

**Faculdade de Biociências**  
**Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular**  
**Dissertação de Mestrado**

**Análise do Polimorfismo C677T da Metilenotetraidrofolato Redutase  
em Pacientes com Episódio de Trombose Venosa**

**AMANDA LOPES**

Março 2006  
Porto Alegre, RS

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO C677T DA  
METILENOTETRAIDROFOLATO REDUTASE EM PACIENTES  
COM EPISÓDIO DE TROMBOSE VENOSA**

**AMANDA LOPES**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Virgínia Minghelli Schmitt**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Março 2006

Porto Alegre, RS

Ao meu amado marido, José, pela paciência, amor e apoio.

Aos meus pais, Jorge e Elizabeth, por acreditarem em mim e pelas portunidades que sempre me proporcionaram.

Ao meu querido irmão, Sandro, que, mesmo de longe, torceu pelo meu sucesso.

À minha saudosa avó, Theolinda, que, com toda certeza, estaria orgulhosa (*in memorian*).

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Virgínia Minghelli Schmitt, pela paciência, competência e pela coragem em aceitar me orientar quando já havia percorrido quase metade do meu caminho.

À Dr<sup>a</sup> Terezinha Paz Munhoz por permitir a continuação do trabalho por ela iniciado e pelo auxílio em diversos momentos.

A todos os estagiários do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, em especial Marina T. Jahns, Jefferson H. do Amaral e Paula Kellermann.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Beatrice Manica da Cruz pelo carinho, atenção, disponibilidade, e amizade durante a primeira etapa da minha jornada.

Às funcionárias da Secretaria do Pós-Graduação, Luiza, Cátia e Joseane, por serem tão prestativas e por estarem sempre dispostas a ajudar e solucionar as inúmeras dúvidas e problemas que surgiram no decorrer do curso.

Aos demais colegas e professores do PPGBCM e a todas as pessoas que de alguma forma me deram apoio e contribuíram para que eu pudesse trilhar meu caminho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b> -----	ii
<b>Agradecimentos</b> -----	iii
<b>Sumário</b> -----	iv
<b>Lista de abreviaturas</b> -----	vi
<b>Lista de figuras</b> -----	vii
<b>Lista de tabelas</b> -----	viii
<b>Resumo</b> -----	ix
<b>Abstract</b> -----	x
<b>Introdução</b> -----	01
<b>Referencial teórico</b> -----	03
Folato-----	03
Homocisteína-----	03
Metabolismo do fragmento de um-carbono-----	05
Hiperhomocisteinemia-----	07
O polimorfismo C677T da MTHFR-----	08
Trombose venosa-----	10
Mecanismos trombogênicos da hiperhomocisteinemia-----	12
Hiperhomocisteinemia e trombose venosa-----	14
Polimorfismo C677T MTHFR, Hiperhomocisteinemia e Trombose Venosa-----	15
<b>Objetivos</b> -----	17
Objetivo geral-----	17
Objetivos específicos-----	17

<b>Artigo Científico</b> “ <i>Prevalence of the MTHFR C677T polymorphism in patients with venous thromboembolism from the south of Brazil</i> ” -----	18
<b>Resultados e Discussão</b> -----	37
A prevalência do polimorfismo C677T da MTHFR em indivíduos sem histórico de trombose venosa-----	37
O polimorfismo C677T da MTHFR e o risco de desenvolvimento de trombose venosa -----	41
<b>Considerações Finais</b> -----	50
<b>Referências Bibliográficas</b> -----	51

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AVC	Acidente vascular cerebral
BHMT	Betaina-homocisteína metiltransferase
C e T	Alelos do gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase
CBS	Cistationa- $\beta$ -sintase
CC, CT e TT	Genótipos da enzima metilenotetraidrofolato redutase (homozigoto normal, heterozigoto, homozigoto para o polimorfismo)
cDNA	DNA complementar
DAC	Doença arterial coronariana
DCC	Doença cardíaca coronariana
DCI	Doença cardíaca isquêmica
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EP	Embolismo pulmonar
GPx-1	Glutaciona-peroxidase
Hcy	Homocisteína
HHcy	Hiperhomocisteinemia
IAM	Infarto agudo do miocárdio
KDa	Kilodaltons
MS	Metionina sintase
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
NO	Óxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SAM	S-adenosilmetionina
TA	Trombose arterial
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TEV	Tromboembolismo venoso
THF	Tetraidrofolato
TV	Trombose venosa
TVP	Trombose venosa profunda
UV	Ultra-violeta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Estruturas dos compostos derivados do ácido fólico-----4

