

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA
DOUTORADO

**DOENÇA CARDIOVASCULAR EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAI: ASSOCIAÇÃO COM FATORES
DA COAGULAÇÃO E SEUS POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

Elizete Keitel

PORTO ALEGRE
1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA
DOUTORADO

**DOENÇA CARDIOVASCULAR EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS: ASSOCIAÇÃO COM FATORES
DA COAGULAÇÃO E SEUS POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

Elizete Keitel

Orientadores: Prof. Dr Flávio Danni Fuchs
Dra. Fiona Green

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica
para obtenção do título de Doutor em Medicina.

PORTO ALEGRE
1999

K27d Keitel, Elizete

Doença cardiovascular em pacientes transplantados renais : associação com fatores da coagulação e seus polimorfismos genéticos / Elizete Keitel ; orient. Flávio Danni Fuchs e Fiona Green. – Porto Alegre, 1999.
90 f. : il. color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina : Clínica Médica.

1. Doenças cardiovasculares. 2. Transplante de rim. 3. Fatores de coagulação sangüínea. I. Fuchs, Flávio Danni. II. Green, Fiona. III. Título.

NLM: WG 120

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Ao Renato e Renatinho

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Flavio Danni Fuchs pela orientação da minha pós graduação deste o projeto inicial até o final neste estudo, pelo incentivo e apoio ao longo desta caminhada.

Ao Professor Peter J. Morris pela oportunidade que me deu de trabalhar no seu Departamento na Universidade de Oxford.

À Dra. Fiona Green, por ter me recebido no seu laboratório e ter me orientado o estudo de genética cardiovascular.

Ao Dr. Ashley Irish por ter permitido que eu continuasse o estudo iniciado por ele e usar os seus dados.

Ao Dr. Antônio Eduardo Bittar pelo assessoramento fundamental para a minha estada em Oxford.

Aos Drs Jorge Neumann e David Saitovich pela ajuda na arte final.

Ao Serviço de Nefrologia da Santa Casa

Ao CNPq

A Comissão Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Medicina:
Clínica Médica

ÍNDICE

LISTA DE QUADROS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	18
Patogênese da aterosclerose	19
Relação entre alterações de coagulação e doença cardiovascular	23
Fibrinogênio e Fator VII da coagulação	24
Fatores ambientais e coagulação	29
Tabagismo e Fibrinogênio	29
Dieta e Fator VII	29
Exercício	30
Interação entre fatores genéticos e ambientais	30
Fibrinólise	33
Interleucina-6 (IL-6)	35
Transplante e coagulação: papel da medicação imunossupressora	36
QUADRO CONCEITUAL	37
HIPÓTESE CONCEITUAL	39
OBJETIVOS	39
MATERIAL e MÉTODOS	40
Delineamento do Estudo	40
Hipótese operacional	40
Amostragem	40
Tamanho da amostra	41
Parâmetros avaliados	42
Coleta do material	42
Métodos bioquímicos	43
Técnicas de biologia molecular	44
Aspectos éticos	49
RESULTADOS	52
Pacientes transplantados comparados ao grupo de indivíduos normais	53
Estudo do grupo de pacientes transplantados renais com e sem doença cardiovascular	54
Avaliação de variáveis ambientais e constitucionais potencialmente associadas com os níveis séricos dos fatores da coagulação	57
Estudo genético	59
Mapeamento do sitio polimórfico da IL-6	59
Genotipagem do alfa e beta-fibrinogênio , fator VII, Pai-1 e IL-6 na amostra de pacientes transplantados renais	61
Genotipagem do alfa e beta-fibrinogênio , fator VII, Pai-1 e IL-6 na amostra de pacientes transplantados renais e a relação com a produção das respectivas proteínas codificadas por estes genes	62
DISCUSSÃO	70

CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Substâncias reguladoras de mitose e outras funções celulares envolvidas na patogênese da aterosclerose	21
Quadro 2: Fatores de risco para doença cardiovascular	27
Quadro 3: Fatores relacionados à produção do fibrinogênio	28
Quadro 4: Fatores associados com o aumento da produção do fator VII	28
Quadro 5: Quadro conceitual	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da cascata da coagulação, em azul e verde estão os fatores que favorecem a coagulação e em amarelo os fatores que dificultam a coagulação ou favorecem a fibrinólise. A letra 'a' indica o estado de ativação da proteína. 24
- Figura 2:** Estudos epidemiológicos prospectivos mostrando a associação entre os níveis plasmático do fibrinogênio e doença cardiovascular. 26
- Figura 3:** Razão de chance para doença cardiovascular em indivíduos com níveis de fibrinogênio no tercil superior comparados com indivíduos com níveis no tercil inferior, nos diferentes estudos epidemiológicos. 26
- Figura 4:** Localizações de polimorfismos dos genes do fibrinogênio e os sítios passíveis de quebra pela diferentes enzimas de restrição (HaeIII, Kpn, SacI, RsaI). Polimorfismo A/G-455 e a representação das bandas no gel vistas sob luz ultravioleta para genotipagem do polimorfismo na região promotora do gene. 46
- Figura 5:** Polimorfismos do gene do fator VII, destacando o polimorfismo do exon 8 que codifica o aminoácido na posição 353 como arginina ou glicina. 47
- Figura 6:** Representação esquemática do gene do PAI-1. As partes identificadas com números indicam os exons e as setas indicam os sítios passíveis de digestão com enzimas de restrição (CA rpt, HindIII). Em destaque o polimorfismo da região promotora do gene do PAI-1. 48
- Figura 7:** Polimorfismos no intron 4 no gene da IL-6. 60
- Figura 8:** Seqüenciamento direto incluindo parte do Intron 4 da IL-6 que apresenta o sítio polimórfico. Nesta técnica de sequenciamento se utiliza "primer" no sentido antisenso (3'→5') mostrando a sequência de bases complementares. 61
- Figura 9:** Média e desvio padrão do PAI-1 de acordo com genótipo. 65
- Figura 10:** Níveis de IL-6 de acordo com genótipo no grupo de pacientes transplantados com um todo. 66

Figura 11: Níveis de IL-6 categorizado por tabagismo e genótipo do intron-4 da IL-6. 67

Figura 12: Prevalência de doença cardiovascular em participantes caracterizados pelo genótipo da IL-6 e pelo hábito de fumar. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos do grupo de pacientes transplantados e grupo controle (variáveis contínuas - média \pm DP ou mediana (variação), variáveis categóricas- frequência (percentagem)).	53
Tabela 2: Dados metabólicos e hemostáticos no grupo de transplantados e grupo control (variáveis contínuas - média \pm DP ou mediana (variação)).	53
Tabela 3: Dados demográficos dos pacientes transplantados com doença cardiovascular (DCV +) e sem doença cardiovascular (DCV -) [variáveis contínuas - média \pm DP ou mediana (variação), variáveis categóricas- frequência (percentagem)].	55
Tabela 4: Medicacões imunossupressoras empregadas nos pacientes transplantados DCV (+) e DCV(-) (frequência e percentagem) e níveis sanguíneos de ciclosporina (mediana e variação).	55
Tabela 5: Dados metabólicos dos pacientes transplantados com (DCV+) e sem (DCV-) doença cardiovascular [variáveis contínuas, média \pm DP ou mediana (variação)]	56
Tabela 6: Fatores da coagulação e hemostasia nos pacientes transplantados com (DCV+) e sem (DCV-) doença cardiovascular [(variáveis contínuas, média \pm DP ou mediana (variação)].	57
Tabela 7: Dosagem de fatores metabólicos, coagulação e fibrinólise de acordo com as medicações imunossupressoras usadas [mediana (variação)].	58
Tabela 8: Genótipos observados e a frequência dos alelos.	62
Tabela 9: Frequência dos alelos dos diferentes genes nos pacientes transplantados com (DCV +) e sem doença cardiovascular (DCV -).	62
Tabela 10: Níveis plasmáticos do fibrinogênio de acordo com o genótipo do alfa e beta fibrinogênio.	63

Tabela 11: Níveis de IL-6 de acordo com o genótipo Msp e presença ou não de DCV. 66

Tabela 12: Resultados do modelo de regressão logística que inclui as variáveis explanatórias selecionadas em conjuntos prévios e doença cardiovascular como variável dependente. 69

RESUMO

As doenças decorrentes da aterosclerose apresentam uma prevalência mais elevada entre pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos comparativamente à população em geral. Os motivos para esta discrepância podem estar na maior exposição dos pacientes transplantados a fatores de risco cardiovascular. Recentemente identificou-se a participação de fatores da coagulação na patogênese da aterosclerose, tanto em estudos populacionais quanto em pacientes transplantados.

No presente estudo aferiram-se diversos fatores da coagulação e a exposição a fatores de risco convencionais para doença cardiovascular em um grupo de 270 pacientes transplantados renais comparativamente a um grupo de indivíduos saudáveis. Adicionalmente, compararam-se pacientes transplantados renais com e sem o diagnóstico de doença cardiovascular quanto a exposição a características ambientais e genéticas relacionadas aos fatores da coagulação e fatores de risco clássicos para doença cardiovascular.

As variáveis estudadas foram: idade, sexo, tabagismo, história familiar de doença cardiovascular, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica, esquema imunossupressor, glicemia, colesterol total, triglicerídios, fibrinogênio, interleucina-6 (IL-6), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator VII coagulante (FVIIc), polimorfismos genéticos do fator VIIc (Arg/Gln³⁵³), alfa (T/A³¹²) e beta (G/A⁴⁴⁵) fibrinogênio, PAI-1 (4G/5G), IL-6 (intron-4).

O grupo de 270 pacientes transplantados renais foi similar ao grupo de 31 indivíduos saudáveis em relação à idade, sexo e índice de massa corporal. Entre os pacientes transplantados a proporção de tabagistas foi menor (15,9% vs 38,7%) e pressão arterial mais elevada (146/84 vs 133/71 mmHg). Os níveis de colesterol total, triglicerídios, fibrinogênio, interleucina 6, fator VII coagulante e dímero-D foram

mais elevados nos pacientes transplantados comparativamente aos indivíduos saudáveis.

Sessenta e três (23,3%) pacientes transplantados tinham o diagnóstico de doença cardiovascular, sendo que 22 já apresentavam doença previamente ao transplante. Estes pacientes eram mais idosos e apresentavam maior frequência de história familiar positiva para doença cardiovascular e tabagismo comparativamente aos pacientes transplantados sem doença cardiovascular. Não houve diferença entre os 2 grupos em relação a sexo, índice de massa corporal e pressão arterial. Os esquemas de medicações imunossupressoras foram similares nos 2 grupos. Os pacientes com doença cardiovascular apresentaram níveis significativamente mais elevados de fibrinogênio [415 (230-1050) mg/dl vs 360 (211-650) mg/dl $P < 0,001$], interleucina-6 [2,4 (0,26-25) pg/ml vs 2,0 (0,19-23,9) $P = 0,017$], glicose [6,6 \pm 2,7 mmol/L vs 5,9 \pm 1,3 mmol/L $P = 0,007$], triglicerídios [1,8(0,7-7,5) mmol/L vs 1,5 (0,4-12,3) mmol/L $P = 0,023$] e mais baixos de albumina (40,5 \pm 3,3 g/L vs 42,5 \pm 3,6 g/L $P < 0,001$). Os níveis de fator VIIc [97(29,8-214) % vs 96 (40,7-226) %; $P = 0,31$], PAI-1 [9,9(2,0-34,6) AU/ml vs 9,0(0,8-50) AU/ml; $P = 0,248$] e colesterol total [6,0(4,0-11,0) mmol/L vs 5,9 (2,9-10,2) mmol/L $P = 0,454$] foram similares.

A frequência dos alelos raros dos polimorfismos genéticos dos genes do beta fibrinogênio (A/G -445), alfa fibrinogênio (A/T 312), IL-6 (intron-4 A/G), fator VIIc (Arg/Gln-353) e PAI-1 (4G/5G) foram similares entre os pacientes transplantados renais com e sem doença cardiovascular. A interação do alelo A-445 do beta fibrinogênio e tabagismo associou-se com maior prevalência de doença cardiovascular nos pacientes transplantados renais.

Em análise de covariância observou-se associação dos níveis de fibrinogênio com a idade, níveis de IL-6 e ciclosporinemia. Os níveis de fator VIIc associaram-se com os níveis de triglicerídios e colesterol e com o genótipo, sendo mais baixo nos portadores do alelo raro (Gln353). Os níveis de PAI-1 associaram-

se com os níveis de glicose e triglicéridios e com o genótipo, sendo mais elevado nos portadores do alelo 4G. Os níveis de IL-6 associaram-se com ciclosporinemia.

Em análise de regressão logística observou-se associação independente de doença cardiovascular com idade, história familiar positiva para doença cardiovascular, tabagismo e níveis séricos de fibrinogênio e albumina.

Em conclusão, identificou-se alterações no sistema de coagulação de pacientes transplantados renais à longo prazo. A prevalência de doença cardiovascular associou-se com estas alterações e com fatores de riscos clássicos para doença cardiovascular, como idade, história familiar e tabagismo. Não detectou-se associação entre a frequência dos diversos polimorfismos genéticos e prevalência de doença cardiovascular entre os pacientes transplantados. A associação entre a interação de tabagismo e presença do alelo raro (A-445) do beta-fibrinogênio com o diagnóstico de doença cardiovascular merece futura investigação.

ABSTRACT

The prevalence of clinical consequences of atherosclerosis is increased in patients submitted to solid organs transplantation, in comparison to the general population. The reason of this is not completely understood. The exposition to a higher prevalence of classical risk factors for cardiovascular disease has been considered. Recently, abnormalities in the coagulation factors are also thought to play a role in the pathogenesis of the atherosclerosis, both in unselected populations and transplant patients.

In this study, we studied coagulation factors and the exposition to classical risk factors for cardiovascular disease in a group of 270 renal transplant recipients and compared them to a sample of 31 healthy subjects. Additionally, we analysed those risk factors for cardiovascular disease in transplant patients with and without a diagnosis of cardiovascular disease. In this setting, we evaluated the distribution of the coagulation factors levels and polymorphisms of the respective genes.

The variables studied were: age, gender, smoking, family history of cardiovascular disease, body mass index, blood pressure, immunosuppressor agents, glicemia, total cholesterol, tryglicerides, fibrinogen, interleukin-6 (IL-6), plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1), factor VII coagulant (FVIIc), D-dimer, and genetic polymorphisms of factor VIIc (Arg/Gln₃₅₃), alpha (T/A 312) and beta (G/A⁻⁴⁴⁵) fibrinogen, PAI-1 (4G/5G), IL-6 (intron-4).

Age, gender and body mass index were similar in renal transplant recipients and control group. However, in the transplant group the frequency of smokers was lower (15,9% vs 38,7%) and the blood pressure was higher (146/84 vs 133/71mmHg). The total cholesterol, tryglicerides, fibrinogen, IL-6, factor VIIc and D-dimer levels were significantly increased in transplant recipients compared to healthy controls.

Cardiovascular disease was present in sixty-three (23,3%) transplant patients. Twenty-two of them have had the diagnosis previous to transplantation. The former patients were older and the frequency of smoking and positive family history of cardiovascular disease was higher compared to transplant patients without cardiovascular disease. There were no differences between these 2 groups related to sex, body mass index and blood pressure. The immunosuppressive regimes were similar in both groups. The patients with cardiovascular disease presented significantly higher levels of fibrinogen [415 (230-1050) mg/dl vs 360 (211-650) mg/dl $P < 0,001$], IL-6 [2,4 (0,26-25) pg/ml vs 2,0 (0,19-23,9) $P = 0,017$], glucose [6,6+2,7 mmol/l vs 5,9+1,3 mmol/l $P = 0,007$] and tryglicerides [1,8(0,7-7,5) mmol/l vs 1,5 (0,4-12,3) mmol/l $P = 0,023$], and lower levels of albumin (40,5+3,3 g/l vs 42,5+3,6 g/l $P < 0,001$). The levels of factor VIIc [97(29,8-214) % vs 96 (40,7-226) %; $P = 0,31$], PAI-1 [9,9(2,0-34,6) AU/ml vs 9,0(0,8-50) AU/ml; $P = 0,248$] and total cholesterol [6,0(4,0-11,0) mmol/l vs 5,9 (2,9-10,2)] mmol/l $P = 0,454$] were similar.

The frequency of the rare alleles of the polymorphic genes of beta fibrinogen (A/G -445), alpha fibrinogen (A/T 312), IL-6 (intron-4 A/G), factor VIIc (Arg/Gln-353) and PAI-1 (4G/5G) were similar in both groups of transplant patients. The interaction of the beta fibrinogen allele A-445 and smoking was associated with a higher prevalence of cardiovascular disease.

Fibrinogen levels were associated with age, IL-6 levels and trough levels of cyclosporin. Difference in plasma factor VIIc levels were associated with factor VII genotype, tryglicerides and cholesterol. Carriers of the Gln353 allele had lower VIIc when compared with Arg353 homozygous, which may confer a reduced thrombotic risk. Difference in PAI-1 levels was associated with glucose, tryglicerides and 4G/5G genotype. Carriers of the 4G allele had higher PAI-1 levels compared with 5G homozygous. IL-6 levels were associated with trough cyclosporin levels.

Cardiovascular disease was independently associated with age, positive family history for cardiovascular disease, smoking, fibrinogen and albumin in multivariate analysis.

In conclusion, long-term renal transplant recipients manifest alterations in coagulation system. Cardiovascular disease was associated with these conditions, as well as with the classical risk factors such as age, positive family history and smoking. There was no association between the polymorphic genes coding for beta and alpha fibrinogen, IL-6, factor VIIc and PAI-1 with a higher prevalence of cardiovascular disease in the transplant recipients presently studied. The association between the prevalence of cardiovascular disease and interaction of smoking and the β -fibrinogen A-445 allele deserves further investigation.

INTRODUÇÃO

As doenças decorrentes de aterosclerose – cardiopatia isquêmica, doença cerebro-vascular, doença vascular periférica - têm alta prevalência nas sociedades ocidentais com taxa de mortalidade mais elevada na Grã- Bretanha, nordeste da Europa, EUA, Austrália e Nova Zelândia. Houve um aumento da taxa de mortalidade no final da primeira guerra mundial atingindo o pico no final dos anos 50 na Europa e final dos anos 60 nos EUA. Mudanças de hábitos dietéticos, prática de exercícios, redução do tabagismo e melhora do nível sócio-econômico das populações foram fatores que contribuíram para uma queda de 45% na mortalidade. Atualmente, ainda 50% dos pacientes morrem no primeiro evento coronariano, sendo 25% imediatamente após o evento.¹

Nos países desenvolvidos, a doença cardiovascular, especialmente o infarto do miocárdio, permanece como a principal causa de morte nos pacientes que necessitam terapêutica de substituição da função renal. Dados do Registro da Associação Européia de Diálise e Transplante (EDTA) de 1990 mostram que a freqüência de óbito por doença cardiovascular nos pacientes em hemodiálise, diálise peritoneal e transplantados foi de 41%, 55% e 38%, respectivamente. Nos pacientes transplantados a incidência de infarto do miocárdio é 8 a 15 vezes maior do que na população geral.² Embora exista uma relação entre a prevalência de complicações ateroscleróticas pré e pós-transplante, a incidência de doença cardiovascular é, também, elevada nos pacientes sem evidência de aterosclerose antes do transplante.^{3,4}

Esta alta prevalência de complicações cardiovasculares em pacientes submetidos a tratamento de substituição da função renal sugere que a diálise e o transplante podem acelerar o processo de aterosclerose.³ A natureza desta associação ainda não está clara,

no entanto, a presença de fatores de risco conhecidos na população geral como hiperlipidemia, intolerância à glicose, tabagismo e, principalmente, hipertensão, é altamente freqüente nesses pacientes. Além destes fatores de risco bem estabelecidos, novos fatores contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose nestes pacientes, como alteração no ritmo circadiano da pressão arterial, diminuição da fibrinólise, aumento da oxidação e níveis plasmáticos elevados de homocisteína ⁵.

