

# Homocisteína e Polimorfismos dos Genes *MTHFR* e *VEGF*: Impacto na Doença Arterial Coronariana

*Homocysteine and MTHFR and VEGF Gene Polymorphisms: Impact on Coronary Artery Disease*

Alexandre Rodrigues Guerzoni<sup>1</sup>, Patrícia Matos Biselli<sup>1</sup>, Moacir Fernandes de Godoy<sup>1</sup>, Doroteia Rossi Silva Souza<sup>1</sup>, Renato Haddad<sup>2</sup>, Marcos Nogueira Eberlin<sup>2</sup>, Erika Cristina Pavarino-Bertelli<sup>1</sup>, Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>1</sup>

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP<sup>1</sup>, São José do Rio Preto, SP; Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP<sup>2</sup>, Campinas, SP - Brasil

## Resumo

**Fundamento:** Polimorfismos em genes relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose, angiogênese e metabolismo da homocisteína (Hcy) podem ser fatores de risco para a doença arterial coronariana (DAC).

**Objetivo:** Avaliar o efeito dos polimorfismos *VEGF* C-2578A e *MTHFR* C677T na DAC e a associação desses polimorfismos com a gravidade e a extensão das lesões ateroscleróticas e concentrações de Hcy.

**Métodos:** 244 indivíduos foram avaliados através de angiografia coronariana e incluídos no estudo (145 com DAC e 99 indivíduos-controle). Os polimorfismos *VEGF* C-2578A e *MTHFR* C677T foram investigados através das técnicas de PCR-SSCP e PCR-RFLP, respectivamente. Os níveis de homocisteína plasmática foram mensurados através de cromatografia líquida/espectrometria de massa seqüencial (CL/EMS).

**Resultados:** Não houve diferença significativa em relação à distribuição de alelos e genótipos entre os grupos, para ambos os polimorfismos. A análise univariada mostrou uma frequência maior do genótipo *VEGF* -2578AA no grupo com doença em três vasos ( $p=0,044$ ). Além disso, o genótipo *VEGF* -2578CA foi observado mais frequentemente entre indivíduos com <95% de estenose ( $p=0,010$ ). Após ajuste para outros fatores de risco para DAC em um modelo multivariado, observou-se que o polimorfismo *VEGF* C-2578A não era um correlato independente da DAC ( $p=0,688$ ). O polimorfismo *MTHFR* não mostrou qualquer relação com a extensão e/ou gravidade da DAC. O polimorfismo *MTHFR* C677T não mostrou uma associação direta com hiperhomocisteinemia ou aumento das concentrações médias de Hcy no plasma.

**Conclusão:** Embora haja uma aparente associação entre o polimorfismo *VEGF* C-2578A e o desenvolvimento de aterosclerose coronariana, essa associação não é independente dos fatores de risco cardiovasculares convencionais. (Arq Bras Cardiol 2009;92(4):263-268)

**Palavras-chave:** Doença de artéria coronariana, aterosclerose, polimorfismo genético, homocisteína.

## Summary

**Background:** Polymorphisms in genes involved in the atherosclerosis development, angiogenesis, and homocysteine (Hcy) metabolism could be risk factors for coronary artery disease (CAD).

**Objective:** To evaluate the effect of the *VEGF* C-2578A and *MTHFR* C677T polymorphisms on CAD, and the association of these polymorphisms with the severity and extension of atherosclerotic lesions and Hcy concentrations.

**Methods:** Two hundred and forty-four subjects were evaluated by coronary angiography and included in the study (145 with CAD and 99 controls). The *VEGF* C-2578A and *MTHFR* C677T polymorphisms were investigated by the PCR-SSCP and PCR-RFLP techniques, respectively. Plasma Hcy was quantified by liquid chromatography/sequential mass spectrometry (LC-MS/MS).

**Results:** There was no significant difference in allele and genotype distribution between the groups, for both polymorphisms. The univariate analysis showed a higher frequency of the *VEGF* -2578AA genotype in the group with three-vessel disease ( $p=0.044$ ). In addition, the *VEGF* -2578CA genotype was observed more frequently among individuals with <95% stenosis ( $p=0.010$ ). After adjustment for other risk factors for CAD in a multivariate model, the *VEGF* C-2578A polymorphism was not found to be an independent correlate of CAD ( $p=0.688$ ). The *MTHFR* polymorphism did not show any association with the extension and/or severity of the CAD. The *MTHFR* C677T polymorphism showed no direct association with hyperhomocysteinemia or increased mean plasma concentrations of Hcy.

