

## Fatores de Risco, Marcadores Bioquímicos e Polimorfismos Genéticos na Doença Arterial Coronariana Prematura

Maria Cristina Izar, Francisco Antonio Helfenstein Fonseca, Sílvia Saiuli Miki Ihara, Nelson Kasinski, Sang Won Han, Ieda Edite Lanzarini Lopes, Leonor do Espírito Santo de Almeida Pinto, Waldir Gabriel Miranda Relvas, Daisy Lourenço, Sérgio Tufik, Ângelo Amato Vincenzo de Paola, Antonio Carlos Camargo Carvalho

São Paulo, SP

**Objetivos** - Examinar os fatores de risco, perfil lipídico e apolipoprotéico, variáveis da hemostasia e polimorfismos nos genes APO AI-CIII na doença arterial coronariana (DAC) prematura.

**Métodos** - Estudo caso e controle com 112 pacientes em cada grupo, controlados por sexo e idade. Após avaliação clínica e orientação nutricional foram colhidas amostras de sangue para ensaios bioquímicos e estudo genético.

**Resultados** - História familiar de DAC prematura (64 vs. 39%), hipertensão arterial (69 vs. 36%), diabetes mellitus (25 vs. 3%) e tabagismo prévio (71 vs. 46%) foram mais prevalentes no grupo caso ( $p < 0,001$ ), sendo a hipertensão e o diabetes fatores de risco independentes. Níveis séricos maiores para o colesterol total ( $235 \pm 6$  vs.  $209 \pm 4$  mg/dL), LDL-c ( $154 \pm 5$  vs.  $135 \pm 4$  mg/dL), triglicérides ( $205 \pm 12$  vs.  $143 \pm 9$  mg/dL), e apolipoproteína B ( $129 \pm 3$  vs.  $105 \pm 3$  mg/dL) e menores para o HDL-c ( $40 \pm 1$  vs.  $46 \pm 1$  mg/dL) e apolipoproteína AI ( $134 \pm 2$  vs.  $146 \pm 2$  mg/dL) [ $p < 0,01$ ], além de elevação do fibrinogênio e dímero-D ( $p < 0,02$ ) caracterizaram a DAC prematura. A presença conjunta dos alelos raros dos genes APO AI-CIII na DAC prematura associou-se à hipertrigliceridemia ( $p = 0,03$ ).

**Conclusão** - Dentre os fatores de risco clássicos, hipertensão e diabetes mellitus foram independentemente associados à DAC prematura. Além de um perfil lipídico desfavorável, aumento no risco trombótico foi identificado nesta população. Houve efeito aditivo dos genes APO AI-CIII nos níveis de triglicérides.

**Palavras-chave:** Doença da artéria coronariana, fatores de risco, polimorfismos genéticos.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, em 1998, a doença cardiovascular foi responsável por mais de 250.000 mortes, correspondendo a 32% de todas as causas de óbito em nosso país. Entre as mortes cardiovasculares, o acidente vascular cerebral vem em primeiro, seguido da doença isquêmica do miocárdio<sup>1</sup>.

A contribuição dos fatores de risco tradicionais na doença arterial coronariana na população geral emergiu dos estudos da cidade de Framingham<sup>2</sup>, e as recentes diretrizes do Programa Nacional de Educação sobre o colesterol dos EUA (ATP III)<sup>3</sup> reconhecem ainda outros marcadores de risco coronariano, classificados como fatores de risco relacionados aos hábitos de vida (obesidade, inatividade física e dieta aterogênica) e aos fatores de risco emergentes [lipoproteína (a), homocisteína, marcadores da trombose e inflamação, glicemia de jejum alterada, e evidência de aterosclerose sub-clínica]<sup>3</sup>. A síndrome metabólica, que tem como substrato a resistência insulínica, tem sido proposta para explicar anormalidades lipídicas, hemostáticas e inflamatórias, predispondo os indivíduos à doença arterial coronariana (DAC) prematura<sup>4,5</sup>.

A apolipoproteína AI, o principal componente protéico da HDL, é um ativador *in vivo* da lecitina: colesterol acil transferase (LCAT) e desempenha um papel crucial no transporte reverso do colesterol<sup>6</sup>. A apolipoproteína CIII é um componente das partículas ricas em triglicérides e da HDL e influencia a regulação das concentrações plasmáticas de triglicérides. Demonstrou-se *in vitro* que a apolipoproteína CIII inibe a lipase lipoprotéica e a lipase hepática, reduzindo a hidrólise de triglicérides, dificultando o reconhecimento das partículas remanescentes pelos receptores hepáticos<sup>7</sup>. Os genes que regulam a expressão das apolipoproteínas AI e CIII situam-se muito próximos num complexo gênico no braço longo do cromossomo 11 humano<sup>8,9</sup>. Polimorfismos em regiões não traduzidas do gene APO AI com substituições G/A (-75 pb) e C/T (+83 pb) (alelos M1 e M2) e no exon 4 do gene APO CIII (3238 C/G) são descritos em

Disciplina de Cardiologia da UNIFESP, São Paulo.

Correspondência: Maria Cristina Izar – Rua Pedro de Toledo, 458 – 04039-001 – São Paulo, SP - e-mail: lipides.dmed@unifesp.epm.br

Recebido para publicação em 08/08/02

Aceito em 08/11/02

associação a alterações dos lípides séricos, à DAC<sup>10-13</sup> e ainda à hiperlipidemia familiar combinada<sup>14</sup>.

O presente estudo objetivou a identificação de fatores e marcadores do risco cardiovascular em uma população com DAC prematura.

## Métodos

Estudo caso e controle com pacientes consecutivos, sendo 112 com doença arterial coronariana prematura (homens < 45, mulheres < 55 anos) e 112 indivíduos sem qualquer manifestação de aterosclerose, controlados por sexo e idade. Todos os pacientes foram consecutivamente selecionados dos ambulatórios da Disciplina de Cardiologia da UNIFESP. Os critérios para DAC incluíram história de infarto do miocárdio, angina estável ou instável, revascularização cirúrgica ou percutânea.