Desde o início dos anos 80 a participação da trombose na etiopatogenia da cardiopatia isquêmica tem recebido progressivo destaque. A trombose coronariana constitui-se no substrato dominante nas síndromes de angina instável, infarto do miocárdio e morte súbita, além de participar da gênese e desenvolvimento de novas lesões ateromatosas e lesões re-estenóticas⁶.

Patogênese da aterosclerose

A aterosclerose é um processo de etiologia multifatorial, começando na infância e se tornando clinicamente evidente na idade adulta. Embora as lesões ateroscleróticas possam ser vistas em todos leitos vasculares, certas áreas, de maior estresse hemodinâmico, são mais freqüentemente acometidas, como o arco aórtico, os locais de ramificações dos grandes vasos, artérias carótidas e coronárias.

No século passado haviam duas hipóteses principais para a patogênese da aterosclerose. A primeira hipótese, da “encrostação” ou “trombótica”, descrita por Carl von Rokitanski⁷ em 1852 e modificada por Duguid⁸, sugeria que o processo inicial consistia na deposição de fibrina na íntima resultando em espessamento intimal, com subsequente organização por fibroblastos e acúmulo secundário de lipídios. A segunda, a hipótese “lipídica” proposta por Virchow ⁹ em 1856, sugeria que os lipídios na parede do vaso representavam a infiltração de lipídios sangüíneos, os quais subseqüentemente formavam complexos com ácidos mucopolissacarídeos; o acúmulo destes lipídios na

parede arterial resultaria em um desequilíbrio em direção aos mecanismos de deposição sobre os de remoção. Hoje é aceita a hipótese de “resposta à injúria”, desenvolvida por Ross¹⁰, como o processo iniciador da aterosclerose, que nada mais é do que a integração das duas hipóteses. A aterosclerose parece se desenvolver como um processo de reparo a repetidos danos na parede vascular onde os fatores de risco funcionam por promover ciclos crônicos de dano e reparo. O LDL oxidado, toxinas do cigarro, tensão de cisalhamento (“shear stress”) da hipertensão, homocisteína¹¹, fibrina e infecções¹² podem causar disfunção endotelial levando a uma resposta protetora. As células endoteliais expressam moléculas de adesão, produzem substâncias promotoras do crescimento e ativam a cascata da coagulação. Monócitos e linfócitos T aderem ao endotélio ativado, se ativam e produzem fatores de crescimento, citocinas e quimioatrativos. Os leucócitos aderentes migram para a íntima arterial onde células musculares lisas são recrutadas da camada íntima e média vascular. Com a repetição de dano e reparo há acúmulo de células musculares lisas, proteínas da matriz, macrófagos com conteúdo lipídico e células T formando a placa aterosclerótica.

Na evolução da aterosclerose espontânea envolvem-se cinco tipos de células: endoteliais, monócitos/macrófagos, células musculares lisas, plaquetas e linfócitos. Há uma complexa interação entre estas células levando ao aumento da produção de moléculas que estimulam ou inibem o processo de crescimento, contração, adesão, secreção e expressão de genes. As principais moléculas implicadas estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 1

Substâncias reguladoras de mitose e outras funções celulares envolvidas na patogênese da aterosclerose

Estimuladoras
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
Fator de crescimento de células endoteliais (ECGF)
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)
Fator de crescimento derivado de células musculares lisas (SMCDGF)
Interleucina-1 (IL-1)
Interleucina-6 (IL-6)
Fator Beta transformador crescimento (TGFb)
Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)
Substâncias vasoativas
Angiotensina II
Epinefrina
Norepinefrina
Serotonina
Neuropeptídios P e K
Endotelina
Trombina
Leucotrienos B4, C4, D4
Prostaglandina E2, prostaciclina
Inibidoras
Fator beta transformador do crescimento (TGFb)
Substâncias semelhantes a heparina
Substâncias vasodilatadoras
Fator relaxante derivado de endotélio (óxido nítrico)
Prostaglandina E, E2, prostaciclina
Interferon gama

Adaptada de Fuster¹³

O endotélio exerce um papel central na patogênese da aterosclerose. A presença de dano endotelial ou mesmo disfunção endotelial leva a uma diminuição na produção de prostaciclina - que previne deposição de plaquetas e vasoespasmo - e óxido nítrico - que medeia a ação vasodilatadora da acetilcolina sobre as células musculares lisas - e um aumento de fatores vasoconstritores como a endotelina-1. Os fatores relaxadores predominam em condições fisiológicas enquanto que no endotélio lesado ou disfuncionado predominam os fatores constritores.^{13,14}

Propõe-se, também, a participação do sistema imunológico na patogênese da aterosclerose. Depósitos granulares de imunoglobulinas e componentes do complemento, bem como altos níveis de expressão do receptor C3b nos macrófagos foram observados dentro de lesões ateromatosas. Além deste fenômeno humoral, células

T ativadas tem sido isoladas em estágios precoces, entre zonas de transição entre íntima normal e deposição de gorduras, predominando sobre monócitos/macrófagos. Os antígenos candidatos a estarem envolvidos nas reações imunes no curso da aterosclerose são: constituintes de lipoproteínas modificadas; antígenos ocultos expostos após a necrose celular; antígenos não lipoproteínas com alteração própria; antígenos que aparecem após desnaturação de proteínas autólogas, tais como durante infecção ou devido a alterações físicas ou químicas com mimetismo antigênico, com reações imunológicas cruzadas entre material exógeno e auto-antígenos.

Wick e colaboradores ¹⁵ sugerem que ocorra uma reação auto-imune contra “heat shock protein 60” (Hsp 60), expressa pelas células endoteliais nas áreas onde ocorre estresse hemodinâmico, iniciando o evento da aterosclerose. Este estado inflamatório, potencialmente reversível, pode progredir para lesão aterosclerótica completa se estiverem presentes fatores de risco adicionais, como hipertensão, hipercolesterolemia, tabagismo e obesidade. Esta hipótese de desenvolvimento de aterosclerose baseada na reação imunológica primária concorda com a hipótese de “resposta a injúria” e “LDL modificado”. Entretanto, muitas dúvidas ainda permanecem, especialmente se a sensibilização ocorre por reação cruzada entre a Hps60 e Hps65 induzida por um antígeno exógeno (pós-infecção) ou se ocorre uma reação auto-imune contra a Hsp 60.

O processo de progressão da placa aterosclerótica foi classificada Stary¹⁶ em 5 fases, desde a presença de uma faixa adiposa até lesões avançadas complicadas. A fase 1 é representada por uma lesão pequena, geralmente encontrada em indivíduos abaixo dos 30 anos, composta por células espumosas derivadas de macrófagos com gotículas lipídicas até células musculares lisas cercadas por lipídios extracelulares. A fase 2 consiste de uma placa, geralmente com alto conteúdo lipídico, passível de ruptura, podendo ser estenótica ou não. A fase 2 pode evoluir para a fase aguda 3 ou 4, e estas podem evoluir para a fase 5 (fibrótica). A fase 3 consiste de uma lesão complicada aguda como resultado de uma ruptura ou fissura, geralmente de uma estenose não severa. Esta

contribui para a formação de um trombo mural, que pode não ocluir completamente a artéria. Como resultado de mudanças em geometria de placas rompidas e de organização de um trombo mural pelo tecido conectivo, a placa pode progredir para o tipo mais estenótico e mais fibrótico de lesões da fase 5. Estas podem se manifestar clinicamente por angina e evoluir para lesões oclusivas. A oclusão final pode ser silenciosa, sem manifestações clínicas, devido ao aumento das artérias colaterais protetoras formadas pela estenose precedente e isquemia.

A lesão aguda complicada na fase 4, ao contrário do que a caracteriza por um trombo mural na fase 3, constitui-se de um trombo oclusivo, clinicamente manifestada por síndrome coronariana aguda. Este trombo oclusivo pode tornar-se fibrótico ou oclusivo da fase 5 se não for dissolvido fisiológica ou farmacologicamente. Esta classificação permite a correlação entre as fases clínicas de evolução da placa e o tipo patológico das lesões descritas.

Relação entre alterações de coagulação e doença cardiovascular

Embora tenha sido sugerido no século passado e, novamente, nos meados dos anos 40, foi somente nos anos 80 que a ativação dos fatores da coagulação, especialmente fibrinogênio, além de uma diminuição da fibrinólise, passaram a ser aceitos como potenciais fatores envolvidos na aterogênese, em adição ao seu papel na oclusão vascular aguda. Três tipos de estudos enfatizaram a importância dos fatores hemostáticos: 1) estudos histológicos demonstraram que a maioria dos infartos do miocárdio resultam de oclusão trombótica da artéria coronariana, frequentemente associada com uma ruptura da placa aterosclerótica^{17,18}; 2) agentes trombolíticos, como estreptoquinase, uroquinase e ativador do plasminogênio tecidual foram sendo utilizados mais frequentemente em pacientes com trombose venosa e arterial¹⁹; 3) surgimento do fibrinogênio como um fator de risco independente para infarto do miocárdio com importância similar a do colesterol.^{20,21,22,23}

A cascata da coagulação está representada na figura 1.

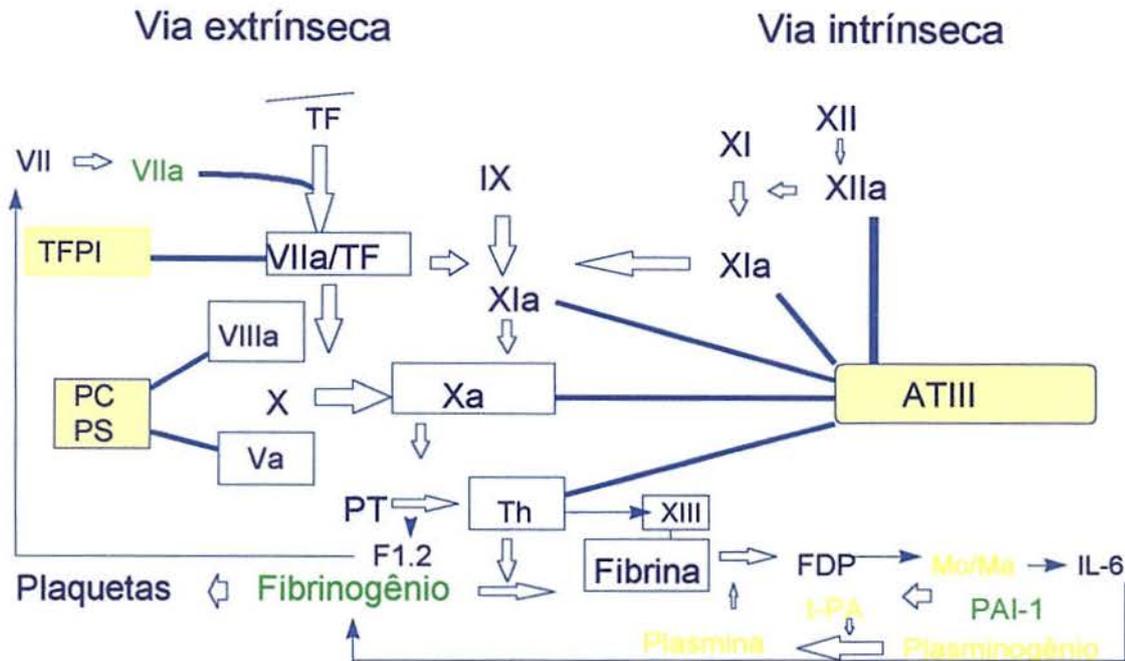


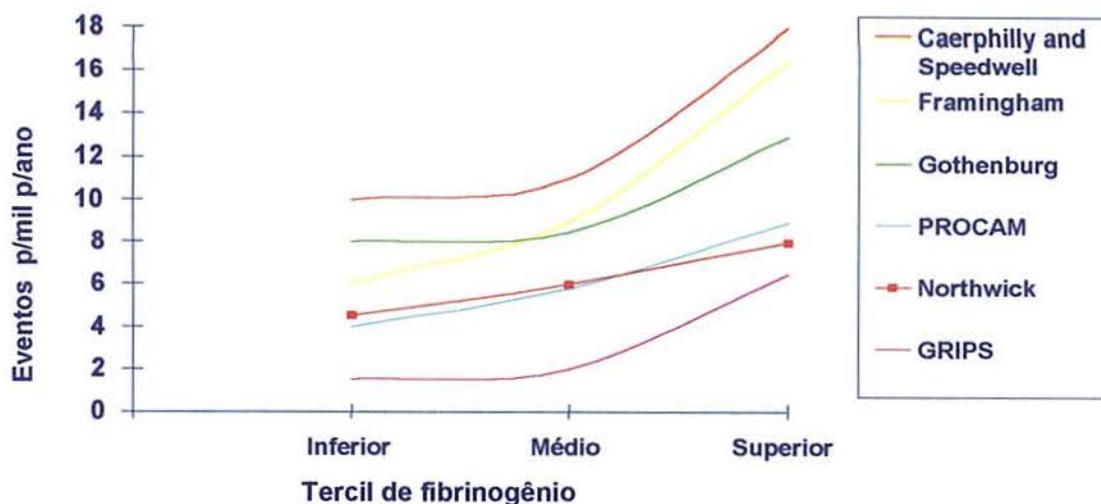
Figura 1:
Representação esquemática da cascata da coagulação. Em azul e verde estão os fatores que favorecem a coagulação e em amarelo os fatores que dificultam a coagulação ou favorecem a fibrinólise. A letra 'a' indica o estado de ativação da proteína.

- | | |
|--|--|
| TF: fator tecidual | TFPI: Via inibitoria do fator tecidual |
| PC: proteína C | PS: proteína S |
| PT: protrombina | Th: trombina |
| ATIII: antitrombina III | FDP: produtos de degradação da fibrina |
| Mo/Ma: monócitos/macrófagos | t-PA: ativador tecidual do plasminogênio |
| PAI-1: inibidor 1 do ativador do plasminogênio | IL-6: interleucina-6 |

Fibrinogênio e Fator VII da coagulação

O fibrinogênio é uma proteína da fase de resposta aguda. Além de ser essencial para a hemostasia normal ao ser polimerizado por ação da trombina para formar fibrina como o evento final da cascata da coagulação, aumenta a viscosidade sanguínea, os glóbulos vermelhos e a agregação plaquetária.²³ O fibrinogênio e seus produtos podem penetrar na parede vascular contribuindo para a patogenese da aterosclerose através de seus efeitos sobre o endotélio e células da muscular lisa vascular.

Dada a natureza inflamatória da placa aterosclerótica, sugere-se que o aumento dos níveis de fibrinogênio plasmático associados a doença atero-trombótica pode refletir o grau de doença vascular pré-existente.^{24,25} No entanto, muitos estudos epidemiológicos prospectivos mostram uma correlação positiva entre concentração plasmática de fibrinogênio e fator VII e subseqüentes eventos cardiovasculares isquêmicos, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, morte súbita, e doença vascular periférica oclusiva (Figura 2).^{26,27,28,29,30} Nos diferentes estudos, a razão de chance para doença cardiovascular foi maior nos pacientes que tinham níveis plasmáticos no terço superior em relação ao inferior, como está demonstrado na figura 3. O fibrinogênio já fora, inclusive, listado em livro texto entre os fatores de risco clássicos para doença cardiovascular (quadro 2).³¹



Adaptado de Heinrich³⁰

Figura 2

Estudos epidemiológicos prospectivos mostrando a associação entre os níveis plasmático do fibrinogênio e doença cardiovascular.

OBS: Os tercils dos níveis plasmáticos de fibrinogênio foram definidos como: inferior (126-264 mg/dl), médio (265 – 311 mg/dl) e superior (312 - 696mg/dl).

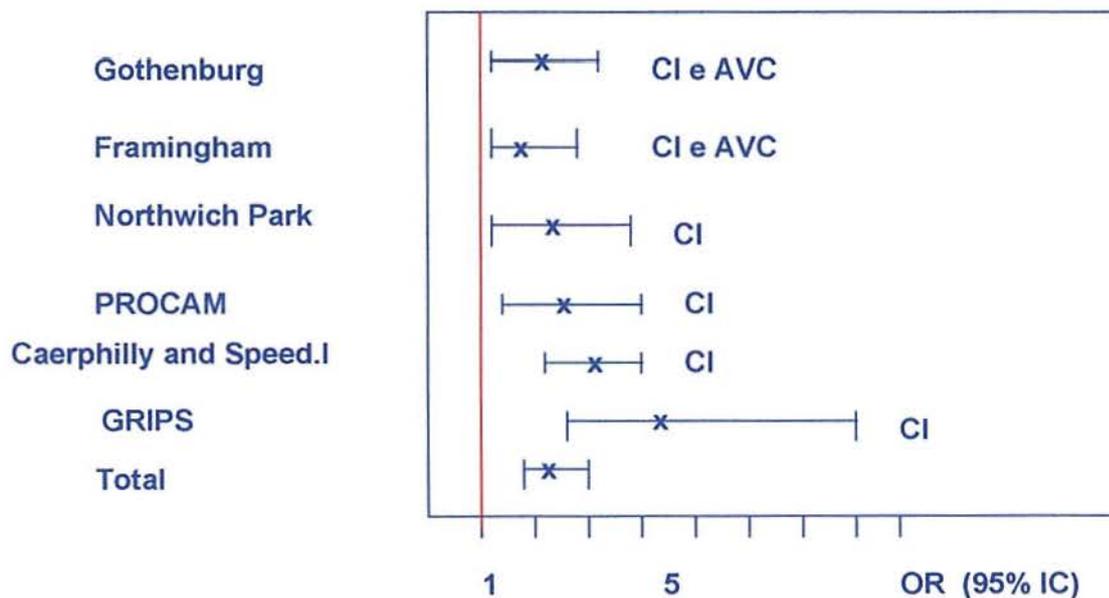


Figura 3:

Razão de chances para doença cardiovascular em indivíduos com níveis de fibrinogênio no tercil superior comparados com indivíduos com níveis no tercil inferior, nos diferentes estudos epidemiológicos.

OR= Razão de chances (odds ratio)

CI= cardiopatia isquêmica

AVC= acidente vascular cerebral

Quadro 2

Fatores de risco para doença cardiovascular

Sexo masculino
Raça (Índios ocidentais)
Dieta rica em gordura saturadas e colesterol, pobre em frutas, grãos e vegetais
História familiar (< 55 anos) em parentes de 1º grau
Hipercolesterolemia (> 210 mg/dl / 5,2 mmol/l)
Tabagismo
Hipertensão arterial sistêmica
HDL < 35 mg/dl / 0,9 mmol/l
Diabete Melito
Obesidade severa (>30% excesso)
Lipoproteína (a) elevada
Fibrinogênio elevado
Hiperhomocisteinemia

O estudo de Northwick Park Heart (NPSH) foi o primeiro a identificar os níveis de fibrinogênio e atividade do fator VII da coagulação como fator capaz de prever a ocorrência de eventos coronarianos agudos em homens. Mostrou que estes dois fatores eram tão poderosos quanto os níveis de colesterol total em prever risco. Para cada aumento de um desvio padrão do fibrinogênio, o risco aumentou em 84% e em 62% no caso do fator VII. Considerando o fator VII, este efeito foi mais acentuado dentro dos primeiros 5 anos.