**Figura 2-** Representação esquemática do ciclo do folato-----5

**Figura 3-** Representação esquemática do metabolismo da homocisteína-----7



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Estudos sobre frequência dos genótipos e do alelo T da MTHFR em indivíduos saudáveis-----	39
<b>Tabela 2-</b> Frequência dos genótipos e alelos da MTHFR em pacientes e no grupo controle-----	42
<b>Tabela 3-</b> Artigos publicados sobre relação entre o polimorfismo C677T e o aumento no risco para doenças cardiovasculares e tromboembólicas-----	43

## RESUMO

**Introdução:** O tromboembolismo venoso (TEV) tem como manifestações clínicas a trombose venosa profunda e o tromboembolismo pulmonar. Trata-se de uma doença multigênica e multifatorial. Mais de 60% dos casos estão relacionados com predisposição genética e a hiperhomocisteinemia é considerada um fator de risco estabelecido. A enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) está envolvida no metabolismo da homocisteína (Hcy) e do ácido fólico. Esta enzima catalisa a redução do 5,10-metilenotetraidrofolato em 5-metiltetraidrofolato, derivado do ácido fólico que atua como co-fator para remetilação da homocisteína em metionina. A transição de uma citosina para uma timina no nucleotídeo 677 do gene da MTHFR resulta na substituição de uma alanina por uma valina, gerando uma variante termolábil da MTHFR. Esta variante termolábil apresenta uma atividade enzimática diminuída, o que resulta em um aumento nos níveis plasmáticos de Hcy.

**Materiais e Métodos:** Foram avaliados 70 indivíduos com episódio de tromboembolismo venoso (grupo caso) e 74 indivíduos sem histórico de doença tromboembólica (grupo controle). O genótipo da MTHFR foi determinado por reação em cadeia da polimerase, seguida de digestão enzimática com a enzima *HinfI* (PCR-RFLP).

**Resultados:** A frequência do alelo T foi 46,0% entre os pacientes e 38,0% entre os controles ( $P=0,92$ ; OR 0,72; 95%CI=0,45-1,15). O genótipo CC (homozigoto normal) foi encontrado em 40,0% dos pacientes e 41,9% dos controles ( $P=0,87$ ; OR 0,92; 95%CI=0,47-1,79). O genótipo CT estava presente em 28,3% dos casos e 40,5% dos controles ( $P=0,16$ ; OR 0,58; 95%CI=0,29-1,17). Os homozigotos para a variante termolábil da enzima (genótipo TT) representaram 31,4% dos indivíduos do grupo caso e 17,6% dos indivíduos do grupo controle ( $P=0,08$ ; OR 2,15; 95%CI=0,98-4,70).

**Discussão e Conclusões:** A frequência dos alelos C e T foi semelhante entre os grupos estudados e a presença do alelo T não representou aumento no risco para TEV. Entre os genótipos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos com e sem histórico de trombose. No entanto, o genótipo TT foi mais frequente no grupo caso que no grupo controle, indicando uma tendência de associação entre o genótipo TT da MTHFR e o desenvolvimento de doenças tromboembólicas. Estes resultados representam o primeiro relato indicativo da frequência deste polimorfismo na população da região estudada, uma vez que não foram encontrados dados na literatura sobre estas frequências, contribuindo para a pesquisa da relação entre este polimorfismo e o TEV.

**ABSTRACT:**

**Introduction:** Venous thromboembolism (VTE) is a multigenic and multifactor disease and main clinical presentations include deep venous thrombosis and pulmonary thromboembolism. More than 60% of VTE cases are related to genetic predisposition and hyperhomocysteinemia is an established risk factor for VTE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme in the homocysteine (Hcy) and folate metabolism. It catalyses the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, a derivative form of folate which acts as a co-factor for remethylation of homocysteine to methionine. A C → T base transition at the nucleotide 677 of the MTHFR gene results in an alanine to valine substitution, generating a thermolabile variant of MTHFR. This thermolabile variant presents a decreased enzymatic activity, resulting in elevated plasma homocysteine levels.

**Materials and Methods:** We studied 70 patients with thromboembolic disease (case group) and 74 individuals with no history of thromboembolism (control group). C677T MTHFR polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction, followed by *HinfI* restriction enzyme digestion (PCR-RFLP).

**Results:** T allele frequency was 46.0% in patients and 38.0% in controls ( $P=0.92$ ; OR 0.72; 95%CI=0.45-1.15). MTHFR genotypes' distribution for case and control groups, respectively, was: 40.0% and 41.9% normal homozygous (CC) ( $P=0.87$ ; OR 0.92; 95% CI=0.47-1.79); 28.3% and 40.5% heterozygous (CT) ( $P=0.16$ ; OR 0.58; 95%CI=0.29-1.17); 31.4% and 17.6% mutant homozygous (TT) ( $P=0.08$ ; OR 2.15; 95% CI=0.98-4.70).