Os controles consistiram de cônjuges, vizinhos residenciais e pessoas do mesmo local de trabalho dos pacientes, com mesmas condições sócio-culturais, nos quais a história clínica, a pesquisa objetiva de sinais de DAC e o exame eletrocardiográfico não sugeriam a presença desta doença.

Foram excluídos pacientes com síndromes coronarianas agudas, cirurgia de revascularização do miocárdio ou intervenção percutânea durante os três primeiros meses destes eventos e ainda os portadores de insuficiência renal (creatinina sérica > 2.0 mg/dL), hepática, hipotireoidismo não controlado, ou neoplasias.

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo. Após a obtenção do consentimento informado, realizou-se avaliação clínica e nutricional. As drogas hipolipemiantes foram suspensas (vastatinas por quatro semanas e fibratos por oito semanas), e os pacientes foram orientados a seguir a dieta da *American Heart Association* (AHA fase I). Após esse período foram colhidas amostras de sangue com jejum de 12h para bioquímica geral e outros ensaios específicos.

A presença dos fatores de risco foi realizada com base nas recomendações do II Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias<sup>15</sup>. Em relação ao fumo, foram considerados tabagistas pregressos os pacientes com consumo de qualquer quantidade de cigarros de maneira regular, por um período superior a seis meses; os tabagistas classificados como atuais foram aqueles que consumiram qualquer quantidade de cigarros até o mês anterior à entrevista, o que foi recentemente validado pelo Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol dos EUA (NCEP III)<sup>3</sup>.

O perfil lipídico completo foi realizado por método enzimático automatizado e o LDL-c estimado pela fórmula de Friedewald<sup>16</sup>. As apolipoproteínas foram determinadas por nefelometria [AI, B e Lp (a), Beckman, e apolipoproteína E, Behring].

O fibrinogênio foi dosado pelo método de Clauss<sup>17</sup> e o fator VII pela adição de um plasma deficiente em fator VII e de tromboplastina (*Simplastin Excel*), ambos por método fotomecânico (*Thrombotimer*). O inibidor do ativador do

plasminogênio – 1, o fator de von Willebrand e o dímero-D foram examinados pela técnica do ensaio imunoenzimático (*American Diagnostica*). Como os pacientes do grupo caso estavam em prevenção secundária da doença aterosclerótica coronariana, as análises foram realizadas na vigência de antiplaquetário (ácido acetil salicílico em 103 pacientes), sendo excluídos dos estudos de coagulação os pacientes em uso de anticoagulante oral. Todos os pacientes do grupo controle não faziam uso de antiplaquetários ou de anticoagulantes.

ODNA genômico total foi extraído dos leucócitos utilizando-se um conjunto de extração (GFX™ *Genomic Blood Purification Kit*, Amersham Biosciences). A amplificação dos genes de interesse se deu pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em termociclador (Peltier Effect Cycling, MJ Research) programado para 5min a 94°C, 30 ciclos com 1min a 94°C, 1,5 minuto a 60°C e 1,5' a 72°C, seguidos de uma extensão final de 10min a 72°C.

Os *primers* utilizados (Gibco) foram:

*APO AI*: senso 5' AGGGACAGAG CTGATCCTTGA ACTCTTAAG-3', anti-senso 5' TTAGGGGCACCTAGCCC TCAGGAAGAGAGCA -3';

*APO CIII*: senso 5' -GGTGACCGATGGCTTCAGTT-3', anti-senso 5' CAGAAGGTGGATAGAGCGCT-3'

Os produtos purificados de PCR foram digeridos com as endonucleases de restrição Msp I (para a *APO AI*) e Sst I (para a *APO CIII*) e os tampões apropriados (Gibco) por 3h a 37° C. Os produtos de digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, (45 min, 5 V/cm), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. A endonuclease de restrição Msp I cliva o DNA na sequência 5'C-CGG3'. No gene *APO AI* (433 pb) promove a quebra de um sítio normalmente existente, determinando 2 alelos M1 (177bp) e M2 (255bp), e ainda os sítios polimórficos com bandas de 177 (M1 --), 177, 110, 67 (M1 +-) e 110, 67 pb (M1 ++), para o alelo M1; 255 (M2 --); 255, 207, 48 (M1 +-) e 207 e 48 pb (M2 ++ para o alelo M2.

A endonuclease de restrição Sst I cliva o DNA na sequência 5'GAGCT-C3', promovendo a quebra do gene *APO CIII* em dois fragmentos com bandas de 265 e 163 pb.

Os alelos mutantes caracterizam-se, respectivamente, pela ausência (*APO AI*) e presença (*APO CIII*) de sítios de restrição das enzimas.

O teste do Qui-quadrado foi utilizado para análise das variáveis categóricas, para testar desvios da distribuição genotípica de *Hardy-Weinberg*, bem como para comparar frequências genotípicas entre casos e controles. As variáveis contínuas foram expressas como média ± EPM. As médias foram testadas por teste t de *Student* não pareado, para variâncias iguais ou desiguais, conforme apropriado. Os lípides foram comparados de acordo com os genótipos e o número de alelos raros pelo teste t de *Student* e análise de variâncias (ANOVA), respectivamente. Regressão logística múltipla foi utilizada para examinar associações entre os parâmetros e a doença arterial coronariana. Valores de p<0.05 foram considerados significantes.

## Resultados

As características dos pacientes por ocasião da admissão no estudo encontram-se na tabela I. Não houve diferenças entre os grupos na distribuição dos pacientes, quanto ao sexo e idade. Cento e nove pacientes foram submetidos à coronariografia e apresentaram um amplo espectro de obstruções coronarianas. O padrão de distribuição das lesões coronarianas entre os pacientes do grupo caso foi predominantemente bi ou tri-arterial (tab I).

História familiar de doença coronariana prematura (64 vs. 39%;  $p=0,0002$ ), hipertensão arterial (69 vs. 36%;  $p<0,0001$ ), diabetes mellitus (25 vs. 3%;  $p<0,0001$ ) e tabagismo pregresso (71 vs. 46%;  $p<0,0001$ ) foram altamente prevalentes na coronariopatia prematura, comparada aos controles, enquanto a prevalência do fumo atual não diferiu (26 vs. 25%). O índice de massa corpórea (IMC) foi semelhante em ambos os grupos ( $27,5 \pm 4,8$  vs.  $26,7 \pm 4,6$ ) e a maioria dos pacientes era obesa ou tinha sobrepeso (65 vs. 62%,  $p>0,05$ ).