**Conclusion:** Although there is an apparent association between *VEGF* C-2578A and the development of coronary atherosclerosis, this association is not independent of conventional cardiovascular risk factors. (Arq Bras Cardiol 2009;92(4):249-254)

**Key words:** Coronary artery disease; atherosclerosis; polymorphism, genetic; homocysteine.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Patrícia Matos Biselli •

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, São Pedro, 15.090-000, São José do Rio Preto, SP - Brasil

E-mail: [patriciabiselli@famerp.br](mailto:patriciabiselli@famerp.br)

Artigo em 15/06/07; revisado recebido 17/10/07; aceito 27/01/08.

## Introdução

O gene que codifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem sido estudado no desenvolvimento de doenças coronarianas<sup>1-3</sup>. O *VEGF*, presente nas paredes dos vasos, promove a proliferação das células endoteliais vasculares e a angiogênese, mas seu papel na aterosclerose ainda é pouco entendido. Há estudos que apontam o *VEGF* como um fator de proteção no desenvolvimento da placa aterosclerótica, ao agir como um regulador da integridade endotelial da parede arterial coronariana<sup>4,5</sup>. Por outro lado, há estudos mostrando que a neovascularização, mediada pelo *VEGF*, influencia a patogênese das doenças arteriais<sup>6</sup>.

Alterações das concentrações de *VEGF* podem ser mediadas por polimorfismos genéticos<sup>7,8</sup>. Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram descritos no gene *VEGF*. Renner e cols.<sup>7</sup> descreveram três polimorfismos do gene *VEGF* (C702T, C936T e G1612A) e observaram níveis significativamente mais baixos de *VEGF* no plasma em carreadores do alelo 936T, quando comparados com não-carreadores. Os polimorfismos C702T e G1612 não mostraram associação com os níveis de *VEGF*. Níveis elevados também foram associados com o alelo G no nucleotídeo *VEGF* -1154<sup>8</sup>. Em um estudo com pacientes submetidos à angiografia coronariana, o polimorfismo C-2578A foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose<sup>1</sup>. Essa variação genética já foi associada com uma menor expressão do *VEGF*<sup>8</sup>.

A hiperhomocisteinemia, isto é, aumento da concentração de homocisteína (Hcy) no sangue, é considerada um fator de risco independente para a aterosclerose e doença arterial coronariana (DAC)<sup>9</sup>. O aumento das concentrações de Hcy é encontrado em 40% dos pacientes com doença arterial coronariana, arterial cerebral ou arterial periférica e em apenas 15% de indivíduos saudáveis<sup>10</sup>.

O mecanismo através do qual a hiperhomocisteinemia induz o desenvolvimento de lesões vasculares ainda é pouco conhecido. Evidências experimentais sugerem que a Hcy pode estar envolvida na aterogênese e trombogênese, levando à hiperplasia da célula muscular e fibrose<sup>10,11</sup>. Concentrações anormais de Hcy podem resultar da interação de fatores genéticos e nutricionais<sup>12</sup>. A enzima metilenoetetraidrofolato redutase (*MTHFR*), que tem um papel importante no metabolismo da Hcy, apresenta diminuição da atividade como resultado do polimorfismo na posição 677 do gene *MTHFR* e leva ao aumento das concentrações de Hcy<sup>13</sup>. A variante alélica *MTHFR* 677T tem sido encontrada com alta frequência em pacientes com doenças vasculares<sup>14-17</sup>.

No presente estudo, analisamos a frequência dos polimorfismos *VEGF* C-2578A e *MTHFR* C677T em pacientes com DAC e em um grupo de indivíduos sem sinais angiográficos da doença e avaliamos a associação entre esses polimorfismos e a gravidade e extensão das lesões ateroscleróticas e as concentrações plasmáticas de Hcy.

## Métodos

### Sujeitos do estudo

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, DF, Brasil. Após a obtenção do Consentimento Livre e Informado, 244 indivíduos

caucasóides foram incluídos no estudo (145 com DAC e 99 sem a doença). O diagnóstico de DAC foi confirmado ou eliminado através de angiografia coronariana, analisada por dois observadores independentes em uma análise cega quantitativa feita no Laboratório de Cateterismo. Indivíduos que haviam sido submetidos à cirurgia cardíaca e aqueles com prótese coronária foram excluídos do estudo. Embora a miscigenação no Brasil seja disseminada, consideramos como Caucásóides aqueles indivíduos que não apresentavam outros grupos étnicos nas três gerações precedentes<sup>18</sup>.