**Discussion and Conclusions:** frequencies of C and T alleles were similar in both groups; presence of T allele did not represent a higher risk for TVE. The higher prevalence of the TT genotype in case group, although not statistically significant, suggests an association between the MTHFR C677T polymorphism and a higher risk for thromboembolic disease. The results presented herein represent the first report on the frequency of this polymorphism in the study population, since no data was available in the literature. These results are also a contribution for the understanding of the relationship between the MTHFR C677T polymorphism and VTE.

## INTRODUÇÃO

A enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) é uma flavoproteína envolvida no metabolismo da homocisteína (Hcy) e do ácido fólico (1, 2). Esta enzima catalisa a formação do 5-metiltetraidrofolato, a forma predominante do folato no plasma, que funciona como co-fator para a remetilação da Hcy em metionina (3). Vários polimorfismos no gene desta enzima já foram identificados, a maioria levando à diminuição da atividade enzimática. Alguns destes polimorfismos vêm sendo relacionados como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças. O polimorfismo C677T da MTHFR pode estar relacionado com hiperhomocisteinemia (HHcy), condição verificada em doenças como Alzheimer e tromboembolismo (4-8).

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença multifatorial e multigênica, que resulta de alterações nos mecanismos de coagulação e anticoagulação. Suas manifestações clínicas habituais são a trombose venosa (TV) e o tromboembolismo pulmonar (TEP). É uma doença bastante comum que acomete cerca de 1/1000 indivíduos anualmente (6, 7, 9, 10).

Vários estudos realizados na última década têm sugerido o polimorfismo C677T da MTHFR como mais um provável fator de risco independente para o desenvolvimento de episódios tromboembólicos. No entanto, essa relação ainda não está totalmente esclarecida (11-19).

Por ser a trombose venosa uma doença bastante comum, influenciada por diferentes combinações de fatores genéticos e adquiridos, é de grande importância a realização de estudos que possam contribuir para o conhecimento da relação entre fatores de risco ainda controversos, como o polimorfismo C677T da MTHFR, e eventos trombóticos.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### *Folato*

O folato é considerado um nutriente essencial, trata-se de uma vitamina hidrossolúvel encontrada em alimentos como vegetais de folhas verdes, frutas cítricas, pão integral, legumes e carnes de fígado e rim, na forma de ácido fólico (3).

No organismo, o folato pode ser encontrado na forma de: i) tetraidrofolato (THF), sua forma biologicamente ativa; ii) 5-metilTHF, a forma predominante no soro e nos tecidos e iii) 5,10-metilenoTHF (Figura 1) (3).

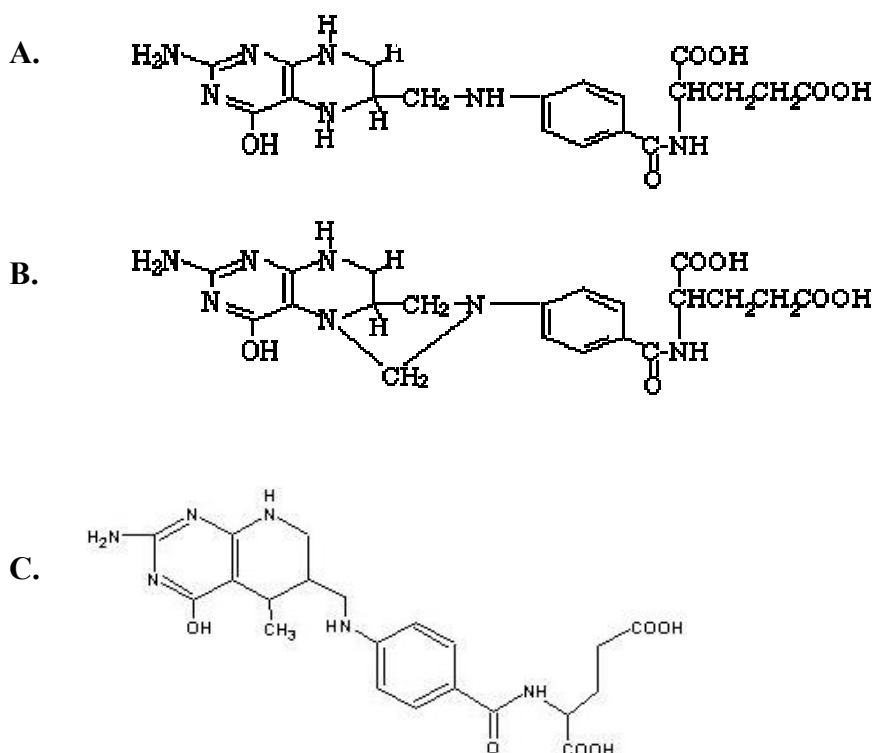
A ingestão inadequada de folato pode resultar em HHcy e hipometilação de DNA, o que pode levar a um aumento no risco de certos tipos de doenças crônicas, alterações no crescimento e desenvolvimento fetal e complicações na gestação (3).