Neste mesmo estudo foi observado, em homens jovens (40-54 anos), que o aumento da atividade do fator VII estava relacionado com eventos coronarianos fatais e que havia uma relação forte a longo prazo entre uma baixa atividade fibrinolítica e a incidência de doença coronariana isquêmica. Obesidade, atividade do fator VII e fibrinogênio associaram-se inversamente com atividade fibrinolítica³².

Vários fatores têm sido associados com o aumento e a diminuição dos níveis de fibrinogênio (quadro 3) e fator VII (quadro 4). Os níveis de fibrinogênio e fator VII aumentam com a idade, com o peso corporal, em mulheres usando anticoncepcional oral e em menopausa, apresentando variação sazonal³³. Além disso, diabete melito³⁴ e síndrome nefrótica³⁵ estão associados com níveis elevados de fibrinogênio. Entre os fatores ambientais, os mais importantes são a relação entre tabagismo e níveis de

fibrinogênio³⁶ e dieta com fator VII. O consumo moderado de álcool relaciona-se a níveis mais baixos de fibrinogênio³⁷.

Quadro 3:
Fatores relacionados à produção do fibrinogênio

Fatores aumentam	Fatores diminuem
Idade	Suspensão do tabagismo
Sexo	Atividade física
Menopausa	Moderado consumo álcool
Genética	Perda de peso
Raça	Reposição hormonal pós-menopausa
Tabagismo	
Obesidade	
Estresse	
Anticoncepcional oral	
Gestação	
Dieta gordurosa	

Quadro 4
Fatores associados com o aumento da produção do fator VII

Fatores associados ao aumento do fator VII
Idade
Índice de massa corporal
Contraceptivos orais
Menopausa
Dieta rica em gordura (VLDL e quilomicrons)

Fatores ambientais e coagulação

Tabagismo e Fibrinogênio

A intensidade do tabagismo parece ter uma influência direta nos níveis de fibrinogênio. A cada 10 cigarros consumidos, aumentam em 0,1 g/L os níveis de fibrinogênio. Um estudo com 30 indivíduos tabagistas demonstrou que após duas semanas de abandono do fumo os níveis de fibrinogênio, hematócrito, viscosidade sanguínea e plasmática foram significativamente mais baixos, comparativamente ao período de tabagismo, além de haver aumento nos níveis do HDL- colesterol.³⁸ O NPSH, também, mostrou que tabagistas ativos têm níveis marcadamente elevados de fibrinogênio. Os ex-tabagistas apresentam níveis intermediários proporcionais ao intervalo de tempo de abandono, sendo necessários 5 anos para que as médias se equiparassem as dos não fumantes. Nos indivíduos que pararam de fumar houve aumento de 3% nos níveis de VIIIc e diminuição de 4,5% nos que voltaram ou iniciaram a fumar. Com o controle para índice de massa corporal em análise multivariada desapareceu o efeito residual do fumo, pois os que pararam de fumar durante o acompanhamento ganharam em média 3,5 Kg comparativamente com 0,7 nos que continuaram fumando e 0,9 nos que nunca fumaram³⁹. Estes estudos sugerem que grande parte da relação entre tabagismo e doença cardíaca isquêmica possa ser mediada pelo fibrinogênio.

Dieta e Fator VII

Existe uma correlação entre os níveis de colesterol e fator VIIIc em humanos e também uma associação com a ingestão de gordura⁴⁰.

O fator VII combina-se com o fator tecidual e ativa o fator X, que por sua vez transforma protrombina em trombina. Entre as fontes do fator tecidual *in vivo* estão a ruptura aguda de placas de ateroma e o resultado da ação de citocinas no endotélio. O fator XII também pode ativar diretamente o fator VII. A importância deste mecanismo consiste na possibilidade do fator XII ser ativado por ácidos graxos carregados negativamente em partículas lipoproteicas ricas em triglicerídios.⁴¹

Exercício

O efeito do exercício no risco cardiovascular pode ser parcialmente mediado pelas alterações nos níveis plasmáticos de fibrinogênio. Imediatamente após exercício extenuante há aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, associando-se com risco para infarto do miocárdio. A redução dos níveis plasmáticos de fibrinogênio propiciado por exercícios sistemáticos associa-se com redução de risco.⁴²

Interação entre fatores genéticos e ambientais

Algumas doenças são determinadas por alterações genéticas em que um único gene principal (monogênica) está envolvido e o portador deste desenvolve a doença dependendo do padrão de herança do gene. Estas doenças são raras e o meio tem pouca ou nenhuma influência na sua manifestação como, por exemplo, a fibrose cística. Em doenças de determinação poligênica há interação com o ambiente para a causação, como por exemplo, nas doenças cardiovasculares.

As duas formas principais de investigação de doenças associadas a alterações genéticas são: o rastreamento de todo o genoma, com vistas a detectar novos genes em pares de indivíduos afetados comparativamente a não afetados, e a pesquisa de polimorfismos de genes já conhecidos.

Na primeira o genótipo é determinado por marcadores polimórficos distribuídos através de todo genoma, sendo que o excesso de alelos compartilhados indica as regiões candidatas do genoma. Por meio de diversas técnicas de biologia molecular, em geral dispendiosas e trabalhosas, como clonagem em plasmídeos e cosmídios, se identificam os novos genes. Por sua vez, a pesquisa de polimorfismos consiste na identificação de genes candidados, codificadores de síntese de substâncias potencialmente envolvidas na fisiopatologia da doença. Por esta abordagem identifica-se polimorfismos nos genes candidatos, analisando-se o efeito destes polimorfismos no fenótipo intermediário e na doença através de estudos prospectivos, casos-controle ou de pares de indivíduos afetados. Este método vem sendo utilizado em pesquisa genética de doença cardiovascular aterosclerótica.

Neste estudo são avaliados alguns polimorfismos dos genes de proteínas envolvidas na coagulação e fibrinólise, candidatos a estarem ligados à patogênese da doença atero-trombótica, tais como fibrinogênio, fator VII, inibidor do ativador do plasminogênio e interleucina 6.

O fibrinogênio é uma molécula de 340 KDa, sintetizado no fígado e megacariócitos, consistindo de 3 pares de cadeias polipeptídicas, A alfa, B beta e gama, cada uma codificada por um gene diferente localizado no cromossoma 4. A sua síntese encontra-se sob controle de retroalimentação positiva pelos produtos de degradação da fibrina, os quais induzem os monócitos/macrófagos a produzirem interleucina-6 (IL-6). Esta é uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na fase de resposta aguda mediadora da transcrição do fibrinogênio através da ação sobre a cadeia B β .

O fator VII, um fator da coagulação dependente de vitamina K também é produzido no fígado. É formado por uma cadeia única, codificada por um gene localizado no cromossoma 13. Está sob controle de retroalimentação positiva na transcrição, por um peptídeo fragmento da protrombina ativada (F1+2), um marcador da ativação da coagulação.

A produção de fibrinogênio e fator VII também são influenciados por determinantes genéticos. Entre outros polimorfismos nos genes do fibrinogênio, encontra-se uma variação comum na seqüência de G/A na posição -445 na região promotora do gene do β -fibrinogênio. Portadores do alelo A representam em torno de 20% da população apresentando níveis de fibrinogênio 0,3-0,5 g/L mais elevados que os GG. O efeito deste genótipo indica um possível aumento no risco de trombose. A magnitude deste efeito é modulada por vários fatores ambientais, demonstrando haver uma interação do genótipo com sexo, idade, tabagismo e atividade física na determinação dos níveis plasmáticos de fibrinogênio⁴³. A associação do tabagismo com níveis de fibrinogênio é mais pronunciada nos portadores do alelo polimórfico (A⁻⁴⁵⁵) comparados com os homozigotos para o alelo comum (G⁻⁴⁵⁵)^{44, 45}. Isto talvez seja mediado por uma resposta exacerbada do alelo A à interleucina-6 produzida pelos macrófagos pulmonares estimulados pelo fumo. Estudos de pacientes com doença cardíaca isquêmica também evidenciaram associação deste polimorfismo com os níveis de fibrinogênio. A frequência dos alelos não diferem entre pacientes e controles^{46, 47}, porém, a frequência do alelo raro foi associado à maior gravidade da doença.⁴⁷

Na região codificadora do gene do alfa fibrinogênio, também, foi descrito um sítio polimórfico na posição 312 (ACT/GCT) levando à mudança do aminoácido treonina por alanina. Os efeitos desse polimorfismo na função ou estrutura do fibrinogênio são pouco conhecidos.⁴⁸ Observou-se em um grupo de mulheres em menopausa que a resposta dos níveis de fibrinogênio ao exercício físico foi menor nas homozigotas para o alelo raro (GG: alanina/alanina).⁴⁹

Aproximadamente 20% da população é heterozigota para um polimorfismo do gene do fator VII, havendo substituição do amino ácido 353 de arginina (Arg 353) por glutamina (Gln 353). Os portadores do alelo Gln 353 apresentam níveis de fator VII coagulante (VIIc) e antígeno em torno de 20-25% mais baixos que os homozigotos para

Arg₃₅₃. Além disso, os portadores do alelo polimórfico apresentam uma menor correlação entre níveis de Vllc e triglicerídios e uma produção pós-prandial mais baixa de fator Vllc ativado, o que poderia ser um fator protetor para doença aterotrombótica.^{50,51}

Recentemente, um estudo de caso-controle italiano mostrou uma menor razão de chance para infarto do miocárdio e níveis mais baixos de fator Vllc nos portadores do alelo Gln₃₅₃.⁵²

Fibrinólise

A fibrinólise constitui um dos mecanismos de defesa endógenos contra a formação de trombo. O sistema fibrinolítico quiescente é normalmente ativado pelo coágulo de fibrina. A fragmentação do fibrinogênio e fibrina é feita pela plasmina, uma protease específica gerada pela ação dos ativadores do plasminogênio sobre os precursores inativos do plasminogênio presentes no sangue e parede vascular. Os principais ativadores do plasminogênio no sistema vascular são o ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e a urokinase. A fibrinólise é regulada pelo balanço entre os ativadores do plasminogênio e o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), específico de ação rápida, produzido no endotélio, células musculares lisas, fígado e plaquetas. O PAI-1 é o principal regulador da fibrinólise. Um desequilíbrio entre os ativadores do plasminogênio e PAI-1 pode levar a consequências clínicas. Por exemplo, um excesso de ativadores do plasminogênio ou uma deficiência de PAI-1 pode se manifestar por hemorragia, enquanto uma deficiência de ativadores do plasminogênio ou um excesso de PAI-1 pode se manifestar por trombose.⁵³ PAI-1 e o sistema fibrinolítico são importantes no tanto no lúmen quanto na parede vascular. Excesso de PAI-1 têm sido encontrado nas placas ateroscleróticas humanas comparativamente a vasos sangüíneos saudáveis.⁵⁴ A plasmina age na parede arterial ativando as metaloproteinases da matriz que são importantes no remodelamento vascular seguindo a

lesão da parede do vaso.⁵⁵ Logo, o excesso de PAI-1 na placa aterosclerótica diminui a plasmina na parede do vaso, diminui a ativação das metaloproteinases e a capacidade de remodelamento. A plasmina também ativa a citocina, fator transformador do crescimento (TGF- β), o qual suprime a migração e proliferação das células musculares lisas. A angiotensina II atua sobre o sistema fibrinolítico aumentando a produção de PAI-1 e diminuindo a produção de t-PA, por degradar a bradicinina, um mediador da produção do t-PA pelas células endoteliais,⁵⁶.

A atividade do PAI-1 tem sido correlacionada com níveis de insulina plasmática, moléculas semelhantes à insulina e triglicerídios.

A atividade fibrinolítica está reduzida em várias situações clínicas, como a diabetes não-insulino dependente⁵⁷ e doença cardiovascular⁵⁸.

Em pacientes com angina instável e infarto agudo do miocárdio observou-se níveis mais elevados de antígenos relacionados à fibrina (D-dímero) e fibrinogênio (D-monômero), comparativamente a pacientes com angina estável, controles sadios e controles doentes, sugerindo haver formação ativa de coágulo e lise naquelas situações.⁵⁹ Observou-se aumento de níveis plasmáticos de PAI-1 em jovens que sofreram infarto do miocárdio, comparativamente a controles saudáveis de mesma idade⁵⁸, associando-se, também, com risco aumentado de infarto recorrente⁶⁰. Em um estudo prospectivo de 2 anos de seguimento, os níveis aumentados de antígenos de t-PA em pacientes com angina do peito foram preditivos de subsequente infarto ou morte súbita.⁶¹

Um sítio polimórfico no gene PAI-1, uma inserção (5G) / deleção (4G) de um par de base foi identificado a 675 pares de base antes do começo da transcrição do gene. Em uma amostra de pacientes jovens com infarto do miocárdio prévio foram demonstrados níveis mais elevados de PAI-1 nos portadores do alelo 4G do que nos portadores do alelo 5G. Este achado se reproduziu em outro estudo, em pacientes diabéticos não-insulino dependentes, no qual os principais determinantes da atividade do

PAI-1 foram a sensibilidade à insulina e a interação entre o genótipo 4G/5G e triglicerídios.⁶²

Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina com efeito pró-inflamatório múltiplo. Descreve-se síntese de IL-6 em vários tecidos, especialmente em monócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos. Experimentos em ratos sugerem que as células de Küpffer do fígado podem secretar IL-6. As células endoteliais e monócitos secretam IL-6 após tratamento com IL-1, o mesmo ocorrendo com as células endoteliais tratadas com fator de necrose tumoral.

Além de relacionar-se à aterogênese pelo estímulo à produção de fibrinogênio, há aumento nos níveis de IL-6 e IL-8 na parede arterial aterosclerótica (placas fibrosas) como depósitos celulares e extracelulares na matriz de tecido conjuntivo, bem como um aumento local na transcrição de seus genes. Isto sugere um aumento na produção local de IL-6 pelas células da parede arterial.^{63,64} Szekanecz estudou o papel das citocinas pró-inflamatórias na patogênese do aneurisma de aorta abdominal, observando aumento na produção de IL-6 e interferon-gama no sobrenadante de culturas de tecido de aneurisma de aorta abdominal comparativamente à aorta normal⁶⁵. A IL-6 pode ser uma das principais moléculas reguladoras de crescimento responsável pela proliferação das células musculares lisas.

A trombina estimula as células musculares lisas da parede arterial a produzirem IL-6, possivelmente mediada por receptores de trombina. Células musculares lisas e células endoteliais, mas não monócitos, contém mRNA codificador para receptores de trombina. A expressão destes receptores na superfície celular foi detectada através de um novo anticorpo monoclonal, sugerindo que as células musculares lisas podem ser

mais sensíveis que monócitos/macrófagos a ativação pela trombina no ateroma humano.⁶⁶

Um sítio polimórfico da IL-6 foi descrito por Bowcock⁶⁷, estando presente em uma população de caucasóides com uma frequência de 0,45 (330 cromossomas), porém sua localização não foi definida precisamente devido ao método de detecção empregado. Ainda não se descreveu associação deste polimorfismo da IL-6 em algum estado patológico.

Transplante e coagulação: papel da medicação imunossupressora

O uso de ciclosporina e prednisona tem sido relacionado com um aumento da coagulação e diminuição da fibrinólise^{68, 69}. Estudos de cultura de células mostraram que a ciclosporina aumenta a síntese de tromboplastina e fator VII⁷⁰. Estudos clínicos mostram concentrações aumentadas de fibrinogênio e fator VIIIc em transplantados renais tratados com ciclosporina, além de identificar aumento da adesividade plaquetária.^{71, 72}

A diminuição da atividade fibrinolítica tem sido atribuída a um aumento nos níveis de PAI-1 em receptores de transplante renal.^{73, 74, 68} Observou-se em pacientes transplantados cardíacos um estado protrombótico atribuído a um aumento dos níveis de fibrinogênio, relacionado, ao menos parcialmente, ao uso de ciclosporina e prednisona.⁷⁵

Alguns estudos *in vitro* demonstram aumento da expressão e secreção IL-6⁷⁶ com o uso de ciclosporina, mas outros mostraram diminuição da secreção desta interleucina e um aumento da expressão de seu receptor.⁷⁷

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os corticosteróides aumentam os níveis de PAI-1 e diminuem a t-PA a.^{78, 79}

QUADRO CONCEITUAL

As doenças decorrentes de aterosclerose e trombose são de alta prevalência e acometem, particularmente, os pacientes transplantados renais.

Além dos fatores de risco convencionais, fatores da coagulação e fibrinólise estão envolvidos na patogênese da aterosclerose. Estudos epidemiológicos prospectivos mostraram um risco maior de eventos cardiovasculares em pacientes com níveis mais altos de fibrinogênio e fator VIIc. Um aumento do principal regulador da fibrinólise - inibidor do ativador do plasminogênio - (PAI-1), parece conferir maior risco. A produção destes fatores é determinada geneticamente e por ação ambiental.

Alguns polimorfismos nos genes do fibrinogênio e PAI-1 mostraram uma relação com aumento da produção de suas proteínas. Por outro lado, um polimorfismo no gene do fator VII mostrou uma relação com níveis mais baixos de fator VIIc podendo conferir proteção para doença cardiovascular.

A interleucina-6, além de ser uma das principais citocinas da fase de resposta aguda envolvida no aumento da produção hepática de fibrinogênio, pode estar envolvida diretamente na formação da placa aterosclerótica. Um sítio polimórfico no seu gene foi descrito, porém sem localização precisa, e não foi descrita associação com alguma condição patológica.