A extensão da DAC foi determinada de acordo com o número de vasos coronários envolvidos (0 a 3) e a gravidade através do grau de obstrução arterial (estenose <50%, >50-75%, >75-95%, e >95%). A fração de ejeção (FE) <40% foi considerada como dano ventricular. Angina típica foi considerada como presente ou ausente. Os fatores de risco clássicos para DAC também foram investigados. Os critérios para a definição de diabetes foram o uso de agentes hipoglicemiantes orais ou tratamento com insulina, ou níveis glicêmicos >126 mg/dl; para hipertensão, o uso de medicação anti-hipertensiva ou pressão arterial >140/90 mmHg; para sedentarismo, a ausência de exercícios regulares e controlados; para alcoolismo, a ingestão de álcool com uma frequência definida sem uma análise quantitativa; indivíduos que haviam fumado  $\geq 100$  cigarros durante a sua vida e no momento fumavam todos os dias ou em alguns dias, foram considerados fumantes.

### Análise bioquímica

Amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas durante o exame angiográfico, após jejum de 12 horas. A separação do plasma foi feita em até uma hora após a coleta do sangue para a mensuração da Hcy, de acordo com o método de cromatografia líquida/espectrometria de massa seqüencial (CL/EMS)<sup>19</sup>. As concentrações de Hcy >15  $\mu\text{mol/ml}$  foram consideradas como caracterizadoras de hiperhomocisteinemia<sup>20</sup>. Os procedimentos para determinação do perfil lipídico foram Feitos No Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Triglicérides (TG), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL<sub>c</sub>) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL<sub>c</sub>) foram mensurados pelo método colorimétrico enzimático.

### Determinação de genótipo

DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico<sup>21</sup>. O polimorfismo *VEGF* C-2578A foi investigado através do método de Reação de Polimerase em Cadeia - Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (PCR-SSCP), de acordo com Brogan e cols.<sup>22</sup>. Trinta ciclos de amplificação (95°C por 30s, 62°C por 30s, e 72°C por 60s) foram feitos para amplificar um produto de 309 pb. Então, 6  $\mu\text{l}$  do produto da PCR foram denaturados a 95°C por 5 minutos com 6  $\mu\text{l}$  de solução corante para eletroforese (80% v/v formamida; 10mM NaOH; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1% w/v de azul de bromofenol e 1,1% xilenocianol). Os produtos denaturados foram analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida e visualizados após coloração com nitrato de prata.

A genotipagem para o polimorfismo *MTHFR* C677T foi feita através de PCR, seguida por digestão enzimática<sup>16</sup>. Trinta e cinco ciclos (94°C por 60s, 58°C por 60s, e 72°C por

60s) foram executados para amplificar um produto de 198 pb. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Hinf* I e os fragmentos foram analisados em gel de poli-acrilamida a 9,6% após coloração com nitrato de prata. O alelo C não foi digerido, enquanto o alelo T foi cortado em dois fragmentos de 175 e 23 pb, respectivamente.

### Análise estatística

Os dados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão (DP) ou números (porcentagens). A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste de Qui-quadrado, teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney, como apropriado. A análise de dependência foi utilizada para examinar as diferenças das frequências de genótipo entre os grupos com uma, duas ou três artérias afetadas, e entre grupos com diferentes graus de estenose. Os valores de Hcy foram modelados baseando-se em uma distribuição normal na escala logarítmica. A concentração de Hcy em relação ao polimorfismo *MTHFR* foi avaliada através de análise de variância (ANOVA). A relação independente dos polimorfismos *VEGF* C-2578A e *MTHFR* C677T com os fatores de risco na presença de DAC foi testada através de análise de regressão logística múltipla. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi utilizado para estabelecer a significância estatística.

### Suporte financeiro

Fundação de Apoio à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP).

## Resultados

As características da população estudada são apresentadas na Tabela 1. Os resultados significativamente diferentes obtidos para indivíduos com e sem DAC estão de acordo com os fatores de risco cardiovascular previamente estabelecidos.