### *Homocisteína*

A Hcy é um aminoácido sulfurado, produto intermediário do metabolismo da metionina. Seu metabolismo intracelular ocorre através da remetilação à metionina e transsulfuração à cisteína. A Hcy não é utilizada na síntese de proteínas e também não é parte significativa da dieta humana, sendo sua única fonte para o organismo a degradação da metionina (4, 5, 20, 21).

A concentração plasmática da Hcy depende de fatores genéticos (defeitos enzimáticos congênitos e gênero) e adquiridos (aporte de ácido fólico ou vitamina B<sub>12</sub>, função renal e consumo de café e tabaco). Os níveis plasmáticos normais de Hcy ficam em torno de 10 µmol/L (4, 5, 21).

O metabolismo da Hcy afeta diversas vias bioquímicas envolvidas na produção de nutrientes essenciais para o funcionamento dos sistemas cardiovascular, esquelético e nervoso. A Hcy está envolvida, por exemplo, na formação da S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupos metil (CH<sub>3</sub>), em diversas reações de metilação cruciais para a síntese de DNA, proteínas e vários neurotransmissores (22, 23).



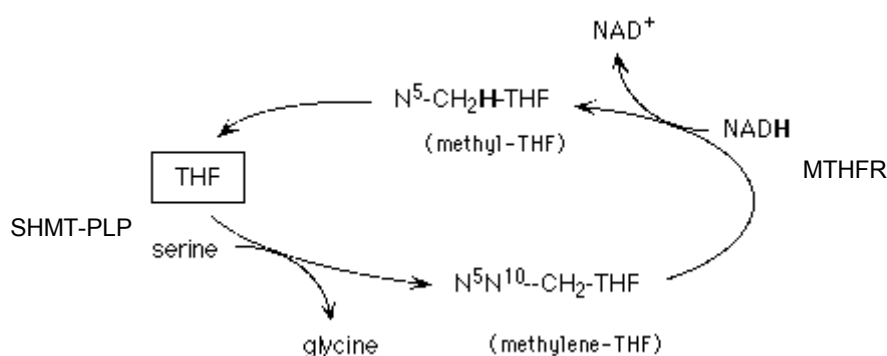
**Figura 1:** estruturas dos compostos derivados do ácido fólico. **A.** Tetraidrofolato; **B.** 5,10-metilenotetraidrofolato; **C.** 5-metiltetraidrofolato.

Adaptado de: [http://web2.airmail.net/uthman/nutritional\\_anemia/nutritional\\_anemia.html](http://web2.airmail.net/uthman/nutritional_anemia/nutritional_anemia.html) e [http://www.nottingham.ac.uk/bennett-lab/nutritional\\_genomics.html](http://www.nottingham.ac.uk/bennett-lab/nutritional_genomics.html)

### ***Metabolismo do Fragmento de Um-Carbono***

As reações dependentes de folato, coletivamente chamadas de metabolismo do fragmento de um-carbono, incluem reações envolvidas no metabolismo de aminoácidos, síntese de purinas e pirimidinas e na formação do agente primário de metilação SAM. A principal função do folato no organismo é ser doador ou acceptor de unidades um-carbono ( $\text{CH}_3$ ) em rotas metabólicas chaves (3).

A molécula aceptora central no metabolismo do fragmento de um-carbono é uma forma poliglutâmica do THF. A conversão do THF em 5,10-metilenoTHF ocorre pela transferência de um  $\text{CH}_3$  de uma serina para o THF. Parte do 5,10-metilenoTHF produzido sofre redução enzimática irreversível ao estado metil oxidado 5-metilTHF pela enzima MTHFR (Figura 2). O grupo metil N-5 do 5-metilTHF só pode ser utilizado metabolicamente para ser transferido para a Hcy no processo de regeneração da metionina (3).



**Figura 2:** Representação esquemática do ciclo do folato. MTHFR: metileno-tetraidrofolato redutase; SHMT-PLP: serina hidroximetiltransferase pirodoxal fosfato-dependente; THF: tetraidrofolato  
Adaptado de: [http://www.hscbklyn.edu/SUNY/Biochem/ALCOHOL/alcohol\\_folate\\_bkgd.html](http://www.hscbklyn.edu/SUNY/Biochem/ALCOHOL/alcohol_folate_bkgd.html)

