



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular

Franciele Moraes Amaral

Frequência dos polimorfismos nos genes da metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR) e cistationina beta-sintetase (CBS) em pacientes com evento trombótico da rede pública do Distrito Federal/Brasília e sua relação com os níveis de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína

Brasília
Julho/2012

Franciele Moraes Amaral

Frequência dos polimorfismos nos genes da metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR) e cistationina beta-sintetase (CBS) em pacientes com evento trombótico da rede pública do Distrito Federal/Brasília e sua relação com os níveis de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

Orientador: Dr. Cesar Koppe Grisolia

Co-orientadora: Dra. Ana Luisa Miranda Vilela

Brasília

Julho/2012

*“Quando nasci um anjo esbelto
desses que tocam trombeta, anunciou:
vai carregar bandeira.*

*Cargo muito pesado pra mulher, esta
espécie ainda envergonhada. Aceito
os subterfúgios que me cabem, sem
precisar mentir.*

*Não sou tão feia que não possa casar,
acho o Rio de Janeiro uma beleza e
ora sim, ora não, creio em parto sem dor.
Mas o que sinto escrevo. Cumpro a sina.*

*Inauguro linhagens, fundo reinos
— dor não é amargura.*

*Minha tristeza não tem pedigree,
já a minha vontade de alegria,
sua raiz vai ao meu mil avô.*

*Vai ser coxo na vida é maldição pra homem.
Mulher é desdobrável. Eu sou.”*

Adélia Prado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho, guiar meus passos e me sustentar perante todas as dificuldades proporcionando a realização desse projeto.

Ao meu esposo Arthur, por preencher a minha vida com a sua presença e pela capacidade de simplificar e solucionar os meus problemas.

Às mulheres "desdobráveis" que Deus colocou na minha vida e que me serviram de exemplo de força para que eu superasse todos os obstáculos enfrentados nesse trabalho: minha mãe Zilda, minha co-orientadora Prof^a. Dra. Ana Luisa Miranda Vilela e Dra Margarete Barbosa Daldegan.

À minha co-orientadora Prof^a. Dra. Ana Luisa, admiração e gratidão eterna pelo apoio fundamental em todas as fases desse projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia agradeço pela confiança e participação nesse estudo.

Aos meus familiares e amigos, de quem recebo toda a energia necessária pra prosseguir em meu caminhar.

Aos meus afilhados, Davi e Raul, pelo carinho imenso recebido em cada sorriso.

Aos meus amigos de bancada em especial Graciana, Ieler e Lilian pela colaboração essencial.

A Prof^a. Dra. Maria de Nazaré Klautau por disponibilizar o laboratório de Genética.

Ao Prof César Martins de Sá (*in memorian*) pela colaboração na compra dos *primers* e que um dia ocorra a concretização de um sonho compartilhado: a instalação de um laboratório de biologia molecular no HBDF para beneficiar os pacientes.

Aos meus pacientes, pela lição diária de perseverança.

Aos doadores de sangue e medula óssea da Fundação Hemocentro de Brasília - FHB, pela lição diária de solidariedade.

Ao Laboratório Sabin pela colaboração com a realização das dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína.

À CNPq, FAPDF e CAPES pelo suporte financeiro ao desenvolvimento desse projeto.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e pelas contribuições que foram enriquecedoras.

RESUMO

Trombofilias são definidas como uma predisposição à trombose devido a alterações hematológicas que induzem hipercoagulabilidade sanguínea; podem ser herdadas ou adquiridas. Elas são individualmente caracterizadas por uma grande variabilidade fenotípica, até quando ocorrem dentro da mesma família. Embora as trombofilias hereditárias ocorram, na maioria dos casos, devido a mudanças relacionadas com inibidores fisiológicos da coagulação ou mutações nos genes de fatores de coagulação, os níveis elevados de homocisteína no plasma também podem ser responsáveis por episódios vaso-oclusivos podendo ser adquiridos (deficiências nutricionais de folato e vitaminas B6 e B12) e / ou causados por fatores genéticos (mutações nos genes responsáveis pela expressão de enzimas envolvidas no metabolismo intracelular de homocisteína). Nosso objetivo foi investigar a frequência de polimorfismos Cistationina β -sintetase (CBS) 844ins68 e Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) C677T e A1298C em 85 pacientes ambulatoriais do Hospital de Base do Distrito Federal com o diagnóstico de trombose, de ambos os sexos (65 mulheres e 20 homens) com idades entre 14-56 anos, além de tentar compreender a possível associação de polimorfismos como fatores de risco para eventos trombóticos. Para isso, amostras de sangue foram submetidas à genotipagem por método baseado em PCR e dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína. Todos os marcadores genéticos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Houve diferença significativa entre os sexos nos valores séricos de homocisteína, sendo que os homens apresentaram dosagem mais elevada. Uma correlação positiva e significativa também foi evidenciada entre trombose recorrente e níveis de homocisteína ($p = 0,006$). Associação significativa com o risco de recorrência foi encontrada para homens (*odds ratio* (OR) = 4,214, intervalo de confiança de 95% (IC) = 1,180-15,048, $p = 0,020$), enquanto decréscimo desse risco foi verificado para as mulheres (*odds ratio* (OR) = 0,237, intervalo de confiança de 95% (IC) = 0,066-0,847, $p = 0,020$). A atividade física também foi significativamente associada com a redução do risco de trombose venosa cerebral (TVC) (*odds ratio* (OR) = 0,531, intervalo de confiança de 95% (IC) = 1,056-8,292, $p = 0,035$). Analisados separadamente, cada um dos polimorfismos estudados não teve influência sobre a variabilidade da dosagem sérica, porém quando a interação dos três polimorfismos foi realizada por MANOVA, os resultados foram significativos para homocisteína ($p = 0,000$). Nestas análises de interação, houve diferenças entre genótipos CBS DD e ID ($p = 0,002$); 677

MTHFR CC e genótipos CT ($p = 0,000$) e MTHFR 1298 entre AA e AC ($p = 0,11$), sendo que todos os heterozigotos apresentaram maior valor. Trombozes são eventos de etiopatogenia multigênica e multifatorial, em que o risco de manifestação da doença associado a cada alteração genética isolada é relativamente baixo, contudo a presença de mutações em vários genes aumenta significativamente este risco. Desta forma, nossos resultados indicam que as interações entre esses polimorfismos podem afetar os níveis séricos de homocisteína, onde a heterozigose pode ser um indicador de fator de risco para episódios vaso-oclusivos.

Palavras-chave: trombofilias hereditárias, polimorfismos genéticos, homocisteína

ABSTRACT

Thrombophilias are defined as a predisposition to thrombosis due to hematological changes inducing blood hypercoagulability; they can be inherited or acquired. They are individually characterized by a large phenotypic variability, even when they occur within the same family. Although hereditary thrombophilias are, in most cases, due to changes related to physiological coagulation inhibitors or mutations in the genes of coagulation factors, high levels of plasma homocysteine may also be responsible for vaso-occlusive episodes and may have acquired (nutritional deficiencies of folate and vitamins B6 and B12) and/or genetic causes (mutations in the genes responsible for expression of enzymes involved in the intracellular metabolism of homocysteine). We aimed to investigate the frequency of the polymorphisms Cystathionine β -synthase (CBS) 844ins68 and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C in 85 outpatients of the Hospital de Base do Distrito Federal with a diagnosis of thrombosis, of both genders (65 women and 20 men) aged 14-56 years old, and to try to understand the possible association of such polymorphisms as risk factors for thrombotic events. For this, blood samples were submitted to genotyping by PCR-based methods and serum dosages of folic acid, vitamin B12 and homocysteine. All genetic markers were in Hardy-Weinberg equilibrium. There was significant difference between the genders in the serum homocysteine values, where the males had a higher dosage. A positive significant correlation was also evidenced between recurrent thrombosis and homocysteine levels ($p=0.006$). A significant association with risk of recurrence was found for man (odds ratio (OR) = 4.214; 95% confidence interval (CI) = 1.180-15.048, $p=0.020$), while decrease in this risk was found for women (odds ratio (OR) = 0.237; 95% confidence interval (CI) = 0.066-0.847, $p=0.020$). Physical activity was also significantly associated with reduced risk of cerebral venous thrombosis (CVT) (odds ratio (OR) = 0.531; 95% confidence interval (CI) = 1.056-8.292, $p=0.035$). Analyzed separately, each one of the studied polymorphisms had no influence on serum dosage variability, but when the interaction of the three polymorphisms was performed by MANOVA, results were significant for homocysteine ($p=0.000$). In these interaction analyses, there were differences between CBS DD and ID genotypes ($p=0.002$); MTHFR 677 CC and CT genotypes ($p=0.000$); and MTHFR 1298 AA and AC genotypes ($p=0.11$), where all heterozygous had higher values. Thromboses are events of multigenic and multifactorial etiopathogenesis, where the risk of disease manifestation associated with each single genetic alteration is relatively low, but the presence of mutations in several genes

significantly increases this risk. Thus, our results indicate that interactions among these polymorphisms can affect serum levels of homocysteine, where heterozygosis could be an indicator of risk factor for vaso-occlusive episodes.

Keywords: inherited thrombophilias, genetic polymorphisms, homocysteine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais receptores plaquetários e seus ligantes.....	17
Figura 2: Estágios de desenvolvimento do trombo plaquetário em um sítio de injúria vascular	18
Figura 3: Fase final da formação do tampão plaquetário	19
Figura 4: Modelo da cascata de coagulação proposto na década de 1960.....	20
Figura 5: Componentes do vaso sanguíneo na formação do trombo: colágeno hemostasia primária/ Fator tecidual hemostasia secundária.....	22
Figura 6: Fase de iniciação da coagulação	23
Figura 7: Fase de amplificação e propagação da coagulação.....	24
Figura 8: Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.....	25
Figura 9: Degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico.....	27
Figura 10: Metabolismo da Homocisteína	32
Figura 11: Genotipagem MTHFR C677T e A1298C.....	43
Figura 12: Genotipagem CBS 844ins68/T833C	45
Figura 13: Perfil da amostra de pacientes no grupo total (A) e por sexos (B) quanto a evento familiar de problema cardiovascular ou trombose antes dos 50 anos, intervenções cirúrgicas, atividade física e uso de anticoagulante na coleta dos exames.....	50
Figura 14: Perfil da amostra de pacientes do sexo feminino quanto a uso de anticoncepcional durante o evento e aborto.....	51
Figura 15: Perfil da amostra de pacientes quanto ao tipo de trombose (venosa ou arterial) e recorrência	51
Figura 16: Perfil da amostra de pacientes quanto ao tipo específico de trombose.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de iniciadores (<i>primers</i>) e enzimas de restrição utilizadas nas análises dos polimorfismos dos genes MTHFR e CBS	40
Tabela 2: Condições da mistura para reação de PCR da MTHFR	41
Tabela 3: Quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR C677T	42
Tabela 4: Quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR A1298C.....	42
Tabela 5: Condições da mistura para reação de PCR da CBS	44
Tabela 6: Quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da CBS 844ins68/T833C	44
Tabela 7: Frequência da distribuição por sexo dos pacientes analisados.....	49
Tabela 8: Frequência da distribuição por faixa etária dos pacientes analisados	49
Tabela 9: Frequência da distribuição por cor da pele dos pacientes analisados.....	49
Tabela 10: Distribuição das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C, dados de diversidade genética e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em pacientes analisados.....	54
Tabela 11: Tabela de contingência para o teste de desequilíbrio genotípico entre os locos CBS 844ins68 e MTHFR C677T	55
Tabela 12: Tabela de contingência para o teste de desequilíbrio genotípico entre os locos CBS 844ins68 e MTHFR A1298C.....	55
Tabela 13: Tabela de contingência para o teste de desequilíbrio genotípico entre os locos MTHFR C677T e MTHFR A1298C	55
Tabela 14: Frequência da distribuição no grupo total e por sexo dos genótipos dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos pacientes analisados	56
Tabela 15: Frequência da distribuição por faixa etária dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos pacientes analisados	57
Tabela 16: Frequência da distribuição por cor da pele dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos pacientes analisados	58
Tabela 17: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, no grupo total e por sexo.....	59

Tabela 18: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, por faixa etária	59
Tabela 19: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, por cor da pele.....	60
Tabela 20: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, por genótipos dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C.....	60
Tabela 21: Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%	62

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

AVC – Acidente vascular cerebral

CBS – Cistationina β -Sintetase

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FT – Fator tecidual

FvW – Fator de von Willebrand

Hcy – Homocisteína

INR – Índice internacional normalizado

MANOVA – Análise de variância multivariada

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase

PAI-I – Inibidor do ativador do plasminogênio tipo I

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDF – Produtos de degradação da fibrina

RNA – Ácido ribonucléico

SAAF – Síndrome do anticorpo antifosfolípide

TAFI – Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina

TEP – Tromboembolismo pulmonar

TEV – Tromboembolismo venoso

TFPI – Inibidor da via do Fator tecidual

t-PA – Ativador do plasminogênio tipo tecidual

TTPa – Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

TVC – Trombose venosa cerebral

TVP – Trombose venosa profunda

u-PA – Ativador do plasminogênio tipo uroquinase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. HEMOSTASIA.....	17
1.2. TROMBOFILIA	27
1.2.1. FATORES DESENCADEANTES.....	27
1.2.2. DIAGNÓSTICO.....	29
1.2.3. TRATAMENTO.....	30
1.3. HOMOCISTEÍNA E POLIMORFISMOS NOS GENES DA MTHFR E CBS	31
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVO	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES.....	38
4.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	38
4.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	39
4.2. COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE PERIFÉRICO	39
4.3. DOSAGENS DE ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B12 E HOMOCISTEÍNA.....	39
4.4. EXTRAÇÃO DE DNA	40
4.5. ESTUDO MOLECULAR (GENOTIPAGEM) DAS MUTAÇÕES MTHFR C677T E A1298C; CBS 844INS68 E T833C	40
4.5.1 GENOTIPAGEM MTHFR C677T E A1298C	41
4.5.2 GENOTIPAGEM CBS 844INS68 E T833C	43
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
4.6.1 ESTATÍSTICA DE POPULAÇÕES.....	45
4.6.2 DIFERENÇAS ENTRE SEXO, FAIXA ETÁRIA, COR DA PELE E GENÓTIPOS DE MTHFR E CBS NAS DOSAGENS SÉRICAS DE ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B12 E HOMOCISTEÍNA.....	46
4.6.3 TESTES DE CORRELAÇÕES/ASSOCIAÇÕES	46
4.6.4 INTERAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS C677T E A1298C DA MTHFR E 844INS68 DA CBS NOS VALORES DAS DOSAGENS SÉRICAS DE ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B12 E HOMOCISTEÍNA	47
4.6.5 ODDS RATIO.....	48
5 RESULTADOS	49
5.1 PERFIL DA AMOSTRA DE PACIENTES	49
5.2 ESTATÍSTICA DE POPULAÇÕES.....	53
5.3 FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA MTHFR E CBS NO GRUPO TOTAL E POR SEXO	56
5.4 FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA MTHFR E CBS POR FAIXA ETÁRIA E COR DA PELE.....	57
5.5 DIFERENÇAS ENTRE SEXO, FAIXA ETÁRIA, COR DA PELE E GENÓTIPOS DE MTHFR E CBS NAS DOSAGENS SÉRICAS DE ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B12 E HOMOCISTEÍNA	58
5.6 TESTES DE CORRELAÇÕES.....	61
5.7 INTERAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS C677T E A1298C DA MTHFR E 844INS68 DA CBS NOS VALORES DAS DOSAGENS SÉRICAS DE ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B12 E HOMOCISTEÍNA	61
5.8 ODDS RATIO.....	61

6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÕES	67
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
	ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA SES-DF	82
	ANEXO 2 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	83
	ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	84
	ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemostasia

Do grego, haimóstasis (háima – sangue / stásis – estase), hemostasia significa parada do fluxo de sangue, ou seja, interrupção de sangramentos provenientes de lesão vascular e restauração do fluxo sanguíneo normal. O sistema hemostático é composto por uma sequência de eventos integrados e complexos que envolvem vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação, fibrinólise e anticoagulantes naturais (ZAGO *et al.*, 2001).

O endotélio vascular e as plaquetas são os componentes da hemostasia primária. As células endoteliais constituem a superfície interna dos vasos sanguíneos e sintetizam proteínas como o colágeno e fator de von Willebrand (FvW), que formam uma matriz extracelular – o subendotélio. As plaquetas são pequenos fragmentos de células derivados do megacariócito (DAVI & PATRONO, 2007). A membrana plaquetária é coberta por uma variedade de receptores: integrinas (α IIb β 3, α 2 β 1), receptores com domínios repetidos ricos em leucina (Glicoproteína Ib/IX/V), receptores acoplados a proteína-G (PAR-1 e PAR-4 receptores de trombina, P2Y1 e P2Y12 receptores de ADP, TP α e TP β receptores de tromboxano A2), proteínas pertencentes à superfamília de imunoglobulinas (Glicoproteína VI) (RIVERA *et al.*, 2009) (**Figura 1**).

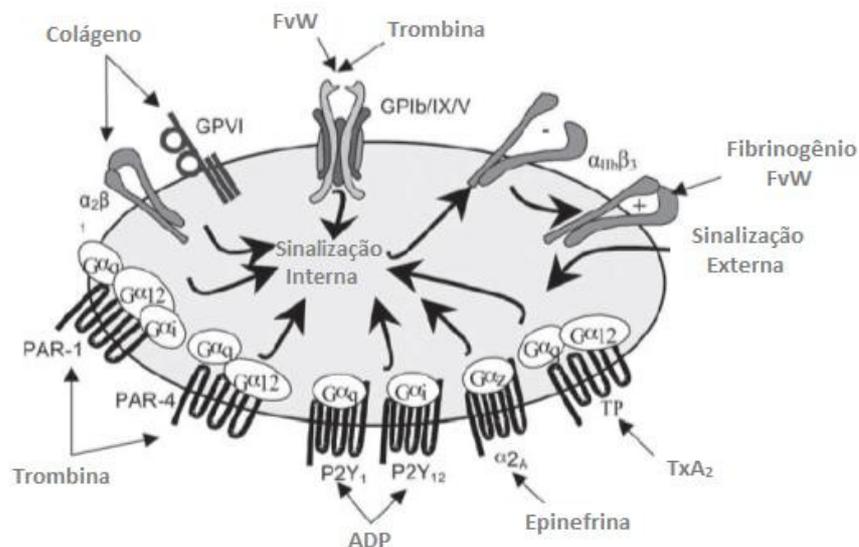


Figura 1: Principais receptores plaquetários e seus ligantes (Adaptado RIVERA *et al.*, 2009)

O citoplasma das plaquetas contém um sistema tubular denso, citoesqueleto, RNA, algumas mitocôndrias e grânulos denominados corpúsculos densos (ricos em nucleotídeos ADP e ATP, serotonina, histamina e cálcio) e grânulos- α (Fator de von Willebrand, fibrinogênio, Fator V, Fator de crescimento derivado de plaqueta) (RIVERA *et al.*, 2009).

A hemostasia primária tem início quando as plaquetas reconhecem a matriz subendotelial exposta por uma injúria vascular (THIJS *et al.*, 2012). Os receptores glicoproteína Ib/IX/V das plaquetas se ligam ao fator de von Willebrand, enquanto os receptores glicoproteína VI se ligam ao colágeno, dando início à adesão plaquetária na parede do vaso (NUYTTENS *et al.*, 2011). Após a fase de iniciação, ocorre a fase de extensão com ativação plaquetária (sinalização intracelular principalmente pela ligação entre receptor Glicoproteína VI e colágeno) e recrutamento de plaquetas adicionais no local da lesão por liberação de agonistas incluindo o ADP, tromboxano A₂, epinefrina e trombina (RIVERA *et al.*, 2009). A fase final de estabilização do tampão plaquetário ocorre após ativação das integrinas, sobretudo a α Ib β 3 (também conhecida como Glicoproteína IIb/IIIa), que se liga ao fibrinogênio e ao fator de von Willebrand. A integrina α 2 β 1 ativada conecta-se ao colágeno (GIBBINS, 2004) (**Figuras 2 e 3**).