### Polimorfismo do gene do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*)

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação às frequências de alelos ( $p=0,995$ ) e genótipo ( $p=0,254$ ) do polimorfismo *VEGF* C-2578A. Os cálculos para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) mostraram que a distribuição genotípica observada foi similar à esperada, no grupo com DAC e no grupo controle ( $\chi^2_1=3,12$ ;  $p=0,077$  e  $\chi^2_1=0,46$ ;  $p=0,496$ , respectivamente).

As frequências genotípicas de acordo com o número de vasos envolvidos e o grau de obstrução arterial são apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Uma frequência significativamente mais alta do genótipo *VEGF* -2578AA foi observada em indivíduos com três artérias afetadas ( $p=0,044$ ). Em relação ao grau de obstrução arterial, o genótipo *VEGF* -2578CA foi observado mais frequentemente em indivíduos com < 95% de estenose ( $p=0,010$ ).

### Polimorfismo do gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase (*MTHFR*) e concentrações de homocisteína

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação às frequências de alelos ( $p=0,895$ ) e genótipo ( $p=0,884$ )

Tabela 1 - Características da população estudada

	DAC (n = 145)	Controles (n = 99)	Valor de p
Idade (anos)	60,4 $\pm$ 12,3	57,8 $\pm$ 11,4	0,084
Sexo			0,066
Masculino	93(64)	51(52)	
Feminino	52(36)	48(48)	
Hipertensão	113(78)	66(67)	0,708
Diabete	36(25)	13(13)	0,040
Sedentarismo	63(43)	50(51)	0,339
Fumante	100(69)	52(53)	0,014
Angina	115(79)	68(69)	0,083
Dano ventricular	50(34)	14(14)	0,0007
Alcoolismo	48(33)	25(25)	0,240
Colesterol Total (>200mg/dl)	60(41)	41(41)	0,996
HDLc (<40 mg/dl)	78(54)	31(31)	0,0008
LDLc (>130 mg/dl)	57(40)	36(36)	0,740
VLDLc (> 30 mg/dl)	58(40)	33(33)	0,356
Triglicérides (>150 mg/dl)	63(43)	36(36)	0,330

Valores são apresentados como média  $\pm$  DP ou número (%). DAC - doença arterial coronariana; HDLc - lipoproteína de alta densidade; LDLc - lipoproteína de baixa densidade; VLDLc - lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 2 - Frequências dos genótipos em pacientes com uma, duas, e três artérias afetadas

Polimorfismo	Uma artéria afetada	Duas artérias afetadas	Três artérias afetadas	Valor de p	
	N (%)	N (%)	N (%)		
<i>VEGF</i> -2578	CC	15 (44)	14 (41)	5 (15)	0,044
	CA	32 (38)	28 (34)	23 (28)	
	AA	6 (21)	8 (29)	14 (50)	
<i>MTHFR</i> 677	CC	24 (45)	16 (30)	13 (25)	0,548
	CT	25 (31)	29 (36)	26 (33)	
	TT	4 (33)	5 (42)	3 (25)	

Tabela 3 - Frequências dos genótipos em pacientes com <50%, >50-75%, >75-95%, e >95% de estenose

Polimorfismo	Grau de estenose				Valor de p	
	<50%	>50-75%	>75-95%	>95%		
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)		
<i>VEGF</i> -2578	CC	2 (6)	6 (18)	16 (47)	10 (29)	0,010
	CA	9 (11)	17 (21)	45 (54)	12 (14)	
	AA	0 (0)	4 (14)	13 (47)	11 (39)	
<i>MTHFR</i> 677	CC	4 (7)	10 (19)	27 (51)	12 (23)	0,991
	CT	6 (8)	16 (20)	41 (51)	17 (21)	
	TT	1 (8)	1 (8)	6 (50)	4 (34)	

do polimorfismo *MTHFR* C677T. A distribuição genotípica observada foi similar à esperada no grupo controle ( $\chi^2_1=2,23$ ;  $p=0,135$ ), mas no grupo com DAC, mostrou desequilíbrio de Hardy-Weinberg, com uma diferença significativa entre as frequências observada e esperada ( $\chi^2_1=5,76$ ;  $p=0,016$ ).

Nenhuma associação foi observada entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e o número de vasos envolvidos e/ou o grau de obstrução arterial (Tabelas 2 e 3). A concentração média de Hcy não diferiu significativamente entre os grupos ( $p=0,222$ ), bem como a presença de hiperhomocisteinemia ( $p=0,266$ ). A média da concentração de Hcy não apresentou nenhuma associação com o número de vasos envolvidos ( $p=0,793$ ) ou o grau de obstrução arterial ( $p=0,700$ ).