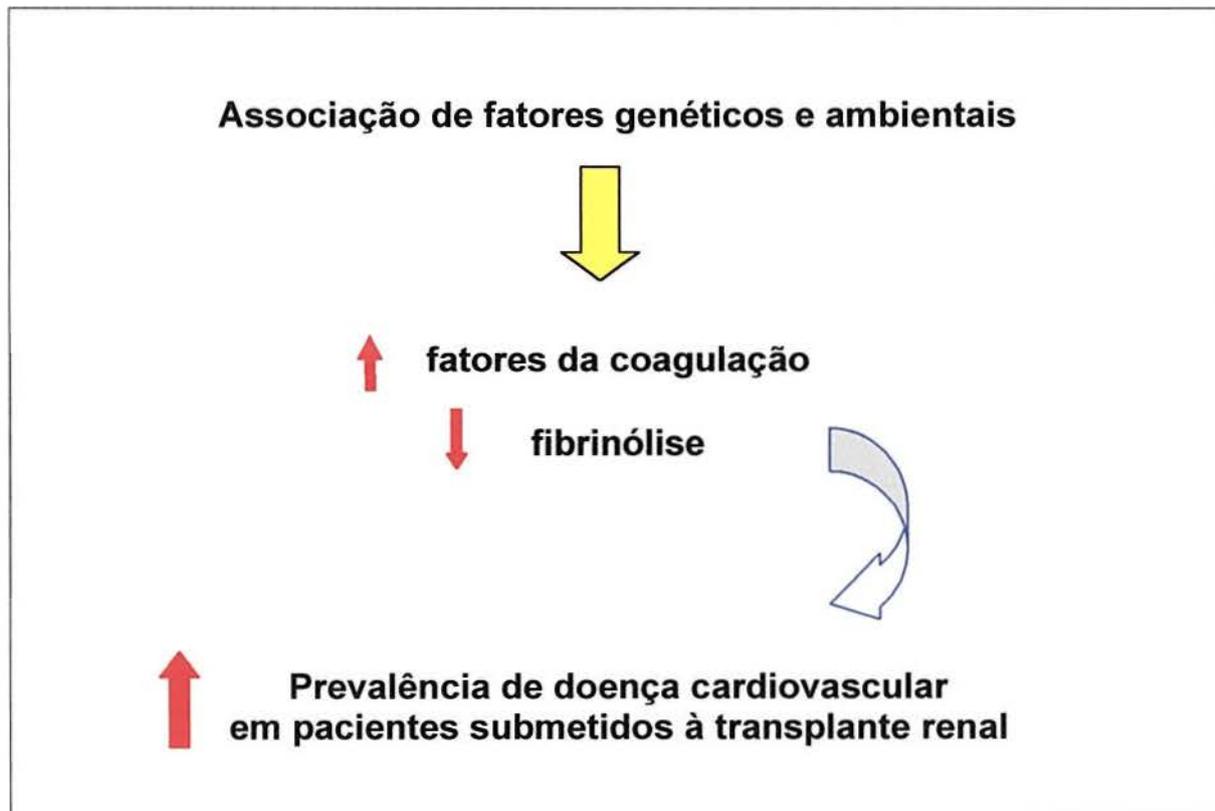
O transplante de órgãos sólidos é uma situação peculiar em que o uso de drogas imunossupressoras faz-se necessário. Além de outros efeitos adversos, como hipertensão, dislipidemia e intolerância a glicose, estas drogas foram relacionadas ao aumento de interleucina-6, fibrinogênio, fator VII e PAI-1.

Considerando a alta prevalência de doença cardiovascular em pacientes submetidos a transplante renal e a presença de diversas variáveis que atuam sobre os

fatores da coagulação, justifica-se investigar interação entre determinantes genéticos e ambientais dos fatores da coagulação e fibrinólise nesta população.

Quadro 5:

Quadro conceitual



Com base no exposto, estabelece-se a hipótese conceitual da presente tese.

HIPÓTESE CONCEITUAL

Os fatores envolvidos na coagulação dos pacientes transplantados renais estão alterados em relação aos indivíduos normais e podem contribuir para a maior prevalência de doença cardiovascular nestes pacientes. A interação de determinantes genéticos e ambientais de fatores da coagulação estão potencialmente associados a estas alterações.

OBJETIVOS

- a) Comparar os fatores envolvidos na coagulação dos pacientes transplantados renais com um grupo de indivíduos normais.
- b) Comparar os fatores envolvidos na coagulação entre os pacientes transplantados renais com e sem doença cardiovascular (DCV).
- c) Investigar a associação entre polimorfismos genéticos de fatores da coagulação e sua interação com fatores ambientais com a prevalência de doença cardiovascular em pacientes transplantados renais.
- d) Analisar as variáveis constituicionais e ambientais que estão potencialmente associados a produção dos fatores da coagulação.
- e) Mapear o sitio polimórfico da IL-6 e testar sua associação com os níveis séricos de IL-6 e com a presença de doença cardiovascular em uma população de transplantados renais.

MATERIAL e MÉTODOS

Delineamento do Estudo

Estudo transversal, prospectivamente planejado.

Hipótese operacional

Parte 1: Os fatores de risco convencionais de doença cardiovascular e fatores envolvidos na coagulação, medidos pelos seguintes parâmetros, são iguais em pacientes transplantados renais e indivíduos normais: tabagismo, história familiar de doença cardiovascular, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica, glicemia, colesterol total, triglicerídios, fibrinogênio, interleucina-6, atividade do fator VII coagulante, inibidor-1 do ativador do plasminogênio.

Parte 2: A frequência de polimorfismos de genes candidatos ao desenvolvimento da aterosclerose, fatores de coagulação e fatores de risco convencionais para doença cardiovascular, listados a seguir, são iguais em pacientes transplantados renais que apresentam ou não doença cardiovascular: genótipos do fator VII, beta fibrinogênio, PAI-1, IL- 6; - tabagismo, história familiar de doença cardiovascular, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica, esquema imunossupressor, glicemia, colesterol total, triglicerídios, fibrinogênio, IL- 6, PAI-1, fator VIIc.

Amostragem

A amostra foi recrutada entre, aproximadamente, 600 pacientes transplantados renais em acompanhamento no ambulatório de revisão anual do Centro de Transplante de Oxford, Churchill Hospital, Universidade de Oxford. Neste ambulatório os pacientes que completam um ano ou mais do acompanhamento após o transplante são avaliados de forma mais minuciosa por um médico experiente (Consultant). A amostragem foi feita de forma seqüencial de acordo com as consultas agendadas na rotina. Os critérios de inclusão foram: ter idade superior a 18 anos, etnia caucasiana, acompanhamento mínimo de um ano após o transplante, ausência de infecção aguda e consentimento verbal do paciente para participação no estudo. Todos os pacientes abordados no período de janeiro a novembro de 1995 aceitaram participar do estudo, constituindo um grupo de 270 pacientes.

Um grupo controle de 31 indivíduos normais, sem história de doenças e com exame físico normal, foram recrutados no Centro de Transplante entre os funcionários e seus cônjuges. Doze destes eram tabagistas.

Tamanho da amostra

Não foi feito um cálculo de tamanho da amostra formal, pois todos os pacientes que puderam ser avaliados no período disponível para o estudo foram recrutados. Correspondiam a aproximadamente 50% dos pacientes em acompanhamento no Serviço. Razões logísticas impediam que qualquer cálculo de tamanho amostral fosse satisfeito pela avaliação de todos os pacientes em seguimento ou pelo estudo de pacientes transplantados em outros serviços. Um estudo anterior realizado no Centro de transplante com 38 receptores de transplante renal e 31 indivíduos no grupo controle mostrou poder suficiente para detectar diferença nos parâmetros metabólicos e de coagulação entre transplantados com e sem doença cardiovascular e grupo controle.⁷¹

Quando pertinente (tendências), calculou-se o poder estatístico para as comparações testadas.

Parâmetros avaliados

Os seguintes parâmetros foram avaliados em todos os grupos: história familiar de doença cardiovascular, tabagismo, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica, níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, triglicerídios, fibrinogênio, IL-6, fator VIIc, PAI-I.

No grupo de pacientes transplantados, além dos parâmetros acima, foram avaliados: a presença de doença cardiovascular pré e após o transplante, esquema imunossupressor empregado, a frequência de polimorfismos genéticos de 4 genes candidatos a estarem envolvidos na patogênese da aterosclerose (fator VII, beta fibrinogênio, PAI-1e IL- 6), dosagem de albumina, plaquetas, hemoglobina, apolipoproteína a, dimero-D. Identificaram-se, adicionalmente, as mulheres em menopausa.

Doença cardiovascular foi definida pela presença documentada no prontuário de pelo menos uma das seguintes condições: infarto do miocárdio, angina, cirurgia de revascularização miocárdica ou angioplastia, acidente vascular cerebral ou doença vascular periférica, utilizando-se os critérios usuais para tais diagnósticos.

Coleta do material

Pacientes e controles foram submetidos à punção venosa pela manhã, após jejum de 12 horas, com sistema de "Vacutainer" e agulha calibre 21. Para distender a veia foi usado torniquete e imediatamente liberado após a punção da veia para coleta das amostras. Amostras para lipídios e parâmetros metabólicos foram coletados em tubos com heparina e EDTA. Amostras para medidas de hemostasia foram coletados em tubos

com citrato 3,8% (volume 1:9) e centrifugados a 3000g por 15 minutos em temperatura ambiente sendo as alíquotas congeladas em tubos plásticos a -70°C. As amostras foram analisadas dentro de 12 meses após a coleta.

A pressão arterial foi verificada com o paciente sentado, considerando a média das 3 verificações mais recentes registrada no ambulatório de transplante. Para os controles saudáveis foi considerada a média de 3 verificações, em com 15 minutos de intervalo, usando um esfigmomanômetro automático (Nippon Colin Company Ltda, Japão, BP103N MarkIII).

Métodos bioquímicos

Os lipídios foram medidos em plasma EDTA por técnicas enzimáticas colorimétrica usando um "kit" Boehringer Mannheim UK (Diagnostics and Biochemicals) Ltda, Bell Lane, Lewes, East Sussex, BN7 1LG)⁸⁰.

Glicemia de jejum foi medida no plasma pelo método hexoquinase (Gluco-quant glucose, Boehringer Mannheim, Lewes, E. Sussex, UK) em uma centrífuga analisadora (Cobas BIO; Roche Diagnostica, Welwyn Garden City, Herts, UK).

Creatinina e albumina também foram medidas por métodos padrões e a concentração de proteína urinária foi medida em amostras de 24 horas de coleta.

Fibrinogênio foi medido pelo método de Clauss. Fator VIIc foi medido usando tromboplastina de cérebro de coelho através de método de bio-ensaio de um estágio, sendo os resultados expressos como percentagem em um pool de plasma normal ⁸¹. Atividade de PAI-1 foi medida por um kit comercial (Kabi Vitrum, Uxbridge, Middlesex, U.K.).

Kits comerciais de ELISA foram utilizados para medir IL-6 (Human IL-6 Quantikine [™] HS, R&D System, Minneapolis MN, USA) e Dímero-D (Dimertest, AGEN Biomedical, Qld, Australia).

Ciclosporinemia foi medida em sangue total, 12 -15 horas após dose diária única por ELISA (EMIT cyclosporin assay, Syva, California, USA) em um analisador COBAS MIRA .

As análises bioquímicas foram realizadas no Diabetes Research Laboratories, Nuffield Department of Clinical Medicine, Radcliffe Infirmary, University of Oxford.

Técnicas de biologia molecular

DNA genômico foi extraído de sangue total através de método padrão ⁸². Iniciadores (“primers”) de oligonucleotídeos específicos para determinadas regiões dos genes do alfa e beta fibrinogênio, fator VII, PAI-I foram usados pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) com Taq polimerase como descritos previamente.^{48,83,50,84}

A sequência do “primer” antisenso (“right hand”) e as condições dos ciclos da PCR do alfa fibrinogênio foram modificadas em relação as publicadas previamente.⁴⁸ Os “primers” utilizados foram (5' para 3') GGA AGG CAT TAA CAG ACA TG e GGT ACT ACC AGG TCT AGG GC. As reações foram realizadas a 95°C (5 minutos) uma vez-denaturação-, seguida por 30 ciclos a 95°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min). O produto do PCR do alfa fibrinogênio foi digerido com a enzima Rsa I seguida de eletroforese em gel da acrilamida a 12% e visualizado sob luz ultravioleta. Da digestão com Rsa I obtém-se fragmentos constantes de 39 e 169 pares de bases e fragmentos variáveis de 117 pares de bases ou 78 e 39 pares de bases. Os homozigotos para o aminoácido treonina (ACT- local em que a enzima cliva o gene) apresentam as bandas que representam os fragmentos de 78 e 39 pares de bases e os homozigotos para o aminoácido alanina (GCT – não há clivagem do gene) apresentam a banda de 117 pares de bases. Os heterozigotos apresentam as 3 bandas (117,78 e 39).

O produto do PCR do beta fibrinogênio foi digerido com a enzima de restrição HaeIII seguida de eletroforese em gel de agarose a 1% em solução de 40 mM Tris-

acetato, 1 mM EDTA, pH 7,7 contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Da digestão com a enzima HaeIII obtém-se um fragmento constante de 343 pares de base (pb), junto com fragmentos de 383pb e 575pb para o alelo comum G-455 e um fragmento único de 958 pb para o alelo A-455. O gene do fibrinogênio e seus polimorfismos, incluindo o A/G -455, a região polimerizada e as bandas vistas sob luz violeta, as quais permitem a genotipagem, estão representadas na figura 4.

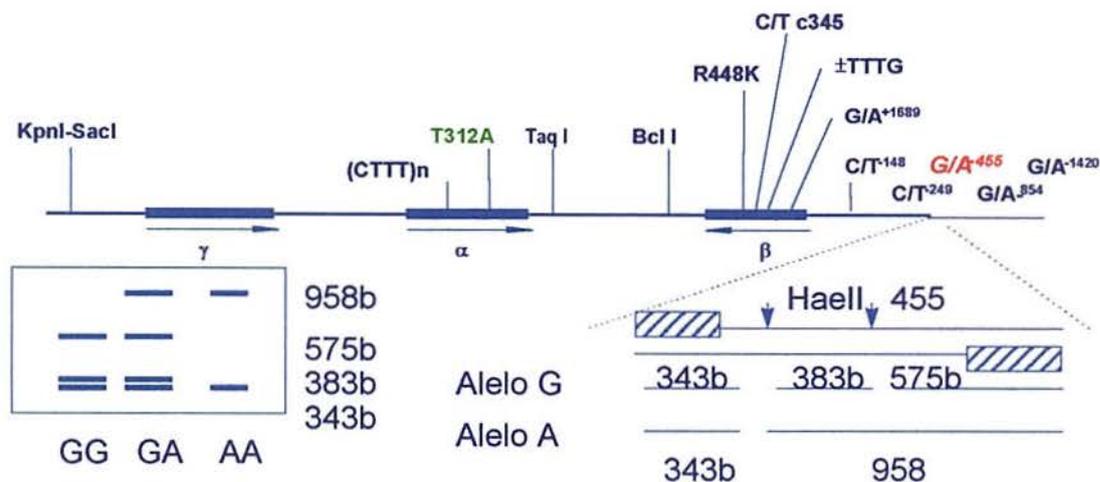


Figura 4

Localizações de polimorfismos dos genes do fibrinogênio e os sítios passíveis de quebra pela diferentes enzimas de restrição (HaeIII, Kpn, SacI, RsaI=T312A). Polimorfismo A/G-455 e a representação das bandas no gel vistas sob luz ultravioleta para genotipagem do polimorfismo na região promotora do gene.

α, β, γ= genes que codificam as 3 cadeias da molécula de fibrinogênio
 bp= número de pares de bases nitrogenadas
 G= guanina A= arginina T= timina C= citosina
 Genotipagem: GG= homocigoto para alelo G
 AA= homocigoto para alelo A
 AG = heterocigoto, alelos A e G

Os iniciadores ("primers") de oligonucleotídeos e as condições de PCR para polimerização do fragmento de DNA para o genótipo do fator VII foram realizadas conforme técnica descrita anteriormente⁵⁰. O produto do PCR foi digerido com a enzima MspI e a separação feita através de eletroforese em gel de agarose a 2% observando-se um fragmento constante de 40pb, junto com fragmentos de 205pb e 67pb para o alelo comum Arg353 e um único fragmento de 272pb para o alelo Gln353. O polimorfismo do gene fator VII e as bandas vistas no gel sob luz ultravioleta que permitem a genotipagem, estão representadas na figura 5.

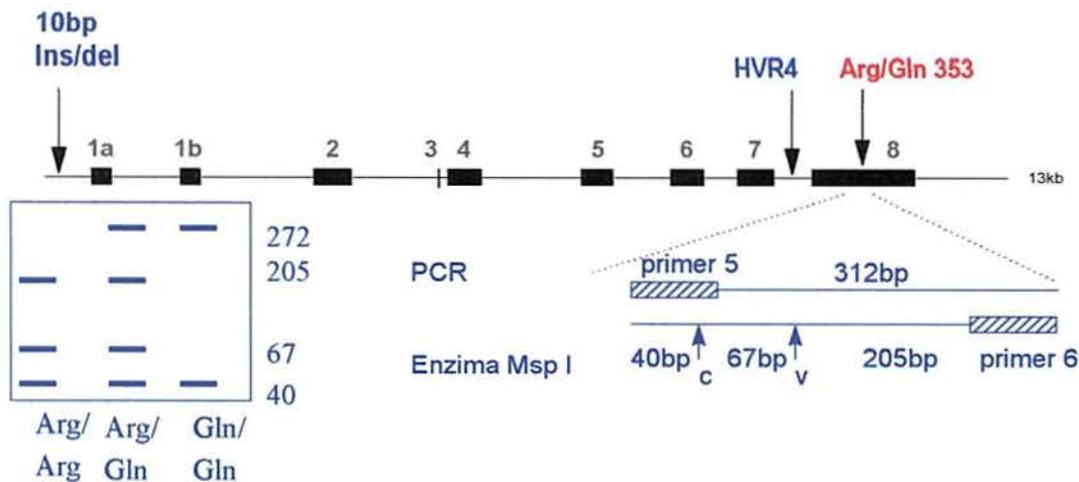


Figura 5

Polimorfismos do gene do fator VII, destacando o polimorfismo do exon 8 que codifica o aminoácido na posição 353 como arginina ou glicina. No quadrado a representação das bandas vistas no gel sob luz ultravioleta para a genotipagem (Arg/Arg= homozigoto para o aminoácido arginina; Gln/Gln= homozigoto para o aminoácido glicina, Arg/Gln= heterozigoto).

As partes numeradas da representação do gene identificam os exons.

Arg= aminoácido arginina Gln= aminoácido glicina

bp= número de pares de bases nitrogenada

c= sítio constante de digestão do gene pela ação da enzima de restrição Msp;

v= sítio variável de digestão do gene pela ação da enzima de restrição Msp

Uma região de 890 pares de bases da região promotora do gene do PAI-1 foi amplificada pela técnica de PCR e o genótipo do PAI-1 foi determinado através do uso da técnica de oligonucleotídeo alelo específico fundido (ASO "melting") como descrito previamente⁸⁴ (figura 6). Controles para o ASO "melting" foram feitos com amostras de genótipo previamente conhecido determinados por análise direta de sequência de DNA.

Conferiu-se a normalidade de distribuição dos parâmetros pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando cabível, compararam-se as variáveis contínuas pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Empregou-se o teste de Mann-Whitney para análise de variáveis que não assumiram distribuição normal. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para a comparação de variáveis categóricas entre os grupos de pacientes transplantados e indivíduos normais. Os mesmos testes foram aplicados para comparar os grupos de pacientes transplantados com e sem o desfecho em estudo (doença cardiovascular). O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar correlação entre as variáveis metabólicas e fatores da coagulação.

Para avaliar a associação dos genótipos com a produção de suas respectivas proteínas foi utilizada análise de variância (ANOVA). As variáveis contínuas sem distribuição normal sofreram transformação logarítmica, antes de serem testadas por ANOVA. Para fins de entendimento, mantiveram-se os valores originais das variáveis na apresentação dos resultados. Empregou-se o teste de contraste de Sheffé para discernir entre médias quando da significância da ANOVA.

Análise de covariância foi empregada para controlar variáveis constitucionais (genéticas) e ambientais, sendo escolhidas segundo pressupostos teóricos ou por sua distribuição na análise bivariada.

Calculou-se o poder da amostra para os testes covariância nos casos de tendência de associação.