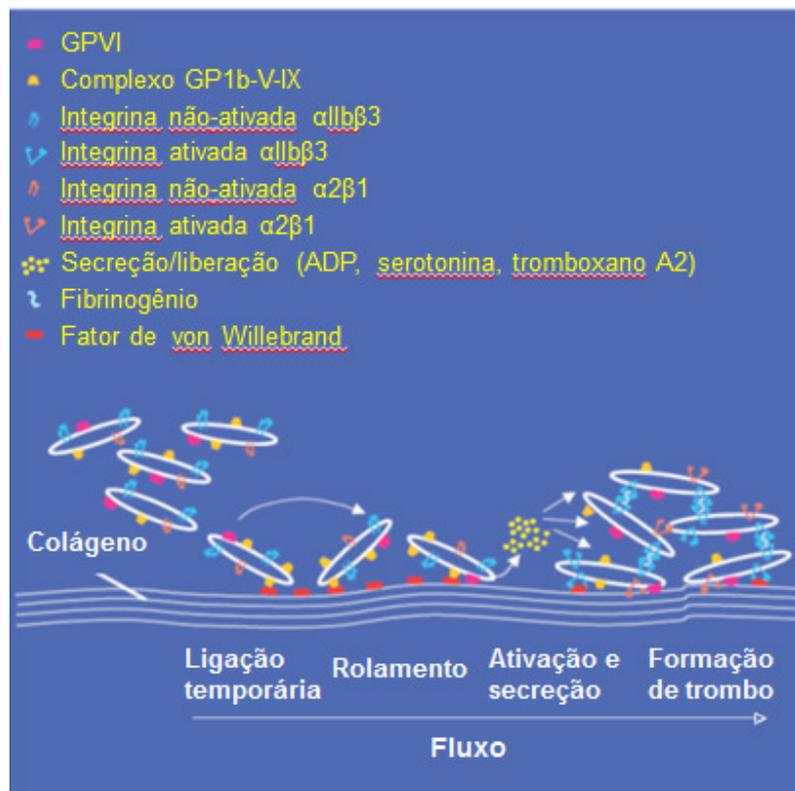


Figura 2: Estágios de desenvolvimento do trombo plaquetário em um sítio de injúria vascular (Adaptado GIBBINS, 2004)

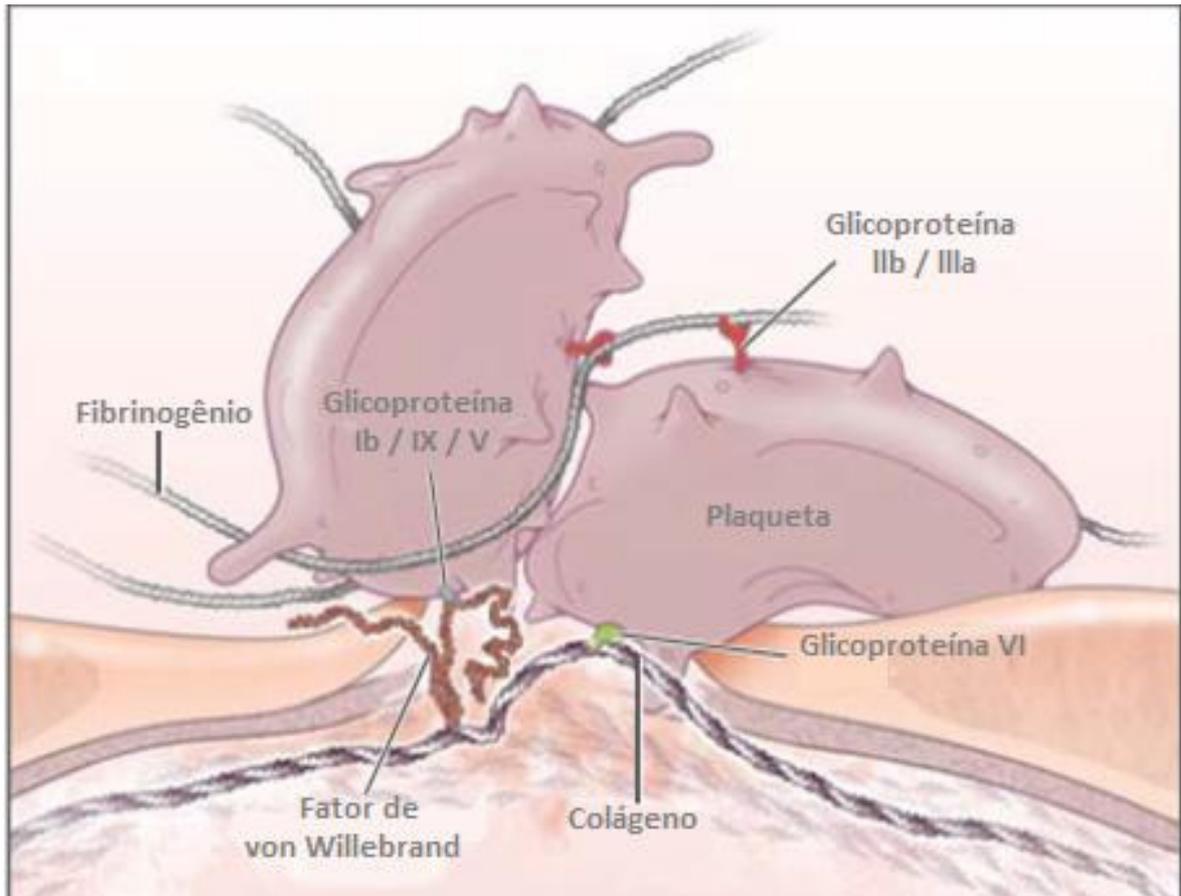


Figura 3: Fase final da formação do tampão plaquetário (Adaptado BORISSOFF *et al.*, 2011)

Após essa sequência de eventos, tem início a hemostasia secundária composta pela interação entre os fatores da coagulação, para formação de fibrina. Esta última é responsável pelo fortalecimento do tampão plaquetário (ZAGO *et al.*, 2001).

Para explicar essa interação entre os fatores da coagulação na hemostasia secundária, MACFARLANE e DAVIE & RATNOFF propuseram, em 1964, um modelo em cascata segundo o qual a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina (**Figura 4**).

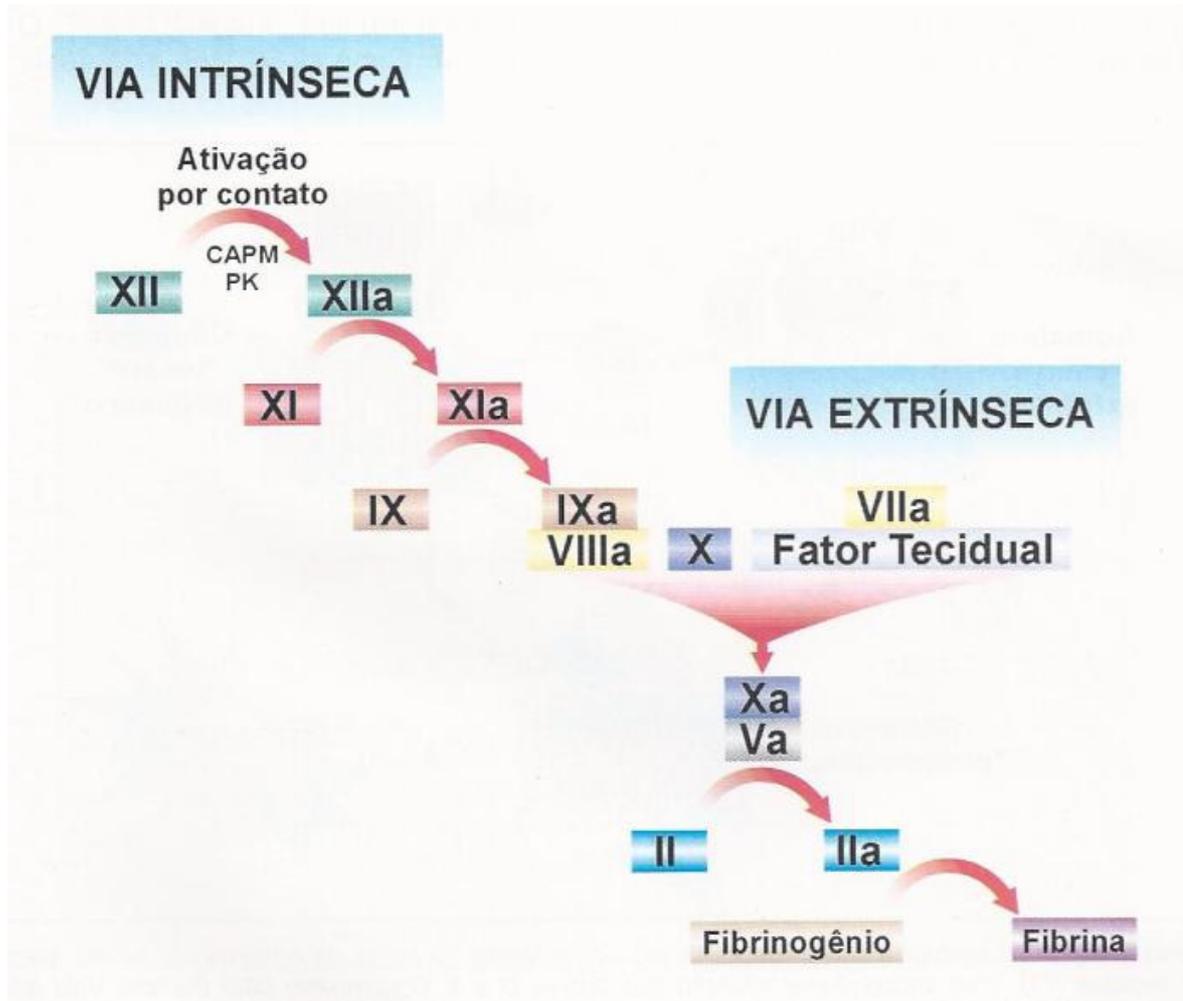


Figura 4: Modelo da cascata de coagulação proposto na década de 1960 (Fonte: ZAGO *et al.*, 2001)

Nesse modelo, a coagulação é dividida em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue e também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular), e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (FX). Na via extrínseca, o fator VII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado (FXIIa) ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na

presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença e íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (FERREIRA *et al.*, 2010).

Apesar do conceito da "cascata" da coagulação ter representado um modelo bem sucedido e um avanço significativo no entendimento da coagulação, observações experimentais e clínicas mais recentes demonstram que a hipótese da cascata não reflete completamente os eventos da hemostasia *in vivo* (HOFFMAN, 2003). Muitos investigadores reconhecem que o modelo da cascata possui sérias falhas em relação ao modelo fisiológico da coagulação e que as vias extrínseca e intrínseca podem não operar como vias independentes e redundantes, como empregado neste modelo (MONROE *et al.*, 2009; RIDDEL *et al.*, 2007). Foi reconhecido também, em estudos prévios da coagulação, que as células têm participação importante neste processo e que a hemostasia normal não é possível na ausência do fator tecidual (FT) associado às células e plaquetas.

O entendimento atual do processo hemostático considera a inter-relação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de estágios ou fases, e não em duas vias (intrínseca e extrínseca) como antes. As fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização, compreendem a atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares (FERREIRA *et al.*, 2010).

A coagulação é desencadeada pela exposição do sangue a componentes que normalmente não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (lesão vascular) ou alterações bioquímicas (liberação de citocinas). Qualquer que seja o evento desencadeante, o início da coagulação do sangue se faz mediante expressão do seu componente crítico, o fator tecidual, e sua exposição ao espaço intravascular (FRANCO, 2001). O FT é uma proteína transmembrânica não expressa constitutivamente nas células endoteliais, mas presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos (FURIE & FURIE, 2008) (**Figura 5**).

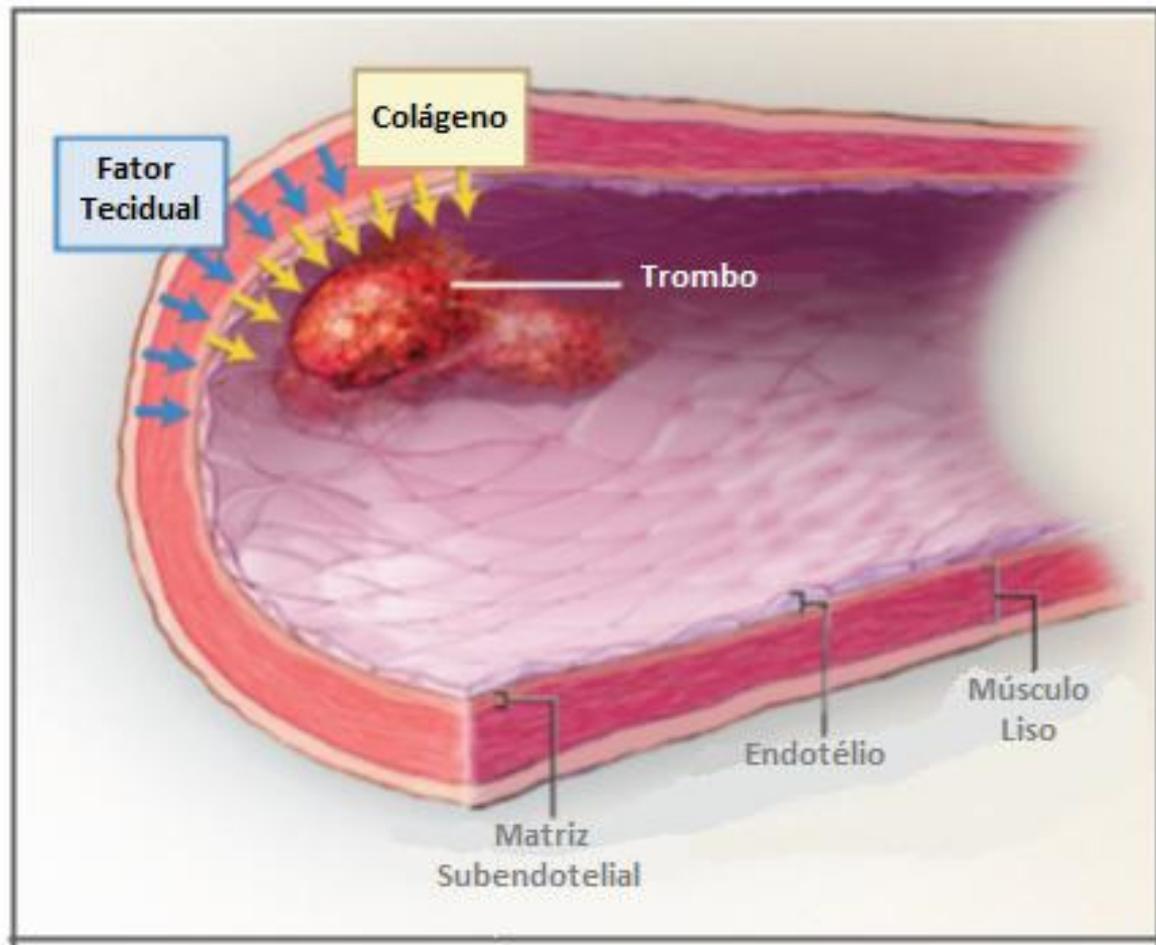


Figura 5: Componentes do vaso sanguíneo na formação do trombo: colágeno hemostasia primária/ Fator tecidual hemostasia secundária (Adaptado FURIE & FURIE, 2008).

O fator tecidual funciona como receptor para o fator VII da coagulação, ativando-o. O complexo formado pelo fator VII ativado (FVIIa) e FT tem como substratos principais o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na ativação de ambos. O FXa, associado com o seu cofator, FVa (pode ser ativado pelo próprio FXa ou por proteases não coagulantes) forma um complexo denominado protrombinase na superfície da célula que expressa o FT (**Figura 6**). Esse complexo converte pequenas quantidades de protrombina (fator II) em trombina, que são insuficientes para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas são de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (FERREIRA *et al.*, 2010).

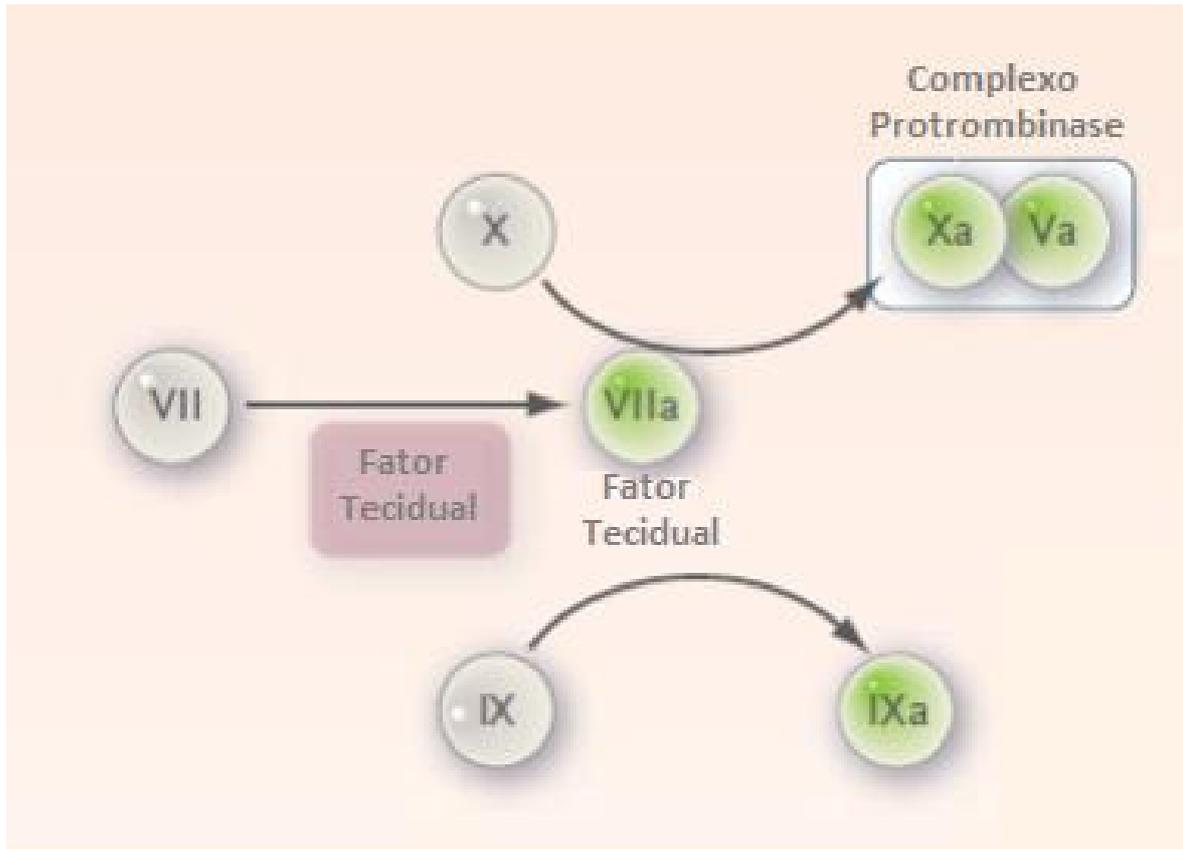


Figura 6: Fase de iniciação da coagulação (Adaptado BORISSOFF *et al.*, 2011)

A pequena quantidade de trombina produzida na fase de iniciação é responsável por ativação das plaquetas para que sejam expostos os receptores e sítios de ligação para os fatores da coagulação ativados e liberação de fibrinogênio e fator V dos grânulos- α . Essa produção de trombina promove também a ativação dos cofatores FV e FVIII e do Fator XI na superfície das plaquetas ativadas – fase de amplificação (**Figura 7**). Na fase de propagação (**Figura 7**), a ligação entre FIXa e FVIIIa forma o complexo tenase que promove a ativação do Fator X. Esse aumento na quantidade do FXa juntamente com aumento do FVa forma um complexo protrombinase mais eficiente na conversão de grande quantidade de protrombina em trombina. Esta última é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial (BORISSOFF *et al.*, 2011).

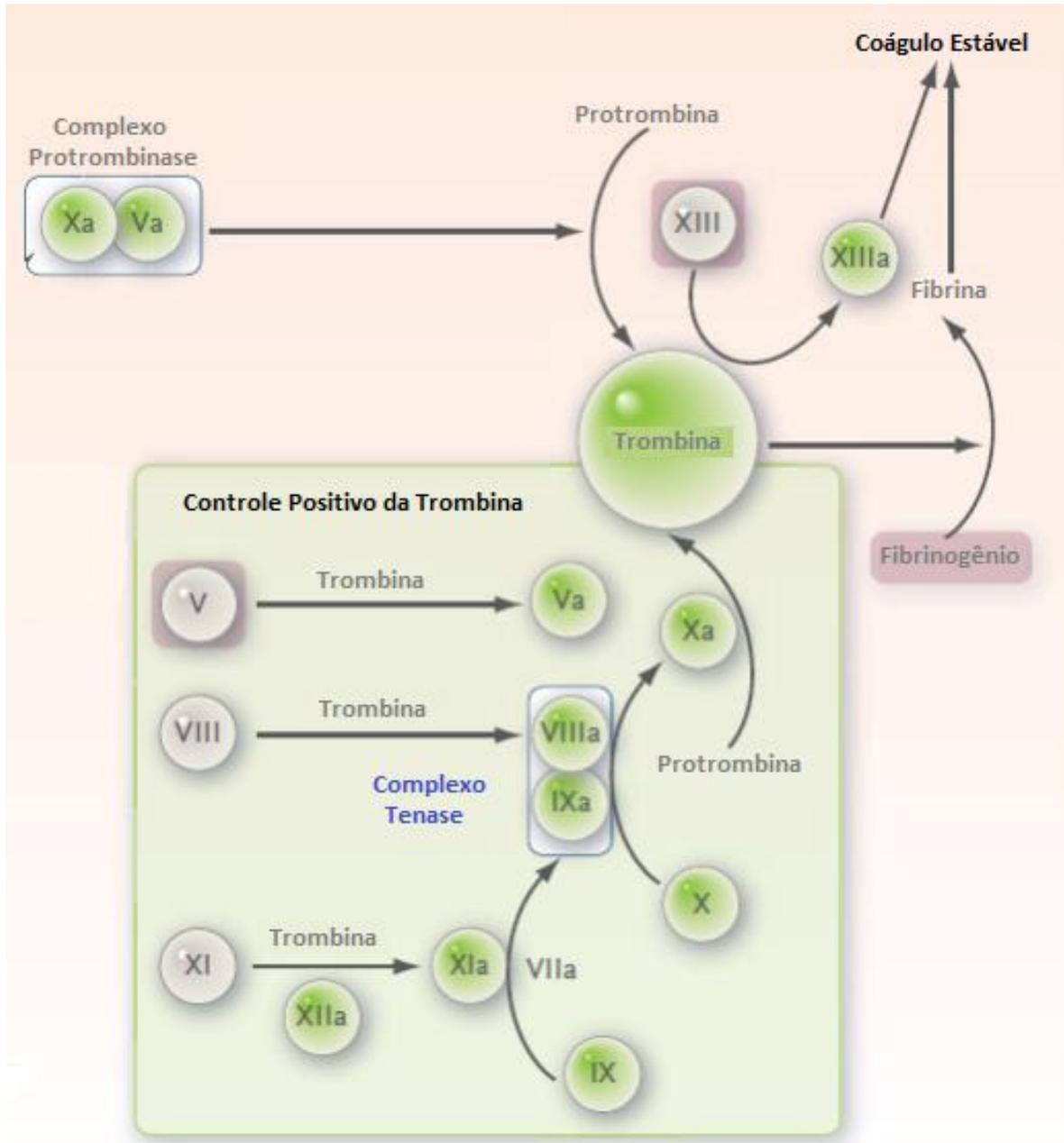


Figura 7: Fase de amplificação e propagação (Adaptado BORISSOFF *et al.*, 2011)

As fases de iniciação, amplificação e propagação da coagulação também podem ser visualizadas na representação feita por FERREIRA *et al.* (2010) (**Figura 8**).