O polimorfismo *MTHFR* C677T não mostrou relação direta com a hiperhomocisteinemia ( $p=0,860$ ) ou aumento da concentração média de Hcy ( $p=0,758$ ).

### Análise multivariada

A regressão logística múltipla foi utilizada para testar os correlatos independentes para a presença de DAC. O modelo incluiu: fumo, hipertensão, diabetes, níveis de HDL<sub>c</sub> e os polimorfismos *VEGF* C-2578A e *MTHFR* C677T. Fumo ( $p=0,006$ ), diabetes ( $p=0,041$ ), e níveis de HDL<sub>c</sub> < 40 mg/dL ( $p=0,0008$ ) foram correlatos independentes da presença de DAC. A hipertensão mostrou uma tendência à associação com DAC ( $p=0,061$ ). Os polimorfismos *VEGF* C-2578A ( $p=0,688$ ) e *MTHFR* C677T ( $p=0,981$ ) não foram preditores independentes de DAC.

### Discussão

No presente estudo, a frequência alélica e a genotípica do polimorfismo *VEGF* C-2578A não diferiram entre pacientes com e sem DAC. Entretanto, uma maior frequência do genótipo *VEGF*-2578AA foi observada em indivíduos com três artérias afetadas. Este resultado corrobora os achados de um estudo recente de Howell e cols.<sup>1</sup> no qual o genótipo *VEGF*-2578AA foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, enquanto o genótipo *VEGF* -2578CC mostrou ter um efeito protetor. De acordo com esse estudo, a frequência do genótipo *VEGF* -2578AA aumentou gradualmente com o número de vasos envolvidos, quando comparada com o genótipo selvagem (*wild-type*) *VEGF* -2578CC, sugerindo que a redução da expressão do *VEGF* resultante do genótipo *VEGF*-2578AA poderia promover o desenvolvimento de aterosclerose. A maior frequência do genótipo *VEGF* -2578CA entre indivíduos com <95% de estenose sugere uma associação entre esse genótipo e a progressão mais lenta da lesão aterosclerótica, possivelmente devido à presença do alelo selvagem. Entretanto, nenhuma associação foi encontrada em relação ao genótipo selvagem *VEGF* -2578CC, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos na amostra.

Embora nossos resultados em relação ao polimorfismo do *VEGF* e a gravidade e extensão da DAC sejam significantes, após o ajuste para outros fatores de risco em um modelo multivariado, a associação positiva entre o polimorfismo *VEGF* C-2578A e a gravidade da DAC perdeu significância estatística. Já que o polimorfismo *VEGF* C-2578A não foi um

fator de risco independente para a DAC, esses dados não confirmam a ligação casual entre o polimorfismo *VEGF* C-2578A e aterosclerose coronariana.

O papel do *VEGF* na aterosclerose é motivo de debate na literatura. Alguns estudos mostraram que a administração de *VEGF* humano recombinante em animais aumenta a progressão das placa aterosclerótica<sup>23</sup>, enquanto outros observaram que ele age como um fator anti-aterosclerótico, promovendo a re-endotelização, reduzindo o espessamento da camada íntima e prevenindo a formação de coágulos<sup>5</sup>.

As correlações entre genótipos e expressão não foram analisadas em nosso estudo. Entretanto, um estudo feito por Shahbazi e cols.<sup>8</sup> com receptores de transplante renal, encontrou uma associação entre o alelo selvagem *VEGF* 2578C e o aumento das concentrações de *VEGF*. Outros polimorfismos do gene *VEGF* já foram associados com variações na expressão da proteína<sup>7,8</sup>. De acordo com Howell e cols.<sup>1</sup>, o genótipo *VEGF* -2578AA poderia ser considerado um fator de risco para aterosclerose devido à redução da expressão da proteína. Esse resultado é consistente com a ação do *VEGF* na regulação endógena da integridade endotelial da parede da artéria coronariana<sup>4</sup>. Por outro lado, a neovascularização da placa aterosclerótica, mediada pelo *VEGF*, disponibiliza nutrientes e componentes da placa, aumentando seu volume. Em paredes arteriais com oclusão total por placas ateroscleróticas, como observado em estudo prospectivo, microvasos chamados *vasa vasorum* foram correlacionados, em sua anatomia e quantidade, ao grau de inflamação da placa intimal<sup>24</sup>. Moulton e cols.<sup>25</sup> observou uma redução na progressão da aterosclerose secundária à inibição da neovascularização mediada pelo *VEGF*. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer o verdadeiro papel do *VEGF* na DAC.