O colesterol total ( $235 \pm 6$  vs.  $209 \pm 4$  mg/dl;  $p=0,0002$ ), o LDL-c ( $154 \pm 5$  vs.  $135 \pm 4$  mg/dL;  $p=0,002$ ) e os triglicérides ( $205 \pm 12$  vs.  $143 \pm 9$  mg/dL;  $p=0,0001$ ) foram maiores nos pacientes com DAC prematura, enquanto os níveis de HDL-c ( $40 \pm 1$  vs.  $46 \pm 1$  mg/dL;  $p=0,0006$ ) foram mais baixos nesses pacientes. Níveis menores de apolipoproteína AI ( $134 \pm 2$  vs.  $146 \pm 2$  mg/dL;  $p=0,0003$ ) e maiores de apolipoproteína B ( $129 \pm 3$  vs.  $105 \pm 3$  mg/dL;  $p<0,0001$ ) foram observados na DAC prematura, enquanto não houve diferenças entre os grupos para os valores de apolipoproteína E ( $3,7 \pm 0,4$  vs.  $3,3 \pm 0,3$  mg/dL) e de Lp(a) ( $43 \pm 4$  vs.  $33 \pm 5$  mg/dL). As figuras 1 e 2 representam a distribuição dos lipídeos e apolipoproteínas por quartis.

As relações CT/HDL ( $6,4 \pm 0,2$  vs.  $5,0 \pm 0,2$ ,  $p<0,0001$ ) e LDL/HDL ( $4,1 \pm 0,2$  vs.  $3,1 \pm 0,1$ ,  $p=0,0001$ ) foram maiores no grupo caso.

Tabela I - Características dos indivíduos dos grupos caso e controle de acordo com a idade, sexo e apresentação clínica				
	Grupo			
	Caso		Controle	
	n	(%)	n	(%)
Idade (mediana)	46		45	ns
Homens	65	(58)	66	(59)
Mulheres	47	(42)	46	(41)
Apresentação clínica				
IAM	85	(76)	-	
Angina instável	12	(11)	-	
Angina estável	15	(13)	-	
Cinecoronariografia:				
Uniarterial	39	(35)	-	
Biarterial	35	(31)	-	
Triarterial	26	(23)	-	
Sem lesão obstrutiva	9	(8)	-	
Não realizada	3	(3)	112	(100)
AVC	13	(2)	-	
Doença vascular periférica	20	(18)	-	
Dados expressam número de pacientes e %. IAM=infarto agudo do miocárdio; AVC= acidente vascular cerebral; ns=não significativo.				

A agregação plaquetária ao ADP  $3\mu\text{M}$  foi menor no grupo com DAC ( $62 \pm 2$  vs.  $71 \pm 3\%$ ;  $p=0,02$ ). Valores mais elevados de fibrinogênio ( $351 \pm 13$  vs.  $308 \pm 9$  mg/dL;  $p=0,006$ ) e dímero D ( $43 \pm 9$  vs.  $20 \pm 3$  ng/ml;  $p=0,01$ ) foram observados na DAC prematura, enquanto o PAI-1 ( $38 \pm 1$  vs.  $37 \pm 1$  ng/ml), o fator VII ( $116 \pm 5$  vs.  $107 \pm 4\%$ ) e o fator de von Willebrand ( $81 \pm 2$  vs.  $79 \pm 2\%$ ) não diferiram. A figura 3 representa a distribuição dos marcadores da hemostasia por quartis.

O DNA para a genotipagem de *APO AI* foi obtido em 104 pacientes de cada grupo e para *APO CIII* em 107 casos e 104 controles. As frequências genotípicas observadas e esperadas para os genes *APO AI* e *APO CIII* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A tabela II representa a distribuição dos genótipos dos genes *APO AI* (M1 e M2) e *APO CIII* entre casos e controles, não havendo diferenças entre os dois grupos.

Os valores de apolipoproteína AI e HDL-c, bem como os dos triglicérides não diferiram entre os genótipos da *APO AI*, e *CIII*, respectivamente, quer considerados os dois grupos em conjunto, quer em cada grupo separadamente. Quando o efeito de múltiplos alelos raros (M1 - /M2 - /S2) foi considerado, observou-se hipertrigliceridemia em presença de dois alelos mutantes no grupo com DAC prematura (TG com 2 alelos >TG com 0 alelos,  $p=0,03$ , ANOVA) (tab III).

Regressão logística múltipla demonstrou que apenas a hipertensão arterial e o diabetes mellitus associaram-se de forma independente à DAC prematura (tab IV).

## Discussão

O propósito deste estudo foi identificar em portadores de DAC prematura, os fatores de risco clássicos e alguns dos novos marcadores de risco, incluindo apolipoproteínas e variáveis da hemostasia, além de polimorfismos dos genes *APO AI-CIII*. Estes marcadores genéticos foram escolhidos por participarem no metabolismo das lipoproteínas, afetando a remoção das partículas remanescentes e, também, o transporte reverso de colesterol. Ademais, eles estão relacionados à síndrome metabólica e a uma forma de dislipidemia comumente encontrada em sobreviventes ao infarto prematuro (hiperlipidemia familiar combinada)<sup>18</sup>.

Sendo um estudo caso e controle, a escolha de cada um dos grupos é fundamental para uma correta interpretação dos dados. Assim, o nosso grupo de DAC prematura teve como base a presença documentada da aterosclerose coronariana e, o grupo controle, a completa ausência de sintomas, antecedentes coronarianos e o eletrocardiograma normal. Embora a aterosclerose subclínica não possa ser afastada, consideramos mais relevante, em uma população controlada por idade e sexo, a ausência clínica da aterosclerose, pois estudos de necropsia têm relatado o desenvolvimento gradual das lesões iniciais ao longo da vida<sup>19,20</sup>. Desta forma, métodos sofisticados como ultrassonografia, angio-ressonância ou tomografia ultra-rápida têm sido questionados na sua predição de eventos coronarianos<sup>21,22</sup>.

