

Patrícia Matos Biselli

Polimorfismos dos genes *VEGF*, *MTHFR* e *MTR* e  
fatores de risco na Doença Arterial Coronária.

São José do Rio Preto

2006

Patrícia Matos Biselli

Polimorfismos dos genes *VEGF*, *MTHFR* e *MTR* e  
fatores de risco na Doença Arterial Coronária.

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Mestre no Curso  
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,  
Área de Concentração: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto  
2006

Biselli, Patrícia Matos

Polimorfismos dos genes *VEGF*, *MTHFR* e *MTR* e fatores de risco na  
Doença Arterial Coronária / Patrícia Matos Biselli

São José do Rio Preto, 2006.

138p; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina De São José do Rio Preto –  
FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

1. Homocisteína; 2. Polimorfismo Genético; 3. Aterosclerose.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	13
2.1. Casuística.....	13
2.2. Método.....	13
2.2.1. Avaliação dos fatores de risco para DAC.....	14
2.2.2. Aspectos fenotípicos das lesões ateroscleróticas.....	14
2.2.3. Extração de DNA.....	15
2.2.4. Quantificação do DNA genômico.....	15
2.2.5. Amplificação do DNA.....	16
2.2.5.a. Fator de crescimento endotelial vascular.....	16
2.2.5.b. Metilenotetrahidrofolato redutase.....	19
2.2.5.c. Metionina sintase.....	21
2.2.6. Dosagem de homocisteína.....	22
2.2.7. Dosagem de ácido metilmalônico.....	23
2.2.8. Dosagem de folato.....	24
2.2.9. Hábito alimentar.....	25
2.2.10. Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Fatores de risco.....	28
3.2. Aspectos fenotípicos das lesões ateroscleróticas.....	31

3.3. Fator de crescimento endotelial vascular.....	34
3.3.1. Análise do polimorfismo <i>VEGF</i> C-2578A.....	34
3.3.2. Análise do polimorfismo <i>VEGF</i> C936T.....	38
3.3.3. Análise do polimorfismo <i>VEGF</i> G-1154A.....	43
3.3.4. Análise dos genótipos <i>VEGF</i> combinados.....	49
3.4. Metilenotetrahidrofolato redutase.....	49
3.4.1. Análise do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	49
3.4.2. Análise do polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C.....	54
3.4.3. Análise dos genótipos <i>MTHFR</i> combinados.....	58
3.5. Metionina Sintase.....	58
3.5.1. Análise do polimorfismo <i>MTR</i> A2756G.....	58
3.6. Análise Multivariada.....	62
3.7. Análise das concentrações de homocisteína (Hcy).....	62
3.8. Análise das concentrações de ácido metilmalônico (MMA).....	65
3.9. Análise das concentrações de folato.....	66
3.10. Análise do hábito alimentar.....	69
4. DISCUSSÃO.....	72
5. CONCLUSÕES.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICE I – Formulário de Pesquisa.....	111
ANEXO I – Aprovação do Comitê Nacional de Ética.....	112
ANEXO II – Aprovação da ampliação metodológica.....	113
ANEXO III – Questionário de hábito alimentar.....	114

## **DEDICATÓRIA**

### **Aos meus pais Sandra e João Hélio**

Dedico esta vitória a vocês que tornaram possível a realização desse sonho. Muito obrigada pelo amor, apoio e esforço que resultaram no meu crescimento pessoal e profissional. Amo muito vocês.

### **Aos meus avós Edite e Jarbas**

Pelo amor e orgulho que sempre tiveram. Exemplo de vida a ser seguido. Agradeço muito por ter vocês comigo, apoiando e vibrando a cada conquista. Amo vocês.

### **Aos meus avós Yolanda e Otávio**

Tenho certeza de que estariam orgulhosos por essa vitória, mas sei que sempre olharão por mim, de onde estiverem. Amo vocês.

### **À minha irmã Joice**

Por sempre torcer pelo meu sucesso e pelo amor demonstrado a cada dia. Sem você e seu apoio não teria chegado até aqui. Amo você.

### **Aos meus tios, tias e primos**

Pelo incentivo e carinho sempre presentes em todos os momentos.

### **Ao meu namorado Leandro**

Pela paciência e carinho principalmente nas horas difíceis. Seu amor é muito importante para mim e sem você tudo teria sido muito mais difícil. Te amo muito.

## **AGRADECIMENTOS**

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny Maria Goloni Bertollo**

Agradeço pelo exemplo de competência e coragem, pelo apoio e acolhimento que tornaram possível a concretização desse sonho. Muito obrigada por trilhar comigo esse caminho difícil, mas muito gratificante.

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Cristina Pavarino Bertelli**

Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte da equipe UPGEM e pelas horas de ajuda e paciência. Seu brilhante conhecimento e experiência tornaram possível a realização desse projeto.

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dorotéia Rossi Silva Souza**

Pela participação brilhante na elaboração deste projeto e pela disponibilidade e colaboração sempre que necessário.

### **Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy**

Profissional brilhante e solícito enriqueceu o projeto de forma única com sua experiência e orientação.

### **Ao amigo Alexandre**

Que iniciou esse trabalho com tanto carinho e dedicação, e participou intensamente de todas as etapas do projeto. Muito obrigada.

**Aos amigos Mariângela, Maria Paula e Celso**

Obrigada pela amizade e respeito e, principalmente, pela contribuição no meu crescimento profissional com sua experiência e sabedoria.

**Aos estagiários e pós-graduandos da UPGEM**

Obrigada pela amizade e apoio de todos.

**Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro**

Agradeço pela colaboração na análise estatística do trabalho.

**Ao Prof. Dr. Emmanuel Dias Neto, Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho e Prof. Dr. Hélio Vannucchi**

Meu agradecimento pela disponibilidade e colaboração no desenvolvimento do projeto.

**Ao Diretor Geral Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior**

Pelo incentivo e apoio para a consolidação da pesquisa na FAMERP.

**Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP**

Pela constante dedicação na manutenção e fortalecimento do curso de pós-graduação da Instituição.



**“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano,  
Mas sem ele o oceano seria ainda menor”.**

**Madre Teresa de Calcutá.**

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Metabolismo da homocisteína (Hcy)..... 5
- FIGURA 2.** Porcentagem de comprometimento das artérias interventricular anterior (IA), coronária direita (CD) e artéria circunflexa (CX) analisadas pela cineangiocoronariografia nos pacientes com DAC..... 29
- FIGURA 3.** Número de indivíduos em relação às artérias envolvidas. IA – artéria interventricular anterior. CD – coronária direita; CX – artéria circunflexa..... 30
- FIGURA 4.** Gel de poliacrilamida 9,6% para análise dos fragmentos obtidos pela técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) de 19 amostras para o polimorfismo *VEGF* C-2578A. As amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 16, 17 e 18 apresentaram o genótipo heterozigoto CA; as amostras 8 e 14, genótipo homozigoto CC; e as amostras 9, 11, 15 e 19, genótipo AA. A coluna M correspondente ao marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pares de base (Amersham Biosciences)..... 31
- FIGURA 5.** Gel de agarose 2,5% do resultado da digestão com a enzima *Nla* III do produto de PCR para o polimorfismo *VEGF* C936T. As amostras 1, 3, 5, 6, 7 e 8 são homozigotas para o alelo normal C. A amostra 4 é heterozigota. A amostra 2 é homozigota para o alelo alterado T. A coluna M correspondente ao marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pares de base (Amersham Biosciences)..... 36

- FIGURA 6.** Resultado da genotipagem de uma amostra homocigota para o alelo G. A curva vermelha representa a amplificação de sinal do fluoróforo FAM, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando um homocigoto GG..... 41
- FIGURA 7.** Resultado da genotipagem de uma amostra homocigota para o alelo A. A curva verde representa a amplificação de sinal do fluoróforo VIC, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando um homocigoto AA..... 41
- FIGURA 8.** Resultado da genotipagem de uma amostra heterocigota GA. As curvas vermelha e verde representam a amplificação de sinal de ambos os fluoróforos FAM e VIC, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando um heterocigoto..... 42
- FIGURA 9.** Análise *endpoint* de todos os indivíduos genotipados. Pontos vermelhos representam homocigotos para o alelo G, verdes representam heterocigotos e azuis homocigotos para o alelo A. Os pontos pretos discriminam amostras indeterminadas, das quais foram obtidos resultados após repetição..... 42
- FIGURA 10.** Gel de poliacrilamida 9,6% para análise dos fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Hinf* I de 15 amostras para o polimorfismo *MTHFR* C677T. A banda de 198 pb corresponde ao alelo selvagem C, enquanto que o fragmento de 175 pb corresponde ao alelo mutado T. O genótipo heterocigoto é observado nas amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 14 e 15. As amostras 9, 10, 11 e 13 apresentaram somente o alelo correspondente à 198 pb (alelo C).

Linhas M correspondem ao marcador de peso molecular de 100 pares de base (Amersham Biosciences)..... 47

**FIGURA 11.** Gel de poliacrilamida 6% para análise do polimorfismo *MTHFR* A1298C de 8 amostras. Os alelos são amplificados e aplicados separadamente no gel. As amostras 1, 3 e 6 apresentam amplificação dos dois fragmentos de 77 e 120 pb correspondente aos alelos A e C, respectivamente. As amostras 2, 4, 5 e 7 apresentaram somente o fragmento de 77 pb (Alelo A). A amostra 8 apresentou somente o fragmento de 120 pb (Alelo C). O fragmento de 198 pb observados em todas as amostras corresponde à seqüência controle de amplificação. A coluna M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham Biosciences). As letras A e C junto ao número da coluna indicam a amplificação correspondente ao alelo A e C, respectivamente..... 52

**FIGURA 12.** Gel de agarose 2,5% mostrando resultado da digestão com a enzima *Hae* III do produto de PCR de 13 amostras para o polimorfismo *MTR* A2756G. As amostras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 13 apresentaram os fragmentos de 413pb, referente ao alelo A. As amostras heterozigotas 1, 2, 9, 10, 11 e 12 apresentaram os três fragmentos de 413 (alelo A), 290 e 123pb (alelo C). A banda de 85pb é observada em todas as amostras como resultado da ação da enzima no sítio constitutivo no produto de PCR. A coluna M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham Biosciences)..... 56

**FIGURA 13.** Média de Hcy, em escala logarítmica, em relação aos genótipos

*MTHFR* 677T..... 61

**FIGURA 14.** . Média de folato, em escala logarítmica, em relação aos genótipos

*MTHFR* A1298C..... 65

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b> Características da população estudada.....	26
<b>TABELA 2.</b> Perfil lipídico de pacientes com DAC e controles.....	27
<b>TABELA 3.</b> Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>VEGF C-2578A</i> .....	33
<b>TABELA 4.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo <i>VEGF C-2578A</i> em relação ao número de artérias envolvidas.....	34
<b>TABELA 5.</b> Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo <i>VEGF</i> <i>C-2578A</i> .....	34
<b>TABELA 6.</b> Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>VEGF C936T</i> .....	38
<b>TABELA 7.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo <i>VEGF C936T</i> em relação ao número de artérias envolvidas.....	39
<b>TABELA 8.</b> Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo <i>VEGF</i> <i>C936T</i> .....	39
<b>TABELA 9.</b> Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>VEGF G-1154A</i> .....	44
<b>TABELA 10.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo <i>VEGF G-1154A</i> em relação ao número de artérias envolvidas.....	45
<b>TABELA 11.</b> Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo <i>VEGF</i> <i>G-1154A</i> .....	45
<b>TABELA 12.</b> Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>MTHFR C677T</i> .....	49
<b>TABELA 13.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo <i>MTHFR C677T</i> em relação	

---

ao número de artérias envolvidas.....	50
<b>TABELA 14.</b> Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	50
<b>TABELA 15.</b> Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C.....	53
<b>TABELA 16.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C em relação ao número de artérias envolvidas.....	45
<b>TABELA 17.</b> Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C.....	54
<b>TABELA 18.</b> Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>MTR</i> A2756G.....	57
<b>TABELA 19.</b> Distribuição genotípica do polimorfismo <i>MTR</i> A2756G em relação ao número de artérias envolvidas.....	58
<b>TABELA 20.</b> Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo <i>MTR</i> A2756G.....	58
<b>TABELA 21.</b> Ingestão de folato e vitaminas B <sub>6</sub> e B <sub>12</sub> entre os grupos.....	67

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANOVA	Análise de Variância
C $\beta$ S	Cistationina $\beta$ -sintetase
CD	Coronária direita
CID	Dissociação induzida por colisão
CT	Colesterol total
CX	Artéria circunflexa
DAC	Doença arterial coronária
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DP	Desvio padrão
DTT	Dihiothreitol
EAR	Estimativa de requerimento médio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização via electrospray
Hcy	Homocisteína
HDL <sub>C</sub>	Lipoproteína de alta densidade
HIF-1 $\alpha$	Fator-1 $\alpha$ induzido por hipóxia
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IA	Artéria interventricular anterior
LC-MS/MS	Cromatografia líquida/espectrometria de massas sequencial
LDL <sub>C</sub>	Lipoproteína de baixa densidade
MMA	Ácido metilmalônico



MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
MTR	Metionina sintase
MTRR	Metionina sintase redutase
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>
PFB	Pentafluorobenzil
PFB-Br	Pentafluorobenzil-brometo
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SDS	Sulfato dodecil de sódio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples
TG	Triglicérides
U-II	Urotensina II
UNICAMP	Universidade de Campinas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL <sub>C</sub>	Lipoproteína de densidade muito baixa

## 1. RESUMO

A aterosclerose coronária resulta da interação entre fatores de risco ambientais e genéticos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar as frequências de polimorfismos do gene *VEGF*, relacionado ao desenvolvimento de novos vasos, e dos genes *MTHFR* e *MTR*, envolvidos no metabolismo da homocisteína (Hcy), associada à formação de lesões ateroscleróticas, em 175 pacientes com doença arterial coronária (DAC) e 108 controles sem sinais angiográficos da doença. Foram analisados níveis plasmáticos de Hcy, folato e ácido metilmalônico (MMA), além da ingestão de micronutrientes requeridos para o metabolismo da Hcy. Destacaram-se como fatores de risco para a DAC hipertensão arterial ( $P=0,021$ ), diabetes ( $P=0,029$ ), tabagismo ( $P=0,006$ ) e níveis de HDLc $<40$  mg/dL ( $P=0,0003$ ). O genótipo alterado *VEGF* – 2578AA foi observado em maior frequência em pacientes com três artérias lesadas ( $P=0,008$ ). O genótipo *MTHFR* 1298AA foi associado com níveis reduzidos de folato no grupo com DAC ( $P=0,010$ ). Os níveis médios de MMA foram significativamente mais elevados no grupo com DAC ( $P=0,048$ ). Deficiência de vitamina B<sub>12</sub> foi prevalente no grupo com DAC ( $P=0,004$ ). Foi observada uma correlação positiva entre os níveis de MMA e concentrações de Hcy no grupo com DAC ( $P=0,001$ ), assim como no grupo controle ( $P=0,020$ ). Os níveis médios de MMA foram significativamente mais elevados em indivíduos com hiper-homocisteinemia em ambos os grupos DAC ( $P=0,0063$ ) e controle ( $P=0,013$ ). Indivíduos com deficiência de B<sub>12</sub> apresentaram níveis mais elevados de Hcy ( $P=0,007$ ). Os níveis de ingestão dos micronutrientes não diferiram entre os grupos ( $P>0,05$ ) e não apresentaram associação com os níveis plasmáticos de Hcy, folato e MMA ( $P>0,05$ ). Os resultados obtidos sugerem que a diminuição da expressão de VEGF resultante do alelo alterado *VEGF* – 2578A é um fator de risco para

aterosclerose. Deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, refletida pela quantificação de MMA, se mostrou importante fator de risco tanto para hiper-homocisteinemia quanto para DAC.

**ABSTRACT**

Coronary atherosclerosis results from interaction among environmental and genetic risk factors. In this sense, the objective of this study was to investigate the frequencies of *VEGF* gene polymorphisms, related to the development of new vessels, and of *MTHFR* e *MTR* genes polymorphisms, involved in the homocysteine metabolism (Hcy), associated to the formation of atherosclerosis lesions, in 175 patients with coronary artery disease (CAD) and 108 control individuals with no angiographic signs of the disease. Plasma Hcy, folate and methylmalonic acid (MMA), besides micronutrients ingestion required for Hcy metabolism were also analyzed. The risk factors for DAC were arterial hypertension (P=0.021), diabetes (P=0.029), smoking (P=0.006) and HDLc levels<40 mg/dL (P=0.0003). The altered *VEGF* -2578CC genotype was observed in higher frequency in patients with three damaged arteries (P=0.008). *MTHFR* 1298AA genotype was associated with decreased folate levels in the group with CAD (P=0,010). MMA mean levels were significantly higher in the group with CAD in relation to the control (P=0.048). Vitamin B<sub>12</sub> deficiency was more frequently observed in CAD group (P=0,004). A positive correlation among MMA levels and Hcy concentrations was observed in the group with CAD (P=0.001), as well as in the control group (P=0.020). MMA mean levels were significantly higher in individuals with hyperhomocysteinemia in both groups CAD (P=0.0063) and control (P=0.013). Individuals with vitamin B<sub>12</sub> deficiency presenting higher Hcy levels (P=0,007).Micronutrients ingestion levels did not differ significantly among the groups (P>0.05) and did not present association with Hcy, folate and MMA plasma levels (P>0.05). The obtained results have suggested that decreased expression of VEGF resultant of altered *VEGF* -2578A allele is a risk factor for atherosclerosis. Vitamin B<sub>12</sub>

deficiency, provided by the MMA quantification, showed to be an important risk factor either for hyperhomocysteinemia or for CAD.

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

A doença arterial coronária (DAC) resulta da interação complexa entre fatores de risco ambientais e genéticos que fazem com que a parede arterial responda a estímulos inflamatórios por meio da ação de células endoteliais, musculares lisas, inflamatórias e plaquetas.<sup>(1)</sup> Uma variedade de substâncias que alteram a estrutura da parede arterial é produzida e leva ao desenvolvimento da placa aterosclerótica, como por exemplo, fatores de crescimento, citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), enzimas e fatores de sinalização.<sup>(2,3)</sup>

A placa aterosclerótica é composta de quantidades variáveis de células musculares lisas, macrófagos, linfócitos T, colesterol, fosfolípidios e tecido conectivo extracelular, que inclui colágeno, proteoglicanas e matriz pericelular formada por fibronectina e fibras elásticas.<sup>(4-6)</sup> Eventualmente, a placa progride até a obstrução do lúmen arterial, reduzindo o fluxo sanguíneo e causando diversas manifestações clínicas.<sup>(7)</sup>

A evolução da DAC é crônica e muitas vezes assintomática, com manifestações clínicas que ocorrem geralmente muito tempo após o início da formação placa. As lesões ateroscleróticas podem se tornar instáveis, sofrer ruptura e causar oclusão parcial ou total da artéria, desencadeando uma crise coronária aguda.<sup>(8)</sup> Muitos fatores podem contribuir para esse fenômeno, incluindo características estruturais da placa, erosões endoteliais, processos inflamatórios e trombose.<sup>(9)</sup>

Sinais clínicos são altamente relevantes para o reconhecimento da aterosclerose, como por exemplo, história de angina ou evento coronário anterior, como infarto do miocárdio. O diagnóstico preciso pode ser obtido por meio do exame

cineangiocoronariográfico, que possibilita a visualização do número, gravidade e localização das lesões ateroscleróticas.<sup>(10)</sup>

A base genética da aterosclerose não é completamente conhecida, embora genes envolvidos em processos inflamatórios, metabolismo lipídico e coagulação tenham sido associados a vários fenótipos relacionados à doença.<sup>(11)</sup> Polimorfismos funcionais em genes candidatos à regulação de outros processos biológicos relevantes ao desenvolvimento e progressão da placa aterosclerótica também requerem atenção para ampliação dos conhecimentos a respeito da etiologia da DAC.