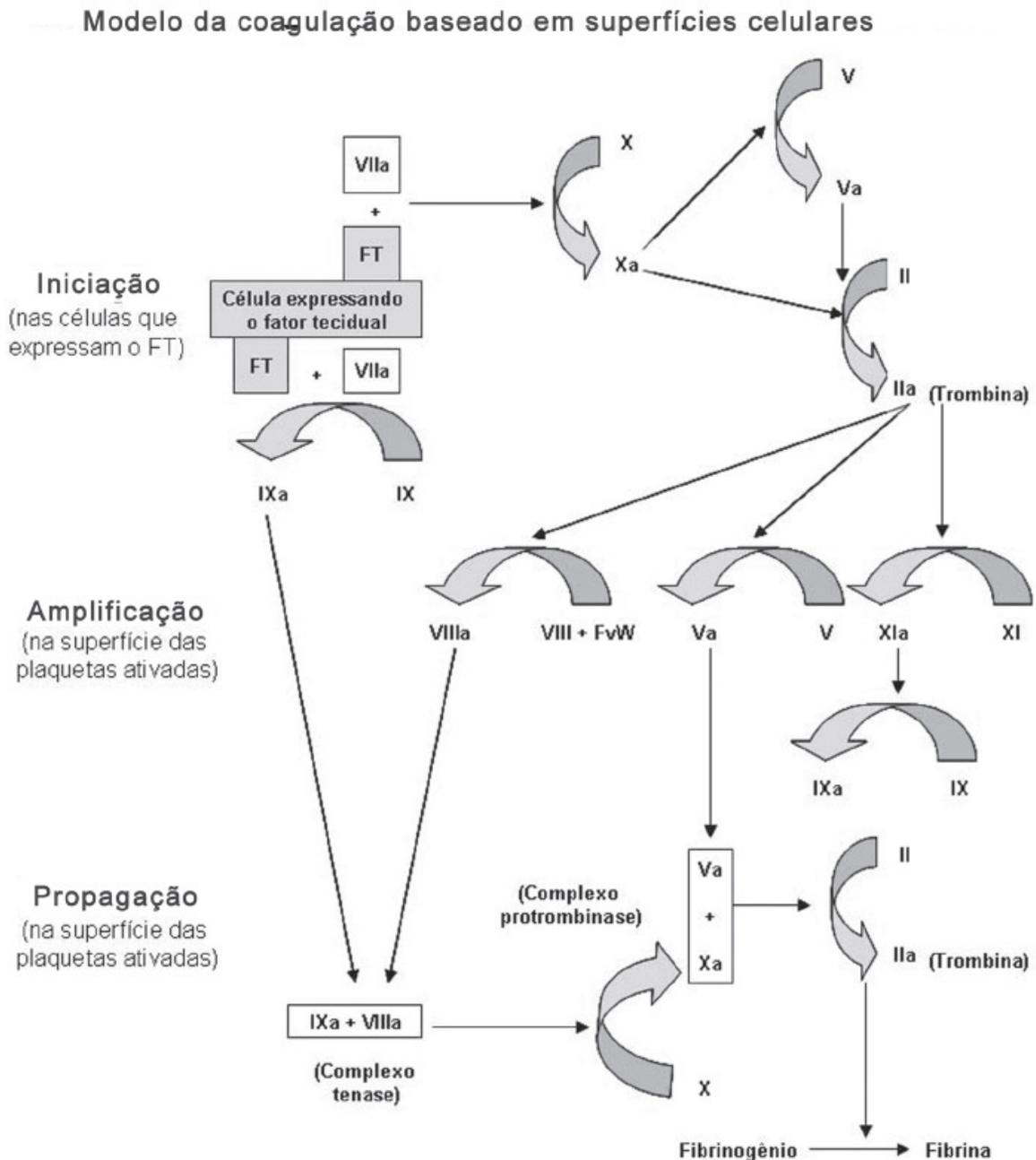


Figura 8: Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares (Fonte: FERREIRA *et al.*, 2010)

Na fase de finalização, a ação dos anticoagulantes naturais limita o processo de coagulação evitando a oclusão trombótica do vaso. Essas proteínas que atuam como anticoagulantes naturais são o inibidor da via do fator tecidual, a proteína C, a proteína S e a antitrombina. O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) é uma proteína secretada pelo endotélio, que forma um complexo quaternário FT/FVIIa/FXa/TFPI que inativa os fatores da coagulação ativados. A proteína C, ativada pela trombina, inibe a coagulação clivando e

inativando os fatores Va e VIIIa. Este processo é potencializado pela proteína S que atua como um cofator não enzimático nas reações de inativação. A antitrombina inibe a atividade da trombina e outras serino-proteases como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa (FERREIRA *et al.*, 2010).

A fibrinólise, outro evento que compõem o sistema hemostático, tem um papel importante na dissolução do coágulo e na manutenção do sistema vascular pérvio. O sistema fibrinolítico (**Figura 9**) é composto pelo plasminogênio, uma proenzima inativa, que pode ser convertida a enzima ativa plasmina que degrada a fibrina em produtos de degradação solúveis da fibrina. Dois ativadores de plasminogênio são identificados no sangue: ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). O controle negativo do sistema fibrinolítico ocorre em nível desses ativadores mediante ação de inibidores específicos como o PAI-1 (PAI – inibidor do ativador do plasminogênio) e diretamente sobre os níveis de plasmina através da α_2 -antiplasmina (RIJKEN & LIJNEN, 2009). O inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) é capaz de inibir a fibrinólise por remover resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo, modificando assim o substrato (ZAGO *et al.*, 2001).

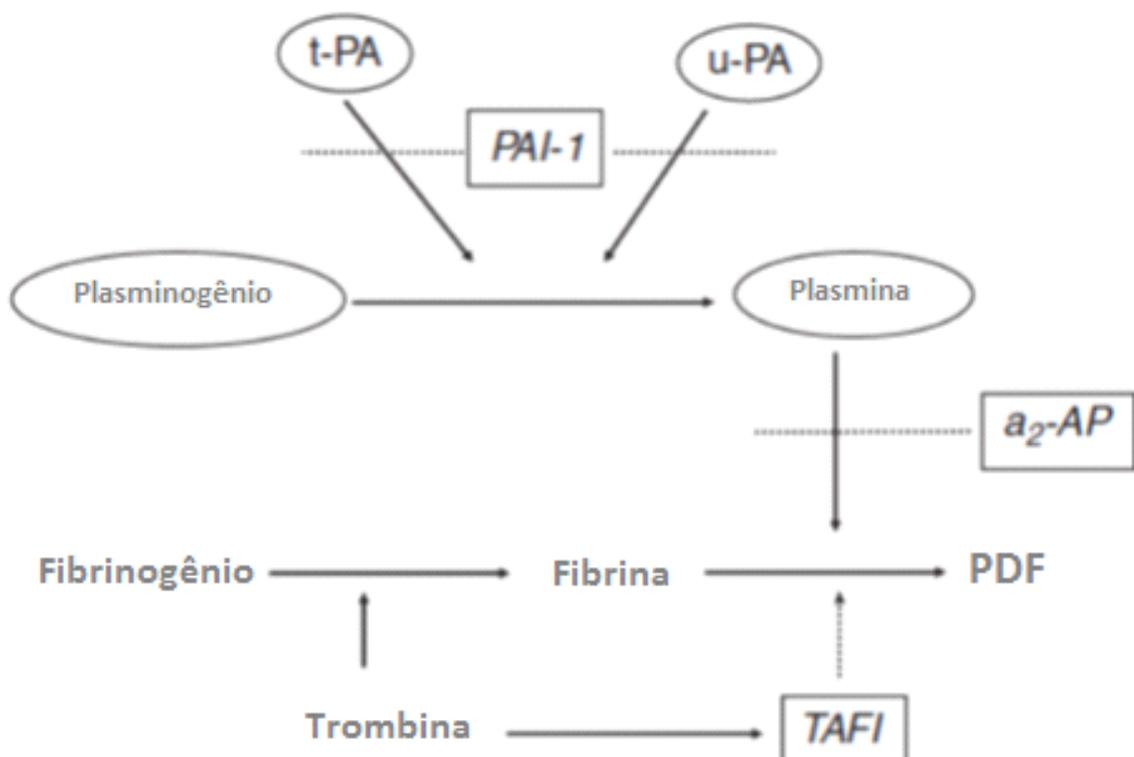


Figura 9: Degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico. O plasminogênio é ativado pelo ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) ou ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). Essas enzimas são reguladas pelo inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1). A plasmina degrada a fibrina em produtos solúveis de degradação da fibrina (PDF) e é regulada pela α 2-antiplasmina (α 2-AP). A trombina não somente converte fibrinogênio em fibrina, mas também ativa o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que inibe a fibrinólise pela modificação do substrato fibrina. (Adaptado RIJKEN & LIJNEN, 2009).

1.2. Trombofilia

Trombofilia é a tendência em desenvolver trombose venosa, ou ocasionalmente, arterial (revisado por MIRANDA-VILELA, 2012). A fisiopatologia da trombose é baseada na tríade de Virchow, teoria elaborada pelo patologista alemão Rudolf Virchow. A tríade é composta por três categorias de fatores que contribuem para trombose: lesão endotelial, alterações no fluxo sanguíneo e alterações nos constituintes do sangue (RASCHE, 2001).

No mecanismo de desenvolvimento do tromboembolismo venoso (TEV), a estase (alterações no fluxo sanguíneo) e o estado de hipercoagulabilidade (alterações nos constituintes do sangue) têm participação efetiva (PREVITALI *et al.*, 2011). A trombose venosa pode ocorrer em qualquer sítio do sistema venoso, sendo a manifestação clínica mais comum a trombose venosa profunda de membros inferiores com ou sem embolismo pulmonar. A trombose pode também envolver sítios raros como na trombose venosa cerebral, trombose mesentérica, trombose de membros superiores, trombose retiniana (MARTINELLI *et al.*, 2008).

A fisiopatologia da trombose arterial difere da venosa e ocorre geralmente após erosão ou ruptura de uma placa aterosclerótica (lesão endotelial). A isquemia cardíaca e o acidente vascular cerebral (AVC) são as manifestações clínicas mais severas de aterotrombose (PREVITALI *et al.*, 2011).

1.2.1. Fatores Desencadeantes

A trombose é uma patologia de caráter multifatorial (em GUIMARÃES *et al.*, 2009). Ela não se manifesta somente devido a um simples fator de risco, mas da interação entre fatores de riscos ambientais e genéticos (VOSSSEN *et al.*, 2005). É uma doença multigênica, em que diferentes mutações em diferentes genes interagem entre si e com fatores ambientais para provocar o evento (MIRANDA-VILELA, 2012). Portanto, em contraste com as doenças monogênicas, em que mutações em um único gene resultam em doença, nas doenças

multigênicas o risco de manifestação da doença, associado a cada alteração genética isolada é relativamente baixo, porém a presença de mutações em vários genes aumenta significativamente esse risco (FRANCO, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Os fatores de risco ambientais (adquiridos) para o tromboembolismo venoso diferem daqueles para trombose arterial. Assim, os principais fatores de risco ambientais para TEV são imobilização, cirurgia, trauma, gravidez, puerpério, doença maligna e medicamentos (terapia de reposição hormonal, anticoncepcional oral, tamoxifeno) (ROSENDAAL, 1999), enquanto aqueles para trombose arterial incluem particularmente hiperlipidemia, tabagismo, diabetes, hipertensão e obesidade (GODOY, 2009). A síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF) é outra condição adquirida sistêmica, de natureza autoimune, e caracterizada por tromboes recorrentes no sistema venoso, arterial ou ambos, estando também associada com morte fetal e abortos espontâneos recorrentes (GONÇALVES *et al.*, 2010; SANTAMARIA *et al.*, 2005).

O TEV atinge em média 1 indivíduo adulto por 1000 habitantes/ano. Em cerca de 40% dos indivíduos atingidos é possível identificar uma trombofilia hereditária, geralmente em associação a um ou mais fatores de risco ambientais (FONSECA & AMARO, 2008; FRANCO, 2001). A trombofilia hereditária é geralmente decorrente de fatores genéticos que alteram as proteínas envolvidas no processo de coagulação sanguínea como a deficiência do anticoagulante natural antitrombina (EGEBERG, 1965), deficiência de proteína C e deficiência de proteína S (SCHWARZ, 1984), mutação G1691A no fator V (Fator V Leiden) e mutação G20210A no gene da protrombina (FONSECA & AMARO, 2008).

No caso da trombose arterial, o papel da trombofilia hereditária não está bem definido. Os estudos realizados não permitiram estabelecer uma relação consistente entre trombofilia hereditária e risco de trombose arterial. No entanto, a hiperhomocisteinemia (elevação anormal das concentrações plasmáticas de homocisteína) e a síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF) são fatores de risco já documentados (FONSECA & AMARO, 2008).

A hiperhomocisteinemia é um fator de risco misto para trombose, pois pode ser herdada ou adquirida. Os aumentos nos níveis de homocisteína são tipicamente causados por defeitos genéticos nas enzimas que participam do seu metabolismo, Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) e Cistationina β -Sintetase (CBS), ou por deficiência nutricional de vitaminas co-fatores como ácido fólico, vitamina B12 (cianocobalamina) e B6 (piridoxina) (PAPA *et al.*, 2001). A homocisteína tem efeito tóxico nas células endoteliais prejudicando a geração de óxido nítrico e prostaciclina; aumenta a adesão plaquetária, ativa fator V, induz a atividade do fator tecidual e inibe o ativador do plasminogênio tipo tecidual (PREVITALI *et*

al., 2011). Deste modo, polimorfismos nos genes da MTHFR e CBS podem influenciar trombofilias venosas e arteriais, particularmente em indivíduos jovens (idade inferior a 50 anos) e na ausência de fatores de riscos ambientais.

1.2.2. Diagnóstico

O rastreio laboratorial para diagnóstico das trombofilias deve ser realizado nos seguintes casos: pacientes com o primeiro episódio de TEV antes dos 40-50 anos, pacientes com trombose recorrente ou trombose espontânea, história familiar de trombose venosa profunda documentada em idade inferior a 50 anos, trombose venosa em local pouco comum (trombose venosa cerebral, trombose mesentérica, trombose hepática) (HEIT, 2007).

Apesar dos defeitos trombofílicos poderem causar várias complicações obstétricas, como dificuldade para engravidar, gestações complicadas, retardo do crescimento fetal, abortamentos e perdas fetais (revisto em MIRANDA-VILELA, 2012), só é recomendado nesses casos a investigação laboratorial para SAAF (BATES *et al.*, 2012).

Na investigação de trombofilia, devem ser realizados os seguintes exames: hemograma completo, que permite o rastreio de síndrome mieloproliferativa; investigação de SAAF, dosagem de Proteína C e S e Antitrombina; resistência à proteína C ativada e Factor V Leiden; mutação G20210A do gene da Protrombina; dosagem de homocisteína, ácido fólico, vitaminas B12 e B6 (FONSECA & AMARO, 2008).

Na investigação de SAAF, é realizada a pesquisa de anticoagulante lúpico, anticorpo anticardiolipina e anti-B2glicoproteína1, porém para o diagnóstico não é necessário positividade nos três exames. O diagnóstico é realizado na presença do quadro clínico (trombose venosa ou arterial e/ou abortamento/perda fetal) juntamente com um dos exames laboratoriais positivos. O exame deverá ser confirmado através de repetição em um intervalo de no mínimo doze semanas (GIANNAKOPOULOS & KRILIS, 2009).

As proteínas C e S estão diminuídas no evento agudo e durante o uso de anticoagulantes orais (inibidores de vitamina K), portanto só deverão ser dosadas após um período de no mínimo seis semanas após o evento ou suspensão da medicação (HEIT, 2007). A proteína S pode estar diminuída também na gestação e durante tratamento hormonal (FONSECA & AMARO, 2008). Outro anticoagulante natural que pode estar diminuído no evento agudo é a antitrombina que pode ter seus níveis diminuídos também pelo uso de heparina. Uma vez alterado, o exame de dosagem de proteína C ou S ou antitrombina deve ser repetido para confirmação (HEIT, 2007).

Os exames de pesquisa genética como o Fator V Leiden e mutação no gene do Fator II não sofrem as influências acima, podendo ser realizados em qualquer momento. Para dosagem sérica de homocisteína, ácido fólico e vitaminas B12 e B6, a coleta de sangue total deve ser realizada em jejum (FONSECA & AMARO, 2008).

1.2.3. Tratamento

O tratamento da trombose venosa aguda é realizado com heparina não fracionada ou heparina de baixo peso molecular seguida por anticoagulante oral (inibidores de vitamina K) (VANES *et al.*, 2011). Comumente, a heparina de baixo peso molecular é preferida devido à maior facilidade no manuseio uma vez que é administrada por via subcutânea sem necessidade de monitorização laboratorial. A heparina não fracionada tem via de administração endovenosa por infusão contínua com requisição de manejo da dose de acordo com o exame de TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial ativada) (BATES & GINSBERG, 2004).

A dose do antagonista de vitamina K deve ser ajustada de acordo com o INR alvo (índice internacional normalizado) que deve estar entre 2,0 e 3,0 (BATES & GINSBERG, 2004). Com o surgimento dos novos anticoagulantes orais, os inibidores de vitamina K podem ser menos utilizados no futuro, uma vez que as novas opções não requerem monitorização laboratorial. A dabigatrana, um inibidor direto da trombina, é administrada como uma pró-droga, o etexilato de dabigatrana (VANES *et al.*, 2011). Outra nova opção aos antagonistas de vitamina K é a rivaroxabana, um inibidor do Fator Xa (BAUERSACHS, *et al.*, 2010).

Em geral, a duração da anticoagulação é de três a seis meses. Para os casos de episódios recorrentes ou espontâneos a anticoagulação pode ser realizada por um ano (SNOW *et al.*, 2007). Para os pacientes com diagnóstico de SAAF a anticoagulação deve ser perene devido ao alto risco de recorrência (GIANNAKOPOULOS & KRILIS, 2009).

Nos pacientes com diagnóstico de deficiência dos anticoagulantes naturais a anticoagulação perene deve ser considerada em caso de trombose recorrente, um evento trombótico com risco de vida ou histórico familiar significativo de trombose. Em caso de um simples evento trombótico (sem risco de vida), a duração da anticoagulação deve ser de seis meses a um ano. Em casos de gravidez ou cirurgia deve ser realizada anticoagulação profilática. O uso de estrógenos deve ser evitado (GREER *et al.*, 2009).

Nos pacientes em que após o primeiro evento trombótico for identificado heterozigose no Fator V Leiden ou heterozigose para a mutação no gene da protrombina deverão ser tratados como os pacientes sem trombofilia. Nos pacientes em que houver a presença de dupla heterozigose ou homozigose deverão ser considerados para anticoagulação perene assim como os pacientes que apresentarem trombose recorrente ou um evento com risco de vida. Assim como na deficiência dos anticoagulantes naturais, anticoagulação profilática deve ser administrada em situações de risco para trombose e o uso de estrógenos também deve ser evitado (GREER *et al.*, 2009).

A continuidade da anticoagulação deve sempre ser avaliada entre o risco de sangramento com a medicação e o benefício em relação ao risco de recorrência do evento trombótico. D-dímero alterado detectado na dosagem realizada um mês após o término da anticoagulação tem uma significativa incidência de recorrência do TEV (PALARETI, *et al.*, 2006). Porém, o D-dímero deve ser analisado em conjunto com os fatores de risco clínico como o sexo e idade (BAGLIN *et al.*, 2008 e COSMI *et al.*, 2010).

Recentemente, foi realizado um estudo que elaborou o DASH score para avaliar a recorrência do evento trombótico: D-dímero +2, idade < 50 anos +1, sexo masculino +1, uso de hormônio no momento do TEV -2. O estudo sugere que pacientes com DASH menor ou igual a um tem um risco de recorrência baixo o suficiente para justificar a suspensão da anticoagulação após 3 a 6 meses de tratamento. Pacientes com DASH maior ou igual a dois tem um risco de recorrência maior que pode justificar a continuidade da anticoagulação.

Outro método que parece estabelecer o risco de recorrência é a avaliação de trombose venosa residual pelo ultrassom cuja presença confere um risco maior de repetição do evento. Entretanto, nem os níveis de D-dímero nem a trombose residual são métodos precisos para prever que pacientes apresentarão TEV após o término do tratamento anticoagulante (SINESCU *et al.*, 2011).

1.3. Homocisteína e polimorfismos nos genes da MTHFR e CBS

A homocisteína (Hcy) é um pequeno aminoácido sulfidrílico formado durante o metabolismo da metionina. É inicialmente derivada da desmetilação da metionina; a partir daí, a metabolização segue uma de duas vias: remetilação ou transulfuração. O ciclo de remetilação é catalisado pelas enzimas metionina sintetase (MS – EC 2.1.1.13) e metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR – EC 1.5.1.20). Neste ciclo, a homocisteína é

reciclada a metionina, adquirindo um grupo metil doado pelo metiltetrahydrofolato, processo que utiliza folato e vitamina B12 como co-fatores. No ciclo da transulfuração, a homocisteína condensa-se com a serina para formar cistationina, numa reação catalizada pela enzima cistationina β -sintetase (CBS – EC 4.2.1.22), que usa vitamina B6 como co-fator. A cistationina é subsequentemente hidrolisada a cisteína (BYDLOWSKI *et al.*, 1998; CARDOSO, 2009; PERSUHN *et al.*, 2006; SACHDEV, 2004) (**Figura 10**). A deficiência na conversão da homocisteína em cistationina constitui fator de risco para doenças vasculares, incluindo a doença arterial coronariana, o tromboembolismo venoso e o acidente cerebral vascular (BONINI-DOMINGOS, *et al.*, 2005).