A associação simultânea entre diferentes características (variáveis explanatórias) com o diagnóstico de doença cardiovascular (variável dependente) foi analisada, exclusivamente entre os transplantados, com modelos de regressão logística. As variáveis incluídas, limitadas pelo número de casos, foram as apontadas pelo referencial teórico e pela natureza da associação bivariada. Primeiramente construíram-se modelos

2μM, 1,6μl MgCl₂ a 50mM concentração final de 2mM Mg⁺⁺), 0,2μl (200ng) “primer” senso (“left hand”), 0,2μl (200 ng) “primer” antisenso (“right hand”), 0,2 μl (1Unidade) Taq polimerase (Bioline), ~100ng de DNA genômico. As reações foram realizadas na máquina de PCR MJ PTC200 Thermal Cycler: 95°C – 5 minutos – 1 vez (denaturação), após 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Após checagem do produto da PCR por eletroforese em gel de agarose a 2% (banda de 306 pares de base) foi realizada a digestão do produto com a enzima de restrição Msp I (cliva o gene na base mutante). O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de acrilamida a 7,5% obtendo-se de 1 a 3 fragmentos do gene, de diferentes tamanhos, que permitiram a genotipagem: 1 fragmento= 306 pares de bases (pb) -homozigoto não mutante (AA); 2 fragmentos = 224 pb + 82 pb,) homozigoto mutante(GG). 3 fragmentos= 306 pb + 224 pb + 82 pb. heterozigoto (AG).

Todos os genótipos foram avaliados por, no mínimo 2 pessoas, independentemente.

Os estudos genéticos foram realizados no Genetic Laboratory for Cardiovascular Disease, Nuffield Department of Surgery, John Radcliffe Hospital, Oxford University.

Aspectos éticos

Seguem as recomendações da Declaração de Helsinki para pesquisa biomédica envolvendo seres humanos.⁸⁵ Foi solicitado somente o consentimento verbal e garantido o sigilo, tendo em vista, especialmente o estudo genético, além da entrevista, exame clínico e coleta de fluidos orgânicos. O projeto foi aprovado pela comissão de ética do The John Radcliffe Hospital - Churchill Hospital.

Análise estatística

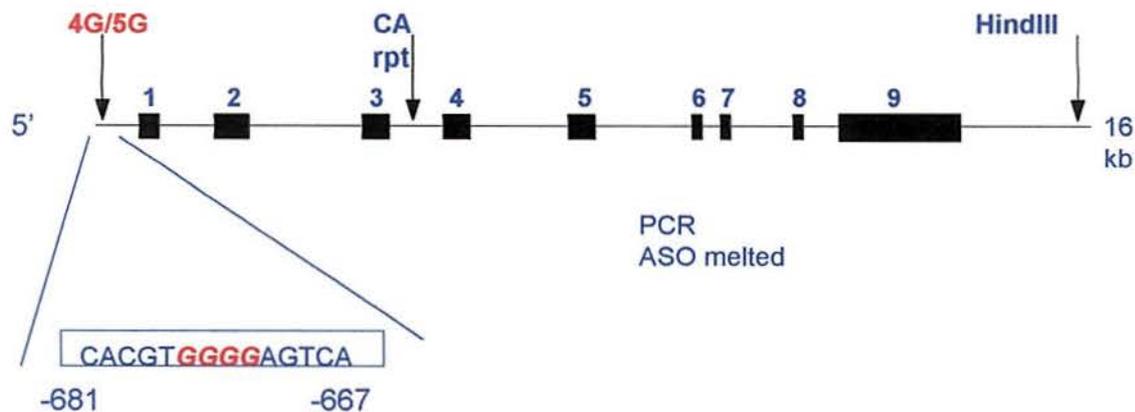


Figura 6

Representação esquemática do gene do PAI-1. As partes identificadas com números indicam os exons e as setas indicam os sítios passíveis de digestão com enzimas de restrição (CA rpt, HindIII). Em destaque o polimorfismo da região promotora do gene do PAI-1.

4G= deleção do par de base guanina (G)

5G= inserção do par de base guanina (G)

PCR= reação da polimerase em cadeia

ASO "melted" = técnica utilizada com oligonucleotídeo específico para um alelo, para determinação do genótipo.

Em relação a IL-6, primeiramente foi mapeado o sítio polimórfico através da obtenção de iniciadores ("primers") que permitiram a amplificação do fragmento do gene incluindo o intron-4 e do exon 5 através da técnica de PCR. Como era de conhecimento prévio que este sítio polimórfico era passível de digestão pela enzima Msp (cliva o gene onde houver a sequência **C CGG**) a qual foi utilizada. Comparando com a sequência publicada de pares de bases nitrogenadas do gene que codifica para IL-6 e comprovando através da análise de sequência direta de pares de base do DNA genômico, foi possível determinar o sítio polimórfico no intron-4 do gene da IL-6, onde havia a substituição da base nitrogenada arginina (A) por guanina (G). A genotipagem dos pacientes foi então realizada pela técnica PCR para amplificação do segmento do gene (intron 4). Os "primers" utilizados foram: sentido CAT ATG TTA ACA TGC TAG GG e antisenso TTC TTC ATG GCC TCT AAA TC. As condições ideais da PCR para um volume de 40µl foram: 4µl de tampão (100mM Tris PH 8,3, 500mM KCL, 0,1% gelatina), 4µl dNTPs a

com entradas forçadas. Entraram no modelo final (método "stepwise") as variáveis com nível de significância menor que 0,20 na primeira equação.⁸⁶

A significância dos testes de hipótese (valor de P) é apresentada para cada teste. Para fins de interpretação, assumiu-se $P < 0,05$ como significativo. Não se controlou para múltiplas comparações, pois as hipóteses principais foram limitadas e estabelecidas segundo o referencial teórico.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, versão 7,0.

A autora foi diretamente responsável por auxiliar na seleção da amostra, pela genotipagem dos polimorfismos do fibrinogênio, pelo mapeamento do polimorfismo e genotipagem da IL-6 e pela análise dos dados.

RESULTADOS

Duzentos e setenta pacientes transplantados renais participaram do estudo. O diagnóstico da doença básica destes pacientes foram : glomerulonefrite crônica (n= 98), nefropatia do refluxo (n=50), rins policísticos (n=45), nefroesclerose hipertensiva (n=15), nefropatia diabética (n=10), doença desconhecida (n=29), outras doenças (n=23).

Os tipos de terapêutica de substituição da função renal a que estes pacientes se submeteram, antes de realizarem transplante renal, foram: hemodiálise (n=148), diálise peritoneal ambulatorial contínua (n= 81), tratamento conservador (n=41).

Duzentos e dezoito pacientes (80,8%) foram submetidos a um transplante renal, 38 (14,1%) a dois transplantes, 13 (4,8%) a três transplantes e somente 1 (0,4%) realizou quatro transplantes.

Ciclosporina estava sendo utilizada em 199 (73,3%) pacientes, azatioprina em 247 (91,5%), prednisolona em 159 (58,9%) e a associação de ciclosporina e prednisolona em 100 (37%) pacientes. Cento e setenta e um receptores (72,5%) apresentaram pelo menos um episódio de rejeição aguda durante a evolução do transplante.

Duzentos e dois pacientes (74,8%) estavam usando algum tipo de medicação anti-hipertensiva, destes, 123 (60,9%) incluíam beta bloqueador no esquema e 87 incluíam (43,1%) diurético. Os demais utilizavam anti-hipertensivos de outras classes.

Quarenta e seis pacientes (17%) faziam uso de aspirina profilática e quinze (5,6%) usavam medicação hipolipemiante.

Quarenta e três (15,9%) pacientes eram tabagistas e 22 (8,1%) tiveram diagnóstico de doença cardiovascular antes de serem submetidos ao transplante.

Pacientes transplantados comparados ao grupo de indivíduos normais

O grupo de 270 pacientes transplantados renais foi similar ao grupo de 31 indivíduos saudáveis em relação a idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), porém os transplantados apresentaram pressão arterial sistólica e diastólica mais elevada e no grupo controle havia maior número de tabagistas. As características dos dois grupos estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1

Dados demográficos do grupo de pacientes transplantados e grupo controle (variáveis contínuas - média \pm DP ou mediana (variação), variáveis categóricas- frequência (percentagem).

Variável	Transplantados N= 270	Controle N=31	P
Idade (anos)	49 \pm 13	46 \pm 12	0,223
Sexo masculino	65 (61,1)	16 (51,6)	0,336
Índice de massa corporal	25,5 \pm 4,3	25,3 \pm 3,1	0,849
Pressão arterial sistólica (mmHg)	145,9 \pm 18,3	133,0 \pm 15,0	<0,001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	83,9 \pm 8,2	71,3 \pm 11,1	0,001
História familiar positiva de doença cardiovascular	78/263 (29,7%)	11 (35,5%)	0,537
Tabagismo	43 (15,9%)	12 (38,7%)	0,005

Os pacientes transplantados apresentaram níveis de colesterol total, triglicerídios, fibrinogênio, interleucina 6, fator VII coagulante e dímero D significativamente mais elevados do que os indivíduos saudáveis (tabela 2).

Tabela 2

Dados metabólicos e hemostáticos no grupo de transplantados e grupo controle (variáveis contínuas - média \pm DP ou mediana (variação).

Variável	Transplantados n=270	Controle n=31	P
Colesterol Total (mmol/l)	5,9 (2,9-10,2)	4,9 (3,6-7,0)	<0,001
Triglicerídios (mmol/l)	1,5 (0,4-12,3)*	0,9 (0,4-2,8)	<0,001
Fibrinogênio (mg/dl)	370 (211-1050)*	264 (160-396)	<0,001
Interleucina-6 (pg/dl)	2,1 (0,19-25)*	1,5 (0,08-6,5)	0,020
Fator VIIc (% padrão)	105 \pm 36	86 \pm 22	<0,001
Dímero-D (mg/dl)	0,26 \pm 0,37	0,08 \pm 0,03	<0,001

*mediana (mínimo -máximo)- Teste de Mann- Whitney

Estudo do grupo de pacientes transplantados renais com e sem doença cardiovascular

No grupo de pacientes transplantados a prevalência de doença cardiovascular foi de 23,3%. Dos 63 pacientes com doença cardiovascular após o transplante, 22 (34,9%) já apresentavam doença previamente ao transplante. Um total de 45 tinham o diagnóstico de cardiopatia isquêmica (infarto do miocárdio em 22 e angina de peito em 23), doença vascular periférica em 7, acidente vascular cerebral em 5 e mais de um diagnóstico em 6.

Os pacientes transplantados portadores de doença cardiovascular eram mais idosos. História familiar positiva para doença cardiovascular e tabagismo foram significativamente mais freqüentes nos pacientes transplantados renais com doença cardiovascular que nos transplantados sem doença cardiovascular. Não houve diferença entre os grupos em relação ao sexo, índice de massa corporal e pressão arterial. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3

Dados demográficos dos pacientes transplantados com doença cardiovascular (DCV +) e sem doença cardiovascular (DCV -) (variáveis contínuas - média \pm DP ou mediana (variação), variáveis categóricas- frequência (percentagem)).

Variável	DCV + N=63	DCV - n= 207	P
Idade (anos)	56,6 \pm 9,9*	46,4 \pm 12,7	<0,001
Sexo masculino	42 (66,6)	123 (59,4)	0,181
Índice de massa corporal	25,5 \pm 3,5	25,5 \pm 4,5	0,918
Pressão arterial sistólica (mmHg)	148,9 \pm 16,1	145,1 \pm 18,8	0,164
Pressão arterial diastólica (mmHg)	83,7 \pm 7,7	84,1 \pm 8,4	0,780
Tabagismo	15 (24,6%)	28 (13,4%)	0,001
História familiar positiva de doença cardiovascular	28 (48,3%)	50 (24,4%)	0,002
Tempo pós-transplante (meses)**	84 (12-240)	72 (12-372)	0,166

** mediana - Teste de Mann-Whitney

As medicações imunossupressoras empregadas foram similares nos dois grupos de pacientes transplantados, bem como os níveis sanguíneos de ciclosporina na ocasião do estudo. Os dados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4

Medicações imunossupressoras empregadas nos pacientes transplantados DCV (+) e DCV(-) (frequência e percentagem) e níveis sanguíneos de Ciclosporina (mediana e variação).

Imunossupressão	DCV + n=63	DCV - N=207	P
Prednisona	41 (65,1%)	118 (57,0%)	0,306
Ciclosporina	48 (76,2%)	151 (72,9%)	0,744
Prednisona + ciclosporina	28 (44,4%)	72 (34,8%)	0,181
Azatioprina	54 (85,7%)	193 (93,2%)	0,189
Ciclosporinemia (ng/ml)	193 (78-843)	176 (70-642)	0,166

Em relação aos dados metabólicos, coagulação e hemostasia os pacientes com doença cardiovascular apresentaram níveis significativamente mais elevados de fibrinogênio, interleucina-6 e glicose e mais baixos de albumina. Os níveis de colesterol e triglicéridios foram semelhantes entre os transplantados com e sem doença cardiovascular. A depuração da creatinina endógena foi significativamente menor nos pacientes com doença cardiovascular (tabelas 5 e 6).

Tabela 5

Dados metabólicos dos pacientes transplantados com (DCV+) e sem (DCV-) doença cardiovascular (variáveis contínuas, média \pm DP ou mediana (variação))

Variável	DCV + n=63	DCV - n=207	P
Creatinina ($\mu\text{mol/l}$)	145,0 \pm 50,0	142,3 \pm 55,9	0,743
Depuração de creatinina endógena (ml/min)**	59 (20-137)	70 (14-193)	0,009
Proteinúria (mg/24 horas)**	194,5 (20-1240)	194,5 (10-16671)	0,977
Albumina (g/l)	40,5 \pm 3,3	42,5 \pm 3,6	<0,001
Glicemia (mmol/l)	6,6 \pm 2,7	5,9 \pm 1,2	0,007
Colesterol total (mmol/l)**	6,0 (4,0-11)	5,9 (2,9-10,2)	0,454
Triglicéridios (mmol/l)**	1,8 (0,7-7,5)	1,5 (0,4-12-3)	0,023
Lipoproteína (a) (mg/dl)	167,0 \pm 119,6	132,1 \pm 165,5	0,562

**mediana (limite inferior e superior), teste Mann-Whitney

Tabela 6

Fatores da coagulação e hemostasia nos pacientes transplantados com (DCV+) e sem (DCV-) doença cardiovascular (variáveis contínuas, média \pm DP ou mediana (variação) .

Variável	Tx DCV + n=63	Tx DCV - n=207	P
Fibrinogênio (mg/dl) *	415 (230-1050)	360 (211-650)	<0,001
IL-6 (pg/ml) *	2,4(0,26-25)	2,0 (0,19-23,9)	0,017
FVIIc (% padrão)*	97 (29,8-214)	96 (40,7-226)	0,131
PAI-1 (AU/ml)*	9,9 (2,0-34,6)	9,0 (0,8-50)	0,248
Dímero D (mg/dl)	0,38 \pm 0,6	0,16 \pm 0,13	0,064
Leucócitos (cél x 10 ³)	6,9 \pm 2,2	6,4 \pm 2,1	0,110
Plaquetas (cél x 10 ³)	220,8 \pm 67,8	215,4 \pm 58,0	0,534
Hemoglobina (g/dl)	13,2 \pm 2,1	12,7 \pm 1,8	0,050

*mediana (limite inferior e superior), teste Mann-Whitney

FVIIc = Fator VII coagulante IL-6 = Interleucina-6

PAI-1= inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

Avaliação de variáveis ambientais e constitucionais potencialmente associadas com os níveis séricos dos fatores da coagulação

Os pacientes transplantados de ambos os sexos apresentaram níveis similares de fibrinogênio [f =363 mg/dl (213-650); m =374mg/dl (211-1050) P=0,238] e fator VII [f=97% DP(42-226); m=96% DP(29-189)]. As mulheres em menopausa apresentaram níveis mais altos de fibrinogênio, IL-6, fator VIIc e PAI-1, porém, quando corrigido para a idade, a diferença não foi mantida.

O uso isolado de prednisolona e ciclosporina não foi associado com níveis de fibrinogênio, fator VII, IL-6 and PAI-. Os pacientes em uso de prednisolona apresentaram níveis mais elevados, colesterol total e triglicerídios. Os níveis de glicose foram mais elevados nos pacientes que usavam ciclosporina. Os níveis de interleucina-6, glicose e triglicerídios foram mais elevados nos que usavam concomitantemente ciclosporina e prednisolona (tabela 7).

Tabela 7

Dosagem de fatores metabólicos, coagulação e fibrinólise de acordo com as medicações imunossupressoras usadas [mediana (variação)].

Variável	Pred Sim Não P	CsA Sim Não P	Pred + CsA Sim Não P
Fib (mg/dl)	373 (213-650) 362(211-1050) 0,468	362 (232-650) 372 (211-1050) 0,976	359,0 (211-1050) 372,5 (213-650) 0,287
FVIIc (% padrão)	97 (30-226) 96 (42-214) 0,669	96 (30-226) 94 (43-187) 0,227	98 (30-226) 95 (42-214) 0,456
IL-6 (pg/ml)	2,2 (0,19 - 25) 1,9(0,26 -18,5) 0,135	2,2 (0,2-25) 1,7 (0,2-15) 0,071	2,6 (0,2 - 25) 1,8 (0,2-18,5) 0,005
PAI-1 (AU/ml)	10,1(0,8-48,7) 8,4 (2-50) 0,116	9,1 (0,8-50) 9,0 (2,6-40,1) 0,749	10,2 (0,8-48,7) 8,7(2,0-50) 0,431
Glic (mmol/l)	5,8 (4,4-10) 5,7 (4,6-23,6) 0,885	6,0 (4,6-14,5) 5,7 (4,4-23,6) 0,016	5,8(4,4-14,5) 5,6 (4,6-23,6) 0,040
Col T (mmol/l)	6,0 (2,9-11) 5,8 (4,0-8,6) 0,019	5,9 (2,9-11) 5,9 (4,0-10,2) 0,921	6,1 (2,9-11) 5,8 (4-12) 0,116
Trig(mmol/l)	1,6 (0,6- 12,3) 1,4 (0,5-6,0) 0,022	1,6 (0,6 - 8,0) 1,3 (0,5-12,3) 0,133	1,7 (0,6-7,5) 1,4 (0,5-12,3) 0,006

Pred = Prednisona CsA = ciclosporina Fib = Fibrinogênio FVII = Fator VII
IL-6 = Interleucina-6 Gli = glicose Col T = colesterol total Trig = triglicerídios

Dos fatores da coagulação houve correlação positiva entre os níveis de fibrinogênio e IL-6 ($r=0,378$ $P=0,008$) e entre fator VII e PAI-1 ($r=0,286$ $P<0,001$). Entre os fatores da coagulação e variáveis metabólicas houve correlação positiva do fator VII com glicose ($r=0,173$ $P=0,008$), colesterol total ($r=0,358$ $P<0,001$) e triglicerídios ($r=0,288$ $P<0,001$) e de PAI-1 com glicose ($r=0,286$ $P<0,001$) e triglicerídios ($r=0,256$ $P<0,001$).

A ciclosporinemia se correlacionou positivamente com os níveis de fibrinogênio ($r=0,249$; $P<0,001$), IL-6 ($r=0,184$; $P=0,014$) e PAI-1 ($r=0,159$; $P=0,033$).