### **Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)**

O gene que codifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem despertado grande interesse em estudos de doenças coronárias.<sup>(12-14)</sup> O VEGF, um mitógeno que promove a proliferação de células endoteliais vasculares e angiogênese, é uma glicoproteína de 45 kDa secretada na parede vascular por células endoteliais, musculares lisas.<sup>(15-17)</sup> Embora o VEGF seja considerado relativamente específico para células endoteliais,<sup>(18)</sup> também influencia a ativação e migração de monócitos e migração de células musculares lisas vasculares.<sup>(19-21)</sup>

Como resultado de *splicing* alternativo, o gene *VEGF* produz quatro proteínas homodiméricas com 121, 165, 189 e 206 resíduos de aminoácidos. As moléculas com 121 e 165 aminoácidos possuem resíduos hidrossolúveis que possibilitam sua secreção, enquanto que uma grande quantidade de moléculas maiores é ligada a proteoglicanas na matriz extracelular.<sup>(22,23)</sup>

Na placa aterosclerótica, monócitos e macrófagos são produtores significativos de VEGF, juntamente com outros fatores de crescimento e citocinas, que possuem papel



central na aterogênese. Estudos apontam para um efeito protetor de VEGF no desenvolvimento da placa aterosclerótica, atuando como regulador da integridade endotelial da parede arterial coronária. Foi observado que a administração de VEGF recombinante em artérias lesadas é capaz de reduzir o espessamento da camada íntima e a formação de trombos.<sup>(24,25)</sup>

Em pacientes acometidos por infarto agudo do miocárdio, os níveis séricos de VEGF aumentam dentro de curto período de tempo.<sup>(26)</sup> O tecido isquêmico produz o fator-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) induzido por hipóxia, cuja seqüência alvo está localizada na região promotora do gene *VEGF*; intensificando, assim, a transcrição da proteína e de seus receptores em células endoteliais.<sup>(27)</sup> O VEGF atua na proteção dos vasos contra danos e também promove sua dilatação, aumentando o fluxo sanguíneo para o miocárdio e tecidos isquêmicos. Novos vasos conhecidos como *vasa vasorum* são formados em resposta à isquemia tecidual crônica e asseguram o fluxo sanguíneo para a área isquêmica.<sup>(28)</sup>

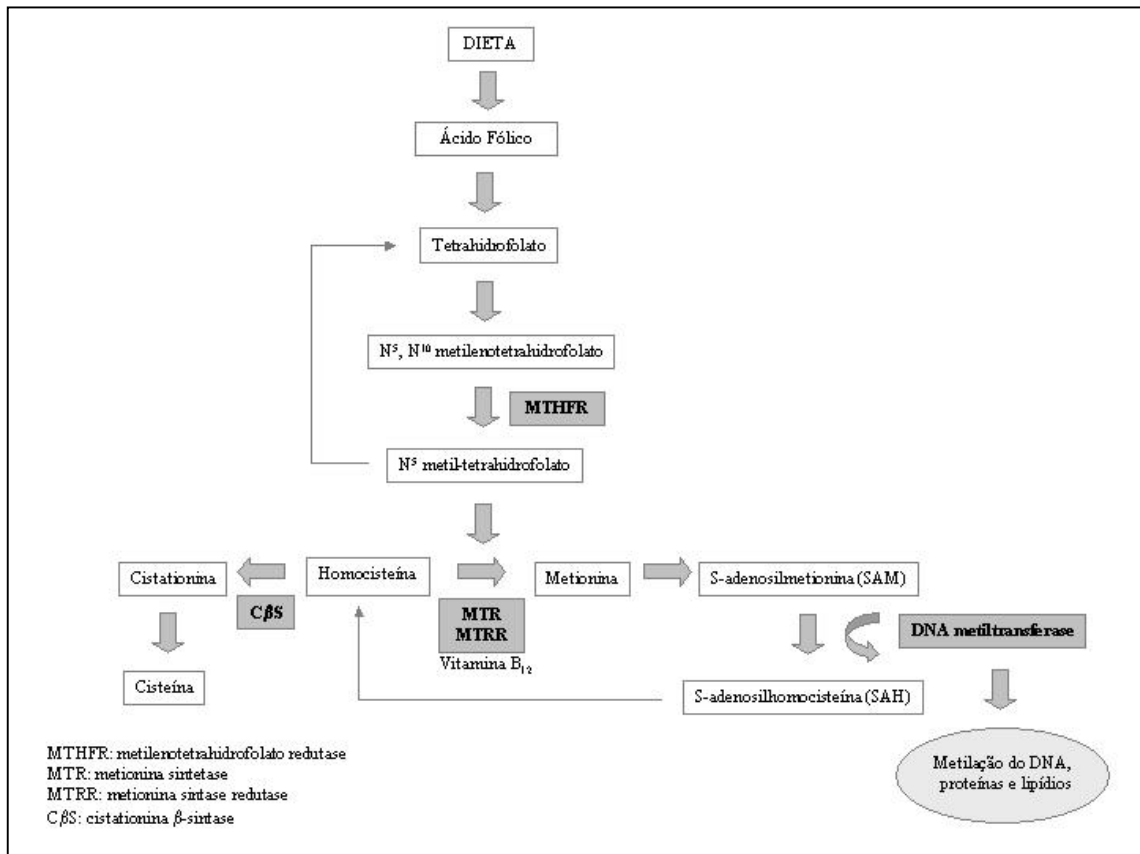
Diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram descritos no gene *VEGF*, alguns dos quais associados com expressão diferencial da proteína.<sup>(29-32)</sup> Renner *et al.* (2000),<sup>(31)</sup> descreveram três mutações no gene *VEGF* (C702T, C936T e G1612A) e observaram níveis plasmáticos de VEGF significativamente mais baixos em portadores do alelo *VEGF* 936T em relação aos não portadores. Em relação às mutações C702T e G1612A não foi observada associação com os níveis de VEGF produzidos. Níveis aumentados foram associados ao alelo G para o polimorfismo G-1154A e ao alelo C para o polimorfismo C-2578A do gene *VEGF*, ambos localizados na região promotora do gene, em estudo com pacientes submetidos a transplante renal (Shahbazi *et al.*, 2002).<sup>(32)</sup>

Recentemente, os polimorfismos C-2578A, G-1154A e C-634G do gene *VEGF* foram investigados no desenvolvimento da aterosclerose.<sup>(14)</sup> O estudo mostrou um aumento proporcional da frequência do genótipo alterado *VEGF* –2578AA em relação ao número de artérias lesadas, sugerindo que a diminuição da expressão de VEGF resultante do genótipo alterado promoveria o desenvolvimento da aterosclerose. Em relação ao polimorfismo *VEGF* G–1154A, o genótipo selvagem *VEGF* –1154GG mostrou um efeito protetor para a doença. Esses resultados reforçam um efeito protetor do VEGF no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

A compreensão do papel do VEGF na aterosclerose, como também dos fatores que podem alterar quantitativamente e qualitativamente a produção desta proteína torna-se, então, de grande importância no esclarecimento dos mecanismos que levam à DAC.

### **Metabolismo da Homocisteína**

A hiper-homocisteinemia, nível elevado de Hcy, é considerada um fator de risco para a DAC.<sup>(33)</sup> A Hcy é um aminoácido formado durante o metabolismo da metionina. No fígado, a metionina é continuamente convertida em Hcy via S-adenosilmetionina, que é desmetilada para formar S-adenosil-homocisteína. Posteriormente, é hidrolisada para adenosina e Hcy. O metabolismo da Hcy predominantemente ocorre no fígado e nos rins por duas vias: transsulfuração ou remetilação para metionina (Figura 1). A Hcy pode ser convertida para metionina por remetilação catalisada pela enzima metionina sintase (MTR) e metionina sintase resutase (MTRR) na presença de vitamina B<sub>12</sub>. Essa reação enzimática requer N<sup>5</sup>-metiltetrahydrofolato como doador de grupo metil. A formação desse radical depende da presença de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilenotetrahydrofolato e da enzima N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR).



**Figura 1.** Metabolismo da homocisteína (Hcy).

No entanto, grande parte da Hcy é convertida para cistionina em uma reação catalisada pela enzima cistionina-β-sintetase (CβS), dependente de vitamina B<sub>6</sub> e, posteriormente, para cisteína, que pode ser metabolizada e excretada na urina na forma de sulfato.<sup>(34)</sup> Sob condições fisiológicas, toda Hcy é remetida para metionina ou catabolizada para formação de cistionina e não é excretada pelos rins em quantidades significativas. Níveis normais de Hcy estão entre 5 e 15 μmol/L, e são aproximadamente 10 a 15% mais baixos em mulheres.<sup>(35)</sup> A hiper-homocisteinemia é classificada como moderada (>15 a 30 μmol/L), intermediária (>30 a 100 μmol/L) e grave (>100 μmol/L).<sup>(36)</sup> Em indivíduos com níveis elevados de Hcy plasmática, uma alta incidência

de doença vascular oclusiva, trombose e DAC tem sido relatada, sugerindo um papel potencial da hiper-homocisteinemia no desenvolvimento de doença cardiovascular.<sup>(37-39)</sup>

Os mecanismos fisiopatológicos referentes ao papel pró-aterogênico da hiper-homocisteinemia ainda não são totalmente esclarecidos. Evidências sugerem que a hiper-homocisteinemia induz a disfunção e lesão endotelial, proliferação de células musculares lisas, ativação de plaquetas e formação de trombos.<sup>(40-42)</sup> O metabolismo da Hcy também produz diferentes ROS, que podem induzir ao dano oxidativo de células endoteliais.<sup>(43)</sup> Além disso, a Hcy é um potente mitógeno para células musculares lisas o que intensifica a adesão de monócitos.<sup>(41,42)</sup> Todos esses achados apontam para um papel potencial da Hcy na promoção da aterosclerose coronária por diferentes mecanismos.

### **Alterações genéticas de enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy**

Entre os fatores que afetam os níveis de Hcy estão alterações genéticas que afetam o seu metabolismo, como, por exemplo, no gene que codifica a MTR, enzima que catalisa a remetilação da Hcy para metionina. Um estudo recente mostrou que a substituição de adenina para guanina no nucleotídeo 2756 do gene *MTR* contribui para o aumento moderado de Hcy, entretanto, não foi associada à DAC.<sup>(44)</sup> Por outro lado, Gueant-Rodrigues *et al.* (2005)<sup>(45)</sup> não encontrou associação entre este polimorfismo e níveis elevados de Hcy em indivíduos com DAC. Por ser a MTR uma enzima dependente de vitamina B<sub>12</sub>, em casos de ausência ou concentrações reduzidas dessa vitamina, há um comprometimento do metabolismo da Hcy devido à diminuição da atividade enzimática de MTR, o que acarreta em uma redução da quantidade de metionina e aumento da homocisteína.<sup>(46)</sup>

A enzima MTR requer metiltetrahidrofolato como doador de grupo metil e a formação desse radical depende da presença da enzima MTHFR. Atividade ou níveis reduzidos de MTHFR levam a hiper-homocisteinemia e níveis reduzidos de metionina.<sup>(47,48)</sup> O polimorfismo C677T do gene *MTHFR* resulta em termolabilidade e atividade enzimática reduzida, e contribui para o aumento dos níveis de Hcy.<sup>(47)</sup> Associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e doenças vasculares foi relatada na literatura em vários estudos,<sup>(49-54)</sup> por outro lado, outros não confirmam essa associação.<sup>(55,56)</sup>

Outro polimorfismo no gene *MTHFR*, uma substituição de adenina para citosina no nucleotídeo 1298, causa mudança de ácido glutâmico para alanina na proteína produzida. A contribuição deste polimorfismo para a atividade enzimática ainda é questionável. Estudo de Weisberg *et al.* (1998)<sup>(57)</sup> avaliou a atividade da enzima MTHFR em extrato de linfócitos e observou que na presença do genótipo *MTHFR* 677CT/1298AA há redução de cerca de 30% da atividade enzimática; enquanto homozigoto *MTHFR* 677CC/1298CC e heterozigoto *MTHFR* 677CT/1298AC resultam na diminuição desta atividade em 35 a 43% e de 38 a 50%, respectivamente.

Resultados similares foram observados em estudo de expressão *in vitro* da enzima MTHFR, que mostrou uma redução de 32% na atividade da enzima mutante 1298 e de 59% para aquela mutada para ambos os polimorfismos (C677T e A1298C).<sup>(58)</sup> Por outro lado, Yamada *et al.*, (2001)<sup>(59)</sup> não observaram alteração na função catalítica ou regulatória da enzima na presença da variante *MTHFR* 1298CC.

Níveis de Hcy de indivíduos heterozigotos *MTHFR* 1298AC e homozigotos *MTHFR* 1298CC não diferem daqueles com genótipo selvagem *MTHFR* 1298AA,

sugerindo que este polimorfismo isolado não afeta significativamente o metabolismo da Hcy,<sup>(58,60)</sup> mas pode exercer um efeito moderado na presença da variante C677T.<sup>(58)</sup>

Em estudo de Szczeklik *et al.* (2001)<sup>(61)</sup> foi encontrada uma relação entre o polimorfismo *MTHFR* A1298C e o início precoce da DAC. A frequência do alelo *MTHFR* 1298C mostrou-se significativamente mais alta em pacientes com DAC em relação aos controles independente dos níveis de homocisteína. A contribuição de polimorfismos do gene *MTHFR* para a DAC ainda não está bem esclarecida, uma vez que alguns estudos mostraram associação,<sup>(62-64)</sup> enquanto outros não.<sup>(65-67)</sup>

### **Fatores nutricionais e concentração de Hcy**

Diversas vitaminas atuam como cofatores e substratos no metabolismo da Hcy e a ingestão destes nutrientes exerce influência sobre a concentração circulante desse aminoácido.<sup>(68)</sup> O ácido fólico e a cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) regulam as vias metabólicas catalisadas pelas enzimas *MTHFR* e *MTR*, respectivamente, e a piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) atua como cofator para a enzima CβS.

A atividade da enzima *MTHFR* depende da condição nutricional de ácido fólico, o que explica o fato de concentrações plasmáticas de Hcy serem facilmente diminuídas em pacientes com doença cardíaca que fazem uso da suplementação com ácido fólico ou alimentos enriquecidos com ácido fólico.<sup>(69)</sup> Nos pacientes com baixos níveis de ingestão destes micronutrientes, a suplementação parece ser uma estratégia segura e eficiente para a normalização das concentrações de Hcy.<sup>(70,71)</sup>

Estudos têm indicado um papel protetor das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folato no desenvolvimento da DAC.<sup>(72-74)</sup> Baixas concentrações plasmáticas de folato e vitamina B<sub>6</sub> são mais frequentes em indivíduos com aterosclerose em relação a controles.<sup>(75,76)</sup>

Relação inversa entre concentrações de Hcy e níveis de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub> tem sido demonstrada<sup>(76,77)</sup> e associação entre deficiência destas vitaminas e hiper-homocisteinemia confere risco para infarto do miocárdio.<sup>(78,79)</sup>

O aumento do risco cardiovascular associado com baixa concentração de folato é dependente da Hcy; no entanto, concentrações reduzidas de vitamina B<sub>6</sub> parecem aumentar o risco, independente dos níveis de Hcy.<sup>(76,80)</sup>

Deficiência de vitamina B<sub>12</sub> é comum entre pacientes com doença vascular e nível sérico reduzido desta vitamina é o maior determinante do aumento da Hcy e formação de placa em artéria carótida.<sup>(81)</sup> Níveis de ácido metilmalônico (MMA) e Hcy se encontram elevados em indivíduos com deficiência de vitamina B<sub>12</sub>.<sup>(81,83)</sup>

O MMA é formado durante o metabolismo da Hcy. Em uma outra via de eliminação do excesso de Hcy, a segunda enzima dependente de vitamina B<sub>12</sub>, a L-metilmalonil-coA mutase, faz a conversão de metilmalonil-coA para succinil-coA, tendo a adenosilcobalamina como co-fator.<sup>(84-86)</sup> A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> impede esta reação desviando o substrato para a formação de MMA, levando a aumentos em seus níveis no sangue e urina.<sup>(87,88)</sup>

O desenvolvimento de testes específicos para a detecção de MMA em urina, soro ou plasma tem viabilizado diagnosticar insuficiência de vitamina B<sub>12</sub><sup>(82,89)</sup> e ainda tem tornado possível diferenciá-la da deficiência de folato, já que esta última condição não eleva os níveis de MMA.<sup>(89)</sup>

Com base nessas evidências o objetivo deste estudo foi:

1. Avaliar a influência de fatores de risco conhecidos (hipertensão arterial, diabetes, sedentarismo, tabagismo, etilismo e perfil lipídico) no desenvolvimento da DAC.
2. Estimar as frequências dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, do polimorfismo A2756G do gene *MTR* e dos polimorfismos C-2578A, G-1154A e C936T do gene *VEGF* em pacientes submetidos à cineangiocoronariografia que apresentam lesão coronária obstrutiva e comparar com aquelas observadas em indivíduos controles sem sinais angiográficos da doença.
3. Verificar a associação entre esses polimorfismos investigados e o número e gravidade das lesões ateroscleróticas.
4. Quantificar os níveis plasmáticos de Hcy, folato e MMA nos indivíduos com DAC e no grupo controle e correlacionar com os polimorfismos genéticos.
5. Avaliar o hábito alimentar dos indivíduos por meio de questionário nutricional validado e correlacionar com os níveis plasmáticos de Hcy, folato e ácido metilmalônico.



## ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

## **2. CASUÍSTICA E MÉTODO**

### **2.1. Casuística**

Foram incluídos no estudo 283 pacientes, procedentes do Serviço de Cardiologia e Cirurgia Vascular do Hospital de Base de São José do Rio Preto, caucasianos, independentemente do sexo, submetidos a cineangiocoronariografia. Embora exista no Brasil vasta miscigenação, foram considerados caucasóides os indivíduos que não apresentaram ascendência de outros grupos étnicos nas três gerações antecedentes.<sup>(90)</sup>

Indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização cardíaca, substituição de válvulas cardíacas ou colocação de prótese laminar coronariana foram excluídos do estudo.

Os voluntários foram incluídos no estudo com consentimento livre e esclarecido e todas as informações necessárias foram obtidas por meio de questionário padronizado (Apêndice I). O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo I) e a ampliação metodológica pelo Conselho de Ética em Pesquisa da FAMERP (Anexo II)

### **2.2. Método**

Os indivíduos foram submetidos a cineangiocoronariografia devido à indicação médica, sendo necessário, para sua realização, dieta zero de 12 horas. Durante a realização deste exame, foram colhidas amostras de sangue periférico para extração de DNA e dosagem plasmática de Hcy, folato e MMA. A separação do plasma foi realizada até uma hora após a colheita da amostra de sangue e a estocagem em freezer – 80°C de acordo com protocolo estabelecido. As condições para o transporte foram

ideais para não interferir nos resultados (embalagem térmica, amostras envolvidas em gelo seco e tempo de entrega menor que 24 horas).

### **2.2.1. Avaliação dos fatores de risco para DAC**

Foram avaliados fatores de risco para o desenvolvimento da DAC como hipertensão arterial, diabetes, sedentarismo, tabagismo, etilismo e perfil lipídico.

Os critérios para definir diabetes foram uso de agentes hipoglicêmicos orais ou tratamento com insulina, ou níveis de glicemia acima de 126 mg/dL; para hipertensão arterial, uso de medicação anti-hipertensiva ou pressão arterial superior a 140/90 mmHg; para sedentarismo, ausência de atividade física regular e controlada; para etilismo, ingestão de álcool com frequência definida sem análise quantitativa; para tabagismo, consumo mínimo de cinco cigarros/dia.

Os procedimentos para determinação do perfil lipídico foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Foram dosados os níveis séricos de: triglicérides (TG), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL<sub>C</sub>) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL<sub>C</sub>) pelo método colorimétrico enzimático. Nível de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL<sub>C</sub>) foi calculado pela fórmula de Friedewald.<sup>(91)</sup>

### **2.2.2. Aspectos fenotípicos das lesões ateroscleróticas**

A interpretação dos exames cineangiocoronariográficos foi realizada por dois observadores em análise cega quantitativa. Os fenótipos estudados foram aqueles abordados pela cineangiocoronariografia onde foram observados a localização da lesão aterosclerótica, o grau de redução do diâmetro do vaso e a anatomia da placa. Foram

analisadas as artérias coronárias interventricular anterior (IA), circunflexa (CX) e coronária direita (CD). Considerou-se existência de DAC quando observado comprometimento obstrutivo do diâmetro da luz do vaso, classificando-se as obstruções em <50%, >50-75%, >75-95% e >95% (obstrução total). Em caso de comprometimento arterial múltiplo considerou-se o de maior grau.

### **2.2.3. Extração de DNA**

O DNA foi obtido por meio da técnica segundo Abdel-Rahmann *et al.* (1994)<sup>(92)</sup> em projeto anterior.<sup>(93)</sup> Brevemente, a amostra de sangue periférico foi colhida em tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e os linfócitos foram isolados com auxílio de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). O DNA genômico foi obtido adicionando aos linfócitos isolados SDS (sulfato dodecil de sódio), proteinase K e RNase A. Após purificação com NaCl, o DNA foi precipitado com etanol e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tampão Tris-EDTA para posterior análise.

### **2.2.4. Quantificação do DNA genômico**

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria, que consiste na determinação da concentração do DNA pela absorvância do comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). Para tanto, o DNA foi previamente diluído em água (5 $\mu\text{L}$  da amostra de DNA para 495 $\mu\text{L}$  de água Mili-Q autoclavada) e o espectrofotômetro calibrado para 260nm. No equipamento, o valor da concentração é dado em ng/ $\mu\text{L}$ . O grau de pureza foi determinado através do cálculo de densidade óptica (OD) a 260 e 280nm; a amostra é considerada pura quando a relação

OD260/OD280 é igual a 1,8. Após a leitura no espectrofotômetro, a concentração das amostras de DNA genômico foi ajustada para 10 ng/μL e 50ng/μL.

### 2.2.5. Amplificação do DNA

#### 2.2.5.a. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

##### ➤ Polimorfismo *VEGF C-2578A*

No presente trabalho foram analisadas 35 amostras para o polimorfismo *VEGF C-2578A*. Duzentas e quarenta e oito já haviam sido investigadas em projeto anterior;<sup>(93)</sup> totalizando, portanto a análise em 283 pacientes.

O polimorfismo *VEGF C-2578A* foi detectado segundo Brogan *et al.* (1999)<sup>(29)</sup> pelo método de análise de polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP), com a utilização dos *primers* descritos a seguir:

---

#### Seqüência dos *primers*

---

***VEGF 2578 Sense:*** 5' - AGG ATG GGG CTG ACT AGG TAA GC -3'

***VEGF 2578 Anti-sense:*** 5' - TCG GGG GAA AAG GAG GTT G -3'

---

Cada reação foi realizada em volume final de 50 μL, contendo 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 10mM de Tris-HCl; glicerol a 10%; 10 pmoles/μL de cada *primer*; 1U de *Taq* DNA polimerase; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; e 200 ng de DNA genômico. A reação de amplificação foi obtida com desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos que compreenderam etapas de 95°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, de 62 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para extensão das cadeias. Um último ciclo de 10 minutos

a 72°C foi realizado para extensão final das cadeias. O produto da amplificação foi submetido ao método de análise de SSCP que permite a visualização do padrão de migração alterado da molécula, quando submetida a um campo elétrico em gel de poliacrilamida após sua desnaturação. A desnaturação foi realizada com 6 µl do produto de amplificação a 95°C durante 5 minutos em 6 µl da solução de corante para eletroforese (80% v/v de formamida; 10mM de NaOH; 1 mM de EDTA, pH 8,0; 0,1% m/v de azul de bromofenol; e 1% de xilenocianol). O produto de desnaturação foi, então, aplicado em gel de poliacrilamida 9,6% e submetido à diferença de potencial elétrico de 200V durante 4 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata.

#### ✓ Polimorfismo *VEGF C936T*

A região onde está localizado o polimorfismo C936T do gene *VEGF* foi amplificada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), segundo Wolf *et al.*, (2004),<sup>(94)</sup> com o seguinte conjunto de *primers*:

Seqüência dos <i>primers</i>	Fragmento amplificado
<b><i>VEGF 936 Sense</i></b> : 5'-AAG GAA GAG GAG ACT CTG CGC -3'	198 pb
<b><i>VEGF 936 Anti-sense</i></b> : 5'-TAT GTG GGT GGG TGT GTC TAC AGG -3'	

pb – pares de base

A amplificação do DNA genômico (100 ng) foi realizada em um volume final de 25µL em uma reação contendo 10mM de Tris-HCl; 1,5 mM de cloreto de MgCl<sub>2</sub>;

0,2mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo; 0,5 pmol/ $\mu$ L de cada *primer* e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. Trinta ciclos (95°C por 60s, 59°C por 60s e 72°C por 60s) foram realizados para amplificar um fragmento de 198 pb (pares de base). Um último ciclo de 10 minutos a 72°C foi realizado para extensão final das cadeias. O produto da amplificação foi submetido à análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com a utilização da enzima de restrição *Nla* III. Os fragmentos resultantes da digestão foram analisados em gel de agarose 2,5% e submetidos à diferença de potencial de 90V, por 1 hora e 30 minutos. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e analisado sob luz ultravioleta (UV).

#### ✓ Polimorfismo *VEGF* G-1154A

A investigação do polimorfismo *VEGF* G-1154A foi realizada pela técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real, com a utilização do SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). *Primers* e sondas *TaqMan* foram desenhados pelo fabricante (Assay ID - C\_1647379-10). Duas sondas distintas foram utilizadas para caracterizar cada alelo. Os “*dye reporters*” ligados às sondas para a emissão de fluorescência utilizados foram FAM e VIC, para os alelos G e A, respectivamente. Após otimização do protocolo recomendado pelo fabricante, reações de 5  $\mu$ L contendo 5ng de DNA, 0,9 $\mu$ M dos *primers* e 0,2 $\mu$ M das sondas (concentração final) foram realizadas em placas de 96 *wells*, no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems). O software SDS versão 2.0 foi utilizado para analisar a fluorescência emitida em tempo real e ao final da reação de PCR (leitura *endpoint*).

### 2.2.5.b. Metilenotetrahydrofolato redutase

#### ✓ Polimorfismo *MTHFR* C677T

Para o polimorfismo *MTHFR* C677T, foram analisados no presente estudo 20 pacientes. Duzentas e sessenta e três amostras foram investigadas em projeto anterior,<sup>(93)</sup> totalizando, portanto, a análise em 283 pacientes.