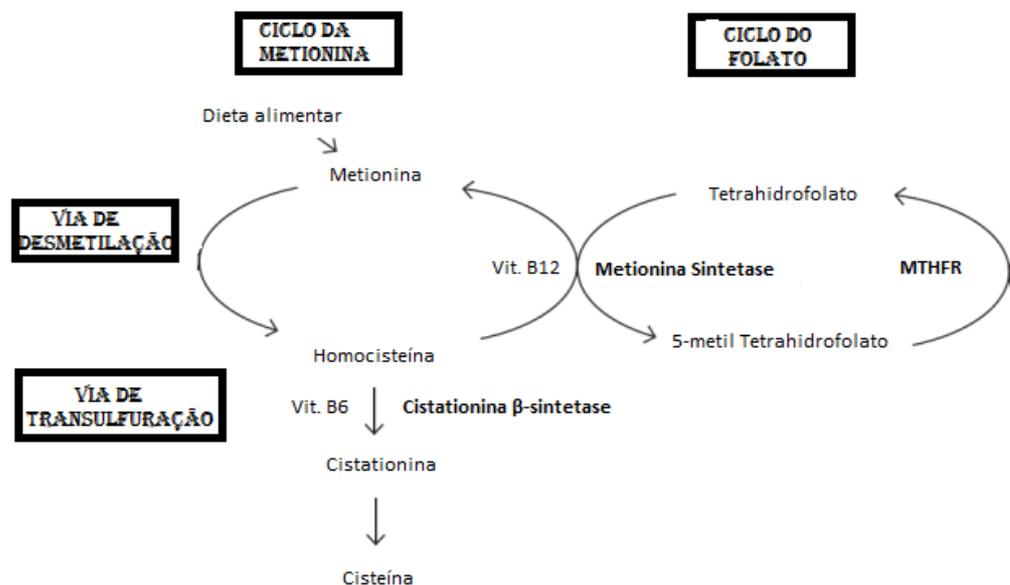


Figura 10: Metabolismo da Homocisteína (Adaptado de CARDOSO, 2009)

A hiperhomocisteinemia é um fator de risco independente para trombose venosa e arterial (PAPA *et al.*, 2001). Sua patogênese é complexa, uma vez que variáveis genéticas e ambientais interagem para determinar os níveis plasmáticos de Hcy (BUCHANAN *et al.*, 2003; FRANCO, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2003). A Hcy plasmática total em jejum varia de 5 a 15 $\mu\text{M/L}$ no adulto normal, sendo considerada hiperhomocisteinemia grave aquela acima de 100 $\mu\text{M/L}$. O defeito genético leva à manifestação clínica de homocistinúria e o quadro adquirido tem associação com eventos obstrutivos coronarianos e vasculares periféricos, inclusive retinianos (MISAWA *et al.*, 2008).

Várias formas de hiperhomocisteinemia são causadas por defeitos genéticos ou não genéticos, ou ainda pela combinação de ambos (PERSUHN *et al.*, 2006) e a extensão exata da

herdabilidade desse traço permanece questionável (BUCHANAN *et al.*, 2003). Aproximadamente 5% da população geral exibem níveis mais altos do que os normais de Hcy e a prevalência no meio de pacientes que apresentam trombose venosa é de cerca de 10% (BUCHANAN *et al.*, 2003). Causas adquiridas incluem deficiências nutricionais de vitamina B6, vitamina B12 ou folato, idade avançada, insuficiência renal crônica e uso de antifólicos (FRANCO, 2001; PERSUHN *et al.*, 2006). Defeitos genéticos envolvem deficiências das enzimas MTHFR e CBS, de herança autossômica recessiva, sendo, portanto, um erro inato do metabolismo da homocisteína (BYDLOWSKI *et al.*, 1998; DUQUE & MELLO, 2003; FRANCO, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2003; PERSUHN *et al.*, 2006). Logo, deficiências hereditárias ou adquiridas, tanto na via de remetilização quanto na via de transulfuração da Hcy, resultam em níveis plasmáticos elevados deste aminoácido e na síndrome clínica da hiperhomocisteinemia ou homocistinúria (BYDLOWSKI *et al.*, 1998; FRANCO, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2003; PERSUHN *et al.*, 2006).

Várias mutações nos genes da MTHFR e CBS já foram identificadas. Na maioria das vezes são mutações raras, cujas consequências clínicas manifestam-se apenas em homozigose, condição em que os pacientes apresentam quadro clínico complexo, caracterizado por déficits neurológicos variados, retardo psicomotor, convulsões, doença arterial prematura e TEV (FRANCO, 2001). Em contraste com a raridade desses defeitos, duas mutações de sentido trocado nos genes da MTHFR (C677T e A1298C) e da CBS (G919A e T833C) e uma inserção de 68 pb no gene da CBS (844ins68) são prevalentes e portanto, merecem destaque para o aumento do risco TEV e de doença arterial prematura (FRANCO, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2003; OMIM +236200).

A anormalidade genética mais comum no metabolismo da homocisteína é uma substituição no nucleotídeo 677 (C677T) no gene que codifica a enzima MTHFR, tornando-a cerca de 50% menos ativa (SACHDEV, 2004). O gene da MTHFR está localizado no cromossomo 1p36.3 e o polimorfismo C677T é encontrado em aproximadamente 12% da população em geral, com variações entre 5% a 18% (TONETTI *et al.*, 2003). A transição de uma citosina (C) para uma timina (T) no nucleotídeo 677 resulta na substituição de uma alanina (GCC) por uma valina (GTC) na posição 222 (Ala222Val) e gera uma variante termolábil da enzima (FROSST *et al.*, 1995). A homozigose 677TT tem sido associada com redução da atividade da MTHFR, dos níveis plasmáticos de folato e elevação das concentrações plasmáticas de Hcy (hiperhomocisteinemia leve e moderada). No entanto, seu papel como fator de risco para TEV e doença cardiovascular ainda é controverso (FRANCO, 2001; FROSST *et al.*, 1995; PERSUHN *et al.*, 2006; TONETTI *et al.*, 2003).

O genótipo termolábil (677TT) tem sido associado com níveis mais elevados de Hcy, mas nem sempre com doença trombótica. Adicionalmente, muitos pacientes homocigotos apresentam níveis normais de Hcy no plasma e já foi demonstrado que a expressão fenotípica de MTHFR é fortemente dependente da disponibilidade do folato, sugerindo que homocigotos para o genótipo termolábil podem ter uma exigência mais elevada do folato do que indivíduos com o genótipo selvagem (677CC). Uma explicação possível é que muitos estudos envolveram grande número de pacientes com níveis de folato adequados e, conseqüentemente, com concentrações normais de Hcy (MAKRIS, 2000).

Um segundo polimorfismo genético do gene da MTHFR - A1298C - resulta na substituição de glutamato (Glu ou E) por alanina (Ala ou A) na posição 429 da enzima (Glu429Ala ou E429A). É observado em aproximadamente 10% dos indivíduos e tem sido associado com redução da atividade enzimática (TONETTI et al., 2003). No entanto, isoladamente, tal polimorfismo não conduz a uma deficiência enzimática severa e não parece estar associado à hiperhomocisteinemia ou a níveis plasmáticos reduzidos de folato. Por outro lado, a combinação em heterocigose de ambos os polimorfismos da MTHFR (C677T e A1298C) conduz a características similares àquelas observadas nos homocigotos 677TT, e tem sido associada à atividade enzimática reduzida, diminuição dos níveis de folato no plasma e hiperhomocisteinemia (FRANCO, 2001; VAN DER PUT *et al.*, 1998).

O gene para CBS está localizado no cromossomo 21q22.3 e já foram identificadas mais de 130 mutações para esse gene. A maioria delas é de sentido trocado, levando à substituição de um aminoácido (Genetics Home Reference, 2008; CBS Mutation Database, 2009). Duas dessas mutações ocorrem no éxon 8 e merecem destaque por terem sido identificadas como prevalentes em casos clínicos de homocistinúria: G919A e T833C. A transição G919A resulta na substituição de uma glicina (G) por uma serina (S) na posição 307 da proteína (G307S), enquanto a transição T833C resulta na substituição de uma isoleucina (I) por uma treonina (T) no códon 278 (I278T) (HU *et al.*, 1993; TSAI *et al.*, 1996; OMIM +236200). Adicionalmente, outra mutação comum no éxon 8, que envolve uma inserção de 68 pb (844ins68), foi encontrada co-segregando em cis com a mutação CBS T833C. Isoladamente esta mutação não parece influenciar os níveis de Hcy ou o risco de TEV, mas em combinação com a mutação MTHFR C677T pode conduzir ao aumento de risco de eventos tromboembólicos. Apesar de frequente em várias populações, a mutação CBS 844ins68 tem revelado grande variabilidade étnica e geográfica (FRANCO *et al.*, 1998; FRANCO, 2001; FRANCO & REITSMA, 2001; TSAI *et al.*, 1996).

A deficiência homozigótica de CBS é rara, sendo sua incidência estimada em 1 em cada 344.000 nascimentos (OMIM +236200). No entanto, sua deficiência heterozigótica é relativamente comum e conduz à moderada elevação de Hcy, estando presente em 1 a cada 300 indivíduos (SACHDEV, 2004). Pacientes homozigotos para a deficiência de CBS desenvolvem a clássica síndrome de homocistinúria, incluindo doença vascular prematura e tromboembolismo, retardo mental e anormalidades esqueléticas (BYDLOWSKI *et al.*, 1998). A expressividade é variável para todos os sinais clínicos. Duas variações fenotípicas são reconhecidas, homocistinúria responsiva à vitamina B6 e homocistinúria não-responsiva à vitamina B6, sendo esses fenótipos relacionados, respectivamente, às mutações I278T (T833C) e G307S (G919A). A homocistinúria responsiva à vitamina B6 é tipicamente, mas nem sempre, mais suave do que a variação não-responsiva (KRAUS *et al.*, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

Os pacientes que apresentam trombose em idade jovem, trombose venosa em local pouco comum, histórico familiar de trombose, trombose recorrente ou trombose espontânea devem ser submetidos à investigação etiológica. A princípio, o resultado dessa investigação não altera o tratamento no evento agudo, porém é de extrema importância para o seguimento do paciente (HEIT, 2007).

A importância na definição etiológica do TEV consiste em, sempre que possível, retirar os fatores de riscos ambientais quando identificados. Nas trombofilias hereditárias, como não há a possibilidade de anular a susceptibilidade genética, o paciente deve ser orientado a não exposição aos fatores de riscos ambientais para trombose. Nos casos em que a exposição é inevitável deverão ser avaliados em relação à administração de anticoagulante profilático para evitar novos episódios de trombose.

Tendo em vista que: as tromboses são eventos de etiopatologia multigênica, constituindo na atualidade uma das causas mais comuns de morbimortalidade (FRANCO, 2001; RAMOS *et al.*, 2006) e que a presença de mutações em vários genes aumenta significativamente o risco de sua ocorrência, principalmente quando combinadas com fatores de risco adquiridos (FRANCO, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2009); é de grande importância a realização de estudos que possam contribuir para uma melhor compreensão da interação genótipo/ambiente na variabilidade das manifestações fenotípicas dessas doenças. Tal compreensão poderá fornecer subsídios para um tratamento em longo prazo mais individualizado e, conseqüentemente, mais eficaz dos portadores de trombofilias.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores preditivos de trombose através da análise dos polimorfismos nos genes MTHFR (C677T e A1298C) e Cistationina β -sintetase (844ins68 e T833C) e das dosagens de homocisteína, ácido fólico e vitamina B12 em pacientes com diagnóstico de trombose, com posterior investigação de uma possível associação entre tais polimorfismos com a alteração dessas dosagens e a variabilidade clínica da trombose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A análise molecular dos polimorfismos estudados neste trabalho foi realizada no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB). As dosagens de homocisteína, ácido fólico e vitamina B12 foram realizadas no Laboratório Sabin.

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal (Anexo 1) e da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Anexo 2). Para a realização desta pesquisa foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo 3). O TCLE foi lido e assinado pelos voluntários previamente à sua participação nesta pesquisa, na presença dos pesquisadores responsáveis. No momento da anamnese, foi preenchido pelos pesquisadores um questionário sobre hábitos de vida, histórico familiar de trombose e doenças cardiovasculares, existência de infecção/inflamação e demais informações relevantes à investigação (Anexo 4). Os voluntários foram devidamente informados sobre o direito de solicitar qualquer informação durante a realização do trabalho, bem como, de abandonar a pesquisa a qualquer momento, se assim desejar, bastando para isso comunicar a decisão aos pesquisadores responsáveis.

Os voluntários participantes foram provenientes da Rede Hospitalar Pública do Distrito Federal, atendidos no serviço ambulatorial do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia (NHH) do Hospital de Base da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Os participantes foram selecionados conforme os critérios de inclusão/exclusão.

4.1. Seleção dos pacientes

Para a realização da pesquisa foram selecionados 85 pacientes com diagnóstico de trombose, em tratamento na Rede Hospitalar Pública do Distrito Federal.

4.1.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes entre 14 e 56 anos com diagnóstico de trombose. O diagnóstico da trombose foi realizado por profissional médico da especialidade correspondente ao local acometido, sendo as trombozes venosas cerebrais e acidente vascular cerebral diagnosticados pela neurologia, as trombozes venosas profundas pela cirurgia vascular, os casos de embolia pulmonar pela pneumologia.

4.1.2. Critérios de Exclusão

Os pacientes portadores de neoplasia, doenças mieloproliferativas, síndrome nefrótica, síndrome do anticorpo antifosfolípide, imobilização prolongada e os pacientes incapazes de compreenderem os termos do TCLE foram excluídos da pesquisa. Para tal, foram realizadas pesquisas em prontuário médico e anamnese.

4.2. Coleta de amostra de sangue periférico

Após a aceitação dos voluntários em participar da pesquisa, a anamnese e a assinatura do TCLE, foi realizada punção venosa com a coleta de dois tubos de sangue periférico (~4 mL/tubo), utilizando-se agulhas descartáveis estéreis e tubos Vacutainer devidamente identificados com o número da amostra. Os tubos utilizados foram um contendo EDTA e o outro sem anticoagulante, ambos submetidos à centrifugação a 1.500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos.

O tubo sem anticoagulante foi encaminhado ao Laboratório Sabin para as dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína logo após a coleta. A fração leucocitária formada no tubo com EDTA de cada amostra, foi transferida para um microtubo de 2 mL previamente enumerado. A esta alíquota, cuidadosamente removida com a ajuda de uma pipeta Pasteur, foi acrescentado aproximadamente igual volume de solução tampão de estocagem de eritrócitos (0,0598 M citrato trisódico; 0,02 M NaH₂PO₄, 0,0197 M Na₂PO₄, 40% de glicerol, pH 7,1). Após homogeneização, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.3 Dosagens de Ácido Fólico, Vitamina B12 e Homocisteína

As dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína foram realizadas no Laboratório Sabin. A metodologia de quimioluminescência foi utilizada para os três exames. Os dois primeiros foram realizados no aparelho Siemens Centaur XP, com uso do Kit VB12 para a dosagem de vitamina B12 e Kit Folate (FOL) para dosagem do ácido fólico. A dosagem de homocisteína foi realizada no equipamento Siemens - Immulite 2000 XPI - com o Kit Homocysteine.

4.4 Extração de DNA

A partir da fração leucocitária previamente armazenada, a extração de DNA foi realizada por kit Blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído foi congelado a -20°C.

4.5 Estudo molecular (genotipagem) das mutações MTHFR C677T e A1298C; CBS 844ins68 e T833C

A genotipagem foi realizada por meio de amplificação dos fragmentos de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction), seguida de corte com enzimas de restrição (exceto CBS 844ins68). Os iniciadores (primers) e as referências dos protocolos utilizados na amplificação do DNA/genotipagens estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Sequência de iniciadores (*primers*) e enzimas de restrição utilizadas nas análises dos polimorfismos dos genes MTHFR e CBS

Gene/Mutação	Localização cromossômica	Sequências dos <i>primers</i> (iniciadores)	Enzima de restrição	Referência
MTHFR C677T				
Sense	1p36.3	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	<i>Hinf</i> I	Yi, <i>et al.</i> , 2002
Antisense		5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'		
MTHFR A1298C				
Sense	1p36.3	5'-CAAGGAGGAGCTGCTGAAGA-3'	<i>Mbo</i> II	Yi, <i>et al.</i> , 2002
Antisense		5'-CCACTCCAGCATCACTCACT-3'		
CBS 844ins68				
Sense	21q22.3		-	Dutta <i>et al.</i> , 2005
Antisense		5'-GTTGTTAACGGCGGTATTGG-3'		
		5'-GTTGTCTGCTCCGTCTGGTT-3'		
CBS T833C				
Sense			<i>Bsr</i> I	
Antisense				

Para ser amplificado, o DNA extraído foi quantificado e diluído para uma concentração de 40 ng/μL. Os iniciadores foram diluídos com água miliQ esterilizada para uma concentração de uso de 50 μM utilizando-se para base de cálculo a quantidade de nanomoles obtidos na síntese destes (dados fornecidos pelo fabricante).

4.5.1 Genotipagem MTHFR C677T e A1298C

As condições da mistura que foi realizada para a reação de PCR da MTHFR encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2: Condições da mistura para reação de PCR da MTHFR

Reagente	Quantidade por tubo (μL)
Água milli-Q	18,69
Tampão 10X	3,67
dNTP 10mM (concentração final de 0,2 mM de cada)	0,5
MgCl ₂ 50mM (concentração final de 1,5 mM)	0,6
Primers C677T (<i>sense</i> e <i>antisense</i>) (concentração final de 0,3 μM - primers F e R misturados)	0,15 (de cada)
Primers A1298C (<i>sense</i> e <i>antisense</i>) (concentração final de 0,5 μM - primers F e R misturados)	0,25 (de cada)
Taq (2,5U)	0,25
Total do Mix	24,11
DNA (40 ng)	1 μL (amostras diluídas para 40 ng/μL)

Após a mistura pipetada em microtubo previamente enumerado e homogeneizada com o DNA correspondente ao número identificado no microtubo, foi acrescentada uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes. O microtubo foi então fechado e colocado no termociclador MJ PTC-100 (MJ. Research Inc., Waltham, MA 02451 USA).

Para MTHFR, as condições da PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 8 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados da MTHFR, de 198 (loco 677) e 128 (loco 1298) pb, foram digeridos com as endonucleases Hinf I e Mbo II nas condições apresentadas nas **Tabelas 3 e 4**. As duas reações foram encubadas a 37°C por 4 horas.

Tabela 3: Quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR C677T

Reagente	Volume por tubo (µL)
Água mili-Q	13,4
Tampão 10X	1,0
<i>Hinf</i> I	0,1
Total do Mix	14,5
Produto da PCR	5,0 (sem resíduo de óleo)
Volume final	19,5

Tabela 4: Quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR A1298C

Reagente	Volume por tubo (µL)
Água mili-Q	8,15
Tampão 10X	1,0
<i>Mbo</i> II	0,1
Total do Mix	9,25
Produto da PCR	5,0 (sem resíduo de óleo)
Volume final	14,25

Os produtos de PCR e os fragmentos de restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante a 150 mV (20-30 mA) durante 2 horas e coloração com nitrato de prata (**Figura 11**).

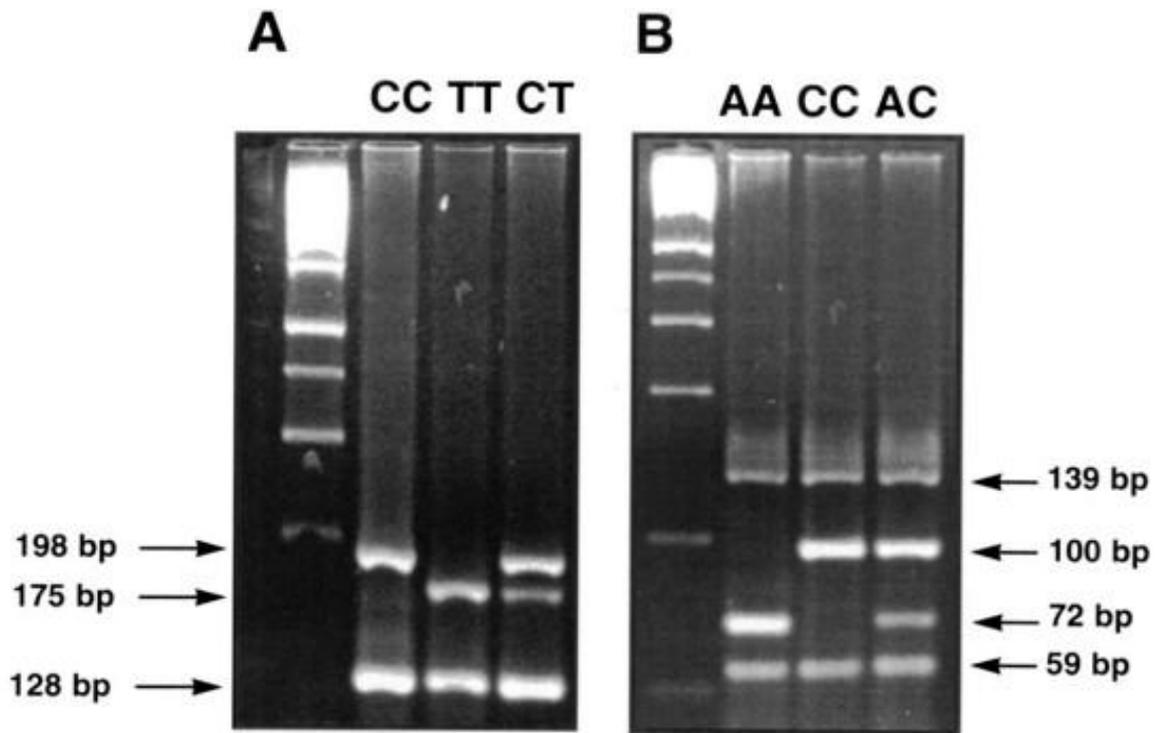


Figura 11: Genotipagem MTHFR C677T e A1298C (Fonte YI *et al.*, 2002). A amplificação por PCR gerou dois fragmentos, de 198 pb e 128 pb, relativos, respectivamente, aos locos 677 e 1298. **(A)** MTHFR C677T: o produto amplificado do genótipo 677CC permaneceu com 198 pb, visto que o alelo selvagem não apresenta o sítio de restrição para enzima *HinfI* (YI *et al.*, 2002). A substituição, ao criar um sítio de restrição, gerou os fragmentos 175 pb e 23 pb (este último não retido no gel). Assim, o genótipo 677CT foi determinado pela presença de duas bandas, de 198 e 175 pb, enquanto o genótipo 677TT, de uma banda de 175 pb. **(B)** MTHFR A1298C: o genótipo 1298AA foi definido pela presença de uma única banda de 72 pb; o genótipo 1298AC, pela presença de duas bandas, de 100 e 72 pb; e o genótipo 1298CC pela presença de uma única banda de 100 pb. O fragmento de 28 pb não foi retido no gel. As bandas de 139 e 59 pb presentes em todos os genótipos foram decorrentes da digestão do fragmento de 198 pb (loco 677) pela enzima *MboII*.