Achados relevantes na DAC prematura foram a alta

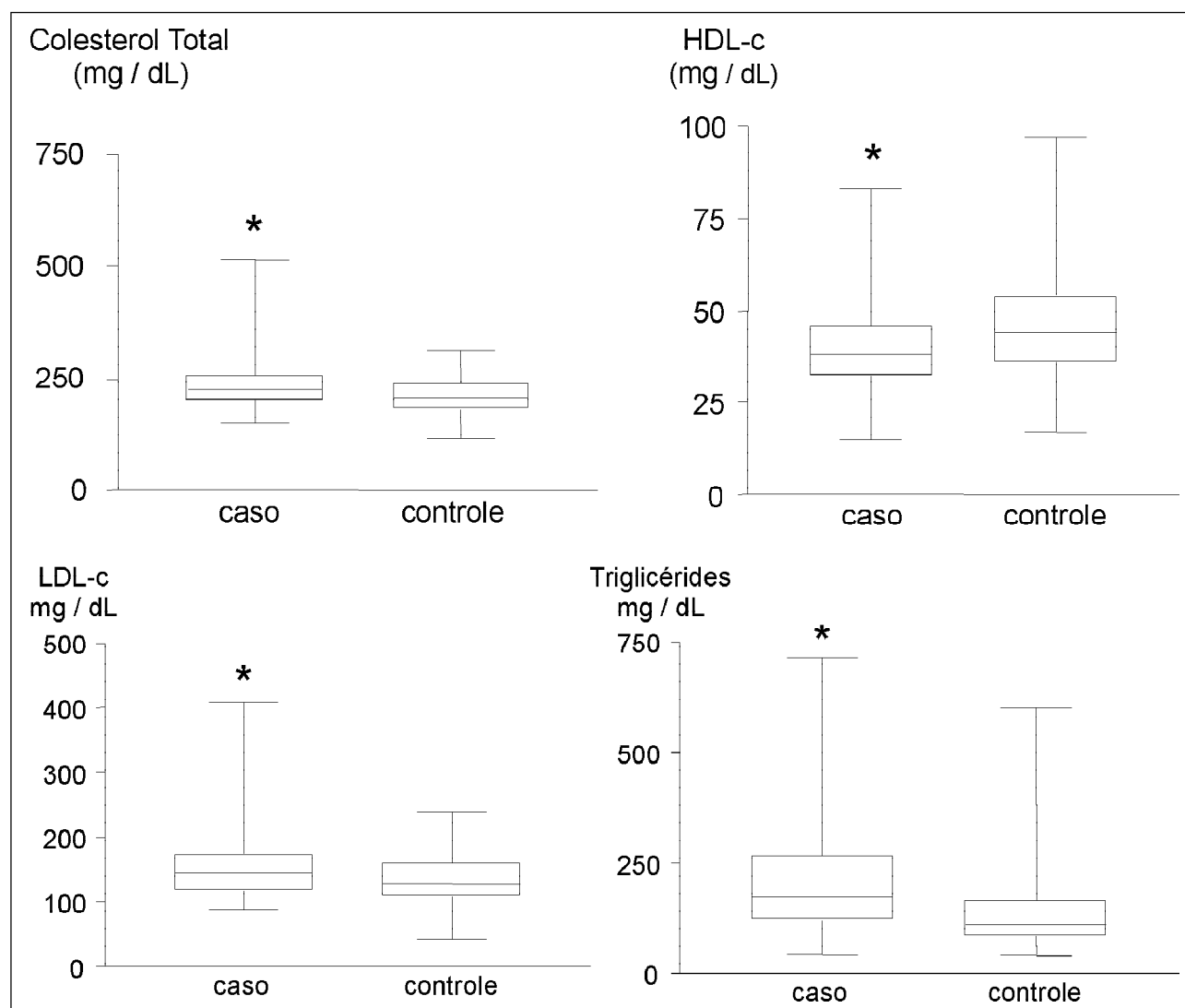


Fig. 1 – Distribuição dos lipídeos de acordo com quartis. Box-plots contém 1° e 3° quartis, a mediana e nos whiskers o menor e maior valores. \* p<0,001 vs. controle (teste t não pareado).

prevalência dos fatores de risco clássicos, sendo a hipertensão arterial e o diabetes independentemente associados, um perfil lipídico desfavorável com elevação do colesterol total, LDL-c e triglicérides e redução de HDL-c. Entre os novos marcadores de risco observou-se maiores níveis de apolipoproteína B e menores de apolipoproteína AI na DAC prematura. Além disso, elevação do fibrinogênio e do dímero-D numa fase crônica e estável da doença coronariana sugerem um risco trombótico aumentado, mesmo na vigência de terapêutica antiplaquetária. Apesar de não haver diferenças na distribuição genotípica entre os grupos, houve associação entre o número de alelos raros e triglicérides elevados na doença arterial coronariana prematura.

No estudo PROCAM, 48,4% dos homens de 45 a 65 anos que desenvolveram DAC eram hipertensos<sup>23</sup>, enquanto no MRFIT num seguimento de 12 anos, 49% das mortes causadas por DAC, na mesma faixa etária, foram ligadas à hipertensão arterial sistêmica<sup>24</sup>. Do mesmo modo, a prevalência de diabetes mellitus observada na DAC prematura (25%) foi oito vezes maior do que nos controles, maior

do que nos indivíduos que desenvolveram a doença coronariana no estudo PROCAM<sup>23</sup>, e muito maior do que a sua prevalência na população geral brasileira, em torno de 7,5%<sup>25</sup>. A história familiar positiva de DAC prematura sugere forte componente hereditário ou ambiental. No estudo PROCAM, a história familiar caracterizou um grupo de alto risco<sup>23</sup> e, recentemente, o NCEP III passou a considerá-la como um fator de risco maior<sup>3</sup>. O risco de DAC entre fumantes no estudo PROCAM foi mais do que o dobro dos não fumantes, enquanto o risco de um ex-fumante foi apenas discretamente aumentado, se comparado aos não fumantes<sup>23</sup>. A alta prevalência do fumo à época da manifestação inicial da doença coronariana, contribuiu para a formação e crescimento da placa aterosclerótica, nos processos oxidativos, fenômenos pró-trombóticos e pró-inflamatórios<sup>26,27</sup>.

