JBS	23	F	NFu	123/74	19,4	172,7	47,6	112,4	63,5	G/G	C/C
40	ZM	24	F	NFu	118/84	21,2	200,1	45,7	143,7	53,6	G/G	C/C
187	LMS	24	M	NFu	121/84	22,1	163,9	40,6	103,2	100,8	G/G	C/C
24	EDM	25	M	NFu	151/73	22,7	118,9	30,3	77,7	54,4	G/G	C/C
27	LMS	25	F	NFu	101/75	27,0	173,4	40,3	122,4	53,8	G/G	C/C
128	LCS	25	M	NFu	135/81	22,6	116,4	40,3	66,3	49,3	G/G	C/C
147	CMSB	25	M	NFu	125/72	22,4	120,5	36,8	7,5	37,6	G/G	C/C
156	JAS	25	F	NFu	131/63	26,0	217,7	46,7	147,5	117,8	G/G	C/C
188	LJP	25	F	NFu	110/82	20,8	174,2	48,5	110,8	74,9	G/G	C/C
262	ALM	25	M	NFu	124/78	21,4	113,5	32,6	73	39,4	G/G	C/T
18	MAS	26	F	NFu	130/80	24,5	137,2	39,0	82	80,8	G/G	C/C
33	CAM	26	F	NFu	114/76	23,9	121	38,4	74,3	41,3	G/G	C/C
66	MLT	26	F	Fu	117/72	20,2	145,9	40,8	89,2	79,8	G/G	C/C
68	MAT	26	F	NFu	150/73	18,5	198,8	49,9	134,1	74,2	G/G	C/C
157	ADC	26	M	Fu	129/72	17,4	157,7	33,9	106,8	85,0	G/G	C/C
159	OMB	26	F	NFu	123/82	21,6	147,5	40,9	99,2	37,3	G/G	C/C
189	OBS	26	M	NFu	100/80	25,7	177,6	35,1	127,2	76,5	G/G	C/T
30	CMSB	27	F	NFu	124/92	24,3	156,1	37,9	87	67,7	G/G	C/C
32	MAP	27	M	NFu	112/74	24,6	104,5	30,3	66,9	36,6	G/G	C/C
133	AS	27	M	NFu	112/73	21,9	170,2	40,1	112,9	86,4	G/G	C/C
129	ABN	28	M	NFu	124/83	21,9	139,4	36,9	84,2	91,5	G/G	C/C
151	LMS	28	F	NFu	100/62	20,1	224,1	49,4	166,5	41,0	G/G	C/T
190	RM	28	M	NFu	115/83	22,9	243,6	39,9	177,7	130,1	G/G	C/C
283	GCS	28	M	NFu	122/85	26,6	229,5	63	148,1	91,8	G/G	C/T
35	IFM	29	F	NFu	125/83	24,1	178,7	44,5	117,2	85,0	G/G	C/C
45	CAP	29	F	NFu	116/75	22,9	103,5	29,8	65,4	41,6	G/G	C/C
175	VRS	29	F	NFu	143/85	28,1	180,5	43,9	100,5	70,9	G/G	C/C
255	MOPS	30	F	NFu	124/88	31,5	159,5	37	90,8	158,4	G/G	C/T
203	JSM	31	F	NFu	116/82	28,2	185	58,0	103,8	116	G/G	C/C
60	AMVS	32	F	NFu	121/82	25,7	202,6	43,2	141,5	89,9	G/G	C/T
69	ACS	32	F	Fu	171/122	29,8	165	45,8	103,1	80,6	G/G	C/C
202	ASM	32	F	Fu	118/80	20,5	143	55,0	75	65	G/G	C/C
71	LJM	33	F	NFu	130/90	27,0	160,4	40,1	100,4	99,5	G/G	C/C
15	MGM	33	F	NFu	119/63	24,4	184,5	50,3	119,6	73,3	G/G	C/C
127	MMSM	33	M	NFu	132/92	28,5	183,9	47,6	119,6	83,8	G/G	C/C
144	JJCM	33	M	NFu	143/101	24,3	199,1	45,4	135,6	90,4	G/G	C/C
158	OSSS	33	F	NFu	137/72	24,3	146,9	48,6	78,5	99,0	G/G	C/T
131	FCM	34	F	NFu	121/75	18,8	165,8	49,2	108,3	41,6	G/G	C/T
177	LPS	34	M	NFu	143/103	22,2	180,6	36,3	116,1	141,1	G/G	C/C
164	MBS	35	F	NFu	158/81	34,5	189,8	38,0	125,5	131,6	G/G	C/C
109	EAM	35	M	NFu	153/85	22,8	161,5	35,9	113,2	82,4	G/G	C/C
174	SCS	35	F	Fu	111/73	23,9	161,8	40,2	97	123	G/G	C/C
186	MLAS	35	F	Fu	183/124	35,8	211,9	50,6	119	99,2	G/G	C/C
22	MATC	36	F	NFu	162/121	34,3	166,5	35,0	103,4	140,6	G/G	C/C
56	DMS	36	F	NFu	170/85	28,6	143,6	33,0	65,6	225,5	G/G	C/C
72	ASC	36	M	NFu	112/64	18,6	161,2	37,6	110,7	64,5	G/G	C/T
42	NFM	37	M	NFu	124/85	24,6	170,1	41,3	87,8	205,3	G/G	C/T
75	SBS	37	M	NFu	111/76	21,5	175,7	39,1	102,1	172,8	G/G	C/C
184	MAMS	38	F	NFu	140/102	22,4	144,4	40,6	90,2	68	G/G	C/C
201	EBS	39	F	Fu	166/100	24,9	299	55,0	190,2	268	G/G	C/T
57	TLS	40	F	NFu	117/73	20,7	150,8	42,0	98,6	51,2	G/G	C/C
155	SJCM	40	M	NFu	124/83	23,6	193,9	40,1	133,9	99,7	G/G	C/T
160	LCS	40	F	NFu	140/81	28,3	184,8	48,0	121,1	78,9	G/G	C/C

Síglas: Inc.: iniciais dos nomes; F: feminino; M: masculino; Fu: fumante; Nfu: fumante não; PA: pressão arterial; IMC: índice de massa corporal; CT: colesterol total; CHDL: colesterol da HDL; CLDL: colesterol da LDL; TG: triacilgliceróis, HAS = Hipertensão, DM = Diabete