4.5.2 Genotipagem CBS 844ins68 e T833C

A reação de PCR foi realizada conforme as condições mostradas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Condições da mistura para reação de PCR da CBS

Reagente	Quantidade por tubo (µL)
Água milli-Q	16,2
Tampão 10X	2
dNTP 10mM (concentração final de 0,2 mM)	0,4
MgCl ₂ 50mM (concentração final de 1mM)	0,4
Primers (<i>sense e antisense</i>) (2,0 µM de cada primer)	0,4 de cada
Taq (1 U)	0,2
Total do Mix	20
DNA (75-100 ng)	2 µL (amostras diluídas para 40 ng/µL)

As condições da PCR da CBS envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 93°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 45 segundos, 58°C por 40 segundos (anelamento), 72°C por 40 segundos (extensão) e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

O produto da PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante após 2 horas a 150 mV (20-30 mA). Dois tipos de fragmentos foram observados: 171 pb, se alelo selvagem, e 239 pb, se alelo mutante (**Figura 12-A**). Visto que a mutação T833C segrega em cis com a 844ins68, para sua análise o produto da PCR da CBS foi submetido à digestão pela enzima *BsrI* (**Tabela 6**).

Tabela 6: Quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da CBS 844ins68/T833C

Reagente	Quantidade por tubo (µL)
Água milli-Q	18,9
Tampão 10X	2,5
<i>BsrI</i> (1U)	0,6
Total do Mix	22 µl
Produto de PCR	3
Volume final	25µl

O produto da digestão foi administrado em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante a 150 mV (20-30 mA) durante 2 horas. A interpretação da digestão e a genotipagem foram realizadas conforme a **Figura 12-B**.

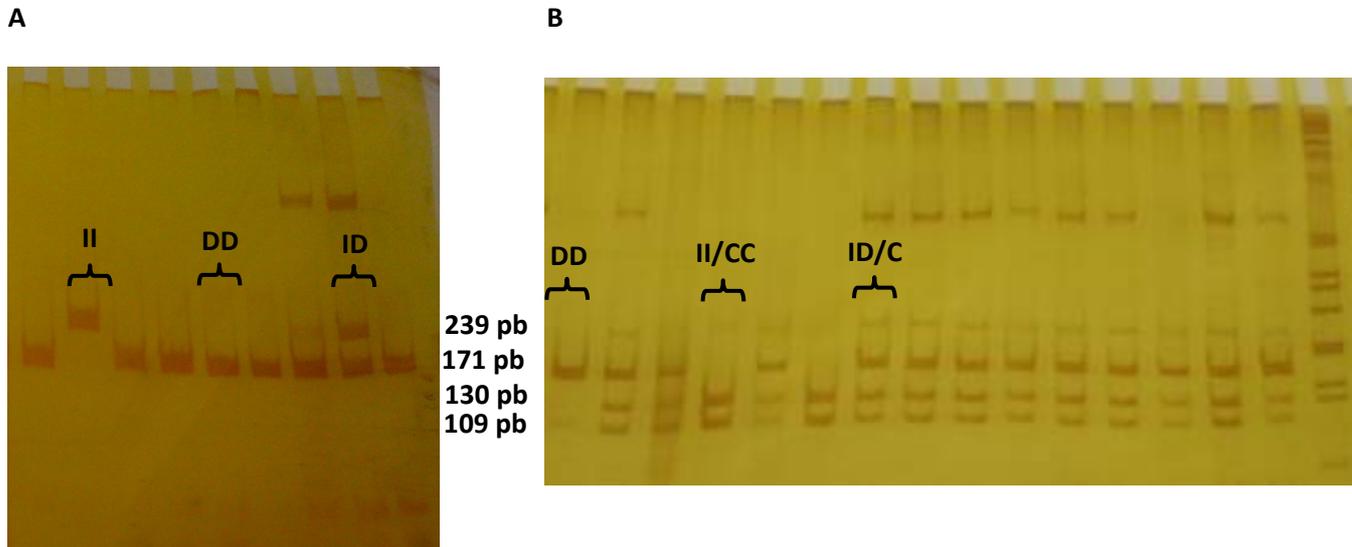


Figura 12: Genotipagem CBS 844ins68/T833C. **(A)** Produto da PCR: 171 pb alelo selvagem e 239 pb alelo mutante. **(B)** Produto da restrição *Bsr* I: digestão da banda 239 pb em uma banda de 130 e outra de 109 pb.

4.6 Análises estatísticas

4.6.1 Estatística de populações

Os marcadores genéticos utilizados foram submetidos ao teste de probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo método convencional do qui-quadrado (χ^2), o qual serve para verificar se uma distribuição observada de dados ajusta-se a uma distribuição esperada (teórica) (CALLEGARI-JACQUES, 2008). Os p-valores foram estimados pelo programa *Genepop on the web* versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>), sendo $p > 0,05$ considerado em EHW. O mesmo programa foi usado para calcular as frequências alélicas e genotípicas de cada loco, os parâmetros de diversidade genética tais como heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e coeficiente de endogamia intrapopulacional (FIS), e testar um possível desequilíbrio de ligação entre os locos da MTHFR e CBS.

4.6.2 Diferenças entre sexo, faixa etária, cor da pele e genótipos de MTHFR e CBS nas dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 15.0. As variáveis contínuas foram testadas para a distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os sexos nas dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney (dados não normalizados). Os indivíduos foram estratificados por idade, de acordo com a sua inclusão em um dos seguintes grupos: adolescentes (15-19 anos), adultos jovens (20-40 anos) e adultos de meia idade (41-56 anos), seguindo os critérios de idade para os valores de referência de parâmetros bioquímicos: para fins clínicos alguns valores de referência são diferentes para idades até 19 anos de idade (FREIRE *et al.*, 2008). Possíveis diferenças entre as dosagens séricas por faixa etária, cor da pele e genótipos de cada marcador genético foram investigadas pelo teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Mann Whitney (para as comparações 2-a-2). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Testes não paramétricos são mais apropriados quando (1) não se conhece a distribuição dos dados em uma população, (2) quando a distribuição é assimétrica e não se deseja realizar uma transformação dos dados, e (3) quando a distribuição é gaussiana em alguns grupos e assimétrica em outros. São, portanto, testes de aplicação mais ampla do que os paramétricos (CALLEGARI-JACQUES, 2008), sendo os mais comuns, (1) o teste de Mann-Whitney (MANN & WHITNEY, 1947), usado para comparar as funções de distribuição de uma variável em duas amostras independentes, e (2) o teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952), usado quando existem mais de dois grupos a serem comparados. Enquanto o teste de Mann-Whitney é a alternativa não paramétrica para o teste T para amostras independentes, o teste de Kruskal-Wallis é a alternativa não paramétrica para ANOVA *one way* (CALLEGARI-JACQUES, 2008).

4.6.3 Testes de correlações/associações

O teste do (χ^2) é também adequado para verificar se existe associação entre duas variáveis qualitativas, sendo então chamado de teste χ^2 de associação (CALLEGARI-JACQUES, 2008). Assim, possíveis associações entre sexo/grupo etário, sexo/cor da pele e grupo etário/cor da pele foram avaliadas pelo teste do χ^2 , enquanto correlações entre estas

variáveis e as dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. O mesmo teste foi usado para verificar possíveis correlações entre trombose arterial ou venosa e entre trombose recorrente ou não e tais dosagens. O coeficiente de correlação de Spearman exige que as variáveis tenham sido medidas pelo menos em escala ordinal, para que os valores possam ser ordenados e pode também ser empregado quando variáveis quantitativas não apresentam distribuição bivariada normal. O coeficiente de Spearman varia entre -1 (correlação perfeita negativa) e $+1$ (correlação perfeita positiva) (CALLEGARI-JACQUES, 2008). Os testes foram realizados usando o programa SPSS versão 15.0 e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.6.4 Interação entre os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR e 844ins68 da CBS nos valores das dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína

Possíveis interações entre os polimorfismos genéticos nos resultados das dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína foram avaliadas através de análise de variância multivariada (MANOVA), usando o programa SPSS versão 15.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Consideramos para essas análises os dados como normais (a violação desta hipótese implica em uma pequena perda da significância, podendo assim ser desconsiderada), e a variância das observações constante. Esta foi verificada no SPSS pelos gráficos de dispersão versus nível com o teste de Levene. Este teste mede a igualdade de variâncias para um par de variações e seu uso é particularmente recomendado porque é menos afetado por desvios da normalidade (HAIR *et al.*, 2007).

A análise multivariada é importante para estudar se em conjunto as variáveis (neste caso, os polimorfismos genéticos estudados) podem demonstrar diferença. Essa diferença pode ser evidenciada pelo acúmulo de diferenças das variáveis individuais ou por diferenças existentes entre combinações dessas variáveis (PONTES, 2005). A MANOVA (análise de variância multivariada) pode ser aplicada neste caso uma vez que é robusta às violações da normalidade multivariada e às violações de homogeneidade das matrizes de variância-covariância, se os grupos forem aproximadamente do mesmo tamanho (RIBAS & VIEIRA, 2011).

4.6.5 Odds Ratio

O Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC) foi calculado para se estimar o risco de recorrência de desenvolver trombose venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP), trombose venosa cerebral (TVC) ou acidente vascular cerebral (AVC), usando-se o programa SPSS. Os p-valores foram gerados pelo teste do qui-quadrado de Pearson, sendo $p < 0,05$ considerados significativos. Para este teste foram usados dados sobre sexo, grupo etário, cor da pele, atividade física, evento familiar de problema cardiovascular ou trombose antes dos 50 anos, intervenção cirúrgica e uso de anticoncepcional (mulheres).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da amostra de pacientes

A amostra foi composta por pacientes brancos, pardos e negros de ambos os sexos e de faixa etária entre 14-56 anos (**Tabelas 7, 8 e 9**).

Tabela 7: Frequência da distribuição por sexo dos pacientes analisados

Mulheres	Homens
N(%)	N(%)
65(76,5)	20(23,5)

Tabela 8: Frequência da distribuição por faixa etária dos pacientes analisados

14-19 anos	20-40 anos	41-56 anos
N(%)	N(%)	N(%)
6(7,1)	59(69,4)	20(23,5)

Tabela 9: Frequência da distribuição por cor da pele dos pacientes analisados

Branca	Parda	Negra
N(%)	N(%)	N(%)
32(37,6)	40(47,1)	13(15,3)

O perfil da amostra de pacientes (grupo total e sexos) em relação a evento familiar de problema cardiovascular ou trombose antes dos 50 anos, intervenções cirúrgicas, atividade física e uso de anticoagulante da coleta dos exames é mostrado na **Figura 13**; o uso de anticoncepcional durante o evento e aborto no sexo feminino na **Figura 14**; o tipo de trombose (venosa ou arterial) e recorrência na **Figura 15**; e os tipos específicos de trombose na **Figura 16**.

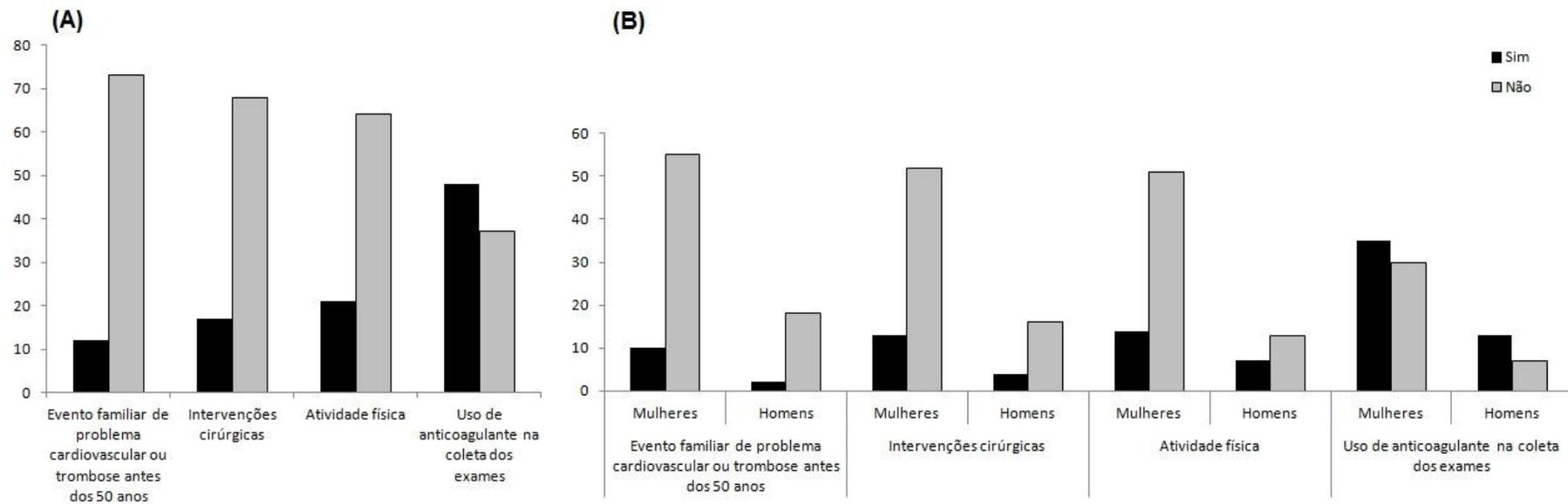


Figura 13: Perfil da amostra de pacientes no grupo total (A) e por sexos (B) quanto a evento familiar de problema cardiovascular ou trombose antes dos 50 anos, intervenções cirúrgicas, atividade física e uso de anticoagulante na coleta dos exames.

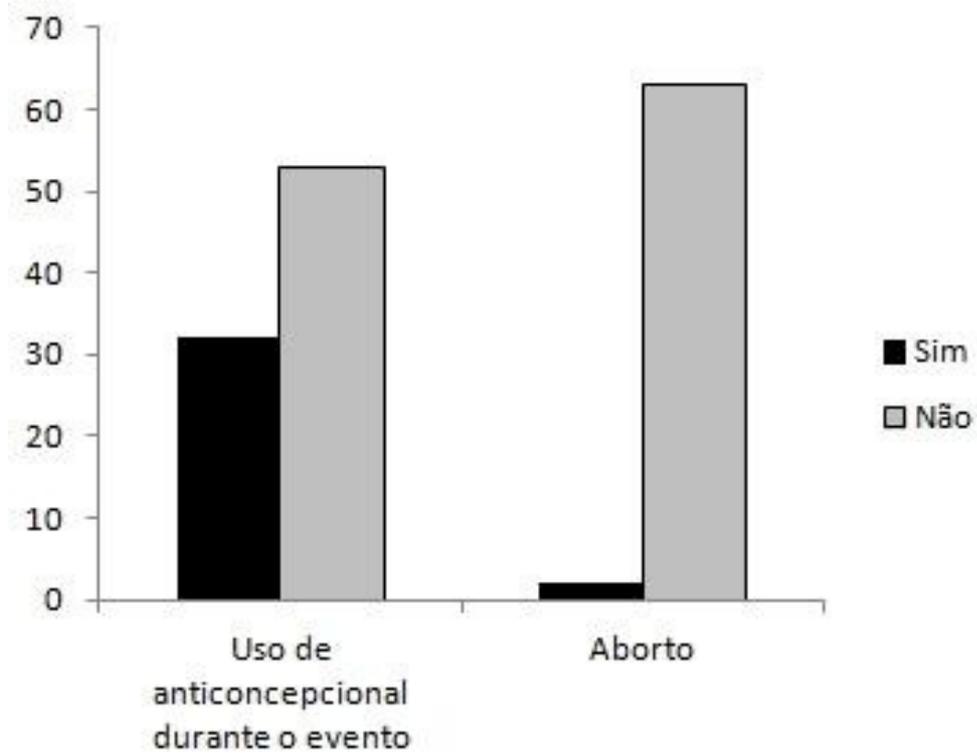


Figura 14: Perfil da amostra de pacientes do sexo feminino quanto a uso de anticoncepcional durante o evento e aborto.

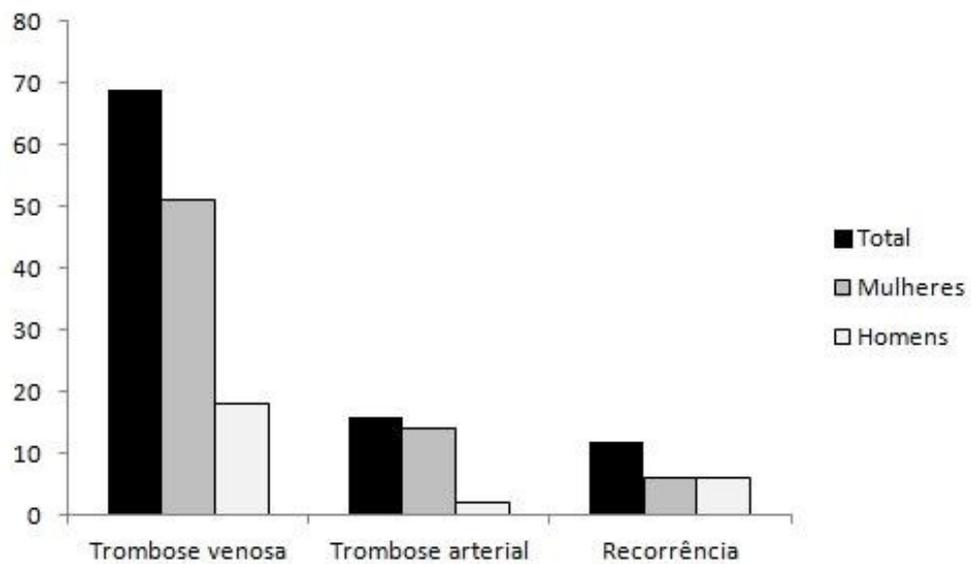


Figura 15: Perfil da amostra de pacientes quanto ao tipo de trombose (venosa ou arterial) e recorrência

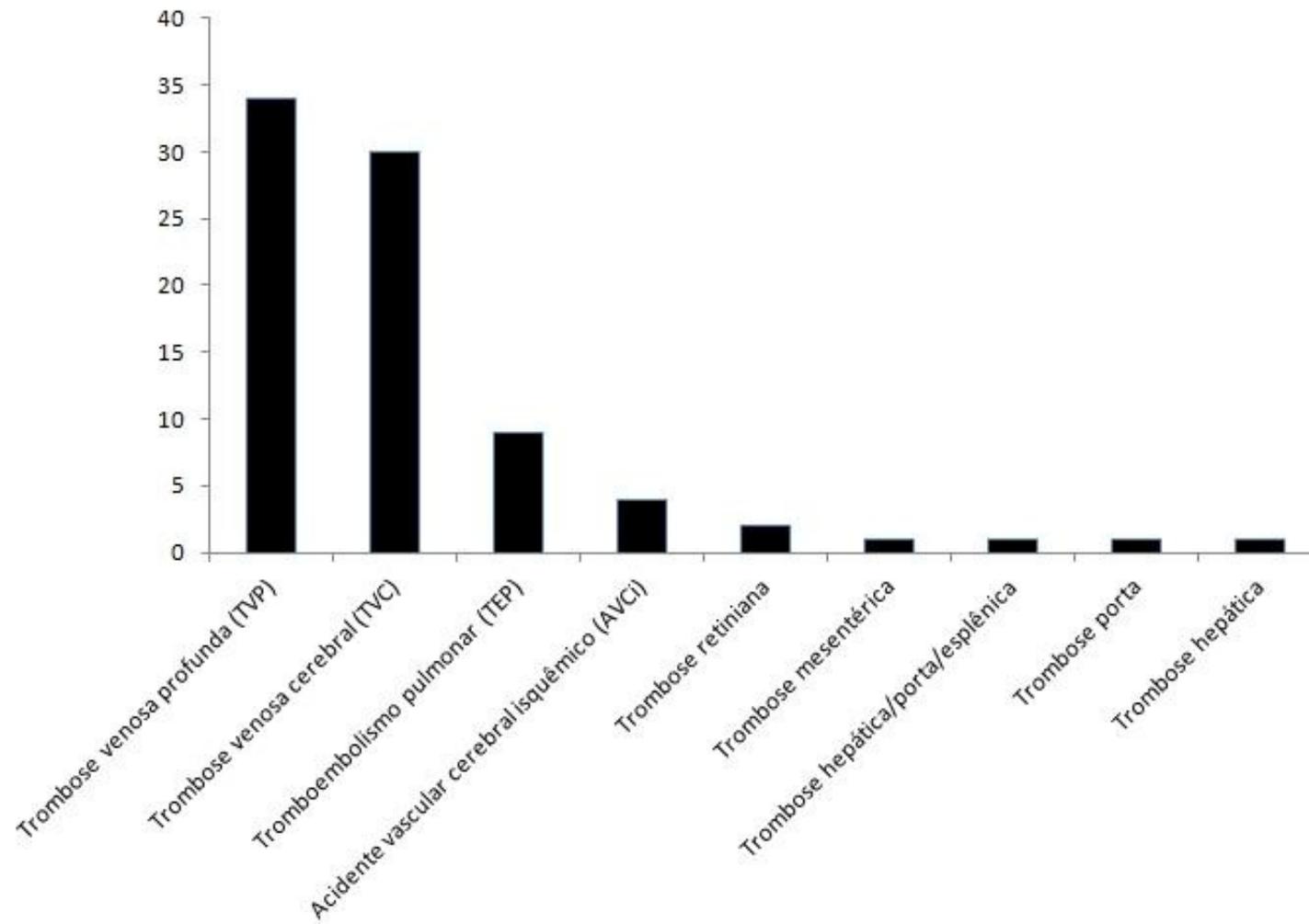


Figura 16: Perfil da amostra de pacientes quanto ao tipo específico de trombose.