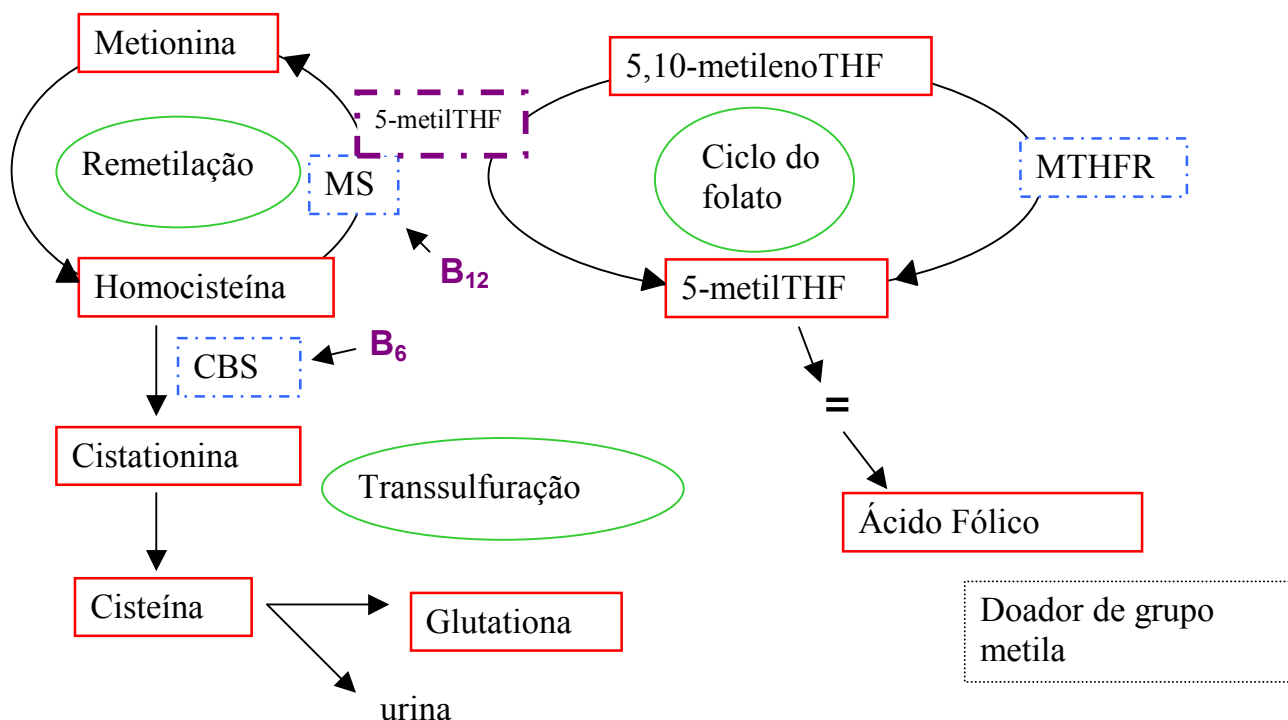


A degradação intracelular da Hcy é feita por duas vias principais: a transsulfuração e a remetilação. A transsulfuração transforma Hcy em cisteína e a remetilação, em metionina (Figura 3) (3-6, 20, 21, 23, 24).

Na 1ª etapa da via de transsulfuração, a Hcy é formada por demetilação da metionina. Nesta etapa estão envolvidas as enzimas ATP/L-metionina-S-adenosiltransferase, várias metiltransferases e a S-adenosil-metionina-hidrolase (3-6, 20, 21, 23, 24).

Na 2ª etapa da transsulfuração, a Hcy interage com a serina para formar a cistationa, que em seguida é transformada em cisteína em uma reação irreversível catalizada pelas enzimas cistationa- $\beta$ -sintase (CBS) e  $\gamma$ -cistationase. A transsulfuração cataboliza o excesso de Hcy que não é utilizado na formação de metionina (3-6, 20, 21, 23, 24).

Para a remetilação existem duas vias e dois doadores de CH<sub>3</sub> estão envolvidos: a betaina e o 5-metilTHF. A metilação realizada pela betaina é catalizada pela betaina-homocisteína metiltransferase (BHMT), expressa somente no fígado. Quando o doador de CH<sub>3</sub> é o 5-metilTHF, a metilação é catalizada pela enzima metionina sintase (MS), essa via de metilação está presente em todos os tecidos. Entre 50 e 80% da Hcy formada é remetilada (3-6, 21, 23, 24).



**Figura 3:** Representação esquemática do metabolismo da Hcy. Em verde: vias bioquímicas; em azul: enzimas participantes em cada etapa; em vermelho: produtos das reações; em roxo: co-fatores. CBS: cistationa-β-sintase; MS: metionina-sintase; MTHFR: metileno tetraidrofolato redutase; THF: tetraidrofolato. Adaptado de <http://www.cardiab.com/content/2/1/2/figure/F3>.