A alta prevalência de sobrepeso e obesidade em ambos os grupos sugere a presença do componente metabólico nesta população. A exposição dos indivíduos a um IMC semelhante promoveu amplas diferenças, quer na ocorrên-

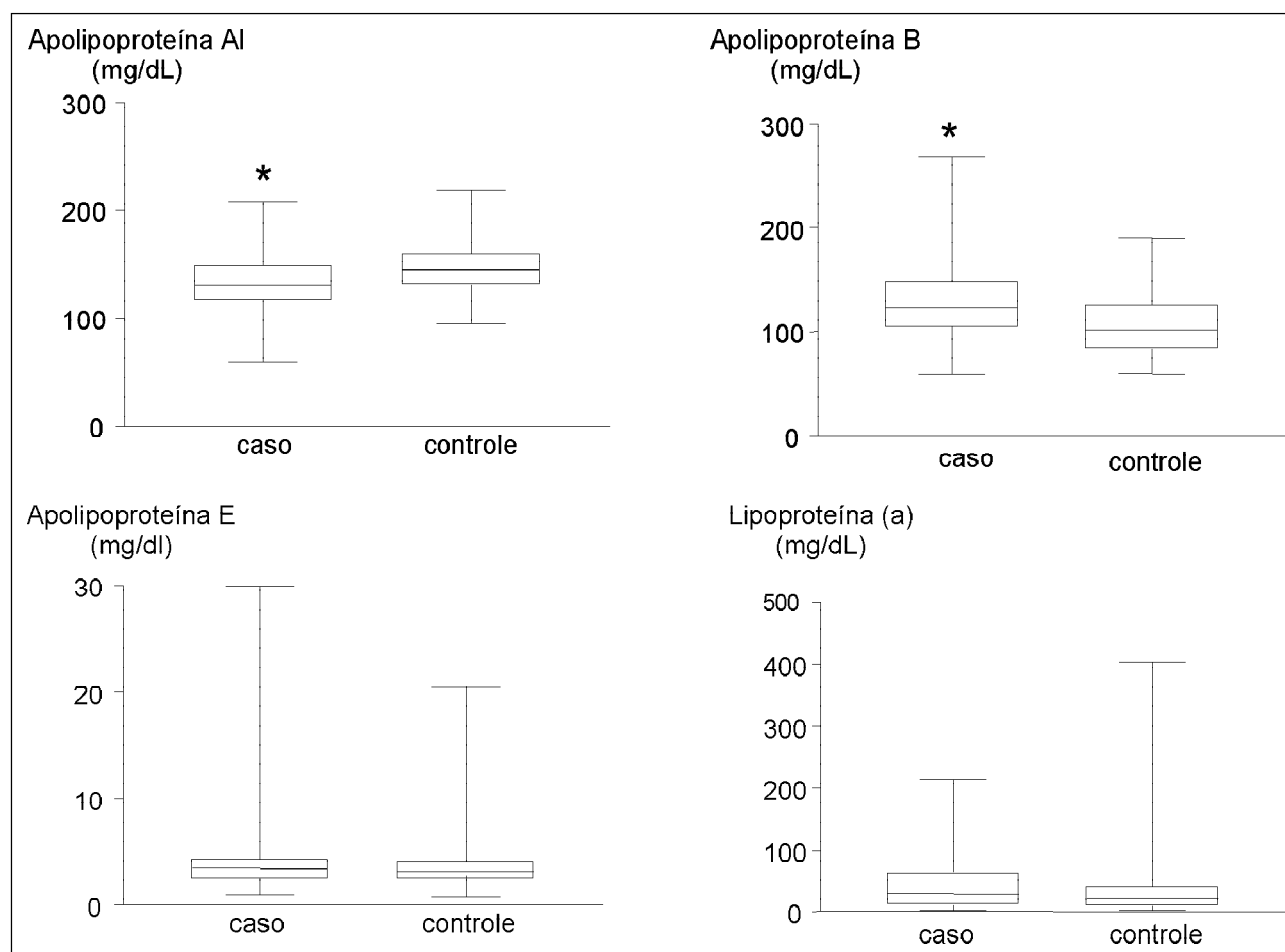


Fig. 2 – Distribuição das apolipoproteínas de acordo com quartis. Box-plots contém 1º e 3º quartis, a mediana e nos whiskers o menor e maior valores. \* $p < 0,001$  vs. controle (teste t não pareado).

cia de diabetes mellitus, quer na de dislipidemia. Desta forma, a plena expressão da síndrome metabólica ou do risco coronariano parece depender de outras condições, possivelmente genéticas, a fim de expressar o fenótipo lipídico característico. A agregação de fatores de risco encontrada em nosso estudo foi outro determinante da ocorrência precoce da doença. A associação da hipertensão arterial e do diabetes, elevação dos TG e redução do HDL-c favorece a hipótese da participação da síndrome metabólica no desenvolvimento da doença coronariana prematura.

As alterações lipídicas e das apolipoproteínas séricas identificaram os pacientes com DAC prematura dos controles, caracterizando um tipo de dislipidemia com aumento das lipoproteínas aterogênicas e de apo B, menores valores de HDL-c e de apo A-I. Um estudo avaliando coortes de indivíduos jovens demonstrou uma forte associação tipo dose-efeito entre o colesterol sérico e doença coronariana e morte cardiovascular<sup>28</sup>, maior do que a observada para homens de meia idade com a mesma colesterolemia. Já os níveis de HDL-c na DAC prematura foram semelhantes aos observados no estudo PROCAM (40 vs. 46 mg/dL)<sup>23</sup>, e esses pacientes não seriam identificados pelos valores de referência utilizados até a publicação das diretrizes de 2001 do NCEP III<sup>3</sup> e da SBC.

Em nosso estudo, a hipertrigliceridemia isolada não foi observada no grupo com DAC prematura, mas associada a HDL-c baixo, LDL-c elevado, ou ambos, conferindo a esses pacientes um risco adicional.