A amplificação dos alelos para o polimorfismo *MTHFR* C677T foi realizada por PCR<sup>(52)</sup> com os *primers* a seguir:

Seqüência dos <i>primers</i>	Fragmento amplificado
<b><i>MTHFR</i> 677 Sense:</b> 5' - TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA -3'	198 pb
<b><i>MTHFR</i> 677 Anti-sense:</b> 5' - AGG CGG TGC GGT GAG AGT G -3'	

pb – pares de base

O DNA genômico (200ng) foi amplificado em uma reação de 50µL contendo 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo; 10mM de Tris-HCl; glicerol a 10%; 10 pmoles/µL de cada *primer*; 1U de *Taq* polimerase; e 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi obtida por PCR com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida de 35 ciclos que corresponderam etapas de 94°C por 1 minuto para desnaturação do DNA, 58°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para extensão das cadeias. Um último ciclo a 72°C por 5 minutos foi realizado para extensão final das cadeias. O produto da amplificação foi submetido a PCR-RFLP com a utilização da enzima de restrição *Hinf* I para reconhecimento da substituição da base nitrogenada citosina pela base timina no segmento polimórfico do gene (C677T). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 9,6% e submetido à diferença de



potencial de 200V por 4 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata.

#### ✓ Polimorfismo *MTHFR* A1298C

O DNA genômico foi amplificado pela técnica de PCR alelo-específico segundo Ranjith *et al.*, (2003),<sup>(95)</sup> com modificações. Os alelos foram amplificados separadamente com *primers* específicos. Foi utilizado também um par de *primers* para amplificação de segmento do gene *MTHFR* para controle positivo de amplificação. O conjunto de *primers* utilizado está descrito a seguir:

Seqüência dos <i>primers</i>	Fragmento amplificado
<i>MTHFR</i> 1298A Sense: 5' - GGA GCT GAC CAG TGA AGA -3'	77 pb
<i>MTHFR</i> 1298A Anti-sense: 5' - TGT GAC CAT TCC GGT TTG -3'	
<i>MTHFR</i> 1298C Anti-sense: 5' - CTT TGG GGA GCT GAA GGA -3'	120 pb
<i>MTHFR</i> 1298C Anti-sense: 5' - AAG ACT TCA AAG ACA CTT G -3'	
<i>MTHFR</i> 677* Anti-sense: 5' - TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA -3'	198 pb
<i>MTHFR</i> 677* Anti-sense: 5' - AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG -3'	

\* controle positivo de amplificação gênica / pb – pares de base

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 $\mu$ L, contendo 10mM de tampão Tris-HCL; 0,2mM de cada desoxinucleotídeo; 0,1 pmol/ $\mu$ L dos *primers* controles; 0,4 pmol/ $\mu$ L de cada *primer* alelo-específico; 1,5U de *Taq* DNA polimerase; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; e 100ng de DNA genômico. A amplificação foi

realizada com desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 50 segundos a 72°C. O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, submetido à diferença de potencial de 200V por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata.

### 2.2.5.c. Metionina Sintase

#### ✓ Polimorfismo *MTR A2756G*

Para análise molecular do gene *MTR*, foi realizada a técnica de PCR-RFLP de um segmento contendo o polimorfismo e o sítio constitutivo para a enzima *Hae III*. As seqüências dos *primers* desenhadas no programa *Primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) para amplificação do fragmento de 498 pb do gene *MTR* estão descritas a seguir:

Seqüência dos <i>primers</i>	Fragmento amplificado
<b>MTR 2756 Sense:</b> 5' - CCA GGG TGC CAG GTA TAC AG -3'	498 pb
<b>MTR 2756 Anti-sense:</b> 5' - GCC TTT TAC ACT CCT CAA AAC C -3'	

pb – pares de base

O DNA genômico (200ng) foi amplificado em uma reação de 25µL contendo 10mM de Tris-HCl; 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo; 0,2 pmol/µL de cada *primer*; 1U de *Taq* polimerase; e 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi obtida com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida de 30 ciclos que corresponderam etapas de 94°C por 1 minuto , 58°C por 1 e 72°C por 1 minuto. Um último ciclo a 72°C por 10 minutos

foi realizado para extensão final das cadeias. Após amplificação, os fragmentos foram submetidos à digestão com a enzima *Hae* III e analisados sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio.

### 2.2.6. Dosagem de Homocisteína

A quantificação da Hcy foi possível para 256 indivíduos. O plasma foi obtido a partir das amostras de sangue periférico colhidas após 12 horas de jejum. A separação do plasma foi realizada imediatamente por centrifugação (10 minutos, 3.000 rpm a 18°C). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da quantificação. A dosagem de Hcy foi realizada pela técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS) em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, responsável pelo Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa do Instituto de Química da Universidade de Campinas – UNICAMP. O método de detecção e quantificação de Hcy plasmática envolveu a desproteínação do plasma e quebra das ligações S-S com DL - dihiotreitól (DTT) e separação cromatográfica por HPLC dos aminoácidos livres utilizando gradiente de solventes. A detecção seletiva foi feita, então, por ionização via electrospray (ESI) seguida de monitoramento por técnica de MIMS via dissociação induzida por colisão (CID) das moléculas protonadas. A quantificação utiliza o método de padrão interno, com o uso de Hcy deuterada. Os valores de referência do nível de Hcy plasmática são aqueles determinados pelo Laboratório Thomson da UNICAMP e os de referências internacionais.<sup>(96,97)</sup> Níveis de Hcy >15µmol/L foram considerados para caracterizar hiper-homocisteinemia.<sup>(98)</sup>

### 2.2.7. Dosagem de Ácido Metilmalônico

A dosagem do MMA foi realizada em 236 amostras de plasma, previamente separadas, pela técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS) em um espectrômetro de massas em tandem Quattro Micro (Waters/Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma sonda de ionização química a pressão atmosférica em modo negativo, um amostrador HP 1050 (Agilent, Palo Alto, EUA) e um sistema de HPLC Shimadzu com duas bombas LC-10Atpv (Shimadzu, Kyoto, Japão). O estudo foi realizado em colaboração com o Dr. Valdemir Melechco Carvalho do Centro de Medicina Diagnóstica Fleury - São Paulo. A aquisição dos dados e o controle de todos os componentes do sistema foram feitos pelo programa MassLynx 4.0 (Waters/Micromass, Manchester, Reino Unido).

Aliquotas de 50  $\mu\text{L}$  de amostra, padrões de calibração e controles foram transferidas para microtubos de 1,5 mL. A seguir foi feita a adição de 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno (MMA- $d_3$  100  $\mu\text{mol/L}$ ), 50  $\mu\text{L}$  do tampão TBA-HS/TEA e 400  $\mu\text{L}$  da solução de derivatizante pentafluorobenzil-brometo (PFB-Br a 0,1 M/L em diclorometano) em cada tubo. Os tubos foram incubados em Thermomixer a 85°C e 1400 rpm por uma hora em capela com exaustão. Em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm; a fase inferior dos tubos foi transferida para vials cromatográficos e 50  $\mu\text{L}$  de dimetil-sulfóxido (DMSO) foram adicionados. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Synergi-MaxRP 4 $\mu$  50 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) eluída com uma fase móvel composta de acetonitrila a 70% a um fluxo de 0,4 mL/min. A aquisição foi feita através de ionização química a pressão atmosférica no modo negativo. O modo de aquisição foi o de monitoramento de reações múltiplas utilizando

as transições de massas 477>231 e 477>279 para a detecção do derivado pentafluorobenzil (PFB) do MMA e 480>234 e 480>281 para a detecção do derivado do padrão interno (MMA-*d*<sub>3</sub>). As análises quantitativas foram realizadas com o programa QuanLynx 4.0.

Níveis de MMA acima de 0,5µmol/L foram utilizados para caracterizar deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. Esse valor foi determinado pelo Instituto de Medicina Diagnóstica Fleury, por meio da análise de 129 amostras de indivíduos normais e foi calculado a partir do intervalo central (95%) por análise não paramétrica apontada pelo NCCLS C28-A (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

#### **2.2.8. Dosagem de Folato**

A quantificação de folato foi realizada a partir do plasma, por meio do kit Immulite (DPC Medlab), em colaboração com Prof. Dr. Hélio Vannucchi, responsável pelo Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo - USP. Essa metodologia foi possível para 226 pacientes. O Immulite é um método de Imunoensaio competitivo com sistema de detecção antiligante. A fase sólida, uma esfera de poliestireno inserida numa Unidade de Teste, é revestida com um anticorpo monoclonal específico para a proteína ligante de folato. Amostra do paciente, análogo de folato marcado com ligante e proteína de ligação foram introduzidas na Unidade de Teste e incubados por aproximadamente 30 minutos a 37°C com agitação intermitente. Durante esse tempo, o folato da amostra compete com o análogo por uma quantidade limitada de proteína ligante. A proteína ligante de folato é capturada pelo anticorpo da esfera de poliestileno. O análogo não ligado é, então, removido por lavagem em centrifugação.

O tipo de amostra recomendada para a quantificação por esse método inclui sangue total, soro e plasma colhido com heparina. Em nosso estudo, somente amostras de plasma com EDTA foram colhidas para dosagens bioquímicas, que seriam realizadas por cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS) em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin do Instituto de Química – UNICAMP. Dessa forma, a quantificação realizada com o kit Immulite a partir de plasma com EDTA, utilizou como valores de referência os resultados obtidos no grupo controle.

### 2.2.9. Hábito Alimentar

A análise do hábito alimentar foi realizada em 248 pacientes, por meio de questionário validado cientificamente (Anexo III).<sup>(99)</sup> Os dados obtidos dos questionários foram analisados com o auxílio do programa DIETSYS (programa criado pelo Instituto Nacional do Hospital do Câncer, USA), em colaboração com o Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública -USP-SP. Os resultados de ingestão foram comparados com as recomendações do *Institute of Medicine and Food and Nutrition Board- US National Academy of Sciences*,<sup>(100)</sup> que determinou como valores mínimos de consumo os valores da Estimativa de Requerimento Médio (*Estimated Average Requirement – EAR*) de acordo com a faixa etária e o sexo. Considerou-se ingestão insuficiente para folato, valores que não atingiram a EAR de 320µg/dia para ambos os sexos na faixa etária de 19 a >70 anos; para vitamina B<sub>6</sub>, 1,1mg/dia para ambos os sexos na faixa etária de 19 a 50 anos, 1,3 mg/dia para mulheres com mais de 50 anos e 1,4mg/dia para homens acima de 50 anos; para vitamina B<sub>12</sub>, 2,0µg/dia para ambos os sexos na faixa etária de 19 a >70 anos.

### 2.2.10. Análise Estatística

Dados foram apresentados como média  $\pm$  DP, números ou proporções. Comparação entre os grupos para os fatores de risco, hiper-homocisteinemia, deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e de ingestão, distribuições alélicas e genotípicas foi realizada utilizando o Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi confirmado pelo Teste Qui-quadrado.

Comparação entre genótipos e número de artérias obstruídas e grau de obstrução arterial foi realizada por meio da Análise de Dependência. Concentrações plasmáticas de Hcy, folato e ácido metilmalônico entre os grupos foram avaliadas por Teste T ou Mann-Whitney. A análise das concentrações de Hcy, assim como dos níveis de folato, em relação aos polimorfismos foi realizada na métrica logarítmica por Análise de Variância (ANOVA). A relação entre concentrações de MMA e os polimorfismos foi analisada por Mood Median Test.

Os níveis de ingestão foram comparados entre os grupos por Teste T ou Mann-Whitney e avaliados em relação às concentrações plasmáticas de Hcy, folato e MMA por Correlação de Spearman.

A relação independente dos polimorfismos e fatores de risco na presença da DAC foi testada por análise de regressão logística múltipla. Valor de  $P \leq 0,05$  foi utilizado para estabelecer significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Minitab for Windows (Release 12.22).

## ***RESULTADOS***

---



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Fatores de risco

Foram caracterizados 283 indivíduos considerando-se os fatores de risco para DAC (Tabela 1). Os resultados significativamente diferentes entre os grupos com e sem DAC estão de acordo com fatores de risco estabelecidos. Destacaram-se nos pacientes com DAC hipertensão arterial (78%) e diabetes (28%), em relação aos controles (64%;  $P=0,021$  e 13%;  $P=0,029$ , respectivamente).

O tabagismo foi observado em 68% dos pacientes e 51% dos controles ( $P=0,006$ ). Sedentarismo e etilismo não diferiram entre indivíduos com DAC (44% e 31%, respectivamente) e controles (51%;  $P=0,272$  e 25%;  $P=0,34$ , respectivamente).

Perfil lipídico incluindo  $CT>200\text{mg/dL}$  foi detectado em 42% dos pacientes,  $LDL_C>130\text{mg/dL}$  em 39% e  $VLDL>30\text{mg/dL}$  em 40%, não diferindo dos controles. Entretanto, níveis de  $HDL_C<40\text{mg/dL}$  foram significativamente mais frequentes nos pacientes (53%) comparado aos controles (31%;  $P = 0,0003$ ).

Os valores médios para o perfil lipídico não foram diferentes entre os grupos, com exceção do  $HDL_C$ , cujos valores médios apresentaram-se significativamente reduzidos nos pacientes ( $38,9\pm 10,4\text{mg/dL}$ ) em relação aos controles ( $42,3\pm 13,7\text{mg/dL}$ ,  $P=0,0008$ ) (Tabela 2).

**Tabela 1.** Características da população estudada.

	<b>DAC</b> (n = 175)	<b>Controles</b> (n = 108)	Valor de P
Idade (anos)	60,7±12,1	57,8±12,3	0,058
Sexo			0,104
Sexo masculino	112(64)	58(54)	
Sexo feminino	63(36)	50(46)	
Hipertensão arterial	136(78)	69(64)	<b>0,014*</b>
Diabetes	49(28)	14(13)	<b>0,003*</b>
Sedentarismo	77(44)	55(51)	0,272
Tabagismo	119(68)	55(51)	<b>0,006*</b>
Etilismo	54(31)	27(25)	0,344
Colesterol total (>200mg/dL)	74(42)	42(39)	0,619
HDL <sub>c</sub> (<40 mg/dL)	92(53)	33(31)	<b>0,0003*</b>
LDL <sub>c</sub> (>130 mg/dL)	69(39)	36(33)	0,314
VLDL <sub>c</sub> (> 30 mg/dL)	70(40)	36(33)	0,312
Triglicérides (>150 mg/dL)	77(44)	45(42)	0,713

Valores estão apresentados como média ± DP ou número (%)

\*P ≤0.05

DAC – Doença arterial coronária

HDL<sub>c</sub>- lipoproteína de alta densidade

LDL<sub>c</sub>- lipoproteína de baixa densidade

VLDL<sub>c</sub>- lipoproteína de densidade muito baixa

**Tabela 2.** Perfil lipídico de pacientes com DAC e controles.

Perfil Lipídico (mg/dL)	DAC (n = 175)		Controle (n = 108)		Valor de p
	Média	DP	Média	DP	
<b>CT</b>	198,5	54,7	191,4	49,4	0,708
<b>HDL<sub>c</sub></b>	38,9	10,4	42,3	13,7	<b>0,0008*</b>
<b>LDL<sub>c</sub></b>	128,2	47,8	120,2	36,7	0,393
<b>VLDL<sub>c</sub></b>	30,7	15,1	30,1	14,5	0,835
<b>TG</b>	160,8	88,3	157,6	90,8	0,542

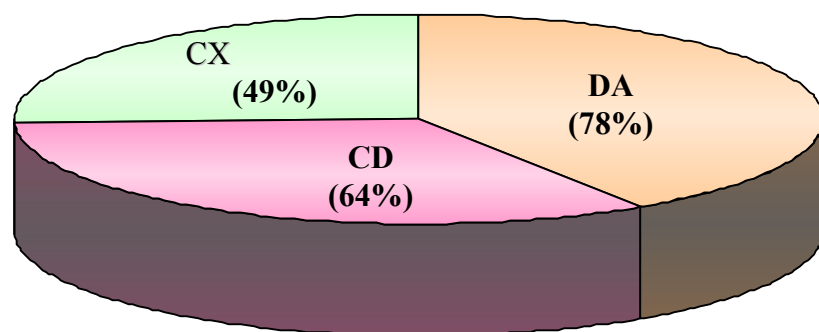
\*P ≤0.05

DAC – Doença arterial coronária

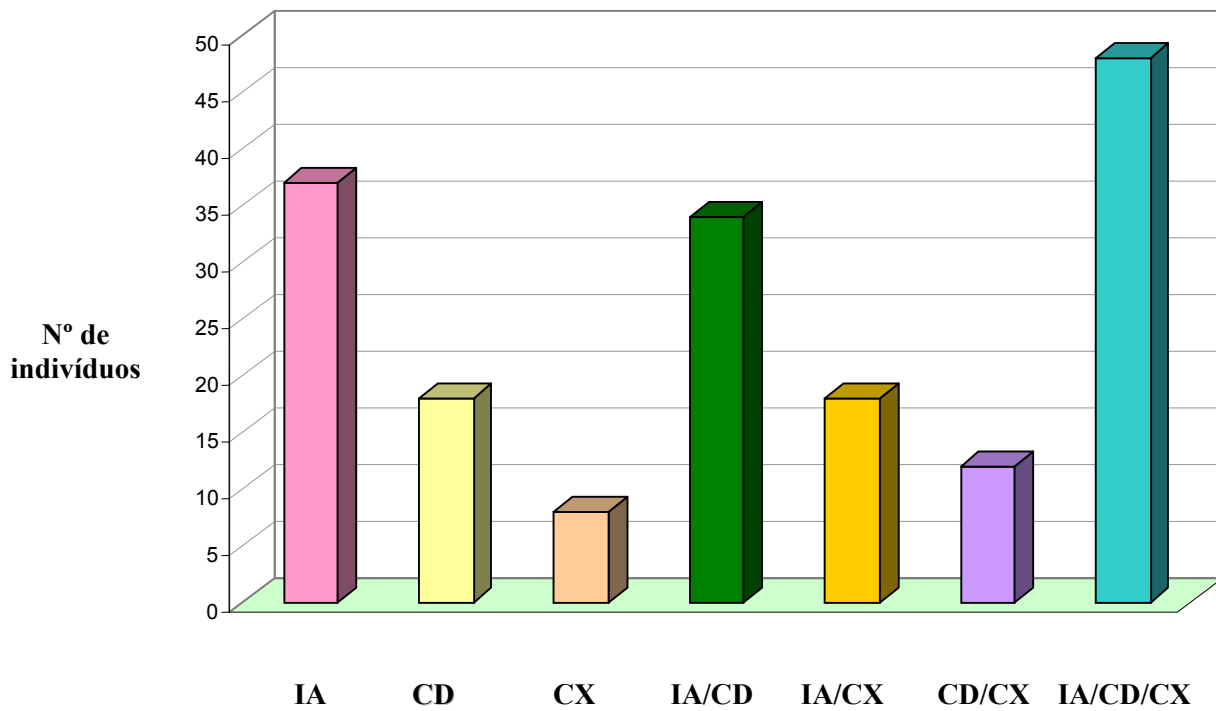
HDL<sub>c</sub>- lipoproteína de alta densidadeLDL<sub>c</sub>- lipoproteína de baixa densidadeVLDL<sub>c</sub>- lipoproteína de densidade muito baixa

### 3.2. Aspectos fenotípicos das lesões ateroscleróticas

O exame cineangiocoronariográfico dos indivíduos que apresentaram lesões ateroscleróticas mostrou maior comprometimento da artéria interventricular anterior (IA) (78%), seguida da coronária direita (CD) (64%) e artéria circunflexa (CX) (49%) (Figura 2). Em relação ao número de artérias comprometidas, 21% dos indivíduos apresentaram lesão na IA, 10% na CD; 5% na CX; 19% nas artérias IA/CD; 10% nas artérias IA/CX; 7% nas artérias CD/CX e 27% nas três artérias coronárias (IA/CD/CX) (Figura 3). Nos exames cineangiocoronariográficos foram observadas lesões ateroscleróticas comprometendo menos que 50% do lúmen arterial até obstrução total da artéria coronária (>95%).



**Figura 2.** Porcentagem de comprometimento das artérias interventricular anterior (IA), coronária direita (CD) e artéria circunflexa (CX) analisadas pela cineangiocoronariografia nos pacientes com DAC.

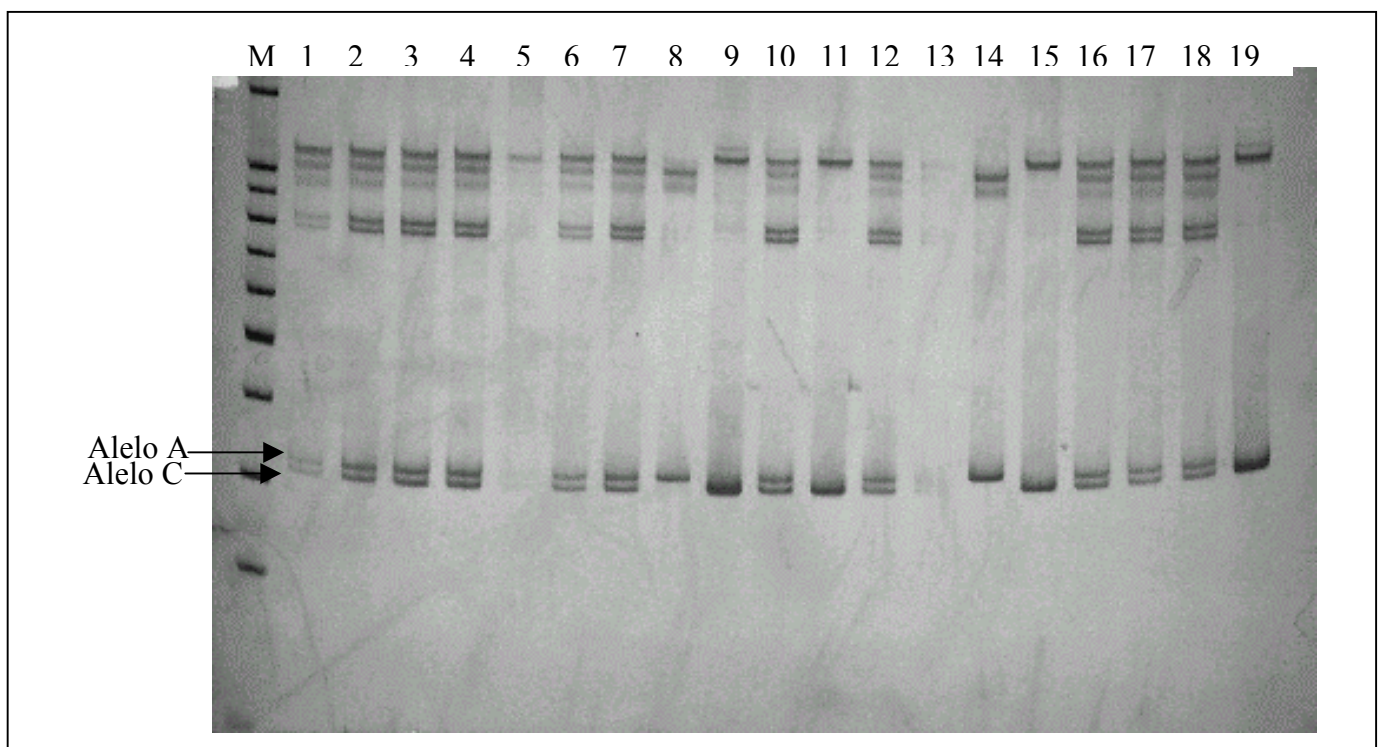


**Figura 3.** Número de indivíduos em relação às artérias envolvidas. IA – artéria interventricular anterior. CD – coronária direita; CX – artéria circunflexa.