### ***Hiperhomocisteinemia***

A hiperhomocisteinemia (HHcy), ou elevação dos níveis de Hcy totais no plasma, é conhecida por estar associada com o risco ou severidade de doenças cardiovasculares e é considerada um fator de risco independente para doenças vasculares ateroscleróticas, sendo uma das anormalidades pró-trombóticas mais comuns na população em geral. A HHcy resulta da inibição de uma ou mais vias metabólicas da Hcy e é resultado de uma interação

gene-nutriente, sendo o defeito genético mais comum uma mutação no gene da MTHFR (6, 7, 9, 20, 21, 25).

Causas adquiridas de HHcy incluem deficiências nutricionais de vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folato, idade avançada, cirurgias, gravidez, insuficiência renal crônica e uso de medicações antifólicas (6, 7, 23).

Pelo menos nove defeitos enzimáticos distintos foram descritos como causadores de alteração nos níveis Hcy até o presente momento. Os determinantes genéticos principais já estudados são a deficiência da CBS e da MTHFR. Numerosas mutações já foram identificadas nos genes que codificam essas duas enzimas, sendo que a maior parte dessas anormalidades é muito rara. No entanto, os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR e 844ins68 da CBS são bastante prevalentes e a presença da variante polimórfica 677T da MTHFR é o fator genético mais freqüente de HHcy moderada (4, 7).

### ***O Polimorfismo C677T da MTHFR***

A enzima MTHFR tem um importante papel regulatório nos metabolismos do folato e Hcy. Seu gene está localizado no cromossomo 1, na região 1p36.3. A seqüência de cDNA apresenta 2,2 kb e possui 11 éxons e o produto do gene é uma proteína cataliticamente ativa de 77 kDa (1, 8, 26).

A transição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 no éxon 4 do gene da MTHFR resulta na substituição de uma alanina (códon GCC) por uma valina (códon GTC) e gera uma variante termolábil da enzima. A variante polimórfica T, associada à isoforma termolábil da enzima, é herdada de forma autossômica recessiva (4, 8, 20, 26).

Este polimorfismo foi primeiramente descrito por Frost et al, em 1995. O grupo demonstrou que a substituição ocorre aleatoriamente em aproximadamente 38% dos cromossomos não selecionados e que está relacionada com redução da atividade enzimática e aumento da termolabilidade em extratos de linfócitos, tanto no estado de heterozigose como em homozigose, o que foi confirmado pela expressão *in vitro* do cDNA contendo a mutação. Também neste estudo foi descoberto que indivíduos com genótipo homozigoto para o polimorfismo apresentavam elevação nos níveis plasmáticos de Hcy (8).

O polimorfismo C677T MTHFR afeta uma grande parcela da população, com uma frequência geral estimada em 12% de homozigotos TT, com variações consideráveis entre diferentes grupos étnicos (4, 20).

Diversos estudos relatam a frequência dos genótipos deste polimorfismo em indivíduos saudáveis nas mais diferentes populações e apresentam resultados bastante discrepantes, com a frequência de indivíduos homozigotos TT variando de zero a 29,0% (2, 4, 11, 20, 27-32).

Schneider et al, em 1998, avaliaram 881 indivíduos de 16 populações para a presença do polimorfismo C677T da MTHFR e este foi encontrado em todas as populações testadas, com uma frequência relativamente alta em todo o mundo (33).

Estudos sobre o polimorfismo C677T da MTHFR na população brasileira são escassos. Pereira et al, em 2004, estudaram indivíduos saudáveis, sendo 87 caucasianos, 83 mulatos e 40 afro-descendentes. O genótipo TT foi encontrado em 11% dos caucasianos, 3,8% dos mulatos e em nenhum indivíduo entre os afro-descendentes (34). Arruda et al pesquisaram em 327 indivíduos saudáveis a frequência de homozigose para o alelo mutante T e encontraram frequência de homozigotos de 10% no grupo de indivíduos caucasianos,

1,5% nos afro-descendentes e 1,2% nos índios (35). Tavares et al estudaram uma população indígena isolada da Amazônia, encontrando uma prevalência do genótipo TT de 14% (36). Um estudo realizado no Rio Grande do Sul em 2002, envolvendo 29 indivíduos saudáveis encontrou 10% de portadores do genótipo TT (37).

Vários estudos têm sido realizados buscando uma relação entre a presença da variante termolábil da MTHFR e risco para doenças. Alguns pesquisadores encontraram nas populações estudadas uma maior prevalência do genótipo TT do polimorfismo C677T em pacientes com doenças cardiovasculares, quando comparados a controles saudáveis, chegando a sugerir um risco três vezes maior para essas doenças, quando da presença do genótipo TT (11, 12, 31, 38-40).