Vários estudos relacionaram os níveis maiores de apolipoproteína B e menores de apolipoproteína A-I à ocorrência prematura da DAC, à presença de eventos recorrentes e aos processos trombóticos<sup>29,30</sup>. A apolipoproteína E total reflete tanto as partículas aterogênicas contendo apo E quanto a apo E do HDL e seus níveis podem não ter diferido entre os grupos porque o maior conteúdo de Apo E no primeiro e menor no segundo poderia mascarar diferenças nos pacientes com DAC prematura<sup>31</sup>. Os níveis de Lp(a) são determinados geneticamente e sofrem influências étnicas<sup>32</sup>. Os dois grupos apresentaram níveis de Lp(a) aumentados, o que poderia estar relacionado à heterogeneidade de etnias em nossa comunidade.

A agregação plaquetária *in vitro* foi significativamente atenuada na DAC prematura devido ao uso crônico de agentes anti-plaquetários. Porém, outros marcadores da hemostasia, como o fibrinogênio e o dímero-D, mostraram-se elevados apesar da utilização desses agentes e numa fase crônica e estável da doença, sugerindo um risco trombótico

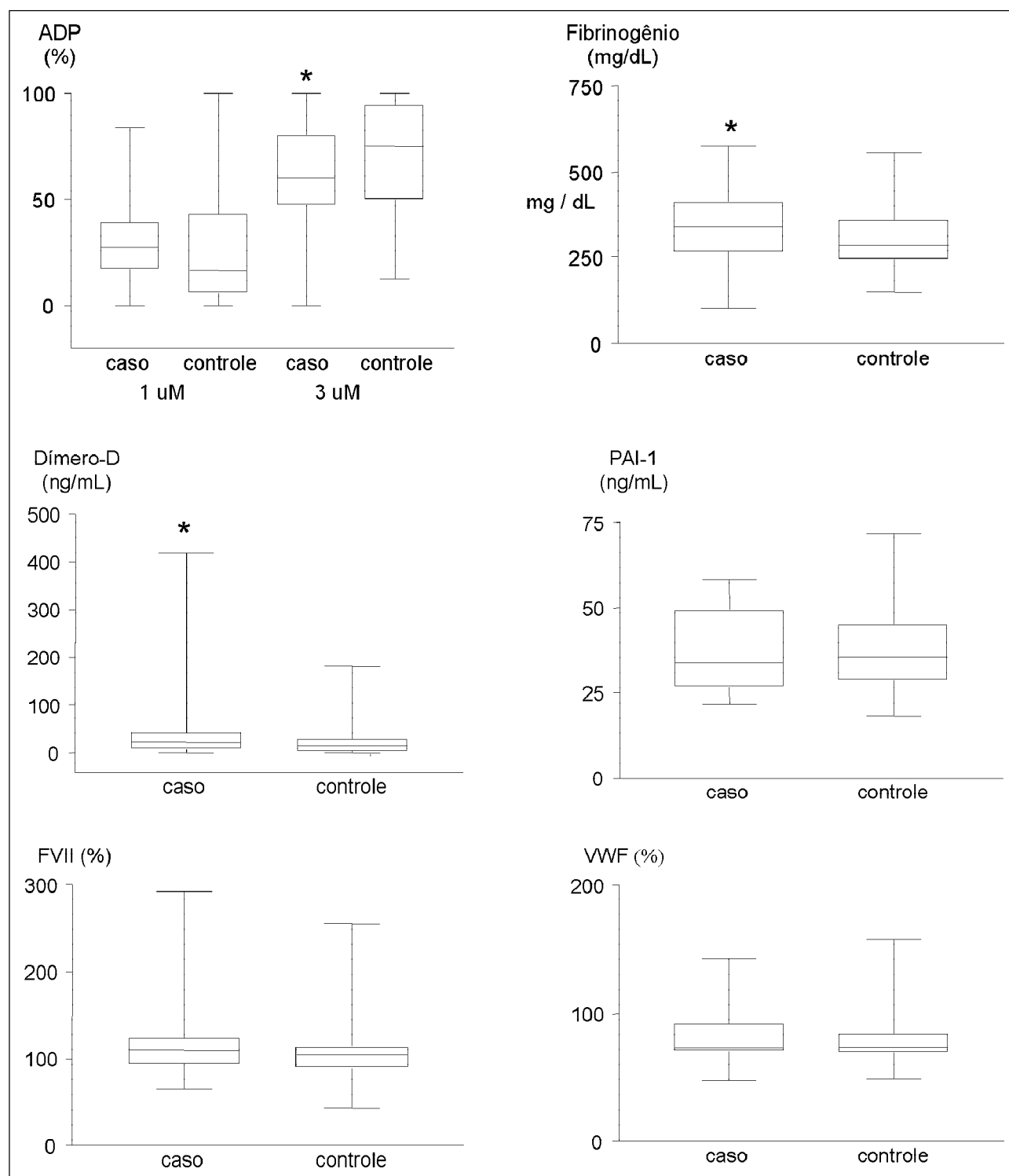


Fig. 3 – Distribuição dos marcadores da hemostasia de acordo com quartis. ADP=adenosina difosfato; vWF=fator de von Willebrand; F VII=fator VII; PAI-1= inibidor do ativador do plasminogênio – 1. Box-plots contém 1º e 3º quartis, a mediana e nos whiskers o menor e maior valores. \*p<0,03 vs. controle (teste t pareado).

aumentado, que pode refletir um processo contínuo de trombose e fibrinólise, ocorrendo sem manifestação clínica, e sob proteção insuficiente com os inibidores da agregação plaquetária. Vários estudos prospectivos e transversais relacionaram altos níveis de fibrinogênio à DAC e uma metanálise reafirmou esses achados<sup>33</sup>. Recentemente,

outros autores demonstraram uma associação independente entre DAC e fibrinogênio, presente mesmo após correção para covariáveis<sup>34</sup>. O fibrinogênio influencia a agregação plaquetária, interage com um sítio de ligação do plasminogênio e participa na formação do trombo; associa-se positivamente à idade, obesidade, tabagismo, diabetes e aos níveis

Tabela II - Distribuição dos genótipos da APO AI e APO CIII entre casos e controles					
	Grupo				P
	Caso		Controle		
	n	%	n	%	
M1 ++	89	(85)	85	(82)	ns
M1 +-	13	(13)	18	(17)	ns
M1 --	2	(2)	1	(1)	ns
M2 ++	65	(63)	71	(68)	ns
M2 +-	37	(35)	31	(30)	ns
M2 --	2	(2)	2	(2)	ns
S1S1	81	(76)	71	(68)	ns
S1S2	23	(21)	32	(31)	ns
S2S2	3	(3)	1	(1)	ns
Dados expressam número de pacientes e %; Caso=controle, p>0.05, teste do Qui-quadrado; ns=não significante.					