### 3.3. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

#### 3.3.1. Análise do polimorfismo *VEGF C-2578A*

Após a padronização e a otimização da técnica de PCR, realizou-se a análise pelo método de SSCP em gel de poliacrilamida obtendo-se as bandas correspondentes aos alelos C e A (Figura 4).



**Figura 4.** Gel de poliacrilamida 9,6% para análise dos fragmentos obtidos pela técnica de polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP) de 19 amostras para o polimorfismo *VEGF C-2578A*. As amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 16, 17 e 18 apresentaram o genótipo heterocigoto CA; as amostras 8 e 14, genótipo homocigoto CC; e as amostras 9, 11, 15 e 19, genótipo AA. A coluna M correspondente ao marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pares de base (Amersham Biosciences).

As distribuições alélicas e genóticas para o polimorfismo *VEGF* C-2578A estão apresentadas na Tabela 3. Não foram observadas diferenças nas frequências alélicas ( $P=0,544$ ) e genóticas ( $P=0,331$ ) entre os grupos. O alelo C foi mais prevalente no grupo com DAC (0,54) e controles (0,51), assim como o genótipo *VEGF* -2578CA (55% nos pacientes e 47% nos controles). O cálculo para o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) mostrou que a distribuição genotípica foi semelhante à esperada em ambos os grupos DAC e controle ( $\chi^2_1=1,94$ ;  $P=0,167$  e  $\chi^2_1=0,32$ ,  $P=0,569$ , respectivamente)

Houve diferença na distribuição genotípica em relação ao número de artérias obstruídas ( $P=0,008$ ) (Tabela 4). O genótipo homocigoto alterado *VEGF* -2578AA foi observado em maior frequência em pacientes com três artérias lesadas. Não foi observada associação entre o polimorfismo *VEGF* C-2578A e o grau de obstrução arterial ( $P=0,106$ ) (Tabela 5).



**Tabela 3.** Distribuição das freqüências alélicas e genóticas do polimorfismo *VEGF* C-2578A.

Alelo	DAC		Controle		Valor de P
	N.º	Freqüência Absoluta	N.º	Freqüência Absoluta	
C	190	0,54	111	0,51	0,544
A	160	0,46	105	0,49	
Total	350	1	216	1	
Genótipo	N.º	%	N.º	%	Valor de P
CC	47	27	30	28	0,331
CA	96	55	51	47	
AA	32	18	27	25	
<b>Total</b>	175	100	108	100	

**Tabela 4.** Distribuição genotípica do polimorfismo *VEGF* C-2578A em relação ao número de artérias lesadas.

<b>DAC (n=175)</b>				
<b><i>VEGF</i> C-2578A</b>	<b>Uma artéria</b>	<b>Duas artérias</b>	<b>Três artérias</b>	<b>Valor de P</b>
<b>CC, n(%)</b>	20 (32)	20 (31)	7 (15)	
<b>CA, n(%)</b>	38 (60)	32 (50)	26 (54)	0,008
<b>AA, n(%)</b>	5 (8)	12 (19)	15 (31)*	

\*Frequência maior do genótipo *VEGF* -2578AA em indivíduos com três artérias lesadas.

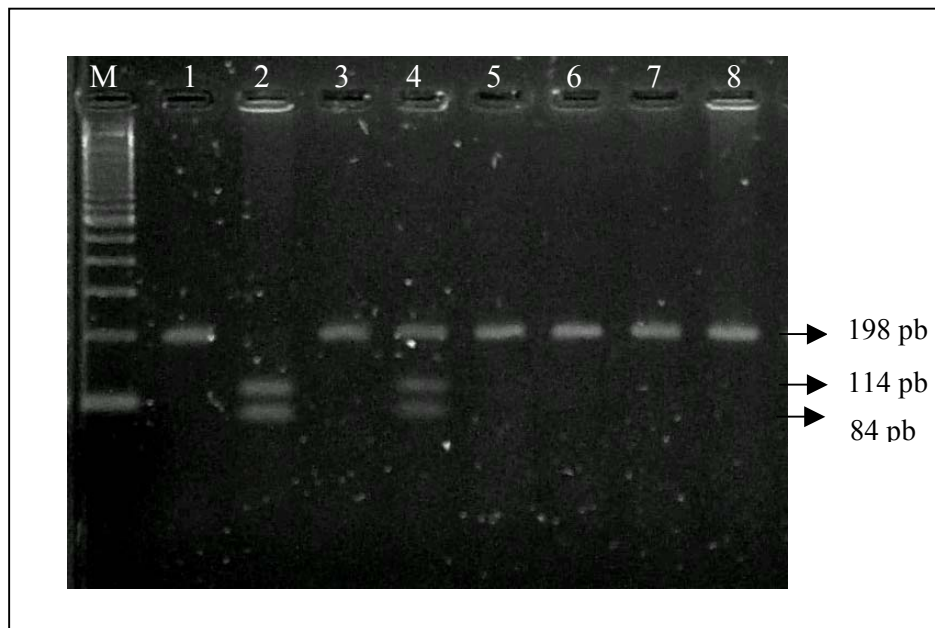
**Tabela 5.** Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo *VEGF* C-2578A.

<b>DAC (n=175)</b>					
<b><i>VEGF</i> C-2578A</b>	<b>&lt;50%</b>	<b>&gt;50-75%</b>	<b>&gt;75-95%</b>	<b>&gt;95%</b>	<b>Valor de P</b>
<b>CC, n(%)</b>	5 (29)	11 (31)	19 (23)	12 (30)	
<b>CA, n(%)</b>	10 (59)	22 (61)	49 (60)	15 (37)	0,106
<b>AA, n(%)</b>	2 (12)	3 (8)	14 (17)	13 (33)	

### 3.3.2. Análise do polimorfismo *VEGF* C936T

Testes foram realizados para a otimização da reação de amplificação para o polimorfismo *VEGF* C936T, que incluíram variações nas concentrações dos reagentes e de DNA, além de adição ou não de glicerol e DMSO.

Após a digestão enzimática, o fragmento de 198 pb produzido pela amplificação do alelo *VEGF* 936C não foi digerido pela enzima de restrição *Nla* III. Para o alelo *VEGF* 936T foram produzidos fragmentos de 114 pb e 84 pb. A Figura 5 apresenta o resultado da digestão da enzima *Nla* III para a genotipagem do polimorfismo *VEGF* C936T.



**Figura 5.** Gel de agarose 2,5% do resultado da digestão com a enzima *Nla* III do produto de PCR para o polimorfismo *VEGF* C936T. As amostras 1, 3, 5, 6, 7 e 8 são homozigotas para o alelo normal C. A amostra 4 é heterozigota. A amostra 2 é homozigota para o alelo alterado T. A coluna M correspondente ao marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pares de base (Amersham Biosciences).

As distribuições alélicas e genóticas estão apresentadas na Tabela 6. Não houve diferença nas distribuições alélicas ( $P=0,704$ ) e genóticas ( $P=0,737$ ) entre os grupos com DAC e controle. O alelo C foi mais prevalente no grupo com DAC (0,86) e controles (0,87), assim como o genótipo *VEGF* 936CC (76% nos pacientes e 77% nos controles). A distribuição genotípica observada neste estudo foi semelhante à esperada em ambos os grupos DAC e controles ( $\chi^2_1=2,99$ ;  $P=0,084$  e  $\chi^2_1=0,07$ ,  $P=0,783$ , respectivamente), confirmando o HWE.

Embora observada diferença na distribuição genotípica dos indivíduos em relação ao número de artérias lesadas ( $P=0,032$ ) (Tabela 7), não foi estabelecida associação desse evento com o polimorfismo *VEGF* C936T, uma vez que o alelo polimórfico *VEGF* 936T foi freqüente nos indivíduos com uma artéria obstruída, bem como naqueles com três artérias. Também não foi observada associação entre o polimorfismo *VEGF* C936T e o grau de obstrução das artérias coronárias ( $P= 0,745$ ) (Tabela 8).

**Tabela 6.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *VEGF* C936T.

Alelo	DAC		Controle		Valor de P
	N.º	Frequência Absoluta	N.º	Frequência Absoluta	
C	302	0,86	189	0,87	0,704
T	48	0,14	27	0,13	
Total	350	1	216	1	
Genótipo	N.º	%	N.º	%	Valor de P
CC	133	76	83	77	0,737
CT	36	21	23	21	
TT	6	3	2	2	
<b>Total</b>	175	100	108	100	

**Tabela 7.** Distribuição genotípica do polimorfismo *VEGF* C936T em relação ao número de artérias envolvidas.

DAC (n=175)				
<i>VEGF</i> C936T	Uma artéria	Duas artérias	Três artérias	Valor de P
CC, n(%)	43 (68)	55 (86)	35 (73)	
CT, n(%)	19 (30)	6 (9)	11 (23)	0,032
TT, n(%)	1 (2)	3 (5)	2 (4)	

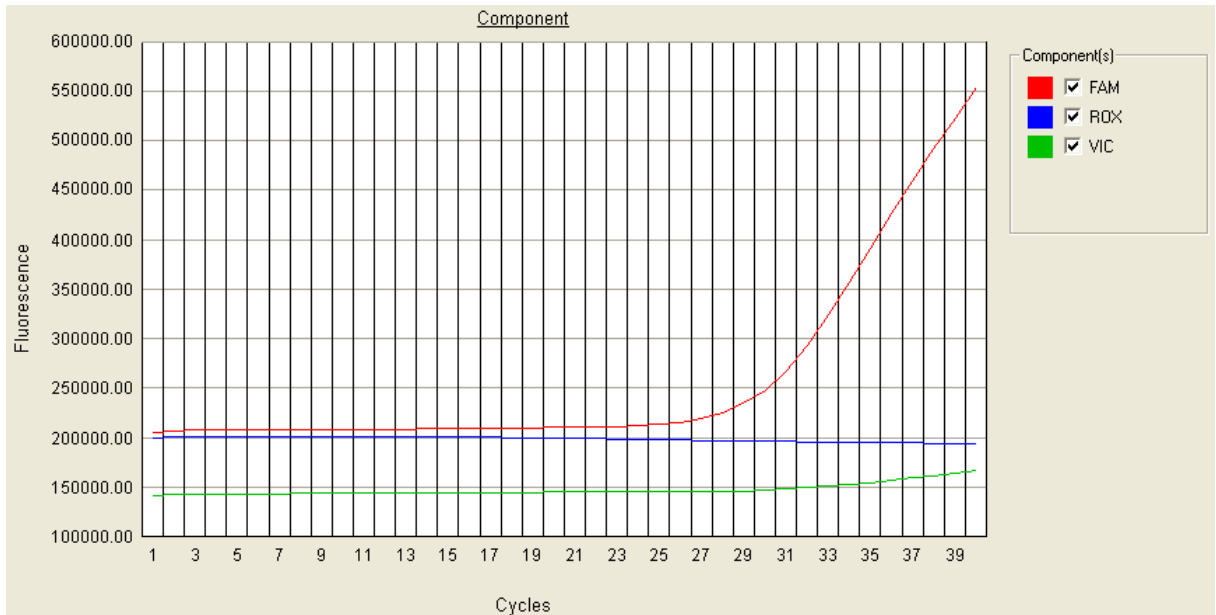
**Tabela 8.** Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo *VEGF* C936T.

DAC (n=175)					
<i>VEGF</i> C936T	<50%	>50-75%	>75-95%	>95%	Valor de P
CC, n(%)	13 (76)	29 (81)	63 (77)	28 (70)	
CT, n(%)	4 (24)	5 (14)	16 (19)	11 (28)	0,745
TT, n(%)	0 (0)	2 (5)	3 (4)	1 (2)	

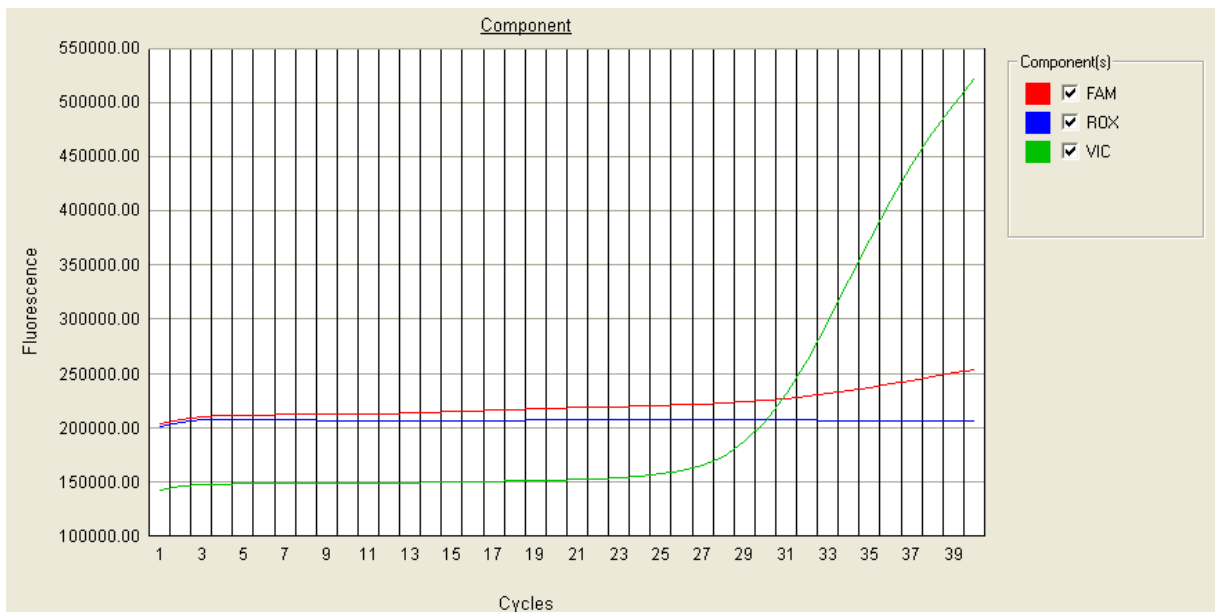
### 3.3.3. Análise do polimorfismo *VEGF* G-1154A

Após otimização do protocolo recomendado pelo fabricante foram utilizados 5ng de DNA, 0,9 $\mu$ M dos *primers*, 0,2 $\mu$ M das sondas e Mix de reagentes para PCR (1X) em reações de 5  $\mu$ L. As Figuras 6 a 9 apresentam o resultado da discriminação alélica para o polimorfismo *VEGF* A-1154G. Apenas a sonda específica para determinado alelo é capaz de se ligar a ele, então, somente a fluorescência emitida por ela foi detectada, sendo assim possível a determinação do genótipo. Para o genótipo heterozigoto *VEGF* -1154GG foi observada somente a emissão do fluoróforo FAM (Figura 6), enquanto que para o homozigoto *VEGF* -1154AA, apenas a emissão de VIC foi visualizada (Figura 7). Amostras heterozigotas apresentaram emissão de ambas fluorescências (Figura 8). Ao final da reação foi realizada a análise *endpoint* das fluorescências emitidas (Figura 9).

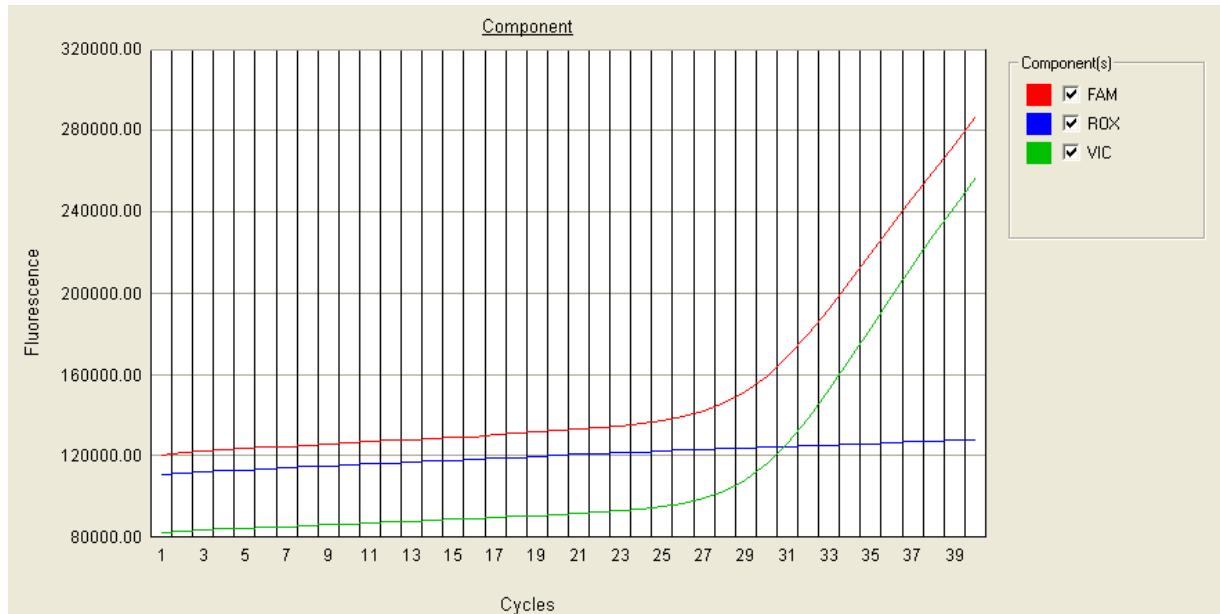




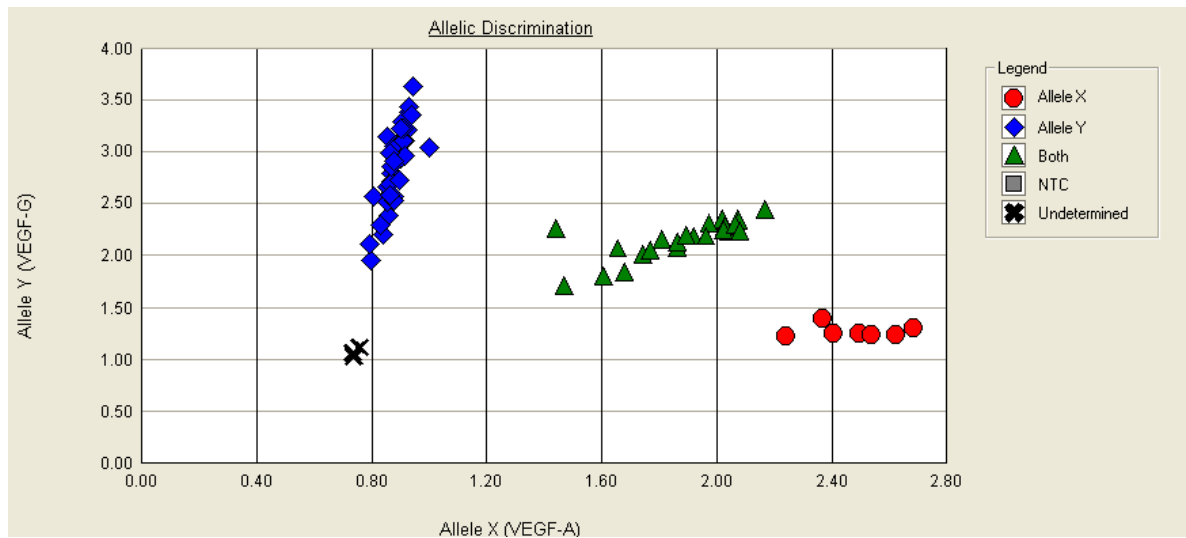
**Figura 6.** Resultado da genotipagem de uma amostra homocigota para o alelo G. A curva vermelha representa a amplificação de sinal do fluoróforo FAM, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando um homocigoto GG.



**Figura 7.** Resultado da genotipagem de uma amostra homocigota para o alelo A. A curva verde representa a amplificação de sinal do fluoróforo VIC, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando um homocigoto AA.



**Figura 8.** Resultado da genotipagem de uma amostra heterozigota GA. As curvas vermelha e verde representam a amplificação de sinal de ambos os fluoróforos FAM e VIC, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando um heterozigoto.



**Figura 9.** Análise *endpoint* de todos os indivíduos genotipados. Pontos vermelhos representam homozigotos para o alelo G, verdes representam heterozigotos e azuis homozigotos para o alelo A. Os pontos pretos discriminam amostras indeterminadas, das quais foram obtidos resultados após repetição.

As distribuições alélicas e genóticas para o polimorfismo *VEGF* G-1154 estão apresentadas na Tabela 9. As frequências alélicas ( $P=0,056$ ) e genóticas ( $P=0,886$ ) não diferiram entre pacientes com DAC e controle. O alelo *VEGF*-1154G foi mais prevalente no grupo com DAC (0,62) e controles (0,70), assim como o genótipo *VEGF*-1154GA nos pacientes com DAC (55%) e o genótipo *VEGF*-1154GG nos controles (53%). O teste do HWE mostrou que a distribuição genotípica foi semelhante à esperada em ambos os grupos DAC e controle ( $\chi^2_1=2,96$ ;  $P=0,085$  e  $\chi^2_1=2,64$ ,  $P=0,104$ , respectivamente)

Não foi observada associação entre o polimorfismo *VEGF* G-1154A e número de artérias lesadas ( $P=0,287$ ) ou grau de obstrução arterial ( $P=0,556$ ) (Tabelas 10 e 11).