Dois pacientes tiveram TVP+TEP ao mesmo tempo.

5.2 Estatística de populações

As distribuições dos genótipos da CBS 844ins68 ($p=0,7155$), MTHFR C677T ($p=0,2832$) e MTHFR A1298C ($p=0,2602$) encontraram-se de acordo com o esperado, não havendo desvio no Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) (**Tabela 10**). Em relação ao polimorfismo CBS T833C, que segrega em cis com a inserção de 68 pb no exon 8, todos os indivíduos portadores da inserção também eram portadores do alelo C (mutante), sendo sua frequência idêntica àquela do alelo I do polimorfismo CBS 844ins68 (0,1765). Sendo assim, não foi possível testar o polimorfismo CBS T833C para o EHW. Nenhum desequilíbrio de ligação foi encontrado entre os locos CBS 844ins68 e MTHFR C677T ($p=0,81597$), CBS 844ins68 e MTHFR A1298C ($p= 0,223910$) ou MTHFR C677T e MTHFR A1298C ($p=0,093130$) e as distribuições genotípicas entre os locos testados são mostradas nas **Tabelas 11, 12 e 13**.

Tabela 10: Distribuição das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C, dados de diversidade genética e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em pacientes analisados

Marcador genético/Alelos	Frequências alélicas	Genótipos	Número de indivíduos observados	Número de indivíduos esperados	Heterozigosidade observada (H _o)	Heterozigosidade Esperada (H _e)	Coefficiente de Endogamia Intrapopulacional (F _{IS})	Teste do EHW (p-valores)
CBS 844ins68								
D	0,8235	DD	58	57,5740	0,2824	0,2907	0,0345	0,7155
I	0,1765	ID	24	24,8521				
		II	3	2,5740				
MTHFR C677T								
C	0,7294	CC	43	45,1243	0,4471	0,3948	-0,1267	0,2832
T	0,2706	CT	38	33,7515				
		TT	4	6,1243				
MTHFR A1298C								
A	0,7412	AA	49	46,5976	0,3294	0,3836	0,1472	0,2602
C	0,2588	AC	28	32,8047				
		CC	8	5,5976				

p<0,05 indica desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados foram gerados pelo programa estatístico *Genepop on the web* versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

Tabela 11: Tabela de contingência para o teste de desequilíbrio genotípico entre os locos CBS 844ins68 e MTHFR C677T

CBS 844ins68	MTHFR C677T			Total
	CC	CT	TT	
DD	28	27	3	58
ID	14	9	1	24
II	1	2	0	3
Total	43	38	4	85

p=0,81597 (<http://genepop.curtin.edu.au>)

Tabela 12: Tabela de contingência para o teste de desequilíbrio genotípico entre os locos CBS 844ins68 e MTHFR A1298C

CBS 844ins68	MTHFR A1298C			Total
	AA	AC	CC	
DD	30	23	5	58
ID	17	5	2	24
II	2	0	1	3
Total	49	28	8	85

p= 0,223910 (<http://genepop.curtin.edu.au>)

Tabela 13: Tabela de contingência para o teste de desequilíbrio genotípico entre os locos MTHFR C677T e MTHFR A1298C

MTHFR C677T	MTHFR A1298C			Total
	AA	AC	CC	
CC	20	17	6	43
CT	25	11	2	38
TT	4	0	0	4
Total	49	28	8	85

p=0,093130 (<http://genepop.curtin.edu.au>)

5.3 Frequência de distribuição dos polimorfismos da MTHFR e CBS no grupo total e por sexo

Para a CBS 844ins68, foi mais frequente a presença do alelo selvagem em homozigose (68,2%), sendo 51,8% nos pacientes do sexo feminino e o restante no sexo masculino. A heterozigose foi observada em 28,3% dos pacientes e o alelo mutante em homozigose em 3,5% (**Tabela 14**). Visto que todos os indivíduos portadores da inserção de 68 pb no exon 8 da CBS também foram portadores do alelo C (mutante) do polimorfismo CBS T833C, a frequência dos genótipos heterozigoto (C0) e homozigoto (CC) da CBS T833C não foi mostrada na **Tabela 14**, por ser a mesma apresentada, respectivamente, pelos indivíduos ID e II do polimorfismo CBS 844ins68. O mesmo raciocínio foi feito para as demais análises realizadas, onde apenas os dados do polimorfismo CBS 844ins68 foram apresentados.

Para os outros marcadores estudados, MTHFR C677T e A1298C, a frequência foi também maior para o genótipo sem mutação, 50,6% e 57,6% na população total sendo 40% e 44,7% nas mulheres, respectivamente. A presença de heterozigose foi de 44,7% para MTHFR C677T e 32,9% para MTHFR A1298C enquanto que a homozigose para mutação foi de 4,7% para o primeiro marcador e de 9,4% para o último (**Tabela 14**).

Tabela 14: Frequência da distribuição no grupo total e por sexo dos genótipos dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos pacientes analisados

Marcador Genético	Grupo Total N(%)	Mulheres N(%)	Homens N(%)
CBS 844ins68			
DD	58(68,2)	44(51,8)	14(16,4)
ID	24(28,3)	19(22,4)	5(5,9)
II	3(3,5)	2(2,3)	1(1,2)
MTHFR C677T			
CC	43(50,6)	34(40,0)	9(10,6)
CT	38(44,7)	28(32,9)	10(11,8)
TT	4(4,7)	3(3,5)	1(1,2)
MTHFR A1298C			
AA	49(57,6)	38(44,7)	11(12,9)
AC	28(32,9)	20(23,5)	8(9,4)
CC	8(9,4)	7(8,2)	1(1,2)

5.4 Frequência de distribuição dos polimorfismos da MTHFR e CBS por faixa etária e cor da pele

A frequência de distribuição dos genótipos acima também foi avaliada para os diferentes grupos de faixa etária e cor da pele conforme ilustrado nas **Tabelas 15 e 16**.

Tabela 15: Frequência da distribuição por faixa etária dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos pacientes analisados

Marcador Genético	Pacientes		
	14-19 anos N(%)	20-40 anos N(%)	41-56 anos N(%)
CBS 844ins68			
DD	4(4,7)	41(48,2)	13(15,3)
ID	2(2,3)	15(17,6)	7(8,2)
II	0(0,0)	3(3,5)	0(0,0)
MTHFR C677T			
CC	1(1,2)	30(35,3)	12(14,1)
CT	4(4,7)	28(32,9)	6(7,1)
TT	1(1,2)	1(1,2)	2(2,3)
MTHFR A1298C			
AA	4(4,7)	32(37,6)	13(15,3)
AC	2(2,3)	20(23,5)	6(7,1)
CC	0(0,0)	7(8,2)	1(1,2)

Tabela 16: Frequência da distribuição por cor da pele dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos pacientes analisados

Marcador Genético	Pacientes		
	Branca N(%)	Parda N(%)	Negra N(%)
CBS 844ins68			
DD	22(25,9)	28(32,9)	8(9,4)
ID	8(9,4)	11(12,9)	5(5,9)
II	2(2,3)	1(1,2)	0(0,0)
MTHFR C677T			
CC	16(18,8)	16(18,8)	11(12,9)
CT	15(17,6)	21(24,7)	2(2,3)
TT	1(1,2)	3(3,5)	0(0,0)
MTHFR A1298C			
AA	17(20,0)	25(29,4)	7(8,2)
AC	12(14,1)	11(12,9)	5(5,9)
CC	3(3,5)	4(4,7)	1(1,2)

5.5 Diferenças entre sexo, faixa etária, cor da pele e genótipos de MTHFR e CBS nas dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína

Com o uso do Teste de Mann-Whitney foi formulada a hipótese nula de que as dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína da população seriam as mesmas para os dois grupos: mulheres e homens. O resultado obtido foi de que essa hipótese só foi aceita para o ácido fólico ($p=0,075$) e vitamina B12 ($p=0,419$). Para as dosagens de homocisteína houve diferença entre mulheres e homens ($p=0,000$) (**Tabela 17**).

Tabela 17: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, no grupo total e por sexo

Grupo	Dosagens séricas		
	Ácido fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)	Homocisteína (micromol/L)
Total	10,07 ± 0,53	471,61 ± 31,98	8,62 ± 0,72
Mulheres	10,45 ± 0,60	433,50 ± 16,17	7,23 ± 0,24
Homens	8,81 ± 1,15	600,00 ± 126,83	13,30 ± 2,86
p-valores	0,075	0,419	0,000

ng/mL= nanogramas por mililitro; pg/mL= picogramas por mililitro, micromol/L= micromol por litro. Os dados correspondem à média ± EPM (erro padrão da média). Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre os sexos.

Pelo teste de Kruskal Wallis, não foi observada diferença entre as dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína e faixa etária. Quando realizado o mesmo teste para as dosagens e cor da pele, também não foi encontrada diferença entre os grupos. Todos os valores de p foram maiores que 0,05 (**Tabelas 18 e 19**). Resultado igual foi obtido também com o uso do teste de Kruskal Wallis para as dosagens séricas e marcadores genéticos individualmente analisados (**Tabela 20**).

Tabela 18: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, por faixa etária

Faixa etária	Dosagens séricas		
	Ácido fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)	Homocisteína (micromol/L)
14-19 anos	9,48 ± 2,52	471,17 ± 63,57	7,60 ± 1,25
20-40 anos	9,79 ± 0,63	445,29 ± 21,49	8,64 ± 1,01
41-56 anos	11,11 ± 1,11	552,11 ± 122,71	8,88 ± 0,68
p-valores	0,272	0,843	0,335

ng/mL= nanogramas por mililitro; pg/mL= picogramas por mililitro, micromol/L= micromol por litro. Os dados correspondem à média ± EPM (erro padrão da média). Os p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal Wallis.

Tabela 19: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, por cor da pele.

Cor da pele	Dosagens séricas		
	Ácido fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)	Homocisteína (micromol/L)
Branca	10,58 ± 0,85	512,63 ± 74,62	7,87 ± 0,48
Parda	9,41 ± 0,82	463,63 ± 28,78	9,21 ± 1,52
Negra	10,74 ± 1,3	394,00 ± 29,73	8,75 ± 0,61
p-valores	0,391	0,590	0,300

ng/mL= nanogramas por mililitro; pg/mL= picogramas por mililitro, micromol/L= micromol por litro. Os dados correspondem à média ± EPM (erro padrão da média). Os p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal Wallis.

Tabela 20: Dosagens séricas de Ácido fólico, Vitamina B12 e Homocisteína dos pacientes analisados, por genótipos dos polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C

Marcador Genético	Dosagens séricas		
	Ácido fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)	Homocisteína (micromol/L)
CBS 844ins68			
DD	10,12 ± 0,69	490,35 ± 44,48	8,01 ± 0,34
ID	9,90 ± 0,92	416,52 ± 29,10	10,31 ± 2,48
II	10,43 ± 0,67	538,00 ± 139,03	7,30 ± 1,25
p-valores	0,640	0,500	0,881
MTHFR C677T			
CC	10,03 ± 0,63	498,19 ± 58,95	7,54 ± 0,28
CT	10,22 ± 0,97	430,08 ± 23,90	9,89 ± 1,57
TT	9,20 ± 1,21	576,75 ± 80,42	8,23 ± 1,97
p-valores	0,837	0,192	0,499
MTHFR A1298C			
AA	9,97 ± 0,69	448,90 ± 26,18	8,01 ± 0,40
AC	10,67 ± 1,05	518,19 ± 86,42	9,87 ± 2,10
CC	8,64 ± 1,14	450,75 ± 38,99	8,08 ± 0,91
p-valores	0,676	0,783	0,926

5.6 Testes de correlações

Nenhuma correlação foi detectada entre sexo/grupo etário, sexo/cor da pele ou grupo etário/cor da pele. Porém, uma correlação positiva foi detectada entre sexo e homocisteína ($p=0,000$), onde os homens apresentaram dosagem maior. Nenhuma correlação foi encontrada entre trombose venosa ou arterial e as dosagens séricas realizadas, mas uma correlação positiva entre trombose recorrente e homocisteína também foi evidenciada ($p=0,006$).

5.7 Interação entre os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR e 844ins68 da CBS nos valores das dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína

Quando o teste de análise de variância multivariada (MANOVA– *multivariate analysis of variance*) foi usado para verificar as interações entre os três polimorfismos (CBS844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C) e as dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína, os resultados foram significativos a um nível de $p=0,000$ para os valores de homocisteína. Neste contexto, o teste de Tukey usado para as comparações 2-a-2 entre os genótipos indicou diferenças entre os genótipos DD e ID da CBS844ins68 ($p=0,002$), entre CC e CT da MTHFR C677T ($p=0,000$), e entre AA e AC da MTHFR A1298C ($p=0,011$), em que os heterozigotos apresentaram níveis mais altos de homocisteína sérica.

5.8 Odds Ratio

Além dos valores significativos relacionados na Tabela 21, vale ressaltar alguns valores não significativos, que tiveram um p-valor relativamente baixo. A atividade física reduziu não significativamente o risco de trombose arterial (OR=0,175, IC=0,022-1,421, $p=,071$), TEP (OR=0,862, IC=0,782-0,950, $p=0,078$), enquanto o uso de anticoncepcional aumentou o risco de trombose venosa (OR=3,043, IC=0,843-10,990, $p=0,081$), estando este mais relacionado à TVC (OR=2,431, IC=0,843-7,009, $p=0,097$). Se formos menos rigorosos quanto à diferença entre as médias podemos considerar que o risco existe.

Tabela 21: Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%

Variável	Trombose/Recorrência	OR	IC 95%	p-valor
Atividade física	TVC	0,531	1,056-8,292	0,035
Sexo feminino	Recorrência	0,237	0,066-0,847	0,020
Sexo masculino	Recorrência	4,214	1,180-15,048	0,020

6 DISCUSSÃO

Além de ser um modelo referencial que serve como base para a comparação com modelos mais realísticos nos quais as forças evolutivas podem modificar as frequências alélicas, o teste de aderência ao EHW é também muito importante para avaliar se o acaso sozinho (erros de amostragem, por exemplo) poderia produzir um desvio entre os valores observados e esperados e para alertar sobre possíveis erros de genotipagem (HARTL & CLARCK, 2010). Uma vez que os p-valores encontrados neste estudo foram maiores do que 0,05, não temos nenhuma razão para rejeitar a hipótese de que as frequências genotípicas estão em proporções de Hardy-Weinberg para os marcadores analisados. Assim, caso algum erro de amostragem, genotipagem e/ou desvio das premissas tenha ocorrido, eles não foram grandes o suficiente para resultar em desvios do EHW que pudessem ser detectados.

Apesar de frequentes em várias populações, os polimorfismos CBS 844ins68, MTHFR C677T e A1298C têm revelado grande variabilidade étnica e geográfica (FRANCO *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 1999; FRANCO, 2001; FRANCO & REITSMA, 2001; TSAI *et al.*, 1996b; ULRICH, 2003). Assim, é importante conhecermos a frequência desses polimorfismos em nossa população e compararmos suas frequências com as outras populações, visto que a população brasileira é miscigenada, primariamente como consequência de cruzamentos inter-étnicos entre europeus, africanos e ameríndios (ALVES-SILVA *et al.*, 2000) e esta mistura genética tri-híbrida pode influenciar a distribuição de certos polimorfismos (LORDELO *et al.*, 2012).

A frequência da CBS 844ins68 em heterozigose em pacientes com trombose arterial ou venosa tem sido reportada variando entre 0% a 37,7%, sendo ausente em asiáticos, rara em ameríndios (0,45%), intermediária em caucasianos (13,5%-14,5%) e populações miscigenadas (11,7%-14,7%), e mais altas em negros (37,7%) (BONINI-DOMINGOS *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 1998; MARCUCCI *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 1996b). Em nosso estudo, a frequência de heterozigotos foi de 28,2% na amostra total de pacientes, sendo encontrada em 25% dos pacientes de cor branca, em 27,5% dos pacientes de cor parda e em 38,5% dos pacientes de cor negra, quando considerado cada grupo separadamente. Apesar de não termos conduzido nenhum estudo de ancestralidade, esses resultados corroboram a grande influência de nossa descendência africana mesmo nos pacientes de cor branca. Sendo a população de Brasília formada por migrantes de todas as regiões do Brasil, ela tende a refletir melhor a população brasileira do que qualquer outra

região do país (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2008).

O polimorfismo C677T da MTHFR tem alta prevalência na população geral, sendo que a frequência de heterozigotos em pacientes com doença trombotica varia entre 33,6% e 51,9% nas diversas etnias (FUJIMURA *et al.*, 2000; HANSON *et al.* 2001; HARMON *et al.*, 1999; HE *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2001; LALOUSCHEK *et al.*, 1999; LOPACIUK *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2002; MARCUCCI *et al.*, 2003; MARKUS *et al.*, 1997; MORITA *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2001; ZHANG & DAI, 2001). Em populações brasileiras dos Estados de Goiás e Rio de Janeiro, esta frequência tem sido reportada em torno de 34% (JACOB *et al.*, 2011; ROCHA, 2009), enquanto em pacientes com TVP de ancestralidade mista dos EUA (HANSON *et al.* 2001), tal frequência, de 46%, foi mais próxima e homogênea daquela encontrada em nosso trabalho.

Já para o polimorfismo MTHFR A1298C, as publicações envolvendo pacientes com doença trombotica são mais raras, e a frequência de heterozigotos tem sido reportada variando entre 37,4% a 46% (FRANCO *et al.*, 1999; SOLTANPOUR *et al.*, 2011; SPIROSKI *et al.*, 2008), sendo a frequência mais baixa encontrada em brasileiros (37,4%), sobretudo pardos (33,3%) (FRANCO *et al.*, 1999). Nossos resultados corroboram esses achados, cuja frequência de heterozigotos (33%) na amostra total de pacientes variou segundo a cor da pele e, quando considerado cada grupo separadamente, foi encontrada em 27,5% dos pardos, 37,5% dos brancos e 38,46% dos negros.

Nosso trabalho mostrou influência do sexo nos níveis de homocisteína, cujos valores foram significativamente maiores nos homens, mesmo apresentando um número amostral muito menor do que o de mulheres. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados em outros estudos em que a dosagem de homocisteína foi maior nos homens do que nas mulheres (GANJI & KAFI, 2003 e 2006; JACQUES *et al.*, 2001; REFSUM *et al.*, 2006). Também corroboram nossos achados de risco aumentado de trombose recorrente para o sexo masculino (CHRISTIANSEN *et al.*, 2010). Visto que o aumento em 5 $\mu\text{mol/L}$ na dosagem da homocisteína tem sido associado com um risco aumentado de trombose venosa de 27% (estudo prospectivo) e 60% (estudo retrospectivo) (DEN HEIJER, *et al.*, 2005), nossos resultados novamente apoiam a literatura (DEN HEIJER, *et al.*, 1995) ao indicarem que o risco de recorrência pode estar associado aos níveis de homocisteína aumentados neste sexo.

Outros fatores testados que podem influenciar na dosagem de homocisteína são a idade e a etnia. A dosagem é maior em idosos do que em adultos jovens (GANJI & KAFI, 2006), por razões ainda não bem esclarecidas, embora mudanças na função renal estejam

certamente envolvidas (REFSUM *et al.*, 2006). Nosso estudo não encontrou nenhuma diferença significativa nas dosagens de homocisteína por faixa etária ou cor da pele, provavelmente porque nossa amostra não incluiu idosos e, como abordado anteriormente, somos miscigenados. Além disso, a diferença étnica mencionada nas dosagens tem sido encontrada em amostras com idade superior a 70 anos (GANJI & KAFAI, 2006).

Outros fatores constitucionais que também podem elevar a Hcy plasmática devido a uma deficiência enzimática são as alterações genéticas na CBS e na MTHFR (FRANCO & REITSMA, 2001). A homocisteína é sintetizada a partir da metionina e tem dois destinos possíveis: metabolização pela via de remetilação, a metionina, ou pela via de transulfuração, a cistationina (BYDLOWSKI *et al.*, 1998). O polimorfismo CBS 844ins68 não parece influenciar sozinho os níveis de homocisteína ou o risco de TVP; porém, em combinação com o polimorfismo da MTHFR C677T, pode resultar em aumento do risco trombótico (FRANCO & REITSMA, 2001). Nossos resultados corroboram esses achados e também indicam a contribuição do polimorfismo MTHFR A1298C neste aspecto.