Dados expressam número de pacientes e %; Caso=controle, p>0.05, teste do Qui-quadrado; ns=não significante.

Tabela III - Valores de HDL- c, Apo AI e triglicérides de acordo com o número de alelos raros na DAC prematura							
	Número de alelos raros						P
	2	n	1	n	0	n	
HDL - c	38±3,7	14	40±1,6	52	39±1,6	37	Ns
Apo AI	137±8,5	14	137±3,8	50	129±3,6	37	Ns
TG	290± 40	38	202± 18	52	190± 16	14	0,03*

Dados representam a média ± EPM e o número de indivíduos. Valores em mg/dL. TG 2>TG 0 alelos, \*p<0,05, ANOVA. Apo = apolipoproteína; ns=não significante.

Tabela IV - Interação dos fatores e marcadores de risco na DAC prematura			
	Regressão logística		
	Odds ratio	IC	P
Hipertensão	3,68	2,14 – 6,32	0,000002*
Diabetes mellitus	2,00	1,11 – 3,59	0,02*
Fumo pregresso	0,69	0,41 – 1,17	0,16
AF +	1,01	0,93 – 1,09	0,86
CT	1,04	0,73 – 1,50	0,81
HDL-c	0,99	0,97 – 1,01	0,29
TG	1,01	0,92 – 1,11	0,81
Apo AI	1,48	0,88 – 2,50	0,14
Apo B	1,02	0,99 – 1,04	0,22

IC=intervalo de confiança. \*P<0,05. AF+=antecedente familiar de DAC prematura; TG= triglicérides; Apo=apolipoproteína.

de LDL-c e, inversamente, ao HDL-c<sup>35</sup>. Sendo uma proteína de fase aguda, pode também refletir o processo crônico da aterosclerose, sendo incorporado à placa, estimulando a proliferação de células musculares lisas e contribuindo para o desenvolvimento da doença coronariana. Nossos achados podem ser atribuídos às características lipídicas dos pacientes, ao IMC aumentado e ao diabetes mellitus, promovendo um risco trombótico aumentado.

Níveis elevados de dímero D na fase crônica da DAC prematura foram observados entre nossos pacientes, sendo que achados semelhantes foram descritos por Salomaa e

cols.<sup>36</sup>. Após o infarto do miocárdio, o aumento do dímero-D associou-se à extensão da aterosclerose, à disfunção ventricular e à presença de aneurisma ventricular, atuando como um marcador hemodinâmico<sup>37</sup> e da recorrência de eventos<sup>38</sup>. Como os níveis de dímero-D aumentam com a idade e, considerando a relativa estabilidade dos pacientes em nosso estudo, níveis elevados de dímero-D não seriam esperados e refletem a presença de fibrinólise, mesmo sem trombose clinicamente detectável. Dados de autópsia em pacientes que morreram por infarto agudo do miocárdio demonstraram ruptura de placas e trombose silenciosas em artérias não relacionadas<sup>39</sup>, placas estas mais frequentes em diabéticos e hipertensos. Em conjunto, nossos achados sugerem um processo dinâmico de trombose e fibrinólise silencioso.

Os níveis de PAI-1 foram elevados nos dois grupos, não discriminando a DAC prematura. Tais níveis podem ser explicados pelas influências do fumo, do índice de massa aumentado, diferenças étnicas e pela alta prevalência de síndrome metabólica.

Níveis semelhantes do Fator VII e do fator de von Willebrand nos pacientes estudados podem estar relacionados às diferentes etnias no primeiro caso e à fase crônica e estável da doença em ambos<sup>40</sup>.

As frequências genótípicas dos alelos M1 e M2 não diferiram entre casos e controles e foram semelhantes às encontradas em uma metanálise<sup>41</sup> de 14 estudos que incluíram pacientes com DAC, indivíduos saudáveis e grupos mistos. Não houve diferenças nos níveis de HDL-c e apolipoproteína AI entre os genótipos, entretanto houve tendência para apo AI mais baixa nos indivíduos M1- (p=0,07). Na DAC prematura, Reguero e cols.<sup>42</sup> observaram uma alta frequência do alelo M1- na angina instável, sem diferenças nos níveis de apolipoproteína AI. O alelo M1- também se associou à hiperlipidemia familiar combinada<sup>43</sup>. Esse mesmo estudo mostrou níveis mais baixos de HDL-c na presença do alelo M2- na DAC prematura.

Não foram encontradas diferenças nas frequências genótípicas do gene *APO CIII* entre os grupos, nem houve associação entre os genótipos e os níveis de triglicérides, apesar destas associações terem sido relatadas em outro estudo<sup>44</sup>. Nossos resultados podem ter sido mascarados pela intervenção nutricional, uma vez que respostas distintas dos parâmetros lipídicos às modificações dietéticas são relatadas para os diferentes genótipos. Além disso, a análise dos triglicérides em jejum pode não permitir a avaliação de sua importância metabólica para a DAC.

Por outro lado, observou-se hipertrigliceridemia na presença de dois alelos raros apenas nos pacientes com coronariopatia prematura. Esse achado sugere um efeito aditivo dos alelos dos genes *APO AI* e *CIII* como resultado do efeito das apolipoproteínas AI e CIII no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides e no HDL. Apesar desses polimorfismos estarem localizados numa região não traduzida, eles interferem na eficiência da transcrição dos genes *APO AI* e *APO CIII*, afetando a estabilidade do RNA mensageiro.