Estudo genético

Mapeamento do sítio polimórfico da IL-6

Foi possível mapear o polimorfismo da IL-6 no intron-4 do gene da IL-6. O fragmento de 306 pares de base foi polimerizado, sendo passível de fragmentação pela enzima de restrição Msp I no sítio polimórfico, onde há substituição da base nitrogenada adenina por guanina. A presença de diferentes bandas foram visualizadas no gel sob luz ultravioleta: homozigotos sem polimorfismo apresentavam fragmentos de 306 pares de bases; heterozigotos apresentavam fragmentos de 306 pb mais fragmentos de 224 pb e 82 pares de bases e os homozigotos para o alelo polimórfico apresentavam fragmentos de 224 pb e 82 pares de bases. O gene da IL-6, o sítio polimórfico e os fragmentos obtidos estão representados na figura 7

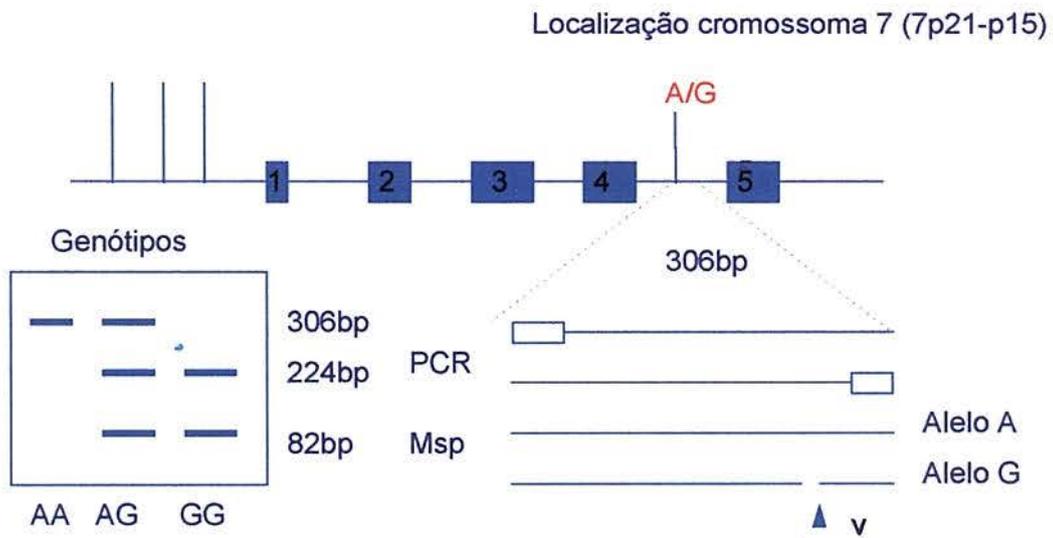


Figura 7
Polimorfismos no intron 4 no gene da IL-6.

A: adenina G: guanina
 PCR= reação da polimerase em cadeia
 Msp: enzima de restrição derivada do *Acinetobacter calcoaceticus*
 bp: pares de base

A presença deste sítio polimórfico foi confirmado pela técnica de sequenciamento direto de bases (Thermo sequenase cycle sequencing kit- Amersham Life Science) de um fragmento maior do gene que incluía o intron-4. Foi utilizado o iniciador ("primer") no sentido 3' → 5' , anti-senso, para o sequenciamento. A sequência comum publicada é TGGTCTAG e a com mudança de base é TGGCCTAG. Na figura 8 está apresentado um exemplo de sequenciamento que inclui a sequência de bases comum e outro a sequência alterada.

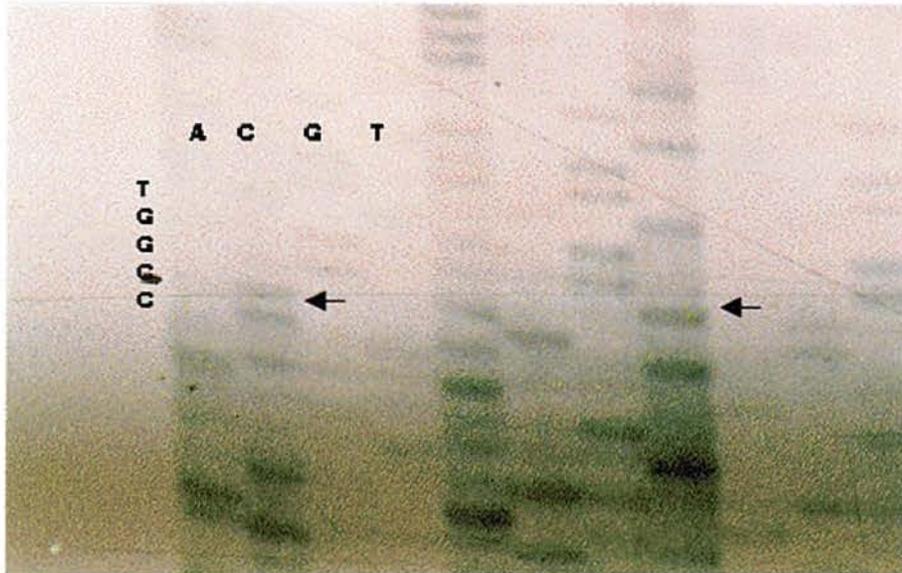


Figura 8
 Seqüenciamento direto incluindo parte do Intron 4 da IL-6 que apresenta o sítio polimórfico. Nesta técnica de seqüenciamento se utiliza "primer" no sentido antisenso (3' → 5') mostrando a seqüência de bases complementares. (reprodução parcial da radiografia do seqüenciamento)

Genotipagem do alfa e beta-fibrinogênio , fator VII, Pai-1 e IL-6 na amostra de pacientes transplantados renais

No estudo genético dos pacientes transplantados como um todo a distribuição dos genótipo e freqüência dos alelos para os diversos genes estão apresentados na tabela 8. Foram considerados como alelo 1 os alelos mais freqüentes, por questão organizacional. A freqüência de alelos encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weiberg (HW), demonstrado pelo teste de Qui-quadrado onde a freqüência observada foi similar a esperada.

Tabela 8
Genótipos observados e a frequência dos alelos.

Gene	RFLP	Genótipo			Alelo		X ²	P (1 gl)
		11	12	22	1	2		
βfib	HaeIII	192	70	8	0,84	0,16	0,27	>0,20
αFib	RsAI	139	109	18	0,73	0,27	0,29	>0,20
FVII	MspI	215	52	3	0,89	0,11	0,19	>0,20
PAI-1	--	80	125	65	0,53	0,47	1,36	>0,20
IL-6	MspI	91	141	35	0,60	0,40	2,93	>0,05

--Genótipo do PAI-1 foi determinado através de oligonucleotídeos alelo específico
RFLP= polimorfismo por restrição de tamanho de fragmento usando enzimas

χ²= teste estatístico qui-quadrado

1 gl = 1 grau de liberdade

Fib= fibrinogênio

FVII= fator VII

IL-6= interleucina-6

PAI-1= inibidor 1 do ativador do fibrinogênio

No estudo dos polimorfismos genéticos dos genes do fibrinogênio, fator VII, PAI-1 e IL-6 observou-se uma frequência similar dos alelos mutantes nos receptores de transplante renal com e sem doença cardiovascular. As frequências destes alelos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9
Frequência dos alelos raros dos diferentes genes nos pacientes transplantados com (DCV +) e sem doença cardiovascular (DCV -).

Gene/ alelo	Tx DCV (+)	Tx DCV (-)	P
B-fib / A-455	0,12	0,16	0,116
alfa-fib/312 ^A	0,25	0,27	0,757
FVII/ Arg-355	0,15	0,08	0,762
PAI-1/ 4G	0,48	0,47	0,938
IL-6/ G intron 4	0,36	0,40	0,660

Genotipagem do alfa e beta-fibrinogênio, fator VII, Pai-1 e IL-6 na amostra de pacientes transplantados renais e a relação com a produção das respectivas proteínas codificadas por estes genes

Fibrinogênio

Não houve diferença nos níveis de fibrinogênio de acordo com os genótipos do alfa e do beta fibrinogênio. A média dos níveis de fibrinogênio nos genótipos do beta-

fibrinogênio (G/A-455) foram GG = $386,4 \pm 99,6$; AG = $382,5 \pm 119,7$; AA = $357,4$ (P=0,739). Para os genótipos do alfa fibrinogênio (t312) foram: TT = $380,3 \pm 109,5$; TA = $395,8 \pm 99,2$; AA = $349,0 \pm 88,8$ (P= 0,168).

Na tabela 10 estão representados os níveis de fibrinogênio de acordo com o genótipo do alfa e do beta fibrinogênio e a presença ou não de doença cardiovascular. Independente dos genótipos, os pacientes com doença cardiovascular apresentaram níveis de fibrinogênio mais elevados em relação aos pacientes sem doença cardiovascular.

Tabela 10
Níveis plasmáticos do fibrinogênio de acordo com o genótipo do alfa e beta fibrinogênio.

	Níveis de fibrinogênio	
	DCV (+)	DCV (-)
B-fib GG ⁻⁴⁵⁵	406,0 (230-710)	369,5 (211-650)
B-Fib AG/AA ⁴⁵⁵	414 (299-1050)	347,0 (213-650)
P	0,949	0,316
A-Fib TT ³¹²	386,5 (243-1050)	354 (213-650)
A-Fib TA/AA ³¹²	420 (230-650)	362 (211-650)
P	0,261	0,513

Nos pacientes portadores do alelo A -455 do β -fibrinogênio a prevalência de doença cardiovascular foi significativamente maior entre os tabagistas (5/10=50%) do que nos não tabagistas (10/68=14,7%); OR=5,8 (1,4-23,7). Nos pacientes portadores do alelo GG -455 não houve diferença entre tabagistas (10/33=30,3%) e não tabagistas (38/159=23,9%); OR=1,3 (0,6-3,2).

Em análise de covariância, foram incluídos: níveis de fibrinogênio (como variável dependente), e os genótipos do alfa e beta fibrinogênio e tabagismo (como variáveis de interesse) e idade, índice de massa corporal e ciclosporinemia e IL-6 (como covariáveis). Observou-se que a idade, IL-6 e ciclosporinemia associaram-se de forma significativa com os níveis de fibrinogênio.

Nesta análise o poder do tamanho da amostra para o genótipo do beta fibrinogênio foi de 5,4%; do alfa fibrinogênio 17,9%; do tabagismo 21%; da interação genótipo do beta fibrinogênio e tabagismo 32,4% e do índice de massa corporal 25,8% para um $P < 0,05$.

Fator VIIc

Os níveis de fator VIIc foram significativamente mais baixos nos portadores do alelo raro, o qual confere proteção, codificando para o aminoácido glicina (Gln) na posição 353 substituindo o aminoácido arginina. De acordo com o genótipo, os níveis de fator VIIc foram: Arg/Arg = $98,4 \pm 23,6$; Arg/Gln = $72,9 \pm 19,2$ e Gln/Gln = $38,3 \pm 7,6$; $P < 0,001$. Pelo teste de contraste de Sheffe todos diferiram entre si de forma significativa. Os dados correspondem às médias dos valores reais, mas os testes foram feitos com os dados transformados por logaritmo. Esta diferença nos níveis de VIIc de acordo com o genótipo foi observada no grupo de pacientes com e sem DCV.

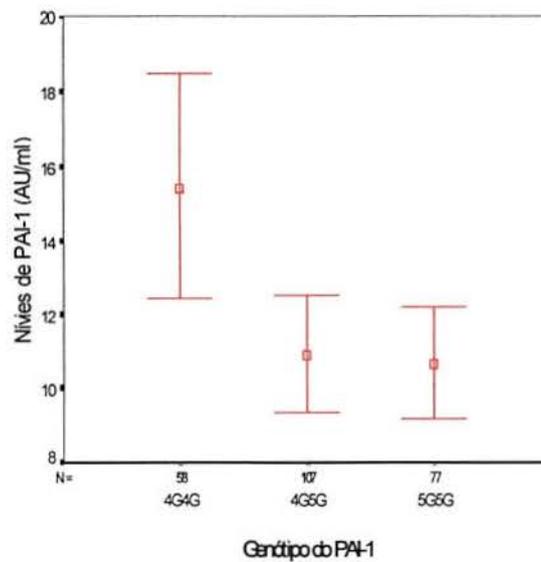
Em análise de covariância que incluía o fator VIIc como variável dependente, o genótipo como variável de interesse e colesterol e triglicerídios como covariáveis, observou-se que as três variáveis associaram-se de forma significativa com os níveis de fator VII.

Analisando a prevalência de doença cardiovascular esta foi similar tanto nos pacientes portadores do genótipo protetor quanto nos não portadores (22% x 29%; $P = 0,285$).

Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)

Os níveis plasmáticos de PAI-1 variaram de acordo com o genótipo. Os homocigotos para o alelo 4G apresentaram níveis significativamente mais elevados em relação aos heterocigotos ou homocigotos para o alelo 5G (4G/4G = $15,4 \pm 11,5$; 4G/5G = $10,9 \pm 8,2$; 5G/5G = $10,7 \pm 6,6$; P = 0,002). (figura 9).

Figura 9: Média e desvio padrão do PAI-1 de acordo com genótipo.



Em análise de covariância com níveis de PAI-1 como variável dependente, genótipo como variável de interesse e os níveis de triglicerídios e glicose covariáveis, observou-se que todas as variáveis testadas estavam associadas de forma significativa aos níveis de PAI-1 (genótipo P=0,032; triglicerídios P= 0,002 e glicose P= 0,001). Se presença de doença cardiovascular for acrescentada como variável de interesse na equação, o genótipo perde a significância mas há também diminuição do poder estatístico (genótipo B=54,9% P=0,06; DCV B=37% P=0,86). Triglicerídios e glicose continuam associados de forma significativa, (P= 0,003 e P=0,002; respectivamente).

Não houve diferença na prevalência de doença cardiovascular nos portadores do alelo 4G comparados aos homozigotos para o alelo 5G (23,2% x 23,8% P=1,000).

Interleucina 6

No grupo como um todo a média dos níveis de IL-6 de acordo com o genótipo não foram diferentes: AA = $3,2 \pm 3,1$; AG = $3,3 \pm 3,9$; GG = $2,3 \pm 1,8$; P = 0,343 (figura 10)

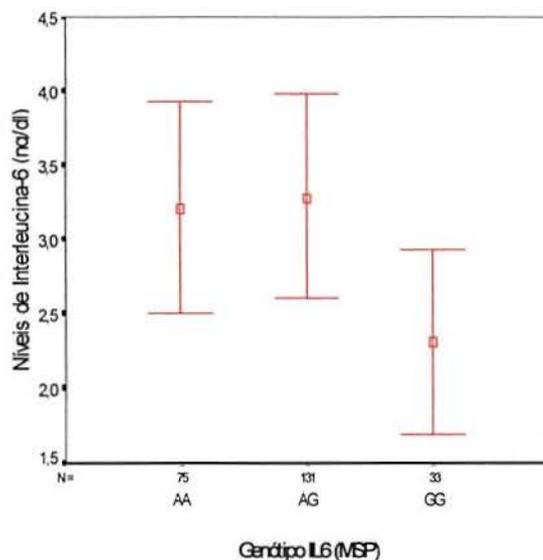


Figura 10
Níveis de IL-6 de acordo com genótipo no grupo de pacientes transplantados como um todo.

Tanto nos pacientes com ou sem DCV os níveis de IL-6 não diferiram significativamente nos diferentes genótipos (tabela 11)

Tabela 11
Níveis de IL-6 de acordo com o genótipo Msp e presença ou não de DCV

Genótipo Msp da IL-6	Níveis de IL-6	
	DCV(+)	DCV(-)
AA	$4,5 \pm 3,4$	$2,9 \pm 3,0$
AG	$3,7 \pm 5,2$	$3,2 \pm 3,6$
GG	$4,4 \pm 2,2$	$1,8 \pm 1,3$
P	0,302	0,080

Estratificando os pacientes pelo hábito do tabagismo, observou-se que os pacientes homozigotos GG tabagistas apresentaram um aumento de 63,5% nos níveis de IL-6 em relação ao mesmo genótipo nos não tabagistas, porém esta diferença não alcançou significância estatística (figura 11).

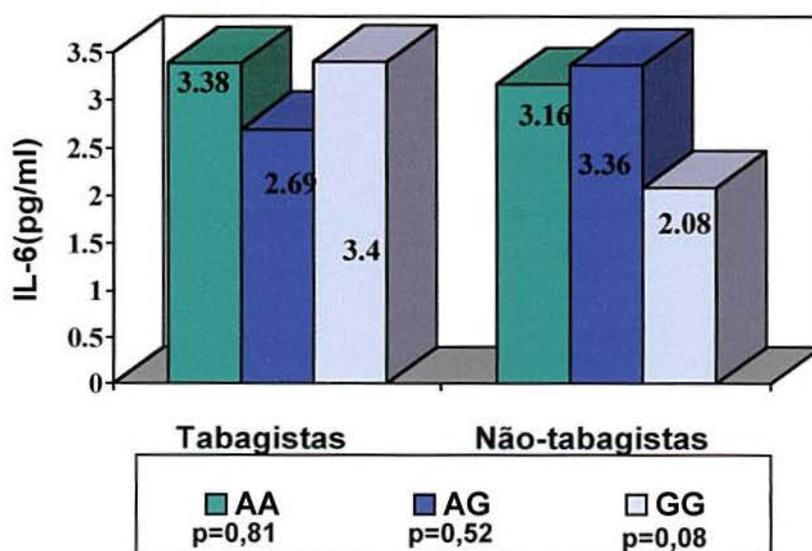


Figura 11
Níveis de IL-6 categorizadas pelo genótipo do intron-4 da IL-6 e o hábito de fumar.

Na figura 12 está apresentada a prevalência de doença cardiovascular de acordo com os genótipos da IL-6 e a condição de ser ou não tabagista. Embora tenha havido uma tendência de uma maior prevalência (43%) de doença cardiovascular nos tabagistas homozigóticos para o genótipo raro (GG) isto não atingiu significância estatística.

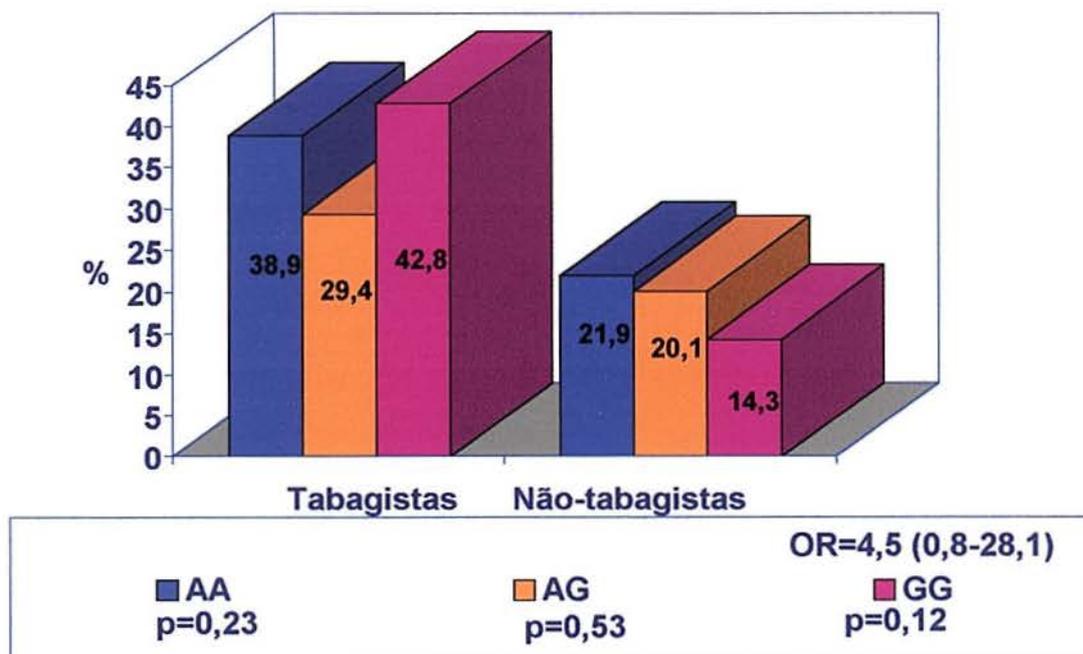


Figura 12
Prevalência de doença cardiovascular em participantes caracterizados pelo genótipo da IL-6 e pelo hábito de fumar

Em análise de covariância com níveis de IL-6 como variável dependente, o genótipo e tabagismo como variáveis de interesse e os níveis sanguíneos de ciclosporina como covariável observou-se que somente os níveis de ciclosporina foram associados aos níveis de IL-6 (genótipo IL-6 Msp: P= 0,916; tabagismo: P= 0,187, interação genótipo/tabagismo: P=0,261; níveis de ciclosporina: 0,048). Nesta análise o poder do tamanho da amostra calculado para genótipo e tabagismo foi de 3,4% e 25,9%, respectivamente para um P < 0,05.