Nesse estudo, as frequências alélica e genotípica do polimorfismo *MTHFR* C677T não foram diferentes entre pacientes e controles. Entretanto, no grupo com DAC, a distribuição genotípica observada foi diferente da esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Estudos de caso-controle com análise de SNPs mostraram fuga do EHW em pacientes, em controles ou em ambos os grupos<sup>26-28</sup>. Esse desequilíbrio pode ser esperado para várias doenças genéticas, considerando que provavelmente haja uma contribuição genética significativa em doenças complexas<sup>29</sup>. Embora alguns estudos tenham encontrado evidência de associação entre o alelo polimórfico *MTHFR* 677T e doenças vasculares, aterosclerose carotídea, doença arterial oclusiva e infarto do miocárdio<sup>15-17,30-32</sup>, outros não confirmaram essas hipóteses<sup>11,33</sup>.

Cerca de 40% dos pacientes com DAC apresentavam hiperhomocisteinemia<sup>34</sup>. Em nosso estudo, 49,7% dos pacientes com DAC e 45,2% dos controles apresentavam concentrações de Hcy > 15  $\mu\text{mol/l}$ , e essa diferença não foi significativa. Outro estudo brasileiro mostrou uma diferença significativa em concentrações de Hcy entre o grupo controle e o grupo com aterosclerose grave. Esses autores também observaram uma correlação positiva entre níveis mais altos de Hcy e DAC<sup>35</sup>. Em nosso estudo, concentrações médias mais altas de Hcy foram encontradas no grupo com DAC quando comparados com o grupo controle, mas a diferença não foi significativa (dados não mostrados), o que está de acordo com



os achados de Yilmaz e cols.<sup>36</sup>.

Estudos clínicos envolvendo tratamentos para reduzir os níveis de homocisteína têm demonstrado que a suplementação com folato não reduziu o risco de complicações e morte por causas cardiovasculares, apesar de uma redução substancial nos níveis plasmáticos totais de Hcy<sup>37,38</sup>. Embora estudos observacionais tenham demonstrado que o nível plasmático total de Hcy é um preditor de eventos cardiovasculares<sup>39</sup>, nenhum papel causativo da Hcy foi substanciado pelos resultados de estudos de intervenção envolvendo tratamento para redução de níveis de homocisteína.

No estudo prospectivo de Frederiksen e cols.<sup>40</sup>, a concentração média de Hcy era mais alta em portadores do genótipo *MTHFR* 677TT quando comparados a outros genótipos; entretanto, o polimorfismo *MTHFR* C677T não foi associado com doença isquêmica cardiovascular ou tromboembolismo. Observações similares foram relatadas por Huh e cols.<sup>41</sup> e Yilmaz e cols.<sup>36</sup> em estudos de DAC. Nas populações estudadas por nós, o polimorfismo *MTHFR* C677T não apresentou uma relação direta com a hiperhomocisteinemia ou aumento das concentrações médias de Hcy, nos grupos com DAC ou controle. Uma correlação entre a presença dessa mutação e a hiperhomocisteinemia também foi observada por Lima e cols.<sup>35</sup>, em um estudo brasileiro.

O tamanho da amostra é um fator importante em estudos de caso-controle, principalmente em investigações de polimorfismos genéticos com alta frequência na população em geral. Embora o número de indivíduos avaliados nesse estudo seja suficiente para demonstrar uma diferença estatística na distribuição do genótipo entre os subgrupos com diferentes graus de obstrução arterial e número de artérias envolvidas, nenhuma diferença foi observada entre o grupo com DAC e

o grupo controle. Os estudos na literatura utilizam amostras maiores, principalmente para avaliar a associação entre polimorfismos e DAC ou Hcy. Além disso, a investigação de alterações em outras enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy e nas concentrações plasmáticas de folato e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, e ingestão de vitaminas, poderia fornecer dados mais consistentes para a discussão sobre o efeito dos polimorfismos nas concentrações de Hcy.