No entanto, diversos pesquisadores não encontram diferenças significativas na frequência do alelo mutante ou no número de homozigotos entre indivíduos com e sem histórico de doença vascular (13-16, 41). Mesmo em estudos realizados no mesmo país, é possível encontrar discrepâncias neste sentido (5, 30). Essas aparentes inconsistências podem ser explicadas pelas diferenças entre as populações estudadas, tanto no que diz respeito ao *background* genético como aos hábitos alimentares, além do fato de grande parte dos estudos já realizados a este respeito terem sido conduzidos com amostras pequenas (5).

### ***Trombose Venosa***

Danos na parede dos vasos, mau fluxo sanguíneo e hipercoagulabilidade foram propostos no século XIX como os três mecanismos que levam à trombose, sendo os últimos dois predominantes na trombose venosa (TV). Ainda hoje, estes fatores são considerados desencadeadores de trombose (42).

A TV é uma doença relativamente comum, afetando de 50 a 150 indivíduos em cada 100.000 na população global. Nos Estados Unidos da América, afeta 1 a 2 indivíduos em cada 1.000, sendo a terceira doença cardiovascular mais comum, com aproximadamente 300.000 hospitalizações e 50.000 mortes por ano (6, 10). No Brasil, a TV é a quinta causa de hospitalização por doenças cardiovasculares (43). As manifestações clínicas habituais são a trombose profunda de membros inferiores e embolia pulmonar (7).

Trata-se de uma doença multifatorial. Apesar de sua patogênese ainda não estar totalmente elucidada, existem evidências de que a ocorrência de eventos trombóticos é influenciada por uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, defeitos herdados ou adquiridos em um ou mais membros das cascatas de coagulação e anticoagulação (6, 7, 9).

Os fatores de risco adquiridos incluem gravidez, cirurgias, uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal, imobilização prolongada, câncer, idade avançada, fraturas, doenças mieloproliferativas e síndrome nefrótica (6, 7, 9).

O termo “trombofilia” é usado para descrever uma predisposição aumentada, normalmente genética, para a ocorrência de trombose venosa, que caracteristicamente ocorre em idade precoce, antes dos 40-45 anos. São considerados fatores de risco hereditários para trombofilia: i) defeitos genéticos nos inibidores de coagulação como a antitrombina, proteína C e proteína S, ii) resistência à proteína C ativada causada por uma mutação no fator V da coagulação, iii) polimorfismos nos genes da protrombina e MTHFR, que elevam os níveis plasmáticos de protrombina e Hcy, respectivamente, iv) outros fatores mais raros, como desfibrinogênias e deficiência do co-fator II. A predisposição hereditária para TV pode estar relacionada a alterações em um ou mais genes (6, 7, 9, 25).

O aumento do risco trombótico relacionado aos fatores genéticos varia de menos de 1 a mais de 10%. Esse aumento de risco é considerável e significativo, mas insuficiente para causar trombose em todos indivíduos portadores desses fatores. A maioria destes indivíduos jamais desenvolverá trombose, deixando claro que interações entre mais de um fator genético ou entre fatores genéticos e adquiridos determinam quando e como um indivíduo sofrerá de TV (7).

### ***Mecanismos Trombogênicos da Hiperhomocisteinemia***

Níveis elevados de Hcy total estão associados com aumento no risco de doenças ateroscleróticas vasculares e agem independentemente de outros fatores de risco conhecidos. Segundo Boushey et al, um aumento de 5  $\mu\text{mol/L}$  na Hcy plasmática equivale a um aumento de 0,5 mmol/L nos níveis de colesterol total e aumenta em 33% o risco de doença vascular (44).

A HHcy pode provocar eventos trombóticos através diversos mecanismos que afetam a viabilidade e a função das células endoteliais e a ativação de plaquetas. Esses mecanismos incluem inibição da síntese de prostaciclina e óxido nítrico (potentes agentes antiagregantes e vasodilatadores), supressão da expressão do anticoagulante heparan sulfato na parede dos vasos, ativação do fator V, inibição da ativação da proteína C, regulação negativa da expressão da trombosmodulina, aumento na agregação plaquetária, problemas na regulação do fator relaxante derivado do endotélio e estimulação da proliferação de células de músculo liso, entre outros (5, 24).

Experimentos realizados com modelos animais de HHcy moderada mostraram vasoreatividade endotélio-dependente e regulação do fluxo sanguíneo prejudicadas, seja por

deficiência de vitaminas, interrupção de genes ou ambos. A Hcy diminui o relaxamento vascular em resposta a estímulos severos assim como inibe a ativação dependente de trombosmodulina da proteína C em células endoteliais aórticas (20, 45). Estudos com modelos de babuínos mostraram que infusões intravenosas de Hcy levam à descamação do endotélio, proliferação de células de músculo liso e trombose arterial (20, 24).