Nos modelos de regressão logística que incluíam o diagnóstico de doença cardiovascular como variável dependente foram observadas tendências de associação (P

< 0,20) para idade, sexo, história familiar de doença cardiovascular, tabagismo, níveis plasmáticos de fibrinogênio, IL-6, Fator VIIc, triglicerídios, glicose, albumina e depuração da creatinina endógena. No modelo com seleção pelo método de "stepwise" permaneceram na equação final, mantendo associação significativa com doença cardiovascular, idade, história familiar positiva, tabagismo e níveis plasmáticos de albumina e fibrinogênio (tabela 12).

Na análise multivariada não houve associação entre doença cardiovascular e depuração da creatinina endógena, glicemia e triglicerídios.

Tabela 12

Resultados do modelo de regressão logística que inclui as variáveis explanatórias selecionadas em conjuntos prévios e doença cardiovascular como variável dependente.

Variáveis	Beta (EP)	Razão de risco (IC)	P
Idade	0,09 (0,02)	1,095 (1,06-1,13)	<0,001
História familiar positiva	1,32 (0,36)	3,75 (1,84-7,62)	<0,001
Tabagismo	1,28 (0,45)	3,612 (1,48-8,82)	0,005
Fibrinogênio	0,005 (0,00)	1,005 (1,00-1,01)	0,006
Albumina	-0,108 (0,50)	0,897 (0,81-0,99)	0,033

DISCUSSÃO

Os achados e interpretações da presente tese devem levar em conta seu delineamento e os critérios de amostragem. O modelo transversal não permite pressupor a direcionalidade das associações, ou seja, tanto as diferenças fenotípicas, genotípicas e suas interações podem ter causado a doença cardiovascular, quanto o inverso é admitido do ponto de vista conceitual. A plausibilidade biológica e a consistência com outros achados, no entanto, sugerem que a linha causal possa ser a primeira. Mesmo assumindo-se esta interpretação, não pode se conceder que as associações identificadas sejam mais do que hipóteses sobre os mecanismos produtores de doença. Os critérios de amostragem também devem ser levados em consideração, pois aproximadamente 1/3 dos pacientes transplantados com doença cardiovascular já a tinham apresentado antes do transplante. Este fato, no entanto, não invalida a interpretação de que, mesmo nestes, as características fenotípicas e genotípicas possam estar associadas à condição de doente cardiovascular. O fato de os outros 2/3 da amostra com doença cardiovascular terem-na apresentado após o transplante sugere que mecanismos produtores de doença possam ter sido desencadeados ou estimulados pelo transplante, ou antes disto, pela fase de doença renal terminal.

No presente estudo observou-se que pacientes submetidos a transplante renal apresentam níveis plasmáticos de lipídios elevados e fatores plasmáticos de coagulação elevados comparativamente a um grupo de indivíduos saudáveis. A consistência da associação reforça-se pelo fato de não ser confundida por idade e por tabagismo, reconhecidos fatores pró-coagulantes.^{23,36-39} O hábito de fumar, inclusive, era mais frequente entre os indivíduos normais.

Houve tanto um aumento do fator VIIc (evidência de ativação da via extrínseca da cascata da coagulação) quanto aumento do fibrinogênio e interleucina-6. A elevação dos

níveis de Dímero-D da fibrina confirma um aumento da produção e degradação de fibrina com ligação cruzada ("crosslinked"). Estes confirmam achados descritos anteriormente.

71,87

Na população geral tem-se observado um aumento de fibrinogênio, factor VIII, fator de von Willebrand, antitrombina III, e menores valores de proteína C em indivíduos de cor preta comparados à branca.⁸⁸ Esta condição não pode ter confundido nossos achados, pois a amostra era constituída exclusivamente por indivíduos da raça branca.

Em pacientes com aterosclerose coronariana, especialmente em diabéticos, também foi demonstrado aumento dos níveis de IL-6 e fibrinogênio.⁸⁹

A prevalência de doença cardiovascular no grupo de transplantados foi de 23%. O grupo de transplantados com diagnóstico de doença cardiovascular apresenta um tempo de acompanhamento pós-transplante, sexo, índice de massa corporal e níveis de pressão arterial similares aos pacientes transplantados sem doença cardiovascular. Por outro lado, incluem uma maior proporção de tabagistas e têm, mais freqüentemente doença cardiovascular prévia ao transplante e história familiar de doença cardiovascular. Não houve diferença no esquema imunossupressor utilizado pelos dois grupos.

Em ambos grupos, transplantados com e sem doença cardiovascular, os níveis de colesterol, triglicerídios e lipoproteína (a) foram similares. No grupo com doença foram observados níveis mais altos de glicose, níveis mais baixos de albumina e uma pior função renal.

Dos fatores envolvidos com coagulação, somente níveis de fibrinogênio e IL-6 foram mais elevados, o aumento de dímero-D da fibrina não atingiu significância estatística nos pacientes com doença cardiovascular, a distribuição de fator VIIIc e PAI-1 foi similar nos 2 grupos.

O sítio polimórfico da IL-6, descrito anteriormente, foi mapeado no intron-4 sendo confirmado pela técnica de seqüenciamento direto.

Para os diversos genótipos (fibrinogênio, IL-6, PAI-1, FVIIc) avaliados não houve diferença de frequência dos alelos raros entre o grupo de pacientes com e sem doença cardiovascular.

Não se observou associação do genótipo do intron-4 da IL-6 com os níveis de IL-6 no grupo de pacientes transplantados como um todo ou categorizados pela presença de doença cardiovascular. Por outro lado, observou-se que os transplantados tabagistas, homocigotos para o alelo menos comum (GG), apresentaram uma tendência de níveis de IL-6 mais elevados em relação aos não tabagistas. A associação não se manteve na análise multivariada, talvez por falta de poder estatístico. A ciclosporinemia persistiu significativamente associada.

Houve, também, uma tendência de maior prevalência de doença cardiovascular entre os tabagistas GG em relação aos não tabagistas, porém sem significância estatística. A sugestão de haver uma interação entre a presença do alelo G e tabagismo requer confirmação por novos estudos. Considerando que o intron não codifica para formação da proteína, é questionável como os homocigotos GG tabagistas aumentariam a produção de IL-6. Uma hipótese é que este polimorfismo esteja em ligação desequilibrada com polimorfismos já identificados na região promotora do gene da IL-6. Com o estímulo das toxinas do cigarro poderia haver uma resposta exagerada na transcrição do gene da IL-6, aumentando sua produção. Esta hipótese encontra-se atualmente em investigação.

Observou-se que os níveis de fibrinogênio foram significativamente mais elevados nos pacientes com doença cardiovascular, independentemente do genótipo do alfa e do beta fibrinogênio. Os pacientes tabagistas portadores do alelo A-445 do β -fibrinogênio apresentaram uma maior prevalência de doença cardiovascular, sugerindo existir uma interação entre a presença do alelo A-445 e o hábito de fumar para aumentar o risco de doença cardiovascular. Por outro lado, não observou-se interação entre o alelo A-445 e

tabagismo sobre os níveis de fibrinogênio, conforme descrito em alguns estudos.^{47,91} Associaram-se de forma significativa com os níveis de fibrinogênio a idade, ciclosporinemia e níveis de IL-6, através de análise multivariada. O poder insuficiente de alguns testes não permite excluir outras associações descritas em outras populações. No estudo multicêntrico ECTIM houve uma associação dos polimorfismos do beta-fibrinogênio com os níveis de fibrinogênio nos tabagistas bem como com a severidade de doença isquêmica coronariana.⁴⁷ Em 384 pacientes com doença coronariana a presença do alelo raro para 3 polimorfismos do beta-fibrinogênio (incluindo o G/A-445) e um do alfa (Taq1) mostrou níveis significativamente mais elevados de fibrinogênio em relação aos homocigotos para o alelo frequente.⁹⁰ Em outro estudo com homens brancos saudáveis, o polimorfismo G/A-445 foi o fator que mais contribuiu para os níveis de fibrinogênio, mas não identificou-se interação entre o polimorfismo e o hábito de fumar.⁹¹ Por outro lado, um estudo Finlandês de 183 pacientes e um estudo de diabéticos não insulino-dependentes não mostraram associação entre os polimorfismos e os níveis de fibrinogênio.^{92,93} Entre os pacientes diabéticos demonstrou-se associação entre o polimorfismo -455 G/A e doença cardiovascular. Esta associação não relacionou-se com os níveis de fibrinogênio sugerindo que este polimorfismo possa estar ligado com algum polimorfismo na região codificadora do beta-fibrinogênio, o que resultaria numa alteração na estabilidade do coágulo de fibrina.

Ensaio *in vitro* demonstram que as alterações das sequências dos polimorfismos do beta-fibrinogênio afetam a ligação das proteínas nucleares hepáticas e podem alterar a taxa de transcrição do gene, aumentando a produção de fibrinogênio. Uma mudança na sequência de bases é próxima àquela na qual acredita-se haver ligação do fator nuclear responsivo a interleucina-6. Esta é a explicação molecular para os diferentes efeitos sobre os níveis de fibrinogênio visto nos tabagistas, os quais experimentam um baixo grau crônico de resposta à injúria.⁹⁴ Os transplantados apresentam níveis mais elevados

de IL-6 e fibrinogênio, podendo representar um baixo grau de fase de resposta aguda persistente, quer seja pela presença do enxerto *per se* ou pela presença de outros fatores, como hipertensão, dislipidemia, tabagismo e uso de imunossupressores. Em estudos experimentais, o gene da IL-6 foi suprimido por corticosteróides.⁹⁵ No presente estudo não houve diferença nos níveis de IL-6 e fibrinogênio nos pacientes em uso de prednisolona e naqueles em que esta medicação foi retirada, possivelmente, devido a baixa dose de manutenção da mesma.

Nos pacientes em uso de ciclosporina houve uma tendência de aumento nos níveis de IL-6. Observou-se uma associação independente entre os níveis de fibrinogênio e IL-6 com a ciclosporinemia, o que é consistente com a hipótese que a exposição crônica à ciclosporina relaciona-se ao estado pró-coagulante em pacientes transplantados.^{66,69}

Os níveis de atividade do fator VIIc foram mais elevados nos pacientes transplantados renais, comparados ao indivíduos saudáveis, mas não se associaram com doença cardiovascular entre os transplantados.

Houve associação entre níveis do fator VIIc e genótipo Arg/Gln 353, o que tem sido um achado consistente nos diversos estudos sugerindo haver alguma consequência funcional desse polimorfismo.^{48,49,50,96} A atividade do fator VIIc foi menor nos portadores do alelo raro, independente da presença de doença cardiovascular. A presença deste alelo poderia conferir proteção para doença cardiovascular, como observado em um estudo italiano de casos e controles, com pacientes acometidos de infarto do miocárdio e com história familiar de doença cardiovascular.⁵² No presente estudo não houve tal associação, comparável ao estudo de Green e colaboradores⁹⁷. A baixa frequência do alelo raro (11%) pode influenciar o poder de detecção desta associação em estudos do norte da Europa, contrastando com uma frequência mais alta deste alelo nos estudos italianos.⁵² Como a presença deste alelo está relacionado a níveis mais baixos de fator

VIIc, a sua baixa frequência poderia até justificar a maior incidência de infarto do miocárdio naqueles países em relação à Itália.

Na análise de 16 anos de acompanhamento no estudo de Northwick Park Heart ³² observou-se relação entre o aumento da atividade do fator VII e eventos coronarianos fatais. Neste estudo transversal, talvez os pacientes com maior atividade do fator VII tenham apresentado eventos fatais e, por isto, não tenha sido detectada diferença entre os pacientes com e sem doença cardiovascular.

Além do genótipo, também, observou-se associação dos níveis de atividade do fator VIIc com os níveis plasmáticos de colesterol e triglicéridios, como tem sido descrito na literatura. ^{49, 96, 98}

Os níveis de PAI-1 não diferiram entre os pacientes transplantados com e sem doença cardiovascular. Também não modificaram de acordo com o uso de prednisolona e ciclosporina. No grupo como um todo, os níveis de PAI-1 variaram de acordo com o genótipo 4G/5G, havendo, também, associação com os níveis de triglicéridios e glicose. Os homozigotos para o alelo 4G apresentaram níveis de PAI-1 significativamente mais elevados em relação aos heterozigotos e homozigotos para o alelo 5G, como descrito na literatura. ^{60, 99}

Não se observou associação entre doença cardiovascular e genótipo, pois a frequência do alelo 4G na região promotora do gene do PAI-1 foi similar nos dois grupos. O insuficiente poder estatístico do teste pode ser uma razão para o resultado negativo, pois há outros relatos de associação na literatura. No estudo de Eriksson e colaboradores ⁹⁸ observou-se maior frequência do alelo 4G em homens que apresentaram infarto do miocárdio antes dos 45 anos de idade em relação à controles saudáveis da mesma idade.

A associação do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1 e os níveis plasmáticos de atividade do PAI-1 sugere haver diferença na ligação de proteínas

nucleares que regulam a atividade de transcrição do gene. Estudos experimentais mostraram que o alelo 5G, liga-se a uma proteína nuclear adicional que poderia funcionar como um repressor da transcrição do gene.⁹⁸

Na análise multivariada identificaram-se associações independentes entre presença de doença cardiovascular pós-transplante com idade, história familiar positiva de doença cardiovascular, tabagismo e níveis de fibrinogênio e albumina.

Na fase de resposta aguda vista após infecção ou outras injúrias é comum observar-se aumento da produção do fibrinogênio e diminuição da síntese de albumina. Os achados deste estudo vão ao encontro da hipótese de que estes pacientes apresentam certo grau de resposta inflamatória persistente, como comentado anteriormente.

Na população geral evidenciou-se haver associação entre fibrinogênio, leucócitos e proteína C reativa com fatores de risco e prevalência de doença cardiovascular, sugerindo que um baixo grau de inflamação pode contribuir para risco de doença isquêmica.¹⁰⁰ Além dos diversos estudos epidemiológicos²⁰⁻³², dados do Edinburgh Artery Study mostram que variáveis hemostáticas e reológicas estão associadas com prevalência e incidência de doença cardiovascular. Sugerem que um distúrbio endotelial e o aumento do "turnover" de fibrina possam ter um papel na patogênese desta doença e sejam os mecanismos pelos quais os fatores de risco como tabagismo, dislipidemia e infecções promovem eventos cardiovasculares.¹⁰¹ Na nossa amostra de pacientes transplantados não foram incluídos os que apresentavam doença aguda, porém, a presença de infecção latente, principalmente pelo citomegalovírus é freqüente nestes pacientes. Sua presença não foi investigada neste estudo.

Questiona-se se hipoalbuminemia é um fator de risco independente para complicações ateroscleróticas. Em pacientes transplantados a albumina sérica mostrou ser um fator de risco independente de fatores de risco clássicos, como idade, sexo,

diabetes, tabagismo ¹⁰². Em pacientes sob tratamento dialítico, estudos de coorte também têm demonstrado ser hipoalbuminemia um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença coronariana isquêmica, mortalidade de causa cardiovascular e mortalidade total. A albumina sérica baixa pode ser um marcador de desnutrição destes pacientes, porém, o que fala a favor de uma alteração em decorrência da fase de resposta aguda é o fato de estar associada à alteração da síntese hepática de outras proteínas envolvidas neste processo ^{103,104,105}. No estudo "The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators" os níveis de albumina se mostraram mais baixos nos pacientes com diabetes e doença cardiovascular, porém, quando ajustado para a presença de fatores de riscos clássicos e variáveis hemostáticas não houve mais tal associação, sugerindo que a hipoalbuminemia seja um marcador de doença crônica sem associação causal com complicações aterosclerótica. ¹⁰⁶

CONCLUSÕES

- a) Os pacientes transplantados renais apresentaram alterações nos níveis de fatores da coagulação em relação a um grupo de indivíduos normais.
- b) Nos pacientes transplantados com diagnóstico de doença cardiovascular apresentaram níveis de fibrinogênio e IL-6 mais elevados em relação aos pacientes sem doença.
- c) Não detectou-se associação entre a frequência dos diversos polimorfismos genéticos e prevalência de doença cardiovascular no grupo de transplantados como um todo. No entanto, a interação de tabagismo e presença do alelo raro (A-445) do beta-fibrinogênio associou-se com o diagnóstico de doença cardiovascular.
- d) No grupo de pacientes transplantados como um todo:
 - a idade, ciclosporinemia e níveis de IL-6 associaram-se de forma significativa com os níveis de fibrinogênio .
 - o genótipo do fator VII, colesterol e triglicerídios associaram-se aos níveis de fator VII coagulante.
 - o genótipo do PAI-1, triglicerídios e glicose associaram-se aos níveis e PAI-1.
 - somente a ciclosporinemia foi associada de forma significativa com os níveis de IL-6.
- e) O sítio polimórfico (Msp) da IL-6 foi localizado no intron-4 do gene da IL-6. Observou-se uma tendência de associação entre a interação de tabagismo e homozigose para o alelo raro (GG) do polimorfismo da IL-6 com os níveis de IL-6 e doença cardiovascular.

f) Idade, história familiar positiva, tabagismo, níveis de albumina e fibrinogênio foram associados de forma independente com o diagnóstico de doença cardiovascular nesta amostra de pacientes transplantados renais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Marmot MG, Mann JI. Ischaemic Heart Disease. Epidemiology and prevention. In **Oxford Textbook of Medicine**. 3rd edition Ed Weatherall DJ, Ledinghan JGG, Warrell DA. Oxford University Press. Oxford. 1996 Vol. 2 page 2305-2318
 - ² Lindholm A, Albrechtsen D, Frodin L. Ischemic heart disease-major cause of death and graft loss after renal transplantation in Scandinavia. **Transplantation** 1995;60: 451-457
 - ³ Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. **Am J Med** 1988; 84:985 – 990
 - ⁴ Gray RJ, Kasiske BL. Patient and renal allograft survival in the late posttransplant period. **Semin Nephrol** 1992, 12:343-352
 - ⁵ Marinus A, van den Dorpel, Ghanem H, Rischen-Vos J. Conversion from cyclosporine A to azathioprine treatment improves LDL oxidation in kidney transplant recipients. **Kidney Int** 1997;51:1608-1612
 - ⁶ Chesebro J.H, Toshi V, Lettino M, Gallo R, Badimon JJ, Fallon JT, Fuster V. Evolving concepts in the pathogenesis and treatment of arterial thrombosis. **Mount Sinai J Med** 1995;62: 275-286
 - ⁷ Rokitansky C. **A manual of pathological anatomy**. Abnormal conditions of the arteries. Vol IV part II, Cap 3.1852 -. London: Sydenham Society
 - ⁸ Duguid JB. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. **J Pathol Bacteriol** 1946;58:207-212
 - ⁹ Virchow R. **Phlogose und thrombose in gefasssystem**, gesammelt abhanlungen zur wissenschaftlichen medicin. 1856:458 Frankfurt-am-Main. Germany:Meidinger Sohn
 - ¹⁰ Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. **N Engl J Med** 1986;314: 488-500
 - ¹¹ Meleady RA, Graham IM. Homocysteine as a risk factor for coronary artery disease. **J Cardio Risk** 1995; 2: 216-221
-