Em resumo, há uma aparente associação entre o polimorfismo *VEGF* C-2578A e o desenvolvimento de aterosclerose; entretanto, essa associação não é independente dos fatores de risco cardiovascular convencionais.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Celso Pereira Reis Filho pelo gerenciamento do banco de dados e ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro pela análise estatística e reconhecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por FAPESP e CNPq.

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Alexandre Rodrigues Guerzoni pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

## Referências

1. Howell WM, Ali S, Rose-Zerilli MJ, Ye S. VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J Med Genet.* 2005; 42: 485-90.
2. Fleisch M, Billinger M, Eberli FR, Garachemani AR, Meier B, Seiler C. Physiologically assessed coronary collateral flow and intracoronary growth factor concentrations in patients with 1- to 3-vessel coronary artery disease. *Circulation.* 1999; 100: 1945-50.
3. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation.* 1998; 98: 2108-16.
4. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzendichler B, Kearney M, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med.* 1997; 3: 879-86.
5. Van Belle E, Tio FO, Chen D, Maillard L, Chen D, Kearney M, et al. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29: 1371-9.
6. Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, Langille BL. Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum. *Cell Tissue Res.* 2002; 307: 303-13.
7. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res.* 2000; 37: 443-8.
8. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 260-4.
9. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol.* 2004; 93: 439-53.
10. Welch GN, Upchurch GJR, Loscalzo J. Hyperhomocyst(e)inaemia and atherothrombosis. *Ann NY Acad Sci.* 1997; 811: 48-58.
11. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 1999; 354: 407-13.
12. Verhoeve P, de Groot LC. Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med.* 2005; 5: 110-23.
13. Pisciotto L, Cortese C, Gnasso A, Liberatoscioli L, Pastore A, Mannucci L, et al. Serum homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2005; 179: 333-8.
14. Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, Rosendaal FR, Beverly RK, Hess DL, et al. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation.* 1997; 96: 81-9.
15. Tsai MY, Welge BC, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K, et

- al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis*. 1999; 143: 163-70.
16. Bova I, Chapman J, Sylantiev C, Korczyn AD, Bornstein NM. The A677V methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1999; 30: 2180-2.
17. Jee SH, Song KS, Shim WH, Kim HK, Suh I, Park JY, et al. Major gene evidence after MTHFR-segregation analysis of serum homocysteine in families of patients undergoing coronary arteriography. *Hum Genet*. 2002; 111: 128-35.
18. Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. Prevalence of the mutation C677-->T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med*. 1998; 78: 332-5.
19. Haddad R, Mendes MA, Hoehr NF, Eberlin MN. Amino acid quantitation in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma. *Analyst*. 2001; 126: 1212-5.
20. Arnadottir M, Hultber, B, Vladov V, Nilsson-Ehle P, Thysell H. Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 1996; 61: 509-12.
21. Abdel-Rahman SZ, Nouraldean AM, Ahmed AE. Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol*. 1994; 9: 121-8.
22. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol*. 1999; 60: 1245-9.
23. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PC, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. 2001; 7: 425-9.
24. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, et al. Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29: 955-63.
25. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvain E, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4736-41.
26. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet*. 2002; 111: 573-4.
27. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Am Coll Phys*. 2004; 141: 137-47.
28. Wittke-Thompson J, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*. 2005; 76: 967-86.
29. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. Competing risks of death and Hardy-Weinberg equilibrium in case-control studies of gene-disease association. *Gac Sanit*. 2005; 19: 321-4.
30. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res*. 1988; 62: 515-23.
31. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Skoumas J, Choumerianou D, et al. ATTICA Study Group. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2005; 100: 409-14.
32. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Gene polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. *J Cardiol*. 1997; 29: 309-15.
33. Couffignal T, Kearney M, Witzensbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol*. 1997; 150: 1673-85.
34. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ*. 2004; 11 (Suppl 1): 56-64.
35. Lima LM, Carvalho MC, Fernandes AP, Sabino Ade P, Loures-Vale AA, da Fonseca Neto CP, et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase in subjects undergoing coronary angiography. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 88 (2): 167-72.
36. Yilmaz H, Isbir S, Agachan B, Ergen A, Farsak B, Isbir T. C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct*. 2006; 24: 87-90.
37. Bona KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1578-88.
38. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1567-77.
39. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002; 288: 2015-22.
40. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood*. 2004; 104: 3046-51.
41. Huh HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ. Gene-nutrition interactions in coronary artery disease: correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population. *Thromb Res*. 2006; 117: 501-6.