Na espécie humana, concentrações elevadas de Hcy estão associadas à presença do polimorfismo C677T no gene MTHFR, que resulta em termolabilidade e atividade reduzida da enzima MTHFR. A contribuição do outro polimorfismo no gene MTHFR, a substituição de adenina para citosina no nucleotídeo 1298, para a atividade enzimática é questionável. Estudo de expressão *in vitro* da enzima MTHFR mostrou uma redução de 32% na atividade da enzima mutante 1298 e de 59% para aquela mutada para ambos os polimorfismos (C677T e A1298C). Foi observado que a presença do haplótipo MTHFR 677CT/1298AA leva à redução de cerca de 30% da atividade enzimática; enquanto os genótipos homozigoto MTHFR 677CC/1298CC e heterozigoto MTHFR 677CT/1298AC resultam na diminuição desta atividade em 35–43% e de 38–60%, respectivamente, em relação ao genótipo selvagem (BISELLI *et al.*, 2009; WEISBERG *et al.*, 1998). Em nosso estudo, o maior aumento na homocisteína foi observado na dupla heterozigose ($13,73 \pm 5,58 \mu\text{mol/L}$) desses polimorfismos, em relação ao selvagem ($7,54 \pm 4,66 \mu\text{mol/L}$). Embora não significativos, nossos resultados indicaram uma influência desses polimorfismos nos níveis de Hcy, possivelmente relacionado à redução da atividade enzimática.

Visto que (1) são raros os trabalhos que avaliaram conjuntamente os polimorfismos CBS 844ins68 e MTHFR C677T em pacientes com doença trombótica (JACOB *et al.*, 2011; MARCUCCI *et al.*, 2003; ZHANG & DAI, 2001); (2) mais raros ainda foram os estudos que avaliaram conjuntamente os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR nesses pacientes

(HANSON *et al.* 2001); e (3) nenhum estudo avaliou conjuntamente as influências dos polimorfismos 844ins68 e T833C da CBS e C677T e A1298C da MTHFR nas dosagens séricas de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína, nosso estudo é inédito e pode ajudar a compreender melhor o papel desses polimorfismos como fator de risco para a manifestação de eventos trombóticos. Neste contexto, a análise multivariada das interações entre os polimorfismos CBS844ins68, MTHFR C677T e MTHFR A1298C obteve resultados significativos para os valores de Hcy corroborando com o caráter multifatorial da trombose (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Essa patologia manifesta não somente devido a um simples fator de risco, mas da interação entre fatores de riscos ambientais e genéticos (VOSSEN *et al.*, 2005). Trata-se de uma doença multigênica, em que diferentes mutações em diferentes genes interagem entre si e com fatores ambientais para provocar o evento (MIRANDA-VILELA, 2012). Assim, nossos resultados indicam que as interações entre esses três polimorfismos estudados podem afetar os níveis séricos de homocisteína, onde a heterozigose múltipla pode ser um indicador de fator de risco para episódios vaso-oclusivos. Tal sugestão é corroborada pelos achados do único paciente que apresentou heterozigose para os três locos e valores de homocisteína sérica elevada (63,6 μ mol/L) (dados não mostrados). O tamanho amostral de homozigotos variantes foi muito pequeno e nenhum homozigoto variante para os três polimorfismos foi detectado.

Apesar dos fatores constitucionais avaliados mostrarem associação com o processo trombótico, o fator ambiental atividade física pode influenciar beneficemente, ao reduzir o risco de trombose venosa, independente da intensidade e do tipo de esporte realizado, desde que praticado com uma frequência mínima de uma vez por semana (VAN STRALEN *et al.*, 2007). Em nosso estudo, encontramos também uma redução significativa do risco de trombose com atividade física para os pacientes com trombose venosa cerebral (TVC). Essa patologia, apesar de ser um tipo raro de doença cerebrovascular que atinge cerca de cinco pessoas por milhão (BOUSSER & FERRO, 2007), foi encontrada em frequência alta neste trabalho. Várias desordens podem causar ou predispor pacientes a TVC: contraceptivos orais, puerpério, infecção no sistema nervoso central ou sítio próximo, câncer, SAAF, deficiência de proteína C, S ou antitrombina, hiperhomocisteinemia, mutação no Fator V Leiden, mutação no gene da protrombina (BOUSSER & FERRO, 2007). Em mulheres há uma associação estatisticamente significativa entre o uso de contraceptivo oral e TVC (COUTINHO & STAM, 2010), o que corrobora a nossa sugestão de que, se formos menos rigorosos quanto à diferença entre as médias podemos considerar que o uso do anticoncepcional oral aumenta o risco de TVC.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram concluir que:

- Os níveis de homocisteína foram significativamente maiores no sexo masculino, que também apresentou um maior risco de recorrência.
- O uso de anticoncepcional oral aumentou não significativamente o risco de trombose venosa cerebral.
- As interações entre os polimorfismos CBS 844ins68 e MTHFR C677T e A1298C podem afetar os níveis séricos de homocisteína, em que a heterozigose pode ser um indicador de fator de risco para episódios vaso-oclusivos.
- O tamanho amostral de homozigotos variantes foi muito pequeno e talvez por isto não ocorreram diferenças significativas quando comparados com as dosagens de ácido fólico, homocisteína e vitamina B12.
- A atividade física reduziu significativamente o risco de trombose venosa cerebral.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Já se encontra em andamento a genotipagem de outro polimorfismo comum da CBS, G919A, o qual tem sido descrito como prevalente em casos clínicos de homocistinúria não-responsiva à vitamina B6 (KRAUS *et al.*, 1999). Devido à atuação das enzimas CBS e MTHFR em conjunto no metabolismo da Hcy e ao caráter multifatorial da trombose, torna-se importante avaliar a possível interação desse polimorfismo com os demais estudados neste trabalho, em associação com os níveis séricos de Hcy.

Além das alterações genéticas relacionadas à hiperhomocisteinemia, várias outras são causadoras de trombofilia. Por isso, se faz necessário a complementação desse estudo com as seguintes genotipagens: polimorfismos nos genes do Fator V, da protrombina e do PAI-I, visto que os dois primeiros são as causas genéticas mais prevalentes de trombofilia (BUCHANAN *et al.*, 2003). Além disto, uma vez que tem sido reportado aumento de risco de trombose venosa por alelos AB do sistema ABO (LIMA *et al.*, 2009), a fenotipagem desse sistema também está prevista.

A realização dessas genotipagens será ampliada para um grupo controle para um estudo de associação caso-controle pareado por sexo, grupo etário e cor da pele, incluindo também as dosagens de ácido fólico, Vitamina B12 e homocisteína.

Pretendemos, ao final do estudo, ajudar em uma maior compreensão do papel desses polimorfismos na manifestação de eventos trombóticos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, v.67, p.444-461, 2000.
- BAGLIN, T.; PALMER, C.R.; LUDDINGTON, R.; BAGLIN, C. Unprovoked recurrent venous thrombosis: prediction by D-dimer and clinical risk factors. **J Thromb Haemost**, v.6, p.577-82, 2008.
- BATES, S.M.; GINSBERG, J.S. Treatment of Deep-Vein Thrombosis. **N Engl J Med**, 351, p.268-77, 2004.
- BATES, S.M.; GREER, I.A.; MIDDELDORP, S.; VEENSTRA, D.L.; PRABULOS, A.M.; VANDVIK, P.O. VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**, v.141, p.e691S-e736S, 2012.
- BAUERSACHS, R.; BERKOWITZ, S.D.; BRENNER, B.; BULLER, H.R.; DECOUSUS, H.; GALLUS, A.S.; et al. Oral Rivaroxaban for Symptomatic Venous Thromboembolism. **N Engl J Med**, v.363, p.2499-510, 2010.
- BISELLI, P.M.; GUERZONI, A.R.; GOLONI-BERTOLLO, E.M.; GODOY, M.F.; ABOU-CHAHLA, J.A.B.; PAVARINO-BERTELLI, E.C. Variabilidade genética MTHFR no desenvolvimento da doença arterial coronária. **Rev Assoc Med Bras**, v.55, p.274-8, 2009.
- BYDŁOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE, D. A. F. Hiperhomocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. **Arq Bras Cardiol**, v.71, p.69-76, 1998.
- BONINI-DOMINGOS, C.R.; ZAMARO, P.J.A.; MENDIBUR, C.F.; SANCHES, F.E.; CINTRA, J.R.; GODOY, J.M.P.; MATTOS, L.C. Frequência da mutação 844ins68 do gene da cistationina β -sintetase em pacientes com trombose venosa profunda. **Rev bras hematol hemoter**, v.27, p.12-15, 2005.

BORISSOFF, J.I.; SPRONK, H.M.H.; CATE, H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. **N Engl J Med**, v.364, p.1746-60, 2011.

BOUSSER, M.G.; FERRO, J.M. Cerebral venous thrombosis: an update. **Lancet Neurol**, v.6, p.162-70, 2007.

BUCHANAN, G.S.; RODGERS, G.M.; BRANCH, D.W. The inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.17, p.397-411, 2003.

CARDOSO, I. L. Homocisteína e a doença cardiovascular. **Rev da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480, p.198-206, 2009.
CAMERLINGO, M.; FINAZZI, G.; CASTO, L.; et al. Inherited protein C deficiency and non hemorrhagic arterial stroke in young adults. **Neurology**, v.41, p.1371-1373, 1991.

CBS MUTATION DATABASE (2009). Disponível em <<http://cbs.lf1.cuni.cz/index.php>> Acesso em 23/04/2012.

CHRISTIANSEN, S.C.; LI J FERING, W.M.; HELMERHORST, F.M.; ROSENDAAL, F.R.; CANNEGIETER, S.C. Sex difference in risk of recurrent venous thrombosis and the risk profile for a second event. **J Thromb Haemost**, v.8, p.2159-68, 2010.

COSMI, B.; LEGNANI, C.; TOSETTO, A.; PENGO, V.; GHIRARDUZZI, A.; TESTA, S.; et al. Sex, age and normal post-anticoagulation D-dimer as risk factors for recurrence after idiopathic venous thromboembolism in the Prolong study extension. **J Thromb Haemost**, v.8, p.1933-42, 2010.

COUTINHO, J.M.; STAM, J. How to treat cerebral venous and sinus thrombosis. **J Thromb Haemost**, v.8, p.877-83, 2010.

D'ANGELO, A.; SELHUB, J. Homocysteine and thrombotic disease. **Blood**, v.90, p.1-11, 1997.

DAHLBACK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v.355, p.1627-32, 2000.

DAVI, G.; PATRONO, C. Platelet Activation and Atherothrombosis. **N Engl J Med**, v.357, p.2482-94, 2007.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v.145, p.1310-2, 1964.

DELRIO-LAFRENIERE, S.A.; MCGLENNEN, R.C. Simultaneous Allele-specific Amplification: A Strategy using modified primer-template mismatches for SNP detection— Application to Prothrombin 20210^a (Factor II) and Factor V Leiden (1691A) Gene Mutations. **Molecular Diagnosis**, v.06, p.201-208, 2001.

DEN HEIJER, M.; BLOM, H.J.; GERRITS, W.B.J.; ROSENDAAL, F.R.; HAAK, H.L.; WIJERMANS, P.W.; BOS, G.M.J. Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? **Lancet**, v.345, p.882-85, 1995.

DEN HEIJER, M.; LEWINGTON, S.; CLARKE, R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. **J Thromb Haemost**, v.3, p.292-9, 2005.

DUQUE, F.L.V.; MELLO, N.A. Trombogênese – Trombofilia. **J Vasc Br**, v.2, p.105-118, 2003.

DUTTA S.; CHATTERJEE A.; SINHA S.; CHATTOPADHYAY A.; MUKHOPADHYAY K. Correlation between cystathionine beta synthase gene polymorphisms, plasma homocysteine and idiopathic mental retardation in Indian individuals from Kolkata. **Neuroscience Letters**, v.453, p.214-218, 2009.

DUTTA S.; SINHA S.; CHATTOPADHYAY A.; GANGOPADHYAY P.K.; MUKHOPADHYAY J.; SINGH M.; MUKHOPADHYAY K. Cystathionine B-synthase T833C/844ins68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children. **Behavioral and Brain Functions**, v.1, p.25, 2005.

EGEBERG, O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. **Thromb Diath Haemorrh**, v.13, p.516-530, 1965.

ESFAHANI, S.T.; COGGER, E.A.; CAUDILL, M.A. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. **J Am Diet Assoc**, v.103, p.200-207, 2003.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.32, n.5, p.416-421, 2010.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina** (Ribeirão Preto), v.34, p.229-37, 2001.

FRANCO, R.F.; MORELLI, V.; LOURENÇO, D.; MAFFEI, F.H.; TAVELLA, M.H.; PICCINATO, C.E.; THOMAZINI, I.A.; ZAGO, M.A. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. **Br J Haematol**, v.105, p.556-559, 1999.

FRANCO, R.F.; ELION J.; LAVINHA J.; KRISHNAMOORTHY R.; TAVELLA M.H.; ZAGO M.A. Heterogeneous Ethnic Distribution of the 844ins68 in the Cystathionine B-Synthase Gene. **Hum Hered**, v.48, p.338-342, 1998.

FRANCO, R.F.; REITSMA, P.H. Genetic risk factors of venous thrombosis. **Hum Genet**, v.109, p.369-384, 2001.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v.10, p.111-113, 1995.

FONSECA, A.G.; AMARO, M. Thrombophilias: the importance of clinical screening in thromboembolic disease. **Rev Soc Port Med Int**, v.15, p.284-290, 2008.

FUJIMURA, H.; KAWASAKI, T.; SAKATA, T.; ARIYOSHI, H.; KATO, H. Monden M, Miyata T. Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia. **Thromb Res**, v.98, p.1-8, 2000.

FURIE, B.; FURIE, B.C. Mechanisms of Thrombus Formation. **N Engl J Med**, v.359, p.938-49, 2008.

GANJI, V.; KAFAI, M.R. Population reference values for plasma total homocysteine concentrations in US adults after the fortification of cereals with folic acid. **Am J Clin Nutr**, v.84, p.989-94, 2006.

GANJI, V.; KAFAI, M.R. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Clin Nutr**, v.77, p.826-33, 2003.

GENETICS HOME REFERENCE (2008). CBS gene. Disponível em <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=cbs>> Acesso em 23/04/2012.

GIANNAKOPOULOS, B.; KRILIS, S.A. How I treat the antiphospholipid syndrome. **Blood**, v.114, p.2020-30, 2009.

GIBBINS, J.M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. **J of Cell Science**, v.117, p.3415-25, 2004.

GODOY, J.M.P. Fatores de risco e eventos trombóticos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.31, p.122, 2009.

GONÇALVES, R.P.; ARAÚJO, M.C.A.; SILVA, M.A.M.; JUCÁ, M.P.B.; RIBEIRO, R.A. Prevalência de anticoagulante lúpico em pacientes encaminhados ao centro de hemoterapia do estado do Ceará (HEMOCE) pelo Hospital Universitário Walter Cantídio. **RBAC**, v.42, p.201-204, 2010.

GREER, J.P.; FOERSTER, J.; RODGERS, G.M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D.A.; *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

GUIMARÃES, S.P.; SOARES, J.B.B.; OLIVEIRA, V.C.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C.S. Predisposing thrombophilic mutations in individuals with clinical suspicion of thrombosis from Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.31, p.19-24, 2009.

HANSON, N.Q.; ARAS, Ö.; YANG, F.; TSAI, M. C677T and A1298C Polymorphisms of the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene: Incidence and Effect of Combined Genotypes on Plasma Fasting and Post-Methionine Load Homocysteine in Vascular Disease. **Clinical Chemistry**, v.47, p.661–666, 2001.

HARMON, D.L.; DOYLE, R.M.; MELEADY, R.; DOYLE, M.; SHIELDS, D.C.; BARRY, R.; COAKLEY, D.; GRAHAM, I.M.; WHITEHEAD, A.S. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5, 10-methylene tetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.19, p.208-211, 1999.

HE, J.A.; HU, X.H.; FAN, Y.Y.; YANG, J.; ZHANG, Z.S.; LIU, C.W.; YANG, D.H.; ZHANG, J.; XIN, S.J.; ZHANG, Q.; DUAN, Z.Q. Hyperhomocysteinemia, Low Folate Concentrations and Methylene Tetrahydrofolate Reductase C677T Mutation in Acute Mesenteric Venous Thrombosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v.39, p.508-13, 2010.

HEIJER, M.D.; LEWINGTON, S.; CLARKE, R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. **J Thromb Haemost**, v.3, p.292-299, 2005.

HEIT, J.A. Thrombophilia: Common Questions on Laboratory Assessment and Management. **ASH Education Book**, p.127-135, 2007.

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Rev**, v.17, suppl.1, p.S1-5, 2003.

HU, F.L.; GU, Z.; KOZICH, V.; KRAUS, J.P.; RAMESH, V.; SHIH, V.E. Molecular basis of cystathionine β -synthase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocystinuria. **Hum Mol Genet**, v.2, p.1857-60, 1993.

JACOB, M.A.; BASTOS, C.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. The 844ins68 cystathionine beta-synthase and C677T MTHFR gene polymorphism and the vaso-occlusive event risk in sickle cell disease. **Arch Med Sci**, v.1, p.97-101, 2011.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILSON, P.W.F.; RICH, S.; ROSENBERG, I.H.;

SELHUB, J. Determinants of plasma total homocysteine concentrations in the Framingham offspring cohort. **Am J Clin Nutr**, v.73, p.613–21, 2001.

KHAN, S.; DICKERMAN, J.D. Hereditary thrombophilia. **Thromb J**, v.4, p.1-15, 2006.

KLERK, M.; VERHOEF, P.; CLARKE, R.; BLOM, H.J.; KOK, F.J.; SCHOUTEN, E.G. MTHFR C677T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease. **JAMA**, v.288, p.2023-2031, 2002.

KRAUS, J.P.; JANOSIK, M.; KOZICH, V.; MANDELL, R.; SHIH, V.; SPERANDEO, M.P. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. **Hum Mutat**, v.13, p.362-75, 1999.

KRUSKAL, W. H; WALLIS, W. A. Use of ranks in one criterion variance analysis. **J. Amer Statist Assoc**, v.47, p.583-621, 1952.

LALOUSCHEK, W.; AULL, S.; SERLES, W.; SCHNIDER, P.; MANNHALTER, C.; PABINGER-FASCHING, I.; DEECKE, L.; ZEILER, K. C677T MTHFR mutation and factor V Leiden mutation in patients with TIA/minor stroke: a case-control study. **Thromb Res**, v.93, p.61-69, 1999.

LI, C.; ZHANG, C.; QIU, S.; LU, X.; ZENG, Y.; WU, H.; CHEN, W.; LUO, W.; LIU J. Polymorphisms of ACE-1 and MTHFR genes and genetic susceptibility of ischemic stroke. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v.82, p.1046-1049, 2002.

LIMA, M.B.P.L.V.; OLIVEIRA-FILHO, A.B.; CAMPOS, J.F.; MELO, F.C.B.C.; NEVES, W.B.; MELO, R.A.M.; LEMOS, J.A.R. Increased risk of venous thrombosis by AB alleles of the ABO blood group and Factor V Leiden in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.264-267, 2009.

LOPACIUK, S.; BYKOWSKA, K.; KWIECINSKI, H.; et al. Factor V Leiden, prothrombin gene G20210A variant, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in young adults with ischemic stroke. **Clin Appl Thromb Hemost**, v.7, p.346-350, 2001.

LORDELO, G.S.; MIRANDA-VILELA, A.L.; AKIMOTO, A.K.; ALVES, P.C.Z.; HIRAGI, C.O.; NONINO, A.; DALDEGAN, M.B.; KLAUTAU-GUIMARAES, M.N.; GRISOLIA, C.K. Association between methylene tetrahydrofolate reductase and glutathione S-transferase M1 gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia in a Brazilian population. **Genet. Mol. Res**, v.11, p.1013-1026, 2012.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**, v.202, p.498-9, 1964.

MARKUS, H.S.; ALI, N.; SWAMINATHAN, R.; SANKARALINGAM, A.; MOLLOY, J.; POWELL, J. A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. **Stroke**, v.28, p.1739-1743, 1997.

MAKRIS, M. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. **Clin Lab Haem**, v.22, p.133-143, 2000.

MAKRIS, M.; LEACH, M.; BEAUCHAMP, N.J.; DALY, M.E.; COOPER, P.C.; HAMPTON, K.K.; BAYLISS, P.; PEAKE, I.R.; MILLER, G.J.; PRESTON, E. Genetic analyses, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. **Blood**, v.95, p.1935-1941, 2000.

MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Ann Math Statist**, v.18, p.50-60, 1947.

MARCUCCI, R.; GIUSTI, B; BETTI, I; EVANGELISTI, L.; FEDI, S.; SODI, A.; CAPPELLI, S.; MENCHINI, U.; ABBATE, R.; PRISCO, D. Genetic determinants of fasting and post-methionine hyperhomocysteinemia in patients with retinal vein occlusion. **Thrombosis Res**, v.110, p.7–12, 2003.

MARTINELLI, I.; BATTAGLIOLI, T.; PEDOTTI P.; CATTANEO M.; MANNUCCI P.M. Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. **Blood**, v.102, p.1363-66, 2003.

MARTINELLI, I.; FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P.M. How I treat rare venous thromboses. **Blood**, v.112, p.4818-4823, 2008.

MIRANDA-VILELA, A.L. Role of polymorphisms in Factor V (FV Leiden), Prothrombin, Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and Cystathionine B-synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias. *Mini Rev Med Chem*. 12(10), 2012, Doi: 10.2174/1389212225125725575.

MIRANDA-VILELA, A.L.; AKIMOTO, A.K.; ALVES, P.C.Z.; HIRAGI, C.O.; PENALVA, G.C.; OLIVEIRA, S.F.; GRISOLIA, C.K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Haptoglobin gene subtypes in three Brazilian population groups of different ethnicities. *Genet. Mol. Biol*, v.32, p.456-461, 2009.

MISAWA, A. K.; SUZUKI, H.; MAIA JÚNIOR, O. O.; BONANOMI, M. T. B. C.; MELO, C. S. N. Obstrução arterial retiniana periférica associada com hiperhomocisteinemia: relato de caso. *Arq Bras Oftalmol*, v.71, p.729-733, 2008.

MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. The coagulation cascade in cirrosis. *Clin Liver Dis*, v.13, n.1, p.1-9, 2009.

MORITA, H.; KURIHARA, H.; TSUBAKI, S.; SUGIYAMA, T.; HAMADA, C.; KURIHARA, Y.; SHINDO, T.; OH-HASHI, Y.; KITAMURA, K.; YAZAKI, Y. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.18, p.1465-1469, 1998.

MUNIZ, M.T.C.; SIQUEIRA, E.R.F.; FONSECA, R.A.; D'ALMEIDA, V.; HOTTA, J.K.; SANTOS, J.E.; et al. Avaliação da Relação Entre o Polimorfismo C677T no Gene Para MTHFR e a Concentração Plasmática de Homocisteína na Doença Arterial Coronariana. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.50, p.1059-1065, 2006.

MUSTAFA, S.; PABINGER, I.; MANNHALTER, C. Protein S deficiency type I: identification of point mutations in 9 of 10 families. *Blood*, v.86, p.3444-51, 1995.

NUYTTENS, B.P; THUIS, T.; DECKMYN, H.; BROOS K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res*, v.127, suppl.2, p.S26-S29, 2011.

OMIM +236200. Homocystinuria. Disponível em <<http://omim.org/entry/236200>> Acesso em 14/04/2012.

PALARETI, G.; COSMI, B.; LEGNANI, C.; TOSETTO, A.; BRUSI, C.; IORIO, A.; et al. D-Dimer Testing to Determine the Duration of Anticoagulation Therapy. **N Engl J Med**, v.355, p.1780-9, 2006.

PAPA et al. Hyperhomocysteinemia and Prevalence of Polymorphisms of Homocysteine Metabolism – Related Enzymes in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Am J Gastroenterol**, v.96, p.2677-82, 2001.

PERSUHN, D.C.; SACKL, D.; SCHUTZ, T.L.; MELO, S.S. Prevalência do polimorfismo G1793A da metilenotetrahidrofolato redutase em idosos – Itajaí, (SC). **RBAC**, v.38, p.47-50, 2006.

PONTES, A.C.F. Análise de variância multivariada com a utilização de testes não-paramétricos e componentes principais baseados em matrizes de postos / Antonio Carlos Fonseca Pontes. Piracicaba, 2005.

PRESTON, F.E.; ROSENDAAL, F.R.; WALKER, I.D.; et al. Increased fetal loss in woman with heritable thrombophilia. **Lancet**, v.348, p.913-916, 1996.

PREVITALI, E.; BUCCIARELLI, P.; PASSAMONTI, S.M.; MARTINELLI, I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. **Blood Transfus**, v.9, p.120-38, 2011.

PROCHOWNIK, E.V.; ANTONARAKIS S.; BAUER, K.A.; et al. Molecular heterogeneity of inherited antithrombin III deficiency. **N Engl J Med**, v.308, p.1540-52, 1983.

RAMOS, C.P.S.; CAMPOS, J.F.; MELO, F.C.B.C.; NEVES, W.B.; SANTOS, M.E.; ARAÚJO, F.A., MELO, R.A.M. Frequência do fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev bras hematol hemoter**, v.28, p.131-134, 2006.

RASCHE, H. Haemostasis and thrombosis: an overview. **Eur Heart J**, v.3, supplQ, p.Q3–Q7, 2001.

REFSUM, H.; NURK, E.; SMITH, A.D.; et al. The Hordaland Homocysteine Study: A Community-Based Study of Homocysteine, Its Determinants, and Associations with Disease. **J Nutr**, v.136, p.1731S–1740S, 2006.

RIDDEL, J.P.; AOUIZERAT, B.E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D.P. Theories of blood coagulation. **J Pediatr Oncol Nurs**, v.24, n.3, p. 123-31, 2007.

RIJKEN, D.C.; LIJNEN, H.R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. **J Thromb Haemost**, v.7, p.4-13, 2009.

RIVERA, J.; LOZANO, M.L.; NUNEZ, L.N.; VICENTE, V. Platelet receptors and signaling in the dynamics thrombus formation. **Haematologica**, v.94, n.5, p.700-711, 2009.

ROCHA, V.R. Perfil de trombofilias hereditárias em pacientes com distúrbios trombóticos em uso de anticoagulante oral. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.31, p.487-488, 2009.

ROSENDAAL, F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. **The Lancet**, v.353, p.1167-73, 1999.

SACHDEV, P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. **Rev. Bras. Psiquiatr**, v.26, p.50–56, 2004.

SANTAMARIA, J.R.; BADZIAK, D.; BARROS, M.F.; MANDELLI, F.L.; CAVALIN, L.C.; SATO, M.S. Síndrome antifosfolípide **An Bras Dermatol**, v.80, p. 225-39, 2005.

SCHWARZ, H.P.; FISCHER, M.; HOPMEIER, P.; BATARD, M.A.; GRIFFIN, J.H. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. **Blood**, v.64, p.1297-1300, 1984.

SINESCU, C.; HOSTIUC, M; BARTOS, D. Idiopathic venous thromboembolism and thrombophilia. **Journal of Medicine and Life**, v.4, p.57-62, 2011.

SOLTANPOUR, M.S.; SOHEILI, Z.; POURFATHOLLAH, A.A.; SAMIEI, S.; MESHKANI, R.; KIANI, A.A.; MAJID, S.; ATAEI, Z.; KAVARI, M. The 1298C Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Its Association With Idiopathic Venous Thrombosis in an Iranian Population. **Labmedicine**, v.42, p.213- 216, 2011.

SNOW, V.; QASEEM, A.; BARRY, P.; HORNBAKE, E.R.; RODNICK, J.E; TOBOLIC, T.; IRELAND, B.; SEGAL, J.B.; BASS, E.B.; WEISS, K.B.; GREEN, L.; OWENS, D.K. Management of Venous Thromboembolism: A Clinical Practice Guideline from the American College of Physicians and the American Academy of Family Physicians. **Ann Intern Med**, v.146, p.204-210, 2007.

SPIROSKI, I.; KEDEV, S.; ANTOV, S.; ARSOV, T.; KRSTEVSKA, M.; DZHEKOVA-STOJKOVA, S.; BOSILKOVA, G.; KOSTOVSKA, S.; TRAJKOV, D.; PETLICHKOVSKI, A.; STREZOVA, A.; EFINSKA-MLADENOVSKA, O.; SPIROSKI, M. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis. **Acta Biochimica Polonica**, v.55, p.587–594, 2008.

TONETTI, C.; SAUDUBRAY, J.M.; ECHENNE, B.; LANDRIEU P.; GIRAUDIER, S.; ZITTOUN J. Relations between molecular and biological abnormalities in 11 families from siblings affected with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Eur J Pediatr**, v.162, p.466-475, 2003.

TORABI , M.R.; DING, K. Selected Critical Measurement and Statistical Issues in Health Education Evaluation and Research. **The International Electronic Journal of Health Education**, v.1, p.26-38, 1998.

TSAI, M.Y.; BIGNELL, M.; SCHWICHTENBERG, K.; HANSON, N.Q. High Prevalence of a Mutation in the Cystathionine B-Synthase Gene. **Am J Hum Genet**, v.59, p.1262-1267, 1996.

THIJS, T.; DECKMYN, H.; BROOS K. Model systems of genetically modified platelets. **Blood**, v.119, n.7, p.1634-1642, 2012.

ULRICH, R.K.C.M. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. **Am J Epidemiol**, v.157, p.571-582, 2003.

VAN DER PUT, N.M.J.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.B.; SMEITINK, J.A.M.; TRIJBELS, F.J.M.; ESKES, T.K.A.B; et al. A Second Common Mutation in the

Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects?. **Am J Hum Genet**, v.62, p.1044–1051, 1998.

VAN STRALEN, K.J.; LE CESSIE, S.; ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J.M. Regular sports activities decrease the risk of venous thrombosis. **J Thromb Haemost**, v.5, p.2186–92, 2007.

VANES, J.; EERENBERG, E.S.; KAMPHUISEN, P.W.; BULLER, H.R. How to prevent, treat, and overcome current clinical challenges of VTE. **J Thromb Haemost**, v.9, p.265–274, 2011.

VOSSSEN, C.Y.; CONARD, J.; FONTCUBERTA, J.; MAKRIS M.; VAN DER MEER, F.J.M.; PABINGER, I.; PALARETI, G.; PRESTON, F.E.; SCHARRER, I.; SOUTO, J.C.; SVENSSON, P.; WALKER, I.D.; ROSENDAAL, F.R. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). **J Thromb Haemost**, v.3, p.459–64, 2005.

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**, v. 64, p. 169–172, 1998.

WU, Y.; TOMON, M.; SUMINO, K. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese. **Kobe J Med Sci**, v.47, p.255-262, 2001.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

ZHANG, G.; DAI C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. **Thromb Res**, v.104, p.187-195, 2001.

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA SES-DF



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 232/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 227/09 – Frequência dos polimorfismos nos genes MTHFR, Cistationina B- sintetase, Fator V Leiden, Protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes portadores de mutação.

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 31/08/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 31 de agosto de 2009.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepsesdf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

ANEXO 2 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 040/2010.

Título: "Frequência dos polimorfismos nos genes MTHFR, cistationina B-Sintetase, Fator V Leiden, protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes portadores de mutação".

Pesquisador Responsável: Ana Luisa Miranda Vilela.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 03/05/2010.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 25/05/2010.

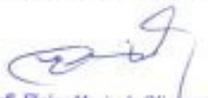
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 28/07/2010.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 28/07/2010, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 30 de janeiro de 2011.

Brasília, 29 de Julho de 2010


 Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina-UNB

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Nº _____

Secretaria de Estado de Saúde-SES
Hospital de Base do Distrito Federal-HBDF
Projeto de parceria Núcleo de Hematologia e Hemoterapia-NHH/Universidade de Brasília-
UnB

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado, a participar do projeto: **Freqüência dos polimorfismos nos genes MTHFR, Cistationina β -sintetase, Fator V Leiden, Protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes portadores de mutação.**

O nosso objetivo é verificar a presença de algumas alterações genéticas (mutações) relacionadas com a coagulação do sangue em pacientes com trombose, por meio de análise do DNA (material genético). A pesquisa ocorrerá no Hospital de Base do Distrito Federal e no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB) e terá duração de 2 anos.

Você receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que todos os seus dados pessoais serão mantidos no mais rigoroso sigilo. Os participantes serão identificados no estudo através de um número gerado por computador e apenas você terá acesso aos resultados de seus exames. Todos os resultados deste estudo serão publicados apenas de forma generalizada em relatórios, congressos e revistas científicas, e não incluirão qualquer informação que possa te identificar como sujeito do estudo.

Você não terá nenhum ganho financeiro, e também nenhum gasto por participar deste estudo. Sua participação é totalmente voluntária e você poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem punição ou prejuízo, bastando informar sua decisão a um dos pesquisadores responsáveis. Em outras palavras, sua desistência não afetará o atendimento nem o tratamento médico atual ou futuro que você recebe no Hospital de Base do Distrito Federal.

Sua participação envolverá uma única coleta de sangue (3 tubos de 4 mL) para a realização dos exames necessários, o preenchimento de um questionário e a coleta de informações no seu prontuário. As informações que serão coletadas são informações que seu médico coletaria normalmente durante as consultas de rotina. Não existe um tempo pré-determinado para responder o questionário, sendo respeitado o tempo de cada um para respondê-lo. Você poderá se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento.

Se qualquer alteração importante na forma de realização deste estudo for necessária, você será informado(a) para decidir sobre sua permanência na pesquisa.

Possíveis benefícios e riscos

A pesquisa para a qual você está sendo convidado a participar, pode não trazer benefícios diretos a você, mas vai gerar informações muito valiosas para que se conheça melhor as trombozes hereditárias e para que se possa melhorar os meios de detectar e tratar esse problema. Durante a coleta de sangue, pode ser que você sinta uma pequena dor e desconforto por causa da agulha; o local de entrada da agulha pode ficar roxo.

Maiores esclarecimentos:

Se, a qualquer momento você tiver alguma dúvida ou pergunta referente ao estudo, procure uma das responsáveis, através dos contatos abaixo:

- 1- Dr^a Franciele Moraes Amaral
Fones: (61) 3297-6900 e 9333-3197
E-mail: franciele_amaral@yahoo.com.br
- 2- Dr^a Margarete Barbosa Daldegan
Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal
Fone: (61) 3315-1790
E-mail: margaretedaldegan@gmail.com
- 3- Prof^a Dr^a Ana Luisa Miranda-Vilela
Dept^o de Genética e Morfologia – Laboratório de Genética – Universidade de Brasília
Fones: (61) 3307-2161 e 9965-7535
E-mail: mirandavilela@unb.com.br

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável. Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte aos pesquisadores antes de assiná-lo.

Concordo em participar como voluntário da pesquisa “Frequência dos polimorfismos nos genes MTHFR, Cistationina β -sintetase, Fator V Leiden, Protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes

portadores de mutação”, uma vez que compreendi o que está explicado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que acabei de ler e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pela equipe responsável pelo estudo.

Brasília, ____ de _____ de 20 ____.

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome (pesquisador): _____

Assinatura (pesquisador): _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA O RESPONSÁVEL POR MENORES DE IDADE

Seu(sua) filho(a) está sendo convidado, a participar do projeto: **Frequência dos polimorfismos nos genes MTHFR, Cistationina β -sintetase, Fator V Leiden, Protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes portadores de mutação.**

O nosso objetivo é verificar a presença de algumas alterações genéticas (mutações) relacionadas com a coagulação do sangue em pacientes com trombose, por meio de análise do DNA (material genético). A pesquisa ocorrerá no Hospital de Base do Distrito Federal e no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB) e terá duração de 2 anos.

Você e seu(sua) filho(a) receberão todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que todos os dados pessoais de seu(sua) filho(a) serão mantidos no mais rigoroso sigilo. Os participantes serão identificados no estudo através de um número gerado por computador e apenas você terá acesso aos resultados dos exames de seu(sua) filho(a). Todos os resultados deste estudo serão publicados apenas de forma generalizada em relatórios, congressos e revistas científicas, e não incluirão qualquer informação que possa identificar seu(sua) filho(a) como sujeito do estudo.

Você não terá nenhum ganho financeiro, e também nenhum gasto por seu(sua) filho(a) participar deste estudo. A participação é totalmente voluntária e você poderá se decidir por retirar seu(sua) filho(a) do estudo a qualquer momento, sem punição ou prejuízo, bastando informar a decisão a um dos pesquisadores responsáveis. Em outras palavras, a desistência não afetará o atendimento nem o tratamento médico atual ou futuro que seu(sua) filho(a) recebe no Hospital de Base do Distrito Federal.

A participação de seu(sua) filho(a) envolverá uma única coleta de sangue (3 tubos de 4 mL) para a realização dos exames necessários, o preenchimento de um questionário e a coleta de informações no prontuário. As informações que serão coletadas são informações que o médico coletaria normalmente durante as consultas de rotina. Não existe um tempo pré-determinado para responder o questionário, sendo respeitado o tempo de cada um para respondê-lo. Você poderá se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento.

Se qualquer alteração importante na forma de realização deste estudo for necessária, você será informado(a) para decidir sobre a permanência de seu(sua) filho(a) na pesquisa.

Possíveis benefícios e riscos

A pesquisa para a qual seu(sua) filho(a) está sendo convidado a participar, pode não trazer benefícios diretos a ele(a), mas vai gerar informações muito valiosas para que se conheça melhor as

tromboses hereditárias e para que se possa melhorar os meios de detectar e tratar esse problema. Durante a coleta de sangue, pode ser que seu(sua) filho(a) sinta uma pequena dor e desconforto por causa da agulha; o local de entrada da agulha pode ficar roxo.

Maiores esclarecimentos:

Se, a qualquer momento você tiver alguma dúvida ou pergunta referente ao estudo, procure uma das responsáveis, através dos contatos abaixo:

- 1- Dr^a Franciele Moraes Amaral
Fones: (61) 3297-6900 e 9333-3197
E-mail: franciele_amaral@yahoo.com.br
- 2- Dr^a Margarete Barbosa Daldegan
Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal
Fone: (61) 3315-1790
E-mail: margaretedaldegan@gmail.com
- 3- Prof^a Dr^a Ana Luisa Miranda-Vilela
Dept^o de Genética e Morfologia – Laboratório de Genética – Universidade de Brasília
Fones: (61) 3307-2161 e 9965-7535
E-mail: mirandavilela@unb.com.br

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável. Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte aos pesquisadores antes de assiná-lo.

Concordo que meu(minha) filho(a) participe como voluntário da pesquisa “Frequência dos polimorfismos nos genes MTHFR, Cistationina β -sintetase, Fator V Leiden, Protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes portadores de mutação”, uma vez que compreendi o que está explicado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que acabei de ler e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pela equipe responsável pelo estudo.

Brasília, ____ de _____ de 20 ____.

Nome do responsável: _____

Assinatura do responsável: _____

Nome (pesquisador): _____

Assinatura (pesquisador): _____

ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO



Nº _____

Secretaria de Estado de Saúde-SES
Hospital de Base do Distrito Federal-HBDF
Projeto de parceria Núcleo de Hematologia e Hemoterapia-NHH/Universidade de Brasília-
UnB

Título do estudo

“Frequência dos polimorfismos nos genes MTHFR, Cistationina β-sintetase, Fator V Leiden, Protrombina e PAI-1 em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com evento trombótico. Estudo familiar dos pacientes portadores de mutação”

Projeto de parceria Núcleo de Hematologia e Hemoterapia-NHH do HBDF/Universidade de Brasília-UnB, sob responsabilidade da pesquisadora Prof^a Dr^a Ana Luisa Miranda-Vilela e da médica Hematologista e Hemoterapeuta Dr^a Margarete Barbosa Daldegan, chefe da unidade NHH/HBDF.

ANAMNESE		
QUESTIONÁRIO SOBRE ESTADO DE SAÚDE E HISTÓRICO FAMILIAR DE TROMBOSES E DOENÇAS VASCULARES		
1. IDENTIFICAÇÃO		
NOME: _____		
SEXO: _____	DATA DE NASCIMENTO: _____	IDADE: _____
2. ATIVIDADES DA VIDA DIÁRIA		
Número de horas trabalhadas por semana: <input type="checkbox"/> Menos de 20 <input type="checkbox"/> 20 a 40 <input type="checkbox"/> 41 a 60 <input type="checkbox"/> Mais de 60		
Atividades desempenhadas no trabalho (+ de 25% do tempo):		
<input type="checkbox"/> Ficar sentado <input type="checkbox"/> Levantar ou carregar pesos <input type="checkbox"/> Ficar de pé <input type="checkbox"/> Caminhar <input type="checkbox"/> Dirigir <input type="checkbox"/> Outros		
Auto-definição da cor da pele: _____		
Observações do médico:		
3. HISTÓRICO MÉDICO		
Data do último exame físico e/ou médico: _____		

<p>Marque aquele(s) que tenha(m) tido algum problema cardiovascular ou trombose antes dos 50 anos: <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Irmão/irmã <input type="checkbox"/> Avô/Avó <input type="checkbox"/> Tio/Tia <input type="checkbox"/> Primo/Prima <input type="checkbox"/> Outro parente (especificar):</p>	
<p>Marque as intervenções cirúrgicas que você tenha feito: <input type="checkbox"/> Coluna <input type="checkbox"/> Coração <input type="checkbox"/> Articulação <input type="checkbox"/> Hérnia de disco <input type="checkbox"/> Rim <input type="checkbox"/> Pulmão <input type="checkbox"/> Olhos <input type="checkbox"/> Outra (especificar):</p>	
<p>Marque o(s) problema(s) abaixo que tenham sido diagnosticados ou tratados por um médico: <input type="checkbox"/> Alcoolismo <input type="checkbox"/> Problema renal <input type="checkbox"/> Enfisema pulmonar <input type="checkbox"/> Anemia <input type="checkbox"/> Fibromialgia <input type="checkbox"/> Artrite <input type="checkbox"/> Problemas oculares (especificar): _____ <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Pressão arterial alta <input type="checkbox"/> AVC <input type="checkbox"/> Obesidade <input type="checkbox"/> Problemas musculares <input type="checkbox"/> Câncer <input type="checkbox"/> Outros (especificar):</p>	
<p>Descreva o(s) medicamento(s) utilizado(s) nos últimos tempos:</p>	
<p>Indique os sintomas, conforme segue: a) Tosse com sangue: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca b) Dor abdominal: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca c) Dor nas pernas: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca d) Dor nos braços: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca e) Dor nas costas ou no pescoço: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca f) Dor no peito: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca g) Dores articulares: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca h) Olhos vermelhos e/ou dor nos olhos: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca i) Falta de ar com esforço leve: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca j) Sentir-se fraco: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca k) Tontura: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca l) Palpitação ou batimento cardíaco acelerado: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> algumas vezes <input type="checkbox"/> nunca</p>	
<p>Você possui alguma alergia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Caso positivo, especifique:</p>	
<p>4. COMPORTAMENTO RELACIONADO À SAÚDE</p>	
<p>Você fuma atualmente? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se positivo, quantos cigarros por dia? Você faz uso de anticoncepcional hormonal ou faz alguma terapia de reposição hormonal? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>	
<p>Atualmente, você realiza alguma atividade física? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual(is) Frequência Duração:</p>	
<p>5. COMENTÁRIOS GERAIS</p>	
<p>Caso você tenha alguma informação para acrescentar, que não tenha sido perguntada neste questionário de saúde, favor registrar neste espaço.</p>	
<p>DATA DO PREENCHIMENTO</p> <p>____/____/____</p>	<p>MÉDICO RESPONSÁVEL PELO ATENDIMENTO</p> <p>_____</p>