Em conclusão, os pacientes com doença arterial coronariana prematura caracterizaram-se por apresentar fatores de risco tradicionais, um perfil lipídico desfavorável e aumento do risco trombótico mesmo na fase crônica da doença. A hipertensão arterial e o diabetes mellitus associaram-se de forma independente à DAC prematura. Os alelos raros dos genes *APO AI-CIII* tiveram efeito aditivo sobre os níveis de triglicérides apenas nos pacientes com DAC prematura, suge-

rindo interações gene-gene e gene-ambiente. A identificação precoce dos portadores da síndrome metabólica parece crucial para a prevenção da doença coronariana prematura.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 98/02174-4) pelo apoio recebido.

## Referências

1. Brasil, Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade- SIM. Brasil, 2000. Em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em 11 de agosto de 2001.
2. Wilson PW, D'Agostini RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
3. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
4. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
5. Reaven GM. Insulin resistance and its consequences: non-insulin dependent diabetes mellitus and coronary heart disease. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. *Diabetes Mellitus*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers;1996. p 509-19.
6. Reichl D, Miller NE. Pathophysiology of reverse cholesterol transport: insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism. *Arteriosclerosis* 1989;9:785-97.
7. Brown VW, Baginsky ML. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;46:375-82.
8. Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Human apolipoprotein AI-CIII gene complex is located in chromosome 11. *Arteriosclerosis* 1984;4:97-104.
9. Karathanasis SK. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and A-IV genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1985;82:6374-8.
10. Rees A, Shoulders CC, Stocks J, Galton DJ, Baralle FE. DNA polymorphism adjacent to the human apolipoprotein AI gene: relation to hypertriglyceridemia. *Lancet* 1983;1:444-6.
11. Rees A, Stocks J, Sharpe CR, et al. Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein AI-CIII gene cluster: association with hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1985;76:1090-5.
12. Paulweber BW, Friedl W, Krempler F, Humphries SE, Sandhofer F. Genetic variation in the apolipoprotein A-I-C-III-A-IV gene cluster and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1988;73:125-33.
13. Ordovas JM, Civeira F, Genest J, et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus: relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991;87:75-86.
14. Dallingha-Thie GM, Lind-Sibenius Trip MV, Rotter JJ, et al. Complex genetic contribution of the apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1997;99:953-61.
15. 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias. *Arq Bras Cardiol* 1996;67:1-16.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
17. Clauss A. Quick method to estimate fibrinogen by a functional clotting assay. *Acta Haematol* 1957;17:237-46.
18. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulski AG. Hyperlipidemia in coronary artery disease: II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544-68.
19. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998;338:1650-6.
20. Zieske AW, Malcom GT, Strong JP. Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY study. *Pediatr Pathol Mol Med* 2002;21:213-37.
21. Faergeman O. Methods for detecting coronary disease: epidemiology and clinical management. *Acta Physiol Scand* 2002;176:161-5.
22. Schermund A, Mohlenkamp S, Stang A, Gronemeyer D, Seibel R, Hirche H, et al. Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle. *Am Heart J* 2002;144:212-8.
23. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at eight years. *Eur Heart J* 1998;19(Suppl A):A2-A11.
24. Stamler J, Dyer AR, Shekelle RB, Neaton J, Stamler R. Relationship of baseline major risk factors to coronary and all-cause mortality and to longevity: findings from long-term follow-up of Chicago cohorts. *Cardiology* 1993;82:191-222.
25. Malerbi DA, Franco LS. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;15:1509-16.
26. McGill HC Jr, McMahan A, Malcom GT, Oalmann MC, Strong JP, for the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:95-106.
27. Blann AD, Steele RH, McClooum CN. The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thromb Res* 1997;85:433-8.
28. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA* 2000;284:311-8.
29. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, et al. Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994b;35:871-82.
30. Tornvall P, Bavenholm P, Landou C, de Faire U, Hamsten A. Relation of plasma levels and composition of apolipoprotein B containing lipoproteins to angiographically defined coronary artery disease in young patients with myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:2180-9.
31. Genest JJ, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Wilson PF, Schaefer EJ. Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991;90:149-57.
32. Sandholzer C, Saha N, Kark JD, et al. Apo (a) isoforma predict risk for coronary heart disease: a study in six populations. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1214-26.
33. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, c-reactive protein, albumin or leucocyte count with coronary heart disease: metaanalysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477-82.
34. Sato S, Nakamura M, Iida M, et al. Plasma fibrinogen and coronary heart disease in urban Japanese. *Am J Epidemiol* 2000;152:420-3.
35. Scarabin PY, Aillaud MF, Amouyel P, et al. Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10,500 males participants in a prospective study of myocardial infarction – the PRIME study. *Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. Thromb Haemost* 1998;80:749-56.
36. Salomaa V, Stinson V, Kark JD, Folsom AR, Davis CE, Wu KK. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The ARIC Study. *Circulation* 1995;91:284-90.
37. Tataru M-C, Heinrich J, Junker R, et al. D-Dimers in relation to the severity of atherosclerosis in patients with stable angina pectoris after myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999;20:1493-502.
38. Moss AJ, Goldstein RE, Marder VJ, et al. Thrombotic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999;99:2517-22.
39. Davies MJ. Stability and instability: the two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture, 1995. *Circulation* 1996;94:2013-20.



40. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo, JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. Angina Pectoris Study Group. N Engl J Med 1995;332:635-41.
41. Juo SHH, Wyszynski DF, Beaty TH, Huang HY, Wilson JEB. Mild association between the A/G polymorphism in the promoter of the apolipoprotein AI gene and apolipoprotein AI levels: a metanalysis. Am J Med Genet 1999;82:235-41.
42. Reguero JR, Cubero GI, Batalla A, Alvarez V, Hevia S, Coto E. Apolipoprotein AI gene polymorphisms and risk of early onset coronary disease. Cardiology 1998;90:231-5.
43. Dallinga-Thie GM, Bu X-D, Lin-Sibenius Trip MV, et al. Apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoprotein B and CIII. J Lipid Res 1996;37:1-13.
44. Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, et al. Variation at the AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of Apo CIII. Atherosclerosis 1991;87:239-47.



Rio Tapajós - PA

Dra. Simone Augusta de Oliveira - São Paulo

---

**Editor da Seção de Fotografias Artísticas:** Cícero Piva de Albuquerque  
Correspondência: InCor - Av. Dr. Enéas C. Aguiar, 44 - 05403-000 - São Paulo, SP - E-mail: delcicero@incor.usp.br

---