**Tabela 9.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *VEGF* G-1154A.

Alelo	DAC		Controle		Valor de P
	N.º	Frequência Absoluta	N.º	Frequência Absoluta	
G	218	0,62	152	0,70	0,056
A	132	0,38	64	0,30	
Total	350	1	216	1	
Genótipo	N.º	%	N.º	%	Valor de P
GG	96	55	57	53	0,886
GA	61	35	38	35	
AA	18	10	13	12	
<b>Total</b>	175	100	108	100	

**Tabela 10.** Distribuição genotípica do polimorfismo *VEGF* G-1154A em relação ao número de artérias envolvidas.

<b>DAC (n=175)</b>				
<b>VEGF G-1154A</b>	<b>Uma artéria</b>	<b>Duas artérias</b>	<b>Três artérias</b>	<b>Valor de P</b>
<b>GG, n(%)</b>	33 (52)	35 (55)	28 (58)	
<b>GA, n(%)</b>	27 (43)	20 (31)	14 (29)	0,287
<b>AA, n(%)</b>	3 (5)	9 (14)	6 (13)	

**Tabela 11.** Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo *VEGF* G-1154A.

<b>DAC (n=175)</b>					
<b>VEGF G-1154A</b>	<b>&lt;50%</b>	<b>&gt;50-75%</b>	<b>&gt;75-95%</b>	<b>&gt;95%</b>	<b>Valor de P</b>
<b>GG, n(%)</b>	11 (65)	19 (53)	45 (55)	21 (52)	
<b>GA, n(%)</b>	4 (23)	15 (42)	30 (37)	12 (30)	0,556
<b>AA, n(%)</b>	2 (12)	2 (5)	7 (8)	7 (18)	

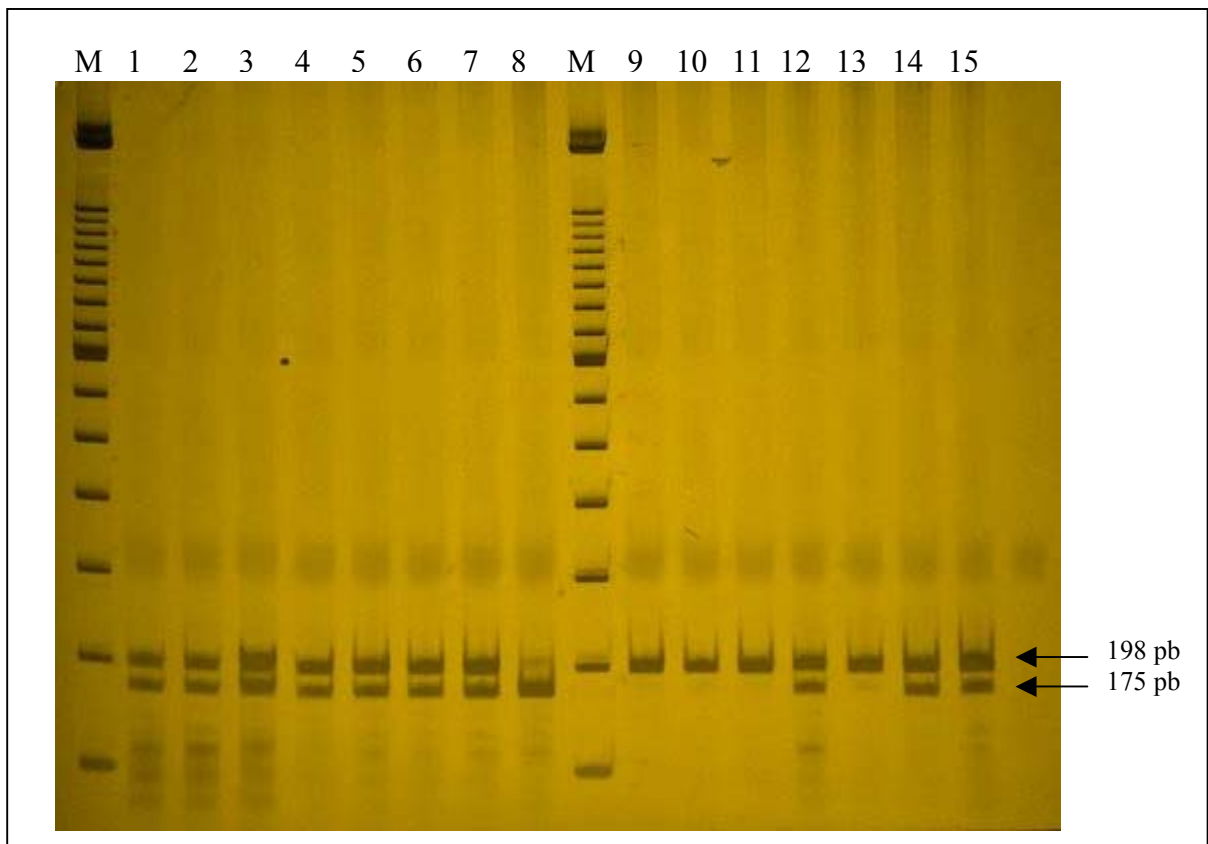
### 3.3.4. Análise dos genótipos *VEGF* combinados

As frequências dos genótipos combinados em relação aos polimorfismos *VEGF* C-2578A, *VEGF* C936T e *VEGF* G-1154A não diferiram entre pacientes e controles (P=1). Não foi observada associação dos genótipos combinados e número de artérias (P= 0,056) ou grau de obstrução arterial coronária (P=0,697).

## 3.4. Metilenotetrahidrofolato redutase

### 3.4.1. Análise do polimorfismo *MTHFR* C677T

O polimorfismo *MTHFR* C677T corresponde à conversão de alanina por valina na proteína resultante. O fragmento de 198 pb derivado do alelo C não é digerido pela *Hinf* I e o fragmento do mesmo tamanho do alelo T é digerido pela enzima em fragmentos de 175 e 23 pb. A Figura 10 apresenta o resultado da digestão com a enzima *Hinf* I do produto de PCR para genotipagem do polimorfismo *MTHFR* C677T.



**Figura 10** - Gel de poliacrilamida 9,6% para análise dos fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Hinf*I de 15 amostras para o polimorfismo *MTHFR* C677T. A banda de 198 pb corresponde ao alelo selvagem C, enquanto que o fragmento de 175 pb corresponde ao alelo mutado T. O genótipo heterozigoto é observado nas amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 14 e 15. As amostras 9, 10, 11 e 13 apresentaram somente o alelo correspondente à 198 pb (alelo C). Linhas M correspondem ao marcador de peso molecular de 100 pares de base (Amersham Biosciences).

As distribuições alélicas e genóticas para o polimorfismo *MTHFR* C677T estão apresentadas na Tabela 12. As distribuições alélicas ( $P=0,789$ ) e genóticas ( $P=0,847$ ) foram semelhantes em pacientes com DAC e controles. O alelo *MTHFR* 677C foi mais prevalente no grupo com DAC (0,62) e controles (0,63), assim como o genótipo *MTHFR* 677CT (53% nos pacientes com DAC e 55% nos controles). A distribuição genotípica se mostrou em HWE em ambos os grupos DAC e controle ( $\chi^2_1=2,86$ ;  $P=0,091$  e  $\chi^2_1=3,40$ ,  $P=0,065$ , respectivamente).

A distribuição genotípica não diferiu em relação ao número de artérias lesadas ( $P=0,156$ ) (Tabela 13). Também não foi observada relação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e grau de obstrução arterial coronária ( $p=0,993$ ) (Tabela 14).



**Tabela 12.** Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo *MTHFR* C677T.

Alelo	DAC		Controle		Valor de P
	N.º	Frequência Absoluta	N.º	Frequência Absoluta	
C	217	0,62	137	0,63	0,789
T	133	0,48	79	0,47	
Total	350	1	216	1	
Genótipo	N.º	%	N.º	%	Valor de P
CC	62	35	39	36	0,847
CT	93	54	59	55	
TT	20	11	10	9	
<b>Total</b>	175	100	108	100	

**Tabela 13.** Distribuição genotípica do polimorfismo *MTHFR* C677T em relação ao número de artérias envolvidas.

<b>DAC (n=175)</b>				
<b><i>MTHFR</i> C677T</b>	<b>Uma artéria</b>	<b>Duas artérias</b>	<b>Três artérias</b>	<b>Valor de P</b>
<b>CC, n(%)</b>	28 (45)	19 (30)	15 (31)	
<b>CT, n(%)</b>	26 (41)	37 (58)	30 (63)	0,156
<b>TT, n(%)</b>	9 (14)	8 (12)	3 (6)	

**Tabela 14.** Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo *MTHFR* C677T.

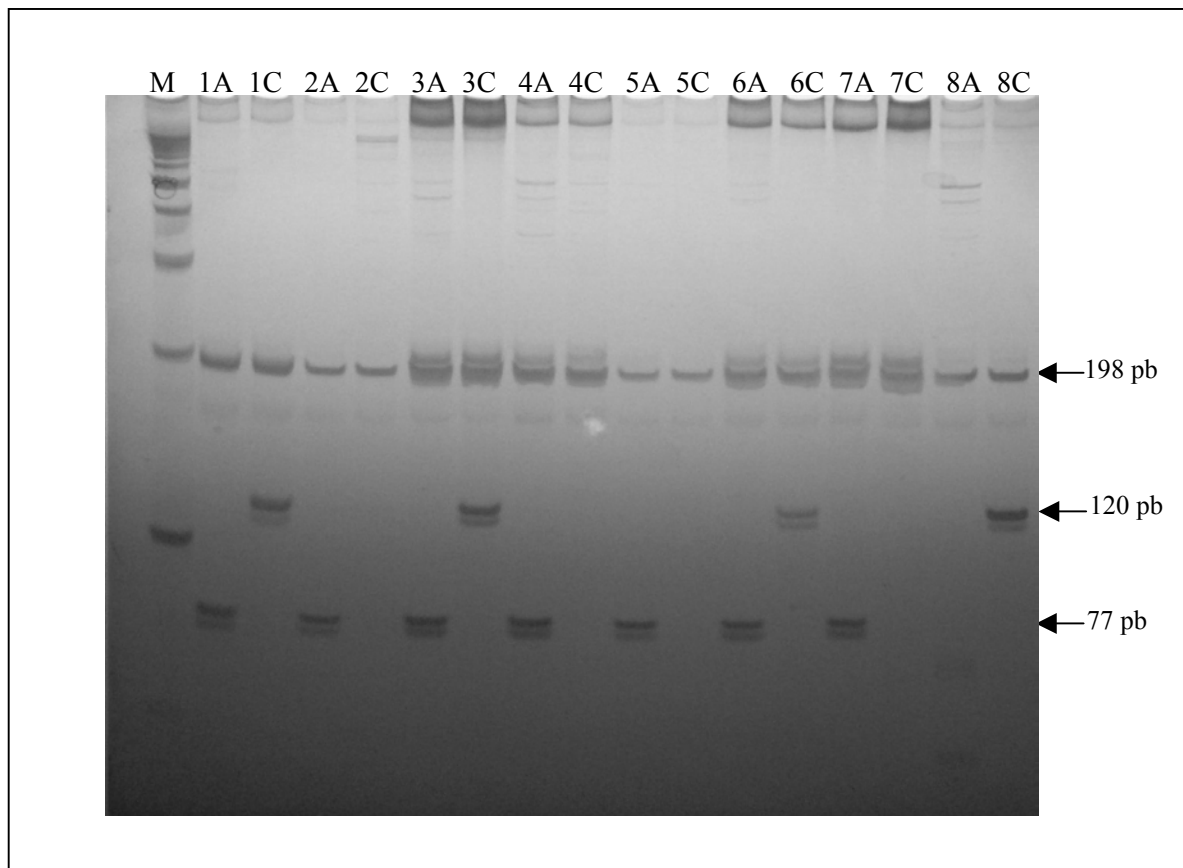
<b>DAC (n=175)</b>					
<b><i>MTHFR</i> C677T</b>	<b>&lt;50%</b>	<b>&gt;50-75%</b>	<b>&gt;75-95%</b>	<b>&gt;95%</b>	<b>Valor de P</b>
<b>CC, n(%)</b>	6 (35)	13 (36)	29 (35)	14 (35)	
<b>CT, n(%)</b>	9 (53)	19 (53)	45 (55)	20 (50)	0,993
<b>TT, n(%)</b>	2 (12)	4 (11)	8 (10)	6 (15)	

### 3.4.2. Análise do polimorfismo *MTHFR* A1298C

Testes foram realizados para a otimização da reação de amplificação. Os testes incluíram variações nas concentrações dos reagentes e de DNA, além de adição ou não de glicerol e DMSO. Após a amplificação o alelo *MTHFR* 1298A apresentou um fragmento de 77pb; o alelo *MTHFR* 1298C, um fragmento de 120pb; e a seqüência controle de amplificação, 198pb (Figura 11).

As distribuições alélicas e genóticas para o polimorfismo *MTHFR* A1298C estão apresentadas na Tabela 15. Não houve diferença entre os grupos estudados em relação às distribuições alélicas ( $P=0,271$ ) e genóticas ( $P=0,448$ ). O alelo *MTHFR* 1298A foi mais prevalente no grupo com DAC (0,78) e controles (0,73), assim como o genótipo *MTHFR* 1298AA (58% nos pacientes e 50% nos controles). O cálculo para o teste do HWE mostrou que a distribuição genotípica foi semelhante à esperada em ambos os grupos DAC e controles ( $\chi^2_1=1,01$ ;  $P=0,313$  e  $\chi^2_1=2,19$ ,  $P=0,138$ , respectivamente)

Nenhuma associação foi observada em relação ao número de artérias lesadas ( $P=0,380$ ) (Tabela 16) e grau de obstrução arterial ( $P=0,800$ ) (Tabela 17).



**Figura 11.** Gel de poliacrilamida 6% para análise do polimorfismo *MTHFR* A1298C de 8 amostras. Os alelos são amplificados e aplicados separadamente no gel. As amostras 1, 3 e 6 apresentam amplificação dos dois fragmentos de 77 e 120 pb correspondente aos alelos A e C, respectivamente. As amostras 2, 4, 5 e 7 apresentaram somente o fragmento de 77 pb (Alelo A). A amostra 8 apresentou somente o fragmento de 120 pb (Alelo C). O fragmento de 198 pb observados em todas as amostras corresponde à seqüência controle de amplificação. A coluna M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham Biosciences). As letras A e C junto ao número da coluna indicam a amplificação correspondente ao alelo A e C, respectivamente.

**Tabela 15.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *MTHFR* A1298C.

Alelo	DAC		Controle		Valor de P
	N.º	Frequência Absoluta	N.º	Frequência Absoluta	
A	269	0,78	157	0,73	0,271
C	81	0,32	59	0,37	
Total	350	1	216	1	
Genótipo	N.º	%	N.º	%	Valor de P
AA	101	58	54	50	0,448
AC	67	38	49	45	
CC	7	4	5	5	
<b>Total</b>	175	100	108	100	

**Tabela 16.** Distribuição genotípica do polimorfismo *MTHFR* A1298C em relação ao número de artérias envolvidas.

DAC (n=175)				
<i>MTHFR</i> A1298C	Uma artéria	Duas artérias	Três artérias	Valor de P
AA, n(%)	33 (52)	41 (64)	27 (56)	
AC, n(%)	29 (46)	20 (31)	18 (38)	0,380
CC, n(%)	1 (2)	3 (5)	3 (6)	

**Tabela 17.** Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo *MTHFR* A1298C.

DAC (n=175)					
<i>MTHFR</i> A1298C	<50%	>50-75%	>75-95%	>95%	Valor de P
CC, n(%)	11 (65)	20 (56)	49 (60)	21 (52)	
CT, n(%)	6 (35)	16 (44)	30 (36)	15 (38)	0,800
TT, n(%)	0 (0)	0 (0)	3 (4)	4 (10)	

### 3.4.3. Análise dos genótipos *MTHFR* combinados

As frequências dos genótipos combinados dos polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C não diferiram entre pacientes e controles ( $P=0,172$ ). Também não foi observada associação dos genótipos combinados e número de artérias ( $P=0,657$ ) ou grau de obstrução coronária ( $P=0,350$ ).

## 3.5. Metionina Sintase

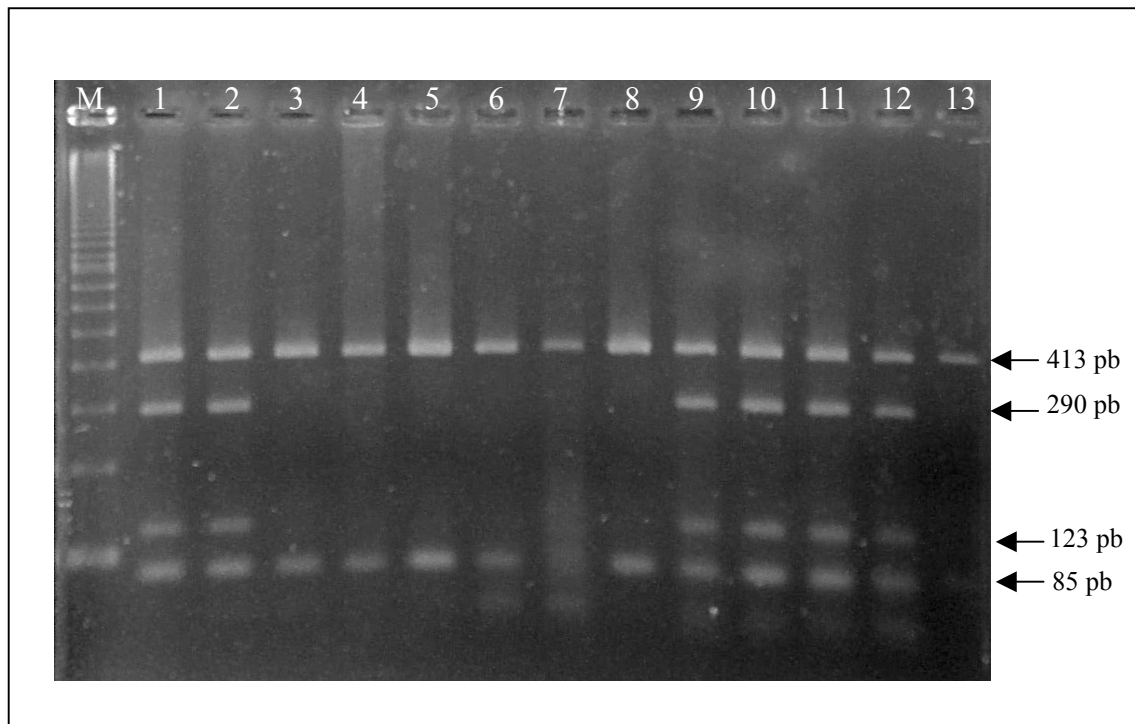
### 3.5.1. Análise do polimorfismo *MTR* A2756G

Testes incluíram variações nas concentrações dos reagentes e de DNA, além de adição ou não de glicerol e DMSO para a otimização da reação de amplificação.

A Figura 12 apresenta o resultado da digestão da enzima *Hae* III para genotipagem do polimorfismo *MTR* A2756G. Através da ação da enzima *Hae* III foi possível detectar, por eletroforese em gel de agarose 2,5%, fragmentos de 85 e 413 pb na presença do alelo *MTR* 2756A e fragmentos de 85, 123 e 290 pb na presença do alelo *MTR* 2756G. O fragmento 85 pb esteve presente nos dois perfis de eletroforese como resultado da ação da enzima *Hae* III no sítio constitutivo presente no produto de PCR.

As distribuições alélicas e genotípicas para o polimorfismo *MTR* A2756G estão apresentadas na Tabela 18. As frequências alélicas ( $P=1,000$ ) e genotípicas ( $P=0,883$ ) não diferiram entre os grupos. O alelo *MTR* 2756A foi mais prevalente no grupo com DAC (0,78) e controles (0,79), assim como o genótipo *MTR* 2756AA (63% nos pacientes e 63% nos controles). A distribuição genotípica foi semelhante à esperada em ambos os grupos DAC e controles ( $\chi^2_1=2,78$ ;  $P=0,096$  e  $\chi^2_1=0,40$ ,  $P=0,527$ , respectivamente) de acordo com o HWE. Nenhuma associação foi observada em relação

ao número de artérias lesadas ( $P=0,375$ ) e ao grau de obstrução arterial ( $P=0,408$ ) (Tabelas 19 e 20).



**Figura 12.** Gel de agarose 2,5% mostrando resultado da digestão com a enzima *Hae* III do produto de PCR de 13 amostras para o polimorfismo *MTR* A2756G. As amostras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 13 apresentaram os fragmentos de 413pb, referente ao alelo A. As amostras heterozigotas 1, 2, 9, 10, 11 e 12 apresentaram os três fragmentos de 413 (alelo A), 290 e 123pb (alelo C) . A banda de 85pb é observada em todas as amostras como resultado da ação da enzima no sítio constitutivo no produto de PCR. A coluna M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham Biosciences).



**Tabela 18.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *MTR* A2756G.

Alelo	DAC		Controle		Valor de P
	N.º	Frequência Absoluta	N.º	Frequência Absoluta	
A	274	0,78	170	0,79	1
G	76	0,32	46	0,31	
Total	350	1	216	1	
Genótipo	N.º	%	N.º	%	Valor de P
AA	111	63	68	63	0,883
AG	52	30	34	31	
GG	12	7	6	6	
<b>Total</b>	175	100	108	100	

**Tabela 19.** Distribuição genotípica do polimorfismo *MTR* A2756G em relação ao número de artérias envolvidas.

<b>DAC (n=175)</b>				
<b><i>MTR</i> A2756G</b>	<b>Uma artéria</b>	<b>Duas artérias</b>	<b>Três artérias</b>	<b>Valor de P</b>
<b>AA, n(%)</b>	39 (62)	44 (69)	28 (58)	
<b>AG, n(%)</b>	17 (27)	18 (28)	17 (36)	0,375
<b>GG, n(%)</b>	7 (11)	2 (3)	3 (6)	

**Tabela 20.** Comprometimento coronariano em relação ao polimorfismo *MTR* A2756G.

<b>DAC (n=175)</b>					
<b><i>MTR</i> A2756G</b>	<b>&lt;50%</b>	<b>&gt;50-75%</b>	<b>&gt;75-95%</b>	<b>&gt;95%</b>	<b>Valor de P</b>
<b>CC, n(%)</b>	11 (65)	21 (58)	53 (65)	26 (65)	
<b>CT, n(%)</b>	6 (35)	13 (36)	20 (24)	13 (33)	0,408
<b>TT, n(%)</b>	0 (0)	2 (6)	9 (11)	1 (2)	

### 3.6. Análise Multivariada

Regressão logística múltipla foi utilizada para testar independentes variáveis na presença da DAC. Foram incluídos no modelo: tabagismo, etilismo, sedentarismo, hipertensão arterial, diabetes, perfil lipídico, hiper-homocisteinemia, deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, ingestão de micronutrientes e os polimorfismos *VEGF* C-2578A, *VEGF* C936T, *VEGF* G-1154A, *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C e *MTR* A2756G. Diabetes (P=0,040) e deficiência de vitamina B<sub>12</sub> (P=0,032) foram independentemente associadas com a DAC. Os polimorfismos *VEGF* C-2578A (P=0,315), *VEGF* C936T (P=0,403), *VEGF* G-1154A (P=0,821), *MTHFR* C677T (P=0,647), *MTHFR* A1298C (P=0,879) e *MTR* A2756G (P=0,358) não se mostraram preditores independentes para a DAC.

### 3.7. Análise das concentrações de homocisteína (Hcy)

Nos indivíduos com DAC, os níveis médios de Hcy foram mais elevados em relação ao grupo controle, porém não estatisticamente significante (20,2±15,5 µmol/L vs. 18,8±13,1 µmol/L; P=0,246). A presença de hiper-homocisteinemia (Hcy >15µmol/L) também não diferiu significativamente entre os grupos (P=0,391). Os níveis de Hcy não apresentaram correlação com o número de artérias envolvidas (Rs=0,056, P=0,368) e com a obstrução arterial (Rs= 0,067, P=0,284).