-
- ¹² Epstein SE, Speir E, Guetta YF, Leon M, Finkel T. The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on cytomegalovirus. **Lancet** 1996;348: s13-s17
- ¹³ Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. (First of two parts). **N Engl J M.** 1992;326: 242-250
- ¹⁴ Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. (Second of two parts). **N Engl J M.** 1992;326: 310-318
- ¹⁵ Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? **Immunology Today** 1995;16: 27-33
- ¹⁶ Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. **Arteriosclerosis** 1989;99:Suppl II-I 19-I 32
- ¹⁷ Davies MJ, Woolf N, Robertson WB. Pathology of acute myocardial infarction with particular reference to occlusive coronary thrombi. **Br Heart J** 1986; 38: 659-664
- ¹⁸ Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden cardiac ischaemic death. **N Engl J Med** 1984;310: 1137-1140
- ¹⁹ Sherry S, Marder VJ. Thrombosis, fibrinolysis and thrombolytic therapy; a perspective. **Prog Cardiovas Dis** 1991, 34: 89-100
- ²⁰ Meade T, North W, Chkrabarti R, Stirling Y, Haines P, Thompson SG. Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. **Lancet** 1980;1: 1050-1054
- ²¹ Smith EB, Thompson WD. Fibrin as a factor in atherogenesis. **Thrombosis Research.** 1994;73: 1 -19
- ²² Heinrich J, Assmann G. Fibrinogen and cardiovascular risk. In Thrombosis as a unitary hypothesis of cardiovascular risk. **Journal of Cardiovascular Risk.** 1995;2: 197 - 205
- ²³ Ernst E. The role of fibrinogen as a cardiovascular risk factor. **Atherosclerosis** 1993;100: 1 - 12

-
- ²⁴ Lowe GDO, Drummond MM, Lorimer AR. Relation Between extent of coronary artery disease and blood viscosity. **Br Med J** 1980;281: 673-674
- ²⁵ Hamsten A, Blomback M, Wiman B, et al. Haemostatic function in myocardial infarction. **Br Heart J** 1986;55: 58-66
- ²⁶ Wilhemsen L, Svärdsuss K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. **N Eng J Med** 1984; 311: 501-505
- ²⁷ Kannel J, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostini RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham study. **JAMA** 1987;258: 1183-1186
- ²⁸ Meade TW, Mellows W, Brozovic M. Haemostatic function and Ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. **Lancet**, 1987; 2: 533-537
- ²⁹ Yarnell JGW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ. Fibrinogen, viscosity and white blood cell count are risk factors for Ischaemic heart disease. **Circulation** 1991, 83:836-844
- ³⁰ Heinrich J, Ballersen I, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM Study in healthy men. **Arterioscler Thromb** 1994; 14: 54-59
- ³¹ Scott J. The pathogenesis of atherosclerosis. Atheroma , the vassel wall, and thrombosis. Cardiovascular Disease. In **Oxford Textbook of Medicine**. 3rd edition Ed Weatherall DJ, Ledingehan JGG, Warrell DA. Oxford University Press. Oxford. 1996 Vol 2 page 2305-2318
- ³² Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. **Lancet** 1993; 342:1076-1079
- ³³ Woodhouse PR, Khaw KT, Plummer M, Foley A, Meade TW. Seasonal variations of plasma fibrinogen and factor VII activity in the elderly: winter infections and death from cardiovascular disease. **Lancet** 1994; 343: 435-439.

-
- ³⁴Kannell WB, D'Agostino RB, Wilson PWF, Belanger AJ, Gagnon DR. Diabetes, fibrinogen and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience. **Am Heart J** 1990;120: 672-676
- ³⁵ Vaziri ND, Gonzales E, Barton CH, Chen HT, Nguyen Q, Arquila M. Factor XIII and its substrates, fibronectin, fibrinogen, and alpha-2-antiplasmin, in plasma and urine of patients with nephrosis. **J Lab Clin Med** 1991;117: 152 - 156
- ³⁶ HC Wilkes, Kelleher C. and T.W. Meade. Smoking and plasma fibrinogen. **Lancet** 1998;2:307-308
- ³⁷Lee AJ, Smith WCS, Lowe GDO, Tunstall-Pedoe H. Plasma fibrinogen and coronary risk factors: The Scottish Heart Health Study. **J Clin Epidem** 1990;43: 913 - 917
- ³⁸ Feher MD, Rampling MW, Brown J, et al. Acute changes in atherogenic and thrombotic factors with cessation of smoking. **J R Soc Med** 1990;83:146-148
- ³⁹ Meade TW, Imeson J, Stirling Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and risk of ischaemic heart disease. **Lancet** 1987;1:986-988
- ⁴⁰ Miller GJ, Cruickshank JK, Ellis LJ, Thompson RL, Wilkes HC, Stirling Y, Mitropoulos KA, Allison JV, Fox TW, Walker AO. Fat consumption and factor VII coagulant activity in middle aged men. **Atherosclerosis** 1989; 78:19-24
- ⁴¹ Kelleher CC. Plasma fibrinogen and factor VII as risk factors for cardiovascular disease. **Eur J Epidemiol.** 1992;8 (suppl 1):79-82
- ⁴² Montgomery HE, Clarkson P, Nwose OM, Mikailidis DP. The acute rise in plasma fibrinogen concentration with exercise is influenced by the G-453-A polymorphism of the B- fibrinogen gene. **Arterioscler Thromb Vasc Bio** 1996;16:386-391
- ⁴³ Thomas AE, Green FR, Kelleher CH, Wilkes HC, Brennan PJ, Meade TW, Humphries. Variation in the promoter region of the B-fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. **Thromb Haemost** 1991;65: 487-490
- ⁴⁴ Thomas AE, Green FR, Humphries SE. Association of genetic variation at the B-fibrinogen gene locus and plasma fibrinogen levels; interaction between allele frequency of the G/A-445 polymorphism, age and smoking. **Clin Genet** 1996; 50: 1-7

-
- ⁴⁵ Green FR, Hamsten A, Blomback M, Humphries S. The role of β -fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. **Thromb Haemost** 1993;70:915-920
- ⁴⁶ Green F, Hamsten A, Blomback M, Humphries S. The role of B-fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. **Thromb Haemost** 1993; 70:915-920
- ⁴⁷ Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Gérard L, Cambou JP, Scarabin PY, Bara L, Green F, Cambien F. β fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. **Circulation** 1996;93:440-449
- ⁴⁸ Baumann RE, Henschen AH. Human fibrinogen polymorphic site analysis by restriction endonuclease digestion and allele-specify polymerase chain reaction amplification: identification of polymorphism at positions $A\alpha 312$ and $B\beta 448$. **Blood** 1993, 82: 2117-2124
- ⁴⁹ Raurama R, Vaisanen S, Nissinen A, Rankinen T, Penttila I, Saarikoski S, Tuomilehto J, Gagnon J, Perusse L, Bouchard C. Physical activity, fibrinogen plasma level and gene polymorphisms in postmenopausal women. **Thromb Haemost** 1997 Aug;78:840-844
- ⁵⁰ Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII in healthy individuals. **Arteriosc Thromb** 1991;11:540-546
- ⁵¹ Humphries SE, Lane A, Green FR, Cooper J, Miller GJ. Factor VII coagulant activity and antigen levels in health men are determined by interaction between factor VII genotype and plasma trygliceride concentration. **Arterioscler Thromb** 1994;14:193-198
- ⁵² Iacoviello L, Castelnovo A, Knijff P, Dórazio A, Amore C, Arboretti R, Klufft C, Donati MB. Polymorphisms in coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med** 1988;338:79-85
- ⁵³ Erickson LA, Fici GJ, Lund JE, Boyle TP, Polites HG, Marotti KR. Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor -1 gene. **Nature** 1990; 346:74-76

-
- ⁵⁴ Gordon D, Augustine AJ, Smith KM, Schwartz SM, Wolcox JN. Localization of cells expressing tPA, PAI-1 and urokinase by in situ hybridization in human atherosclerotic plaques and in the normal rhesus monkey (Abstr). **Thromb Haemost** 1989; 62:131
- ⁵⁵ Libby P. Molecular bases of acute coronary syndromes. **Circulation** 1995;91:2844-2850.
- ⁵⁶ Vaughan DE. The renin-angiotensin system and fibrinolysis. **Am J Cardiol** 1997;79:12-16
- ⁵⁷ Auwerx J, Bouillon R, Collen D, Geboers J. Tissue-type plasminogen activator antigen and plasminogen activator inhibitor in diabetes mellitus. **Arteriosclerosis** 1988;8:68-72
- ⁵⁸ Hamsten A, Wiman B, De Faire U, Blomback M. Increased plasma level of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. **N Engl J Med** 1985;40:113-121
- ⁵⁹ Kruskal JB, Commerford PJ, Franks JJ, Kirsch RE. Fibrin and Fibrinogen-related antigens in patients with stable and unstable coronary artery disease. **N Engl J Med** 1987;317:1361-1365
- ⁶⁰ Hamsten A, Walldius G, Szamosi A, Blombäck M, de Faire U, Dahlen G, Landou C, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. **Lancet** 1987; ii:3-9
- ⁶¹ Thompson SG, Kienast J, Pyke SMD, Haverkate F, van de Loo JCW, for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Haemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. **N Engl J Med** 1995;332:635-641
- ⁶² Panahloo A, Mohame-Ali V, Lane A, Green F, Humphries SE, Yudkin JS. Determinants of plasminogen activator inhibitor activity in treated NIDDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor gene. **Diabetes** 1995;44:37-42
- ⁶³ Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, Kano S, Shimada K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. **Cytokine** 1994;6: 87-91

-
- ⁶⁴ Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and (IL-6) interleukin-8 (IL-8) protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. **Atherosclerosis** 1996;127:263-271
- ⁶⁵ Szekanecz Z, Pearce WH, Koch AE. Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce Interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. **Agents Actions** 1994;42:159-162
- ⁶⁶ Kranzhofer R, Clinton SK, Ishii K, Coughlin SR, Fendon JW, Libby P. Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscles cells but not in mononuclear phagocytes. **Circ Res** 1996;79:286-294
- ⁶⁷ Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, Daneshvar L, May LT, Ray A, Sehgal PB, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL. The human "Interferon- β 2/Hepatocyte stimulating factor/ Interleukin-6" gene: DNA polymorphisms studies and localization to chromosome 7p21. **Genomics** 1988; 3:8-16
- ⁶⁸ Baker LRI, Tucker B, Kovacs B. Enhanced in vitro homeostasis and reduced thrombolysis in cyclosporine-treated renal transplant recipients. **Transplantation** 1990; 49:905-909
- ⁶⁹ Vaziri ND, Ismail M, Martin DC, Gonzales E. Blood coagulation, fibrinolytic and inhibitory profiles in renal transplant recipients: comparison of cyclosporine and azathioprine. **Int J Artif Organs** 1992; 15:365-369
- ⁷⁰ Carlsen E, Prydz H. Enhancement of procoagulant activity in stimulated mononuclear blood cells and monocytes by cyclosporine. **Transplantation** 1987;43: 543-548
- ⁷¹ Irish AB, Green FR. Environmental and genetic determinants of the hypercoagulable state and cardiovascular disease in renal transplant recipients. **Nephrol Dial Transpl** 1997;12:167-173
- ⁷² Vanrenterghem Y, Lerut T, Roels L, Gruwez J, Micheielsen P, Gresele P, Colocci M, Deckmyn H, Arnout J, Vermynen J. Thromboembolic complications and haemostatic changes in cyclosporin-treated cadaveric kidney allograft recipients. **Lancet** 1985;1: 999-1002

-
- ⁷³ Cohen H, Neild GH, Mackie IJ, Machin SJ. Persistent decreased fibrinolytic activity in cyclosporin-treated renal transplant recipients. **Fibrinolysis** 1988;2: 197- 199
- ⁷⁴ Verpooten GA, Cools F, Van der Planken MG, Bedert LC, Claes R, Van Gaal LF, De Broes ME. Elevated plasminogen activator inhibitor levels in cyclosporin-treated renal allograft recipients. **Nephrol Dial Transplant** 1996; 11:347-351
- ⁷⁵ Hunt BJ, Segal H, Yacoub M. Hemostatic changes in heart transplant recipients and their relationship to accelerated coronary sclerosis. **Transplantation** 1993;55: 309-315
- ⁷⁶ Walz G, Zanker B, Melton LB, Uthanthiran M, Strom TB. Possible association of the immunosuppressive and B cell lymphoma-promoting properties of cyclosporine. **Transplantation** 1990;49: 191-194
- ⁷⁷ Moutabarrik A, Takahara S, Namoki M, Kokado Y. Effect of FK 506 and cyclosporine on the expression of IL-6 and its receptor on stimulated monocytes. **Transplant Proc** 1993;25:2320-2321
- ⁷⁸ Petrassi GM, Sartori MT, Rigotti P, Di Landro D, Theodoridis P, Fioretti M, Capalbo M, Saggiorato G, Boeri G, Girolami A. Reduced fibrinolytic potential one year after kidney transplantation. Relationship to long-term steroid treatment. **Transplantation** 1995;59:1416-1420
- ⁷⁹ Patrassi GM, Sartori MT, Livi U, Casonato A, danesin C, Vettore S, Girolami A. Impairment of fibrinolytic potential in long-term steroid treatment after heart transplantation. **Transplantation** 1997;64:1610-1614
- ⁸⁰ UK Prospective Diabetes Study Group. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) XI: Biochemical risk factors in Type 2 diabetic patients at diagnosis compared with age-matched normal subjects. **Diabetic Med** 1994;11: 534 -544
- ⁸¹ Miller GJ, Stirling Y, Esnouf MP, et al. Factor VII-deficient substrate plasmas depleted of protein C raise the sensitivity of the factor VII bio-assay to activated factor VII: an international study. **Thromb Hemost** 1994;71:38-48

-
- ⁸² Talmud P, Tyaeberg-Hansen A, Bhatnagar D. Rapid screening for specific mutations in patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis** 1991;89: 137
- ⁸³ Thomas AE, Green FR, Kelleher CH. Variation in the promoter region of β fibrinogen is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. **Thromb Haemost** 1991;65: 487-490
- ⁸⁴ Dawson SJ, Wiman B, Hamstem A, Green F, Humphries S, Henney A. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene responds differently to IL-1 in HEPG2 cells. **J Biol Chem** 1993;268: 10739-10745
- ⁸⁵ Declaration of Helsinki. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 42sd World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989.
- ⁸⁶ Hosmer DW, Lemeshow S. **Applied Logistic Regression**. John Wiley & Sons, Inc. 1989
- ⁸⁷ Malysko J, Malysco JS, Pawlak K, Mysliwiec M. The coagulo-lytic system and endothelial function in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. **Transplantation** 1996;62: 828-830
- ⁸⁸ Folsom AR, Wu KK, Conlan MG, Finch A, Davis CE, Marcucci G, Sorlie PD, Szklo M. Distributions of hemostatic variables in blacks and whites: population reference values from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Ethn Dis** 1992;2:35-46
- ⁸⁹ Brown AS, Hong Y, de Belder A, Beacon H, Beeso J, Sherwood R, Edmonds M, Martin JF, Erusalimsky JD. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1997; 17: 802-807
- ⁹⁰ Heinrich J, Funke H, Rust S, Schulte H, Schonfeld R, Kohler E, Assmann G. Impact of polymorphisms in the alpha- and beta-fibrinogen gene on plasma

fibrinogen concentrations of coronary heart disease patients. **Thromb Res** 1995;77:209-215

- ⁹¹ Thomas AE, Green FR, Lamlum H, Humphries SE. The association of combined alpha and beta fibrinogen genotype on plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. **J Med Genet** 1995;32:585-589
- ⁹² Vaisanen S, Rauramaa R, Penttila I, Rankinen T, Gagnon J, Perusse L, Chagnon M, Bouchard C. Variation in plasma fibrinogen over one year: relationships with genetic polymorphisms and non-genetic factors. **Thromb Haemost** 1997;77: 884-889
- ⁹³ Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. **Diabetes Care** 1996;19:1265-1268
- ⁹⁴ . Humphries SE. Genetic regulation of fibrinogen. **Eur Heart J** 1995;16 Suppl A:16-9; discussion 19-20
- ⁹⁵ Zanker B, Walz G, Wieder KJ, Strom TB. Evidence that glucocorticosteroids block expression of the human interleukin-6 gene by accessory cells. **Transplantation** 1990;49:183-185
- ⁹⁶ Meilahn E, Ferrell R, Joseph K, Temple A, Green F, Humphries S, Kuller L. Genetic determination of Coagulation Factor VIIc levels among healthy middle-aged women. **Thromb Haemost** 1995; 73(4):623-625
- ⁹⁷ Lane A, Green F, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Humphries S, Evans A, Luc G, Cambou JP, Arveiler D, Cambien F. Factor VII Arg/Gln 353 polymorphism determines factor VII coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast and in France but is not a strong indicator of MI risk in the ECTIM study. **Atherosclerosis** 1996;119:119-127
- ⁹⁸ Hoffman CJ, Miller RH, Hultin MB. Correlation of factor VII activity and antigen with cholesterol and triglycerides in healthy young adults. **Arterioscler Tromb** 1992;12:267-270.

-
- ⁹⁹ Erikson P, Kallin B, Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 is associated with myocardial infarction. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92:1851-1855
- ¹⁰⁰ Grau AJ, Bugge F, Becher H, Werle E, Hacke W. The association of leukocyte count, fibrinogen and C-reactive protein with vascular risk factors and ischemic vascular diseases. **Thromb Res** 1996;82:245-255
- ¹⁰¹ Lowe GD. Etiopathogenesis of cardiovascular disease: hemostasis, thrombosis, and vascular medicine. **Ann Periodontol** 1998;3:121-6
- ¹⁰² Kasiske BL, Guijarro C, Massy ZA, Wiederkehr MR, Ma JZ. Cardiovascular disease after renal transplantation. **J Am Soc Nephrol** 1996;7:158-65
- ¹⁰³ Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE. Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uraemia. **Kidney Int** 1996;49: 1428-1434
- ¹⁰⁴ Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. Hypoalbuminemia, cardiac morbidity, and mortality in end-stage renal disease. **J Am Soc Nephrol** 1996;7:728-736
- ¹⁰⁵ Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, Rubin AL. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis** 1998;32:107-14
- ¹⁰⁶ Folsom AR, Ma J, Eckfeldt JH, Nieto FJ, Metcalf PA, Barnes RW. Low serum albumin. Association with diabetes mellitus and other cardiovascular risk factors but not with prevalent cardiovascular disease or carotid artery intima-media thickness. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. **Ann Epidemiol** 1995;5:186-191