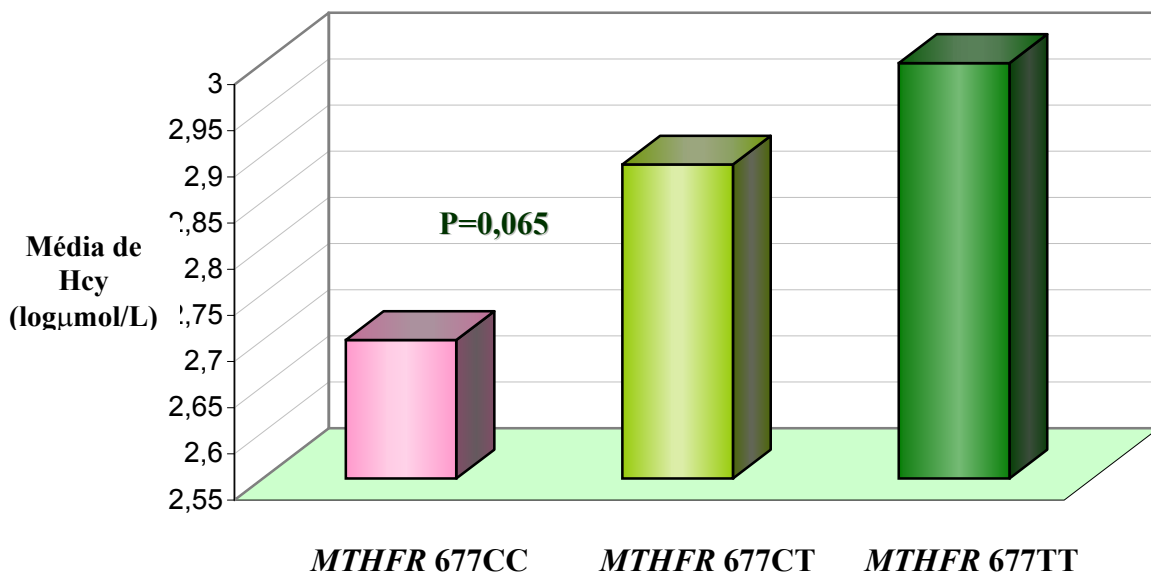
Foram observadas concentrações circulantes de Hcy maiores em indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino (20,9±15,1µmol/L vs. 17,6±13,6µmol/L; P=0,003). Níveis significativamente mais elevados de Hcy foram encontrados em indivíduos com idade acima de 50 anos em relação aos mais jovens (19,7±12µmol/L vs. 19,1±20,1µmol/L; P=0,016).

A análise das concentrações de Hcy em relação aos polimorfismos foi realizada na métrica logarítmica, uma vez que os valores de Hcy são ajustados na distribuição log normal.

No grupo com DAC, a média de Hcy em escala logarítmica não foi significativamente diferente entre os genótipos *MTHFR* C677T ( $P=0,065$ ), embora maior na presença do alelo *MTHFR* 677T (Figura 13). No grupo controle também não houve associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e Hcy ( $P=0,263$ ). Em relação ao polimorfismo *MTHFR* A1298C, não foi observada associação entre os genótipos e Hcy no grupo com DAC ( $P=0,464$ ), assim como no grupo controle ( $P=0,484$ ). Os genótipos *MTR* A2756G também não apresentaram associação com Hcy no grupo com DAC ( $P=0,161$ ) e controle ( $P=0,889$ ).

Os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C não apresentaram relação com a hiper-homocisteinemia no grupo com DAC ( $P=0,874$  e  $P=0,400$ ) e controle ( $P=0,253$  e  $P=0,261$ ). O mesmo foi observado em relação aos genótipos *MTR* A2756G em ambos os grupos (DAC,  $P=0,417$  e controle,  $P=0,961$ ).

A análise combinada dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C não mostrou associação com os níveis de Hcy tanto no grupo com DAC ( $P=0,999$ ) quanto nos controles ( $P=0,999$ ).



**Figura 13.** Média de Hcy, em escala logarítmica, em relação aos genótipos *MTHFR* C677T.

### 3.8. Análise das concentrações de ácido metilmalônico (MMA)

Os níveis médios de MMA foram significativamente mais elevados no grupo com DAC em relação ao grupo controle ( $0,34 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$  vs.  $0,22 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$ ,  $P=0,048$ ). No grupo com DAC foram encontrados 12 indivíduos com níveis de MMA  $>0,5 \mu\text{mol/L}$  (deficiência de vitamina B<sub>12</sub>), enquanto no grupo controle essa condição não foi observada ( $P=0,004$ ); o que impossibilitou a análise de deficiência de vitamina B<sub>12</sub> em relação aos polimorfismos estudados neste último grupo.

Os polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C não apresentaram associação com níveis médios de MMA no grupo com DAC ( $P=0,338$  e  $P=0,192$ , respectivamente), assim como no grupo controle ( $P=0,414$  e  $P=0,082$ ). Esses polimorfismos também não foram relacionados com níveis de MMA  $>0,5 \mu\text{mol/L}$  no grupo com DAC (*MTHFR* C677T,  $P=0,802$ ; *MTHFR* A1298C,  $P=1$ ).

O mesmo foi observado para o polimorfismo *MTR* A2756G, que não mostrou relação com os níveis médios de MMA no grupo com DAC ( $P=0,172$ ) e no grupo controle ( $P=0,545$ ), e com níveis de MMA  $>0,5 \mu\text{mol/L}$  no grupo com DAC ( $P=0,538$ ).

Os níveis médios de MMA não apresentaram relação com os polimorfismos combinados *MTHFR* (DAC  $P=0,524$ ; controle  $P=0,479$ ). Também não foi observada relação entre os genótipos *MTHFR* combinados e níveis de MMA  $>0,5 \mu\text{mol/L}$  no grupo com DAC ( $P=1$ ).

Foi observada uma correlação positiva entre níveis médios de MMA e Hcy no grupo com DAC ( $R_s=0,276$ ;  $P=0,001$ ) e no grupo controle ( $R_s=0,251$ ;  $P=0,020$ ), demonstrando a relação entre o aumento de MMA e o aumento Hcy plasmática. Os níveis de MMA foram significativamente mais elevados em indivíduos com hiperhomocisteinemia em relação a indivíduos com níveis de Hcy  $\leq 15 \mu\text{mol/L}$  em ambos os

grupos DAC ( $0,44 \pm 1 \mu\text{mol/L}$  vs.  $0,22 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ ,  $P=0,0063$ ) e controle ( $0,25 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$  vs.  $0,21 \pm 0,6 \mu\text{mol/L}$ ,  $P=0,013$ ). Níveis médios mais elevados de Hcy foram observados em indivíduos com níveis de MMA  $>0,5 \mu\text{mol/L}$  em relação a indivíduos com níveis de MMA  $\leq 0,5 \mu\text{mol/L}$  no grupo com DAC ( $30,6 \pm 20 \mu\text{mol/L}$  vs.  $19,4 \pm 15,4 \mu\text{mol/L}$ ,  $P=0,009$ ).

### 3.9. Análise das concentrações de folato

Os níveis médios de folato não diferiram significativamente entre os grupos DAC e controle ( $5,3 \text{ ng/mL} \pm 2,9$  vs.  $4,8 \text{ ng/mL} \pm 2,6$ ;  $P=0,111$ ).

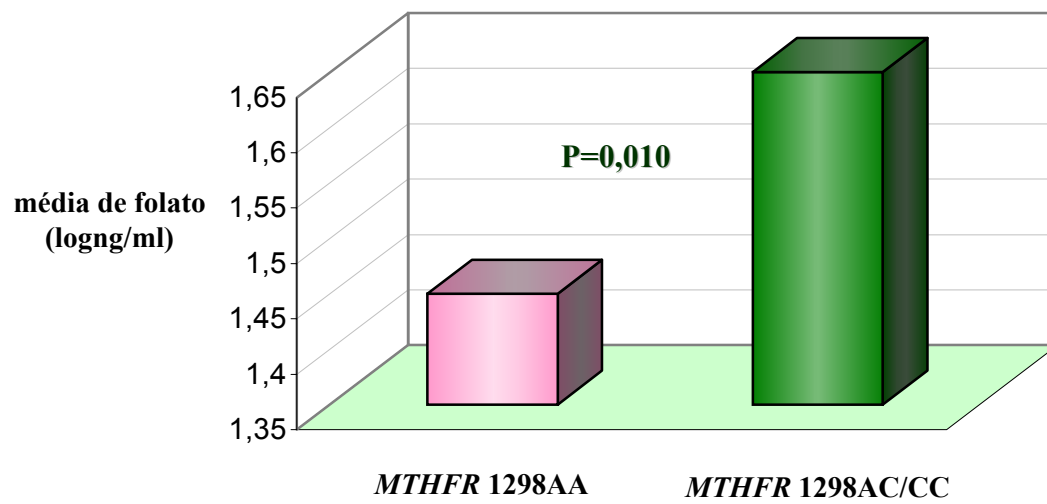
A análise das concentrações de folato em relação aos polimorfismos foi realizada na métrica logarítmica, uma vez que estes valores são ajustados na distribuição log normal.

O polimorfismo *MTHFR* C677T não apresentou relação com folato no grupo com DAC ( $P=0,109$ ) e controle ( $P=0,718$ ). O polimorfismo *MTHFR* A1298C não foi associado com folato no grupo controle ( $P=0,082$ ), no entanto a média de folato, em escala logarítmica, foi significativamente menor em portadores do genótipo selvagem *MTHFR* 1298AA, comparado com os portadores do genótipo *MTHFR* 1298AC no grupo com DAC ( $P=0,037$ , ANOVA). A associação estatisticamente significativa entre níveis de folato plasmático e genótipos *MTHFR* 1298 também foi confirmada pelo teste T, onde portadores do genótipo *MTHFR* 1298AA apresentaram média de folato significativamente menor em relação a indivíduos portadores do alelo alterado (*MTHFR* 1298AC e *MTHFR* 1298CC) ( $P=0,010$ ) (Figura 14). Não foi observada associação entre o polimorfismo *MTR* A2756G e folato plasmático no grupo com DAC ( $P=0,334$ ), assim como no grupo controle ( $P=0,593$ ).

Os polimorfismos *MTHFR* combinados não foram associados com os níveis médios de folato em ambos os grupos (DAC  $P=0,834$ ; controle  $P=0,411$ ).

Não houve correlação entre os níveis plasmáticos de folato e concentração de Hcy tanto no grupo com DAC ( $R_s=-0,095$ ,  $P=0,267$ ) quanto no grupo controle ( $R_s=-0,123$ ,  $P=0,278$ ). Também não foram observadas diferenças nos níveis de folato entre indivíduos com e sem hiper-homocisteinemia em ambos os grupos (DAC,  $P=0,390$ ; controle,  $P=0,315$ ).





**Figura 14.** Média de folato, em escala logarítmica, em relação aos genótipos *MTHFR* A1298C.

### 3.10. Análise do hábito alimentar

Os níveis de ingestão dos micronutrientes nos grupos estudados estão apresentados na Tabela 21. Não houve diferença significativa nos níveis médios de ingestão de ácido fólico ( $P=0,809$ ), vitamina B<sub>6</sub> ( $P=0,284$ ) e vitamina B<sub>12</sub> ( $P=0,133$ ) entre os grupos com DAC e controle. Também não foi observada relação entre ingestão insuficiente de folato, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub> e DAC ( $P=0,575$ ;  $P=0,305$  e  $P=0,438$ , respectivamente) (Tabela 21).

A análise do hábito alimentar não mostrou associação entre níveis médios de Hcy e de ingestão de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub> no grupo com DAC ( $R_s=0,014$ ,  $P=0,867$ ;  $R_s=-0,023$ ,  $P=0,780$ ;  $R_s=0,050$ ,  $P=0,543$ ) e no grupo controle ( $R_s=0,094$ ,  $P=0,360$ ;  $R_s=0,194$ ,  $P=0,194$ ;  $R_s=0,030$ ,  $P=0,774$ ). A ingestão de ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> também não foi associada à hiper-homocisteinemia em ambos os grupos DAC ( $P=0,711$ ;  $P=0,880$  e  $P=0,594$ , respectivamente) e controle ( $P=0,948$ ;  $P=0,472$  e  $P=0,874$ , respectivamente).

Os níveis médios de Hcy não diferiram significativamente entre indivíduos com ingestão normal e insuficiente de folato ( $21,4\pm 10,8$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $19,5\pm 16,1$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P=0,299$ ), vitaminas B<sub>6</sub> ( $19,8\pm 16,4$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $19,6\pm 15,8$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P=0,966$ ) e vitamina B<sub>12</sub> ( $19,4\pm 17,1$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $20,0\pm 14,4$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P=0,582$ ) no grupo com DAC, assim como no grupo controle para vitamina B<sub>6</sub> ( $18,3\pm 13,3$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $18,8\pm 13,4$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P=0,932$ ) e vitamina B<sub>12</sub> ( $18,0\pm 10,5$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $19,8\pm 16,2$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P=0,991$ ). Neste último grupo não foi possível a realização de teste estatístico para baixa ingestão de folato devido ao número insuficiente de indivíduos.

Os níveis de MMA não apresentaram relação com a ingestão de vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub> e folato nos grupos DAC (P=0,354; P=0,539; P=0,113, respectivamente) e controle (P=0,273; P=0,326; P=0,229).

A ingestão de ácido fólico não apresentou associação com os níveis médios de folato plasmático observados no grupo com DAC (P=0,375) e controle (P=0,868).

**Tabela 21.** Ingestão de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> entre os grupos.

<b>Vitaminas</b>	<b>DAC</b> <b>N=149</b>	<b>Controle</b> <b>N=99</b>	<b>Valor de P</b>
Folato (Média ±DP; µg/dia)	167,8±111,3	158,3±77	0,809
Ingestão de folato <EAR (%)	93	96	0,575
Vitamina B <sub>6</sub> (Média ±DP; mg/dia)	1,2±0,8	1,1±0,5	0,284
Ingestão de vitamina B <sub>6</sub> <EAR (%)	75	69	0,385
Vitamina B <sub>12</sub> (Média ±DP; µg/dia)	5,3±16,1	6,4±17,1	0,134
Ingestão de vitamina B <sub>12</sub> <EAR (%)	49	44	0,438

DAC= Doença arterial coronária

DP= Desvio padrão

EAR= *Estimated Average Requirement*<sup>(100)</sup>.

***DISCUSSÃO***

---

#### 4. DISCUSSÃO

A DAC é uma doença multifatorial modulada por fatores de risco genéticos e ambientais. Sua incidência é relacionada à alimentação, sedentarismo, estresse, tabagismo, entre outros fatores de risco conhecidos e alterações em genes envolvidos nos mecanismos de desenvolvimento da aterosclerose.<sup>(1,14,56, 61, 101,102)</sup>

Como esperado, neste estudo, os fatores de risco para aterosclerose foram mais frequentes nos pacientes com DAC em relação ao grupo controle. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi significativamente prevalente em pacientes com DAC (78%), o que está de acordo com a literatura.<sup>(102)</sup> Em estudo de Prati *et al.*, (2006),<sup>(103)</sup> HAS foi um elemento significativo no desenvolvimento de placa aterosclerótica em artéria carótida. O mecanismo molecular pelo qual a pressão elevada leva à progressão da doença não está esclarecido. Urotensina II (U-II) humana, um peptídeo vasoconstritor endógeno, e seu receptor estão envolvidos na etiologia da hipertensão e promove a proliferação celular, expressão de colágeno tipo 1 e estimula a proliferação de células musculares lisas. Dessa forma, U-II pode contribuir para o desenvolvimento acelerado da aterosclerose, e conseqüentemente, da DAC.<sup>(104)</sup>

Diabetes *mellitus* também apresentou associação com a DAC, corroborando com estudo de Norhammar *et al.*, (2004),<sup>(105)</sup> que mostra a influência da doença na gravidade da DAC. Roy *et al.* (2006)<sup>(106)</sup> observaram que a diabetes acelera a aterogênese e aumenta a resposta inflamatória das lesões ateroscleróticas em modelos animais. Segundo esse estudo, foi observado um acelerado processo de aterogênese, juntamente com aumento da quantidade de macrófagos nas lesões ateroscleróticas.<sup>(106)</sup>

Foi observada uma associação entre tabagismo e a DAC no presente estudo. Outros trabalhos encontraram relação entre o hábito tabagista e o risco aumentado para

doenças cardiovasculares.<sup>(107,108)</sup> Está estabelecido que o fumo é um dos principais fatores de risco para DAC e infarto do miocárdio.<sup>(109,110)</sup>

Disfunção vasomotora, inflamação e alteração lipídica são fatores importantes para o início e progressão da aterosclerose.<sup>(1,111)</sup> Em humanos, o fumo causa disfunção da vasodilatação em artérias coronárias<sup>(112,113)</sup> e estudos *in vitro* mostraram que o cigarro está associado com diminuição da disponibilidade de óxido nítrico (ON),<sup>(114,115)</sup> um radical livre responsável pela vasodilatação do endotélio.<sup>(116)</sup> *In vivo*, o fumo está associado com níveis elevados de marcadores inflamatórios, como proteína C-reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral.<sup>(117-119)</sup> O fumo pode promover a aterosclerose, ainda, por sua influência no perfil lipídico. Fumantes apresentam níveis de colesterol sérico, triglicérides e LDL<sub>c</sub> significativamente mais altos em relação à não fumantes, enquanto que os níveis de HDL<sub>c</sub> são encontrados mais baixos nesses indivíduos.<sup>(120)</sup>

Concentrações significativamente mais baixas de HDL<sub>c</sub> são associadas ao desenvolvimento da aterosclerose.<sup>(121,122)</sup> Essa relação também foi observada no presente trabalho confirmando resultados em estudo de indivíduos com DAC.<sup>(123)</sup> HDL<sub>c</sub> possui propriedades biológicas protetoras na aterogênese, que inclui capacidade de efluxo do colesterol celular e atividades antioxidativas e antiinflamatórias. Função deficiente e níveis baixos de HDL<sub>c</sub> podem atuar sinergisticamente para acelerar o desenvolvimento da aterosclerose.<sup>(124)</sup>

A escolha do grupo controle apropriado é a principal consideração para estudos caso-controle. No presente estudo, foram incluídos no grupo controle indivíduos submetidos ao exame cinangiocoronariográfico que não apresentaram sinal de lesão aterosclerótica. Vários estudos determinaram a eficácia da cineangiocoronariografia no diagnóstico da DAC, sendo este exame considerado o teste “padrão ouro” (*gold*

*standard*).<sup>(125,126,127,128,129)</sup> No entanto, uma desvantagem da utilização desses indivíduos está relacionada ao perfil clínico para indicação de cateterismo e, portanto, esses pacientes poderiam representar um grupo com outras doenças.

### **Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)**

Neste estudo, frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene *VEGF* não diferiram entre pacientes com e sem DAC. O genótipo *VEGF* -2578AA foi observado em maior frequência em indivíduos com três artérias lesadas, corroborando com estudo de Howell *et al.* (2005),<sup>(14)</sup> no qual o genótipo *VEGF* -2578AA foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Segundo este estudo, a frequência do genótipo *VEGF* -2578AA aumentou gradualmente em relação ao número de artérias envolvidas, comparado com o genótipo *VEGF* -2578CC, sugerindo que a diminuição da expressão de VEGF, resultante do genótipo alterado *VEGF* -2578AA, promoveria o desenvolvimento da aterosclerose.

Em relação ao polimorfismo *VEGF* G-1154A, os mesmos autores observaram que o genótipo selvagem *VEGF* -1154GG foi menos prevalente no grupo de indivíduos com três artérias lesadas.<sup>(14)</sup> Em nosso estudo, este polimorfismo não foi associado ao número de artérias comprometidas ou gravidade da DAC.

O papel desempenhado pelo VEGF na aterosclerose é motivo de debate na literatura, uma vez que alguns estudos observaram que ele atua como fator anti-aterosclerótico, promovendo a reendotelização, que leva à redução do espessamento da camada arterial íntima e da formação de trombos;<sup>(25)</sup> enquanto outros mostraram que a administração de VEGF humano recombinante em animais acentua a progressão da placa aterosclerótica.<sup>(130)</sup> A neovascularização da placa aterosclerótica, mediada pelo

VEGF, disponibiliza nutrientes e componentes para a placa, aumentando seu volume. Em paredes de artérias com oclusão total, microvasos denominados *vasa vasorum* foram relacionados, em anatomia e quantidade, ao grau de inflamação da camada interna da placa.<sup>(131)</sup> Moulton *et al.* (2003)<sup>(132)</sup> observaram uma diminuição da progressão da aterosclerose secundária à inibição da neovascularização mediada pelo VEGF. Dessa maneira, mais estudos são necessários para o esclarecimento do real papel do VEGF na DAC.

Correlações entre genótipos e expressão não foram examinados no presente estudo. Entretanto, estudo de Shahbazi *et al.* (2002)<sup>(32)</sup> com pacientes submetidos a transplante renal verificou que o alelo selvagem *VEGF* -2578C para o polimorfismo C-2578A está associado com níveis elevados de VEGF. O genótipo *VEGF* -2578AA, associado com a diminuição da expressão da proteína, pode ser considerado um fator de risco para a aterosclerose, enquanto níveis elevados de VEGF decorrentes do genótipo *VEGF* -2578CC parece conferir proteção contra a doença.<sup>(14)</sup> Esses resultados são consistentes com a atuação do VEGF na regulação endógena da integridade endotelial da parede da artéria coronária.<sup>(24)</sup>

Outros polimorfismos no gene *VEGF* já foram associados com variações na expressão da proteína.<sup>(31,32)</sup> Níveis plasmáticos de VEGF significativamente mais baixos foram observados em portadores do alelo alterado *VEGF* 936T em relação aos não portadores.<sup>(31)</sup> Neste estudo o polimorfismo *VEGF* C936T não foi associado à extensão ou gravidade da DAC.



### Metilenotetrahidrofolato redutase e Metionina sintase

Neste estudo as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos do gene *MTHFR* não diferenciaram pacientes e controles. Existem evidências de associação do alelo polimórfico *MTHFR* 677T com doenças vasculares, aterosclerose de carótida, doença arterial obstrutiva e infarto do miocárdio,<sup>(50-54)</sup> embora outros estudos não confirmem esses achados.<sup>(55,56,71,133-135)</sup>

Estudo de Szczeklik *et al.* (2001)<sup>(61)</sup> mostrou frequência do alelo *MTHFR* 1298C significativamente maior em indivíduos com DAC em relação aos controles, independente dos níveis de Hcy, o que não foi confirmado por nosso estudo. A contribuição da variante polimórfica *MTHFR* 1298CC na redução da função enzimática não é totalmente esclarecida, uma vez que estudos observaram resultados contraditórios.<sup>(57,59)</sup> Além disso, tal polimorfismo não afeta o metabolismo da Hcy<sup>(58,60)</sup>, que é frequentemente associada ao desenvolvimento de doença vascular.<sup>(51,52)</sup>

Em trabalho de Gueant-Rodriguez *et al.* (2005)<sup>(45)</sup> os polimorfismos *MTHFR* A1298C e *MTHFR* C677T não foram associados à DAC; entretanto, uma substituição de alanina para guanina no gene da metionina sintase redutase (*MTRR* A66G), não investigado no presente estudo, foi mais frequente em pacientes com DAC em relação aos controles, sendo o genótipo *MTRR* AA considerado um significativo preditor da doença. O polimorfismo *MTRR* A66G, assim como alterações no gene *MTHFR*, está associado ao aumento das concentrações de Hcy.<sup>(45)</sup>

O polimorfismo *MTR* A2756G não foi associado à DAC no presente estudo. Embora a contribuição na atividade enzimática não seja totalmente esclarecida, foi sugerido que a variante *MTR* 2756G aumenta os níveis de Hcy e o risco para doenças cardiovasculares.<sup>(101)</sup> Em estudo de Klerk *et al.* (2003),<sup>(136)</sup> o genótipo *MTR* 2756GG foi

associado com um risco quatro vezes maior de doença coronária, embora outros autores não tenham observado associação com doenças vasculares.<sup>(137,138)</sup> Pesquisadores ainda não foram capazes de expressar a enzima MTR humana em níveis suficientes na sua forma ativa para avaliar os efeitos bioquímicos desse polimorfismo.<sup>(139)</sup> A correlação entre a mutação isolada do gene *MTR* e DAC não foi observada por Wang et al (1998);<sup>(140)</sup> no entanto, uma interação do polimorfismo e o tabagismo foi considerada preditiva para aumento do número de artérias lesadas, assim como para a presença de DAC.

### **Níveis de Hcy plasmática**

Cerca de 40% dos pacientes com doença arterial coronária apresentam hiperhomocisteinemia.<sup>(141)</sup> Neste estudo, 49,7% dos pacientes com DAC mostraram níveis de Hcy > 15 µmol/L, não sendo observada diferença entre os grupos. Concentrações plasmáticas de Hcy foram encontradas significativamente mais elevadas em pacientes com estenose em relação aos controles sem estenose.<sup>(142)</sup> Os níveis médios de Hcy, observados no presente estudo, se mostraram mais elevados no grupo com DAC em relação aos controles, entretanto, não estatisticamente significante, o que está de acordo com o estudo de Yilmaz *et al.* (2006).<sup>(143)</sup> Níveis mais elevados de Hcy foram associados ao sexo masculino e à idade acima de 50 anos, corroborando com estudos anteriores.<sup>(144,145)</sup>

No presente trabalho o polimorfismo *MTHFR* C677T não foi associado com níveis elevados de Hcy, assim como em estudos de Kim *et al.* (2001)<sup>(146)</sup> e Meisel *et al.* (2001)<sup>(147)</sup> em indivíduos com DAC, embora a média da Hcy na escala logarítmica tenha sido mais elevada na presença do alelo *MTHFR* 677T. Estudo prospectivo em

doença cardiovascular isquêmica e tromboembolismo mostrou nível de Hcy aumentado nos indivíduos com genótipo *MTHFR* 677TT em relação aos outros genótipos; entretanto, o polimorfismo *MTHFR* C677T não foi associado a estas afecções.<sup>(148)</sup> O mesmo foi observado por Huh *et al.* (2005),<sup>(149)</sup> Yilmaz *et al.* (2006)<sup>(143)</sup> e Kolling *et al.*, (2004)<sup>(71)</sup> na DAC. Em trabalho de Schwartz *et al.* (1997),<sup>(150)</sup> também houve maior concentração plasmática de Hcy nos portadores do genótipo *MTHFR* 677TT, particularmente em pacientes com DAC. Neste caso, concentração igual ou acima de 15,6  $\mu\text{mol/L}$  associou-se com maior risco de infarto do miocárdio comparado a níveis abaixo de 10,0  $\mu\text{mol/L}$ .

Os níveis de Hcy não diferem entre os genótipos *MTHFR* A1298C neste estudo, reforçando os achados de que este polimorfismo não afeta significativamente o metabolismo da Hcy.<sup>(58,60)</sup>

Assim como em nosso estudo, Meisel *et al.* (2001)<sup>(147)</sup> também não observou influência significativa dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C combinados nos níveis de Hcy, assim como no processo de desenvolvimento da DAC.

O alelo 2756G do gene *MTR* foi associado com aumento nos níveis de Hcy, em estudo de Laraqui *et al.* (2006),<sup>(44)</sup> mas não foi relacionado com a DAC. Existem evidências de que o polimorfismo *MTR* A2756G influencie significativamente os níveis de Hcy circulante. No presente estudo, não foi observada associação entre o polimorfismo *MTR* e Hcy, assim como em vários estudos.<sup>(133,136,137,151,152,153)</sup> Outros achados mostram, ainda, que os níveis de Hcy diminuem na presença do alelo *MTR* 2756G.<sup>(135-137)</sup>

### Níveis plasmáticos de MMA e folato

Deficiências de folato e vitamina B<sub>12</sub> são frequentemente associadas ao desenvolvimento de doenças vasculares.<sup>(78,79,81)</sup> Placas observadas em artéria carótida foram relacionadas a níveis reduzidos de vitamina B<sub>12</sub> em estudo de Robertson *et al.*, (2005).<sup>(81)</sup> Em indivíduos acometidos por infarto do miocárdio foram encontradas deficiências de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, sugerindo uma correlação entre níveis reduzidos dessas vitaminas e risco aumentado para DAC.<sup>(154)</sup> A associação entre deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e risco de doença coronária também foi observada por Siri *et al.* (1998),<sup>(154)</sup> embora outros estudos não demonstrem correlação.<sup>(76,78,155)</sup>

Níveis de MMA se encontram elevados em indivíduos com deficiência de vitamina B<sub>12</sub> em decorrência do desvio de substrato para a formação desse metabólito.<sup>(87)</sup> Assim, a dosagem de MMA plasmático constitui um método eficiente de detecção de deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. No presente estudo, não foi observada associação entre os níveis de folato e a DAC; entretanto, níveis médios significativamente elevados de MMA e níveis de MMA > 0,5 μmol/L foram encontrados no grupo com DAC, sugerindo uma associação entre a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e a DAC.

Correlação positiva foi observada entre MMA e níveis de Hcy; no entanto, não foi observada associação entre os níveis de folato e concentrações desse aminoácido. Também foram observados níveis médios mais elevados de Hcy em indivíduos com níveis de MMA > 0,5 μmol/L no grupo com DAC neste estudo.

Em estudo de Iqbal *et al.* (2005),<sup>(156)</sup> a média de Hcy em indivíduos com deficiência de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> foi significativamente elevada em relação a

indivíduos com níveis vitamínicos normais. Níveis séricos de folato foram inversamente associados com concentrações de Hcy no estudo de Huerta *et al.* (2004).<sup>(157)</sup> Folato e cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) atuam seqüencialmente na remetilação da Hcy para metionina. Assim, níveis inadequados de folato sérico podem resultar em remetilação desequilibrada independente dos níveis de cobalamina. Por outro lado, a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> atua como fator limitador para a via metabólica de remetilação quando o nível de folato é inadequado.<sup>(158)</sup>

A associação entre os polimorfismos no gene *MTHFR* e níveis plasmáticos de MMA não foi observada no presente estudo. Em relação às concentrações de folato, foi observada uma associação entre níveis reduzidos de folato e o genótipo selvagem *MTHFR* 1298AA no grupo com DAC. Baixas concentrações de folato em portadores do genótipo selvagem *MTHFR* 1298AA foram relatadas por Kapiszewska *et al.* (2005).<sup>(159)</sup> Segundo esses autores, essa condição pode refletir o fato dos indivíduos homozigotos 677TT serem frequentemente portadores do genótipo 1298AA, o que leva à redução da atividade da enzima *MTHFR* e conseqüente diminuição da formação de 5-metiltetrahydrofolato, principal forma circulante de folato.<sup>(160)</sup> No entanto, em nosso estudo não foi observada redução de folato nos indivíduos com genótipo combinado 677TT/1298AA em relação à outras combinações genotípicas.

Kolling *et al.* (2004)<sup>(71)</sup> não encontrou associação entre mudanças significantes nas concentrações de folato e o polimorfismo *MTHFR* 1298, no entanto, níveis reduzidos de folato foram observados naqueles com a variante polimórfica *MTHFR* C677T.

Estudos sugerem uma interação entre o polimorfismo C677T no gene *MTHFR* e nível de folato,<sup>(161)</sup> embora tal associação não tenha sido observada no presente estudo.

Huh *et al.* (2006)<sup>(149)</sup> não observaram diferença nos níveis de folato ou vitamina B<sub>12</sub> de acordo com os genótipos *MTHFR* 677; no entanto, uma tendência de aumento nos níveis de folato e redução nos níveis de vitamina B<sub>12</sub> foi observada na presença do alelo *MTHFR* 677T. Por outro lado, alguns estudos mostraram associação entre homozigotos *MTHFR* 677TT e níveis séricos de folato significativamente mais baixos comparados com homozigotos *MTHFR* 677CC,<sup>(71,162)</sup> com níveis intermediários na presença do genótipo heterozigoto.<sup>(162)</sup>

Em relação ao polimorfismo *MTR* A2756G, Geisel *et al.* (2001)<sup>(163)</sup> não encontraram associação entre este polimorfismo e concentrações de MMA. Hyndman *et al.* (2000)<sup>(152)</sup> não observaram influência da variante *MTR* A2756G nos níveis de vitamina B<sub>12</sub> em indivíduos acometidos por infarto do miocárdio, embora tal influência tenha sido relatada por Klerk *et al.* (2003)<sup>(136)</sup> em doença coronária. Neste último estudo, indivíduos com genótipo *MTR* 2756GG apresentaram níveis significativamente mais baixos de vitamina B<sub>12</sub>. Esse resultado não foi esperado, segundo os autores, uma vez que polimorfismo associado com alteração da atividade enzimática não seria capaz de afetar os níveis de seu cofator.

O polimorfismo *MTR* A2756G não foi associado aos níveis plasmáticos de folato no presente trabalho. Alguns estudos mostram um aumento das concentrações de folato associada ao alelo *MTR* 2756G,<sup>(138,164)</sup> embora tal associação não tenha sido confirmada por estudo de Klerk *et al.* (2003)<sup>(136)</sup> em pacientes com doença coronária.

### **Ingestão de micronutrientes**

A ingestão de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> não apresentaram relação com a DAC, assim como com Hcy, folato e MMA plasmáticos. Em estudo de Shimakawa *et al.*

(1997)<sup>(165)</sup> foram observados resultados semelhantes entre dieta de folato e vitaminas B e níveis plasmáticos de Hcy em pacientes com aterosclerose de carótida e indivíduos-controle. Não foram encontradas correlações entre ingestão e níveis séricos de folato e vitamina B<sub>12</sub> em estudo de Huerta *et al.* (2004).<sup>(157)</sup> Uma vez que existem diversos processos homeostáticos que regulam a absorção, transporte e estocagem das vitaminas ingeridas, e mecanismos que modulam os níveis plasmáticos dessas vitaminas de acordo com o requerimento fisiológico e quantidades ingeridas, a relação entre o consumo e as concentrações séricas dessas vitaminas não seria esperada.<sup>(166)</sup>

Os valores de ingestão diária das vitaminas em ambos os grupos de pacientes neste estudo se mostraram abaixo dos valores mínimos de consumo (EAR) para folato e vitamina B<sub>6</sub>, com exceção da vitamina B<sub>12</sub>, que apresentou níveis acima do valor recomendado.<sup>(100)</sup> Ainda assim, a ingestão de vitamina B<sub>12</sub> não mostrou influência nas concentrações de Hcy.

Uma dieta caracterizada por alta ingestão de alimentos ricos em folato e vitaminas B foi associada com baixas concentrações de Hcy.<sup>(156,167)</sup> Efeitos benéficos da ingestão de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> na DAC são biologicamente plausíveis, uma vez que estas vitaminas estão inversamente associadas com os níveis de Hcy, que pode causar danos vasculares via acúmulo de substâncias tóxicas em células endoteliais e geração de radicais livres.<sup>(78,168)</sup>

Em indivíduos com deficiências vitamínicas, a suplementação tem se mostrado eficiente na redução da Hcy. Doses diárias de 400 µg de ácido fólico combinados com 12,5 mg de vitamina B<sub>6</sub> e 500 µg de vitamina B<sub>12</sub> se mostraram eficientes para a normalização dos níveis de Hcy em pacientes com DAC.<sup>(169)</sup> Uma meta-análise revelou que 0,4 a 5mg de ácido fólico reduziram os níveis de Hcy em 25% em indivíduos com

ou sem doença vascular.<sup>(70)</sup> Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de folato e vitamina B<sub>6</sub> pode influenciar a ocorrência dos principais eventos relacionados à DAC. Indivíduos que consumiram mais de 400 µg de folato ou 3 mg de vitamina B<sub>6</sub> diariamente tiveram um risco reduzido para doença cardíaca em relação àqueles com níveis de ingestão mais baixos.<sup>(170)</sup> Além disso, placas em artéria carótida regrediram em pacientes com hiper-homocisteinemia suplementados com quantidades de 2,5 a 5 mg de ácido fólico, 25 mg de vitamina B<sub>6</sub> e 250 µg de vitamina B<sub>12</sub> diários durante 4 anos.<sup>(171)</sup> Dessa forma, a investigação dos níveis plasmáticos dessas vitaminas, bem como da ingestão de micronutrientes envolvidos no metabolismo da Hcy, mostra-se de grande importância para o esclarecimento dos fatores envolvidos no aumento do risco para o desenvolvimento da DAC.



***CONCLUSÕES***

---

## 5. CONCLUSÕES

- O desenvolvimento da DAC está associado à hipertensão arterial, diabetes, tabagismo e níveis de HDLc < 40mg/dL.

- As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos estudados não diferenciam pacientes com DAC e controles.

- O genótipo *VEGF* -2578AA apresenta relação com a extensão da DAC, sugerindo que a diminuição da expressão de VEGF, resultante deste genótipo, promove o desenvolvimento da aterosclerose.

- O polimorfismo *MTHFR* A1298C apresenta relação com as concentrações de folato plasmático.

- Deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, refletida pela quantificação de MMA, é importante fator de risco tanto para a hiper-homocisteinemia quanto para a DAC.

- A ingestão de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> não mostraram relação com a DAC, assim como com níveis plasmáticos de Hcy, folato e MMA.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-74.
3. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Almeida JR, Anderson TJ, Verna S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*. 2003; 108:1917-23.
4. Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Nino E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin (IL)-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-I expression in cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999; 99:420-6.
5. Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, et al. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 1999; 99:993-8.
6. Lindstedt KA, Leskinen MJ, Kovanen PT. Proteolysis of the pericellular matrix: a novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1350-8.
7. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart* 1999; 82:265–268.
8. Ambrose JA, Tannenbaum MA, Alexopoulos D, Hjendahl-Monsen CE, Leavy J, Weiss M, et al. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12:56-62.
9. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-50.

10. Mitty HA. Advances in angiography and their impact on endovascular therapy. *Mt Sinai J Med* 2003; 70:359-63.
11. Lusic AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233–41.
12. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98:2108-16.
13. Fleisch M, Billinger M, Eberli FR, Garachemani AR, Meier B, Seiler C. Physiologically assessed coronary collateral flow and intracoronary growth factor concentrations in patients with 1- to 3-vessel coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100:1945-50.
14. Howell WM, Ali S, Rose-Zerilli MJ, Ye S. VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J Med Genet* 2005; 42:485-90.
15. Berse B, Brown LF, van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3:211–20.
16. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189–95.
17. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; 25: 913–7.

18. Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tjiburg P, Borden L, et al. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood* 1993; 81:2767–73.
19. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172:1535–45.
20. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87:3336–43.
21. Grosskrutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 1999; 58:128–6.
22. Leung DW, Cachianes G, Kuang W, Goeddel DV. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-12.
23. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267:26031–7.
24. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzenbichler B, Kearney M, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 1997; 3:879-86.
25. Van Belle E, Tio FO, Chen D, Maillard L, Chen D, Kearney M, et al. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:1371-9.

26. Socki T, Yamura Y, Shinohara H, Tanaka H, Bando K, Fukud N. Role of circulating vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in patients with coronary artery disease. *Heart Vessels* 2000; 15:105-11.
27. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28:131–8.
28. Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, Langille BL. Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum, *Cell Tissue Res* 2002; 307:303–13.
29. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' untranslated regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 1999; 60:1245–9.
30. Watson CJ, Webb NJA, Bottomley MJ, Brenchley PEC. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12:1232–5.
31. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000; 37:443–8.
32. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV. Polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene are associated with increased risk of acute rejection in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:260–4.
33. Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, Davoodi G, Mahmoodian M, Fallah N, et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* 2006; 6:38.

- 
34. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 Suppl 2:40-4.
35. Morris MS, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2000; 152:140-8.
36. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12:279-98.
37. Dunn J, Title LM, Bata I, Johnstone DE, Kirkland SA, O'Neill BJ, et al. Relation of a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase to plasma homocysteine and early onset coronary artery disease. *Clin Biochem* 1998; 31:95-100.
38. Mager A, Battler A, Birnbaum Y, Magal N, Shohat M. Plasma homocysteine, methylene-tetrahydrofolate reductase genotypes, and age at onset of symptoms of myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 2002; 89:919-23.
39. Cesari M, Rossi GP, Sticchi D, Pessina AC. Is homocysteine important as risk factor for coronary heart disease? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:140-7.
40. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1042-50.
41. Wang G, Woo CW, Sung FL, Siow YL, O K. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1777-83.
42. Silverman MD, Tumuluri RJ, Davis M, Lopez G, Rosenbaum JT, Lelkes PI. Homocysteine upregulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured human aortic endothelial cells and enhances monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:587-92.



43. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77:1370-6.
44. Laraqui A, Allami A, Carrie A, Coiffard AS, Benkouka F, Benjouad A. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2006; 61:51-61.
45. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary disease in the French population. *Thromb Haemost* 2005; 94:510-5.
46. Niclot S, Pruvot Q, Besson C, Savoy D, Macintyre E, Salles G, et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. *Blood* 2006; 108:278-85.
47. Haviv YS, Shpichinetsky V, Goldschmidt N, Atta IA, Ben-Yehuda A, Friedman G. The common mutations C677T and A1298C in the human methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 92:120-6.
48. Ono H, Sakamoto A, Mizoguchi N, Sakura N. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene contributes to hyperhomocysteinemia in patients taking anti-convulsants. *Brain Dev* 2002; 24:223-6.
49. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries. Responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res* 1988; 62:515-23.

50. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Gene Polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. *J Cardiol* 1997; 29:309-15.
51. Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K, et al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis* 1999; 143:163-70.
52. Bova I, Chapman J, Sylantiev C, Korczyn AD, Bornstein NM. The A677V methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke* 1999; 30:2180-2.
53. Jee SH, Song KS, Shim WH, Kim HK, Suh I, Park JY, et al. Major gene evidence after MTHFR-segregation analysis of serum homocysteine in families of patients undergoing coronary arteriography. *Hum Genet* 2002; 111:128-35.
54. Dedoussis GVZ, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Skoumas J, Choumerianou D, et al. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2005; 100:409-14.
55. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354:407-13.
56. Couffinhal T, Kearney M, Witzendichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997; 150:1673-85.
57. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64:169-72.

58. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Ellison RC, et al. The 1298A3C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001; 156:409–415.
59. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:14853-8.
60. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044-51.
61. Szczeklik A, Sanak M, Jankowski M, Dropinski J, Czachor R, Musial J, et al. Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia. *Am J Med Genet* 2001; 101:36-9.
62. Kluijtmans LAJ, Kastelein JIP, Lindemans J, Boers GHJ, Heil S, Brusckhe AVG, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96:2573-7.
63. Mager A, Lalezari S, Shohat T, Birnbaum, Adler Y, Magal N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and early-onset coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100:2406-10.
64. Payne DA, Chamoun AJ, Seifert SL, Stouffer GA. MTHFR 677 C→T mutation. A predictor of early-onset coronary artery disease risk. *Thromb Res* 2001; 103:275-9.
65. Loktionov A, Vorster H, O'Neill IK, Nell T, Bingham SA, Runswick SA, et al. Apolipoprotein e and methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in relation to other risk factors for cardiovascular disease in UK caucasians and black South Africans. *Atherosclerosis* 1999; 145:125-35.

66. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem* 2001; 47:661-6.
67. Rothenbacher D, Fischer HG, Hoffmeister A, Hoffmann MM, Marz W, Bode G, et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters. *Atherosclerosis* 2002; 162:193-200.
68. Zhang G and Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes in chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular disease. *Thromb Res* 2001; 104:187-95.
69. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999; 99:178-82.
70. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998; 316:894-8.
71. Kolling K, Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schomig A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93:1201-6.
72. Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CCH, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamin A, C, and E and carotene. *Lancet* 1991; 337:1-5.

73. Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the established populations for epidemiological studies of the elderly. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:190-6.
74. Nishtar S. The role of vitamins as risk modifying agents in coronary artery disease. *Pak J Cardiol* 1999; 10:5-7.
- 75- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277:1775-81.
76. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P, et al. Low circulating folate and vitamin B<sub>6</sub> concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease: European COMAC Group. *Circulation* 1998; 97:437-43.
77. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693-8.
78. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, and folate. *Am J Epidemiol* 1996; 143:845-59.
79. Bates CJ, Pentieva KD, Prentice A, Mansoor MA, Finch S. Plasma pyridoxal phosphate and pyridoxic acid and their relationship to plasma homocysteine in a representative sample of British men and women aged 65 years and over. *Br J Nutr* 1999; 81:191-201.

- 
80. Verhoef P, Meleady R, Daly LE, Graham IM, Robinson K, Boers GH. Homocysteine, vitamin status and risk of vascular disease: effects of gender and menopausal status. European COMAC Group. *Eur Heart J* 1999; 20:1234-44.
81. Robertson J, Iemolo F, Stabler SP, Allen RH, Spence JD. Vitamin B12, homocysteine and carotid plaque in the era of folic acid fortification of enriched cereal grain products. *CMAJ* 2005; 172:1569-73.
82. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999; 159:1289-98.
83. Gültepe M, Ozcan O, Avsar K, Cetin M, Ozdemir AS, Gok M. Urine methylmalonic acid measurements for the assessment of cobalamin deficiency related to neuropsychiatric disorders. *Clin Biochem* 2003; 36:275-82.
84. Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K, Rassoul F, Richter V. Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians. *Clin Chem* 2001, 47:1094-101.
85. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Elevated serum methylmalonic acid concentrations are common among elderly Americans. *J Nutr* 2002; 132:2799-803.
86. Obeid R, Jouma M, Herrmann W. Cobalamin status (holo-transcobalamin, methylmalonic acid) and folate as determinants of homocysteine concentration. *Clin Chem* 2002; 48:2064-5.
87. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* 2000; 46:1277-83.
88. Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cattaruzza T, Cazzato G, Bava A. Vitamin B12 and folate depletion in cognition: a review. *Neurol India* 2004; 52:310-8.

89. Monsen ALB, Ueland MP. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:7-21.
90. Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, Von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. Prevalence of the mutation C677-->T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med* 1998; 78:332-5.
91. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
92. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of [2,3-<sup>14</sup>C] acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol* 1994; 9:191-8.
93. Guerzoni AR. Polimorfismos dos genes do fator de crescimento endotelial vascular e da enzima metilenotetrahidrofolato redutase na doença arterial coronária [tese]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, 2005.
94. Wolf G, Aigner RM, Schaffler G, Langsenlehner U, Renner W, Samonigg H, et al. The 936C>T polymorphism of the gene for vascular endothelial growth factor is associated with 18F-fluorodeoxyglucose uptake. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88:205-8.
95. Ranjith N, Pegoraro RJ, Rom L. Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in a young South African Indian-based population with acute myocardial infarction. *Cardiovasc J S Afr* 2003; 14:127-32.
96. Haddad R, Mendes MA, Hoehr NF, Eberlin MN. Amino acid quantitation in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma. *Analyst* 2001; 126:1212-15.

97. Vellasco AP, Haddad R, Eberlin MN, Höehr NF. Combined Cysteine & Homocysteine Quantitation in Plasma by Trap & Release Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Analyst* 2002; 127:1050-3.
98. Arnadóttir M, Hultber, B, Vladov V, Nilsson-Ehle P, Thysell H. Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61:509-12.
99. Ribeiro AB, Cardoso MA. Construção de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. *Revista de Nutrição-Campinas* 2002; 15:201-7.
100. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington (DC) National Academy Press; 1998.
101. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human Mol Genet* 1996; 5:1867-74.
102. Lawes CM, Rodgers A, Bennett DA, Parag V, Suh I, Ueshima H, et al. Blood pressure and cardiovascular disease in the Asia Pacific region. *J Hypertens* 2003; 21:707-16.
103. Prati P, Vanuzzo D, Casaroli M, Bader G, Mos L, Pilotto L, et al. Determinants of Carotid Plaque Occurrence. A Long-Term Prospective Population Study: the San Daniele Project. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22:416-22.
104. Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 2006; 29:375-87.



105. Norhammar A, Malmberg K, Diderholm E, Lagerqvist B, Lindahl B, Rydén L, et al. diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:585-91.
106. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Kokina I, Uotila S, Ahtialansaari T, et al. VEGF-A, VEGF-D, VEGF receptor-1, VEGF receptor-2, NF- $\kappa$ B, and RAGE in atherosclerotic lesions of diabetic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J*. No prelo 2006.
107. Negri E, Franzosi MG, La Vecchia C, Santoro L, Nobili A, Tognoni G. Tar yield of cigarettes and risk of acute myocardial infarction: GISSI-EFRIM Investigators. *BMJ* 1993; 306:1567–70.
108. Centers for Disease Control and Prevention. Annual smoking attributable mortality, years of potential life lost, and economic costs—United States, 1995–1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 5:300–3.
109. LaCroix AZ, Lang J, Scherr P, Wallace RB, Cornoni-Huntley J, Berkman L, et al. Smoking and mortality among older men and women in three communities. *N Engl J Med* 1991; 324: 1619–25.
110. Miyake Y. Risk factors for non-fatal acute myocardial infarction in middle-aged and older Japanese. Fukuoka heart study group. *Jpn Circ J* 2000; 64: 103–9.
111. Clarkson TB, Weingand KW, Kaplan JR, Adams MR. Mechanisms of atherogenesis. *Circulation* 1987; 76:20–8.
112. Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, et al. Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1161–7.

- 
113. Sumida H, Watanabe H, Kugiyama K, Ohgushi M, Matsumura T, Yasue H. Does passive smoking impair endothelium-dependent coronary artery dilation in women? *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:811–5.
114. Mayhan WG, Patel KP. Effect of nicotine on endothelium dependent arteriolar dilatation in vivo. *Am J Physiol* 1997; 272:2337–42.
115. Ota Y, Kugiyama K, Sugiyama S, Ohgushi M, Matsumura T, Doi H, et al. Impairment of endothelium dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract—role of free radicals and attenuation by captopril. *Atherosclerosis* 1997; 131:195–202.
116. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5:88–97.
117. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG, Cushman M, Cornell ES, et al. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2167–76.
118. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997; 78:273–7.
119. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol* 2002; 89:1117–9.
120. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ* 1989; 298:784-8.

121. Alagona C, Soro A, Westerbacka J, Ylitalo K, Salonen JT, Salonen R, et al. Low HDL cholesterol concentration is associated with increased intima-media thickness independent of arterial stiffness in healthy subjects from families with low HDL cholesterol. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:457-63.
122. Von Birgelen C, Hartmann M, Mintz GS, Baumgart D, Schmermund A, Erbel R. Relation between progression and regression of atherosclerotic left main coronary artery disease and serum cholesterol levels as assessed with serial long-term (> or =12 months) follow-up intravascular ultrasound. *Circulation* 2003; 108:2757-62.
123. Satoh H, Nishino T, Tomita K, Saijo Y, Kishi R, Tsutsui H. Risk factors and the incidence of coronary artery disease in young middle-aged Japanese men: results from a 10-year cohort study. *Intern Med* 2006; 45:235-9.
124. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58:342-74.
125. Vitarelli A, De Curtis G, Conde Y, Colantonio M, Di Benedetto G, Pecce P, et al. Assessment of congenital coronary artery fistulas by transesophageal color Doppler echocardiography. *Am J Med* 2002; 113:127-33.
126. Peace RA, Staff RT, Gemmell HG, Mckiddie FI, Metcalfe MJ. Automatic detection of coronary artery disease in myocardial perfusion SPECT using image registration and voxel to voxel statistical comparisons. *Nucl Med Commun* 2002; 23:785-94.
127. Rodrigues O, Picano E, Fedele S, Morelos M, Marzilli M. Noninvasive prediction of coronary artery disease progression by comparison of serial exercise

electrocardiography and dipyridamole stress echocardiography. *Inr J Cardiovasc Imaging* 2002; 18:93-9.

128. Haraldsson H, Ohlsson M, Edenbrandt L. Value of exercise data for the interpretation of myocardial perfusion SPECT. *J Nucl Cardiol* 2002; 9:169-73.

129. Nieman K, Rensing BJ, Van Geuns RJ, Munne A, Ligthart JM, Pattynama PM, et al. Usefulness of multislice computed tomography for detecting obstructive coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2002; 89:913-8.

130. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature Medicine* 2001; 7:425-9.

131. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, et al. Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:955-63.

132. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvain E, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4736-41.

133. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94:2410-6.

134. Anderson JL, King GJ, Thomson MJ, Todd M, Bair TL, Muhlestein JB, et al. A mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1206-11.

135. van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Vasikaran SD, Taylor RR. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95: 21–3.
136. Klerk M, Lievers KJA, Kluijtmans LAJ, Blom HJ, den Heijer M, Schouten EG, et al. The 2756A>G in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. *Thromb Res* 2003; 110:87-91.
137. Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, et al. Polymorphism of the methionine synthase gene-association with homocysteine metabolism and late-onset vascular diseases in the Japanese population. *Arteriol Thromb Vasc Biol* 1999; 19:298–302.
138. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;154:667– 72.
139. Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JWG, Young IS, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Gen Epidemiol* 1999; 17:298– 309.
140. Wang XL, Cai H, Cranney G, Wilcken DE. The frequency of a common mutation of the methionine synthase gene in the Australian population and its relation to smoking and coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5:289 – 95.
141. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004; 11 Suppl 1:56-64.

142. Nihei S, Tasaki H, Yamashita K, Ozumi K, Morishita T, Tsutsui M, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with human coronary atherosclerosis through the reduction of the ratio of endothelium-bound to basal extracellular superoxide dismutase. *Cir J* 2004; 68:822-8.
143. Yilmaz H, Isbir S, Agachan B, Ergen A, Farsak B, Isbir T. C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 2006; 24:87-90.
144. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274:1526-33
145. Morris MS, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2000; 152:140-8.
146. Kim CH, Hwang KY, Choi TM, Shin WY, Hong SY. The methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Koreans with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2001; 78:13-7.
147. Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Müller JM. Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001; 154:651-8.

148. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood* 2004; 104:3046-51.
149. Huh HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ. Gene-nutrition interactions in coronary artery disease: Correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population. *Thromb Res* 2006; 117:501-6.
150. Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, Rosendaal FR, Beverly RK, Hess DL, et al. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation* 1997; 96:81-9.
151. van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 1997; 90:511-7.
152. Hyndman ME, Bridge PJ, Warnica JW, Fick G, Parsons HG. Effect of heterozygosity for the methionine synthase 2756 A-->G mutation on the risk for recurrent cardiovascular events. *Am J Cardiol*. 2000; 86:1144-6.
153. D'Angelo A, Coppola A, Madonna P, Fermo I, Pagano A, Mazzola G, et al. The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombotic events. *Thromb Haemost* 2000; 83:563-70.

154. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ. Vitamins B6, B12, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998; 17:435-41.
155. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; 98:204– 10.
156. Iqbal MP, Ishaq M, Kazmi KA, Yousuf FA, Mehboobali N, Ali SA, et al. Role of vitamins B6, B12 and folic acid on hyperhomocysteinemia in a Pakistani population of patients with acute myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:100-8.
157. Huerta JM, González S, Vigil E, Prada M, Martín JS, Fernández S, et al. Folate and cobalamin synergistically decrease the risk of high plasma homocysteine in a nonsupplemented elderly institutionalized population. *Clin Biochem* 2004; 37:904-10.
158. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:217-46.
159. Kapiszewska M, Kalemba M, Wojciech U, Milewicz T. Uracil misincorporation into DNA of leukocytes of young women with positive folate balance depends on plasma vitamin B12 concentrations and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. A pilot study. *J Nutr Biochem* 2005; 16:467-78.
160. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:13217- 20.
161. Girelli D, Martinelli N, Pizzolo F, Friso S, Olivieri O, Stranieri C, et al. The Interaction between MTHFR 677 C3T Genotype and Folate Status Is a Determinant of Coronary Atherosclerosis Risk. *J Nutr* 2003; 133:1281-5.



162. Kluijtmans LAJ, Young IS, Boreham CA, Murray L, McMaster D, McNulty H, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101:2483-8.
163. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hubner U, et al. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:698-704.
164. Lucock M, Daskalakis I, Briggs D, Yates Z, Levene M. Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677c --> t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756a --> g methionine synthase genotypes. *Mol Genet Metab* 2000; 70:27-44.
165. Shimakawa T, Nieto FJ, Malinow MR, Chambless LE, Schreiner PJ, Szklo M. Vitamin intake: a possible determinant of plasma homocyst(e)ine among middle-aged adults. *AEP* 1997; 7:285-93.
166. Riboli E, Ronnholm H, Saracci R. Biological markers of diet. *Cancer Surv* 1987; 6:685– 718.
167. Lasheras C, Huerta JM, Gonzalez S, Brana AF, Patterson AM, Fernandez S. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. *Free Radic Res* 2002; 36:875– 82.
168. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58:731-41.
169. Lobo A, Naso A, Arheart K, Kruger WD, Abou-Ghazala T, Alsous F, et al. Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. *Am J Cardiol* 1999; 83:821-5.

170. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998; 279:359-64.

171. Peterson JC, Spence JD. Vitamins and progression of atherosclerosis in hyperhomocyst(e)inaemia. *Lancet* 1998; 351:263.

## ***APÊNDICE E ANEXOS***

---

**FORMULÁRIO DE PESQUISA**

NOME.....  
 RG.....PRONTUÁRIO.....  
 ENDEREÇO.....  
 CIDADE.....CEP.....-.....  
 TELEFONE..... DATA DE NASCIMENTO ...../...../.....  
 PESO.....ALTURA.....ETNIA.....

**Classificação Clínica:**

Com DAC ( )                      Sem DAC ( )

Cineangiocoronariografia:

Artéria comprometida:    DA ( )    CD ( )    CX ( )

Grau de obstrução: <50%( ) 50 – 75%( ) 75 – 95%( ) >95%( )

Comprometimento ventricular:    Sim ( )              Não ( )

Medicamentos em

uso:.....

β-bloqueadores ( )    Hipolipemiantes ( )    Diuréticos ( )

**antecedentes pessoais:**

Tabagismo: S( ) N( )    Tempo.....    No de cigarros/dia.....

Etilismo: S( ) N( )    Tempo.....    doses/dia.....

Doença Renal ( )    HAS ( )    DM ( )    Sedentarismo ( )

Angina ( )    Enfarto ( )

**Antecedentes Familiares:**

HAS ( )    DM ( )    DAC ( )

Grau de parentesco:.....

Exames complementares:

CT.....    HDL.....    LDL.....    VLDL.....    TG.....



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 262/2001

Processo nº 25000.015909/2001-82      Registro CONEP = 2106 (Protocolo CEP 0629/2001)  
**Projeto de Pesquisa:** " Polimorfismo dos genes do Fator de Crescimento Endotelial Vascular e da enzima Metilenotetrahidrofolato redutase na doença obstrutiva coronária".  
**Pesquisador Responsável:** Dra. Eny Maria Goloni Bertollo  
**Instituição:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto / FAMERP  
**Área Temática Especial:** Genética Humana.

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

- a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 22 de março de 2001.

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP-MS



## FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n° 8899 de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal n° 74.179 de 14/06/74)

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto tomou ciência e aprovou a solicitação de extensão do projeto de pesquisa intitulado "Polimorfismo dos genes do fator de crescimento endotelial vascular e da enzima metilenotetrahidrofolato redutase na doença obstrutiva coronariana" - Proce. CEP n° 0629/2001, sob responsabilidade da Pesquisadora Eny Maria Goloni Bertollo.

São José do Rio Preto, 10 de outubro de 2005.

**Prof. Dr. Antonio Carlos Pires**  
Coordenador do CEP/FAMERP

**PESQUISA SOBRE HÁBITOS ALIMENTARES**

Registro \_ \_ \_

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ anos Sexo (1) M (2) F

Peso habitual? \_\_\_\_\_ kg Peso aos 21 anos? \_\_\_\_\_ kg Altura? \_\_\_\_\_ cm

Você mudou seus hábitos alimentares recentemente ou está fazendo dieta? \_ \_ , \_ \_

- (1) Não (5) sim, redução de sal  
 (2) sim, para perda de peso (6) sim, redução de colesterol/triglicérides  
 (3) sim, sob orientação médica (7) ganho de peso  
 (4) sim, dieta vegetariana

GRUPO DO LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Leite integral (puro/ com café ou chocolate)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo pequeno (150 ml)	P M G O O O	_____
Leite desnatado (puro/ com café ou chocolate)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo pequeno (150 ml)	P M G O O O	_____
Iogurte natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo americano (200 ml)	P M G O O O	_____
Iogurte aromatizado ("com frutas")	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo americano (200 ml)	P M G O O O	_____
Queijo fresco ou ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia (30 g)	P M G O O O	_____
Queijo prato, mussarela, provolone, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia (20 g)	P M G O O O	_____
GRUPO DOS PÃES, BISCOITOS E CEREAIS MATINAIS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Pão francês, pão de forma	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (50 g)	P M G O O O	_____
Pão integral, trigo, centeio	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 fatias (50 g)	P M G O O O	_____
Pão sovado, doce, croissant, pão de queijo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 unidades peq. (40g)	P M G O O O	_____
Biscoito salgado ou doce, torradas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 unidades (21 g)	P M G O O O	_____
Requeijão passado no pão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colh. sobr. (20 g)	P M G O O O	_____
Margarina <i>light</i> passada no pão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ponta de faca (2,5 g)	P M G O O O	_____
Margarina comum (não <i>light</i> ) passada no pão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ponta de faca (2,5 g)	P M G O O O	_____
Manteiga passada no pão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 pontas de faca (5 g)	P M G O O O	_____
Geléia ou mel em pães ou biscoitos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colh. sopa (15g)	P M G O O O	_____
Aveia, granola e outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 colh. sopa (26 g)	P M G O O O	_____
GRUPO DOS CEREAIS, TUBÉRCULOS E MASSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 escumadeira (77,5 g)	P M G O O O	_____
Batata frita ou mandioca frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colh. sopa (50 g)	P M G O O O	_____
Batata, mandioca, inhame, cará	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (70 g)	P M G O O O	_____
Batata doce ou abóbora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unid. (70 g)	P M G O O O	_____
Massas (macarronada, lasanha, nhoque, panqueca, pizza)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 prato sobr.(95 g) ou 1 ½ fatia	P M G O O O	_____

Pastelaria salgada (coxinha, pastel, esfiha, torta salgada)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade grande (110g)	P M G O O O	----
Farofa, farinha de milho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colh. sopa (25 g)	P M G O O O	----
<b>GRUPO DAS LEGUMINOSAS</b>	<b>QUANTAS VEZES VOCÊ COME</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>PORÇÃO MÉDIA (M)</b>	<b>SUA PORÇÃO</b>	<b>CODIF.</b>
Feijão roxo, carioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha ( 110 g )	P M G O O O	----
Ervilha, lentilha, grão-de-bico, feijão branco, soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ½ colh. sopa (30 g)	P M G O O O	----
Feijoada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha cheia ( 225 g )	P M G O O O	----
<b>GRUPO DE VERDURAS/LEGUMES E SOPAS</b>	<b>QUANTAS VEZES VOCÊ COME</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>PORÇÃO MÉDIA (M)</b>	<b>SUA PORÇÃO</b>	<b>CODIF.</b>
Alface, escarola, agrião, rúcula, almeirão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 folhas ( 30 g )	P M G O O O	----
Repolho, acelga, couve-flor	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 a 3 colh. sopa ( 45g )	P M G O O O	----
Couve, brócolos, espinafre cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 colh. sopa ( 45g )	P M G O O O	----
Cenoura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colheres sopa (25g)	P M G O O O	----
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade pequena ( 50 g )	P M G O O O	----
Berinjela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colh. sopa ( 50 g )	P M G O O O	----
Beterraba, vagem, chuchu, abobrinha, milho verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colh. sopa (40g)	P M G O O O	----
Salada de maionese	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 pires (90 g)	P M G O O O	----
Sopas (de legumes, cremosa e outras)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 prato fundo (520 g)	P M G O O O	----
<b>GRUPO DAS FRUTAS</b>	<b>QUANTAS VEZES VOCÊ COME</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>PORÇÃO MÉDIA (M)</b>	<b>SUA PORÇÃO</b>	<b>CODIF.</b>
Laranja, mixirica, ponkan	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade ( 180g )	P M G O O O	----
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (60 g)	P M G O O O	----
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade pequena ( 80 g )	P M G O O O	----
Mamão, papaya	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	½ unid (155 g)	P M G O O O	----
Melancia, melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média ( 90 g )	P M G O O O	----
Uva, abacaxi, goiaba, na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 cacho pequeno ou 1 unidade	P M G O O O	----
Abacate na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 xícara chá ( 130 g )	P M G O O O	----
Manga, caqui, na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	4 pedaços (100 g)	P M G O O O	----
Outras frutas (figo, pêssego, morango, ameixa, nectarina, frutas em calda)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade ( 60 g )	P M G O O O	----
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo americano (200 ml)	P M G O O O	----
Suco de outras frutas naturais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo americano (200 ml)	P M G O O O	----
<b>GRUPO DAS CARNES E OVOS</b>	<b>QUANTAS VEZES VOCÊ COME</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>PORÇÃO MÉDIA (M)</b>	<b>SUA PORÇÃO</b>	<b>CODIF.</b>
Carne bovina	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 bife médio (100 g)	P M G O O O	----
Carne de porco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (165 g)	P M G O O O	----



Carne de frango, chester, peru	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 filé (100g)	P M G O O O	----
Peixe fresco ou congelado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 filé (130g)	P M G O O O	----
Miúdos (coração, moela, fígado, bucho/dobradinha)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 pedaços (100 g)	P M G O O O	----
Camarão, lula, frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 escumadeira (120 g)	P M G O O O	----
Embutidos (linguiça, salsicha)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidades ( 60 g )	P M G O O O	----
Presunto, mortadela, outros frios	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ½ fatia (22 g)	P M G O O O	----
Ovos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade ( 50 g )	P M G O O O	----
<b>GRUPO DAS BEBIDAS</b>	<b>QUANTAS VEZES VOCÊ COME</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>PORÇÃO MÉDIA (M)</b>	<b>SUA PORÇÃO</b>	<b>CODIF.</b>
Cafê	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 copo pequeno ( 75 ml )	P M G O O O	----
Açúcar no café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colh. sopa cheia (29 g)	P M G O O O	----
Adoçante no café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 –4 gotas ou 1 envelope (0,8 g)	P M G O O O	----
Chá preto ou mate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 xícara ( 200 ml )	P M G O O O	----
Chá de ervas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 xícara ( 200 ml )	P M G O O O	----
Água	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo americano ( 200 ml )	P M G O O O	----
Cerveja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	350 ml (1lata)	P M G O O O	----
Pinga, caipirinha, whisque, vodka, conhaque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	68 ml (1 1/2 dose)	P M G O O O	----
Vinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 cálices (100 ml)	P M G O O O	----
Sucos artificiais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo grande (300 ml)	P M G O O O	----
Refrigerante <i>diet</i>	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo grande (300 ml)	P M G O O O	----
Refrigerante normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo grande (300 ml)	P M G O O O	----
<b>GRUPO DE DOCES E MISCELÂNEAS</b>	<b>QUANTAS VEZES VOCÊ COME</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>PORÇÃO MÉDIA (M)</b>	<b>SUA PORÇÃO</b>	<b>CODIF.</b>
Bolo, tortas, paves	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia/1 pedaço (100g)	P M G O O O	----
Chocolates, brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 unid./1 barra (30 g)	P M G O O O	----
Sorvetes ou milk-shake	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (80 g)	P M G O O O	----
Pudins, flans, curau, arroz doce, doce de leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade ( 100 g )	P M G O O O	----
Doce de abóbora ou de batata doce, goiabada, marmelada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher sopa ( 30 g )	P M G O O O	----
Amendoim, castanha de cajú, castanha do pará	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 xícara chá (50 g)	P M G O O O	----
Salgadinhos, chips, torresmo, pipoca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	½ pacote (50 g)	P M G O O O	----

	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	
Com que frequência você usa gordura ou óleo no preparo de suas refeições?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	— — — —
Quantas porções de vegetais (verduras e legumes) você costuma comer, sem incluir saladas ou batatas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	— — — —
Quantas porções de frutas você costuma comer, sem incluir sucos de frutas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	— — — —

Por favor, liste qualquer outro alimento ou preparação importante que você costuma comer ou beber pelo menos **UMA VEZ POR SEMANA**, que não foram citados no questionário.

CÓDIGO	ALIMENTO	FREQUÊNCIA POR SEMANA	CODIF.
			— — — —
			— — — —

- Quantas refeições você faz por dia? \_\_\_\_\_
- Quantas refeições você faz fora de casa, por semana? \_\_\_\_\_
- Em que local você costuma fazer as suas refeições fora de casa?  
 Restaurante: (1) por quilo, *self-service* (4) leva marmita (7) não faz  
 (2) restaurante do trabalho (5) bar, padaria  
 (3) lanches rápidos (Mc Donald's, Bob's) (6) outro \_\_\_\_\_
- Que tipo de óleo/gordura você costuma usar no preparo (cozimento) de suas refeições? \_\_\_\_, \_\_  
 (1) óleos vegetais (soja, milho, outros) (2) margarina e/ou manteiga (3) azeite de oliva  
 (4) banha (5) bacon (6) não usa (7) não sabe
- Que tipo de óleo/gordura você costuma adicionar em saladas, legumes e outros vegetais? \_\_\_\_, \_\_  
 (1) óleos vegetais (soja, milho, outros) (2) azeite de oliva (3) margarina e/ou manteiga  
 (4) maionese/ molhos prontos (5) bacon (6) não usa (7) não sabe
- Quando você come carne de boi/vaca ou de porco, você costuma comer a gordura visível? \_\_  
 (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre
- Quando você come carne de frango, você costuma comer a pele? \_\_  
 (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre
- Você costuma acrescentar:  
 sal na comida depois de pronta? (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre \_\_  
 usar pimenta em suas refeições? (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre \_\_
- Com que frequência você costuma comer carnes fritas/assadas ou grelhadas? \_\_  
 (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre
- Quando você come os seguintes alimentos, com que frequência você consome produtos "light" (com baixo teor de gordura)?  
 Queijo/requeijão (1) sempre (2) algumas vezes (3) raramente \_\_  
 Iogurte/sorvete (1) sempre (2) algumas vezes (3) raramente \_\_  
 Molhos para salada (1) sempre (2) algumas vezes (3) raramente \_\_

**AGRADECEMOS SUA ATENÇÃO E COOPERAÇÃO!**