Outro mecanismo pelo qual a Hcy pode causar danos à parede vascular e tromboembolismo pode ser a formação de homocistina (dímero oxidado de Hcy), a Hcy sofre autooxidação quando adicionada ao plasma, o que leva à formação de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e produção de radicais livres. A formação desses radicais livres de oxigênio pode causar danos vasculares, proliferação de células de músculo liso e aumento da trombogenicidade. Este processo também altera os níveis de colesterol LDL e causa danos diretos às células (4, 20, 46).

Estudos *in vitro* com culturas de células endoteliais mostram que a Hcy tem efeitos tóxicos sobre essas células (5). Starkebaum et al, em 1986, examinaram em culturas de células endoteliais se os efeitos tóxicos da Hcy poderiam resultar da formação e da ação de peróxido de hidrogênio, uma vez que a oxidação catalisada por cobre de outros tióis pode levar à redução de oxigênio com produção de peróxido de hidrogênio. Os resultados deste estudo indicaram que o cobre catalisa uma oxidação oxigênio-dependente da Hcy e que durante essa reação é gerado peróxido de hidrogênio, o que poderia causar danos às células endoteliais (45).

Uma outra hipótese também envolve formação de radicais livres com resultante diminuição da biodisponibilidade de NO (óxido nítrico). A Hcy inibe a expressão da enzima antioxidante glutathione-peroxidase (GPx-1) o que pode levar a um aumento de espécies reativas de oxigênio que inativam o NO e promovem disfunção endotelial. Weiss et al, em



2001, testaram a superexpressão de GPx-1 em camundongos com HHcy induzida e conseguiram restaurar a função endotelial normal (46).

### ***Hiperhomocisteinemia e Trombose Venosa***

A associação entre Hcy e doença trombótica foi relatada há mais de 30 anos e vários estudos têm demonstrado que a HHcy é um fator de risco para TV (11, 25-50).

Simioni et al (47) e Den Heijer et al (48) claramente demonstraram que a HHcy moderada estava associada com um aumento no risco de TV. Nos dois estudos, um aumento de 2,5 vezes no risco de trombose foi encontrado em pacientes com níveis de Hcy plasmática excedendo 18,5  $\mu\text{mol/L}$  e um aumento de 3 a 4 vezes do risco foi encontrado para níveis acima de 20  $\mu\text{mol/L}$  quando comparados com indivíduos com níveis normais de Hcy plasmática. 10% dos pacientes com TVP de Den Heijer e 25% dos pacientes com trombose de Simione tinham concentrações de Hcy acima de 18,5  $\mu\text{mol/L}$ .

Em um outro estudo, Den Heijer et al relacionaram a HHcy com TV recorrente, 25% dos pacientes apresentavam concentrações de Hcy em jejum 90% acima das concentrações do grupo controle e isto estaria associado a um risco duas a três vezes maior de TV recorrente (49). Uma meta-análise realizada por Den Heijer e colaboradores, envolvendo trabalhos publicados entre 1984 e 1997, apresentou resultados que indicam que a HHcy é um fator de risco para TV (50). Shmeleva et al, em um estudo prospectivo de 2003, demonstraram que a HHcy é um fator de risco freqüente e significativo para trombose venosa e arterial idiopática e recorrente no norte da Rússia (11).

A HHcy é uma anormalidade bastante comum que afeta 5% da população e interage com outros fatores pró-trombóticos herdados e adquiridos para aumentar o risco para TV (5, 7, 20, 24). Estima-se que pacientes com HHcy têm um risco duas a três vezes mais elevado de TV e este risco aumenta quanto existe um efeito sinérgico com a presença concomitante de outros fatores predisponentes como a presença do fator V de Leiden ou o polimorfismo G20210A da protrombina (9, 51).

### ***Polimorfismo C677T MTHFR, Hiperhomocisteinemia e Trombose Venosa***

Vários estudos realizados nos últimos dez anos a respeito da associação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e episódios de TV apresentam resultados bastante controversos.

Brattström et al, em 1998, realizaram uma meta-análise com os resultados de estudos que documentavam a concentração de Hcy plasmática em relação aos genótipos do polimorfismo da MTHFR e de estudos que avaliavam o risco de doenças cardiovasculares para os genótipos TT e CC. Os resultados desta meta-análise sugerem que apesar dos portadores do genótipo TT apresentarem níveis 25% mais altos de Hcy plasmática, eles não apresentaram maior risco para doença cardiovascular. Os autores sugerem que a HHcy observada em pacientes com doenças vasculares possa ser resultado da associação entre níveis elevados de Hcy e outras características do perfil de pessoas com risco de doença cardiovascular (idade, fumo e pressão arterial elevada). Sugerem também que uma disfunção renal causada por hipertensão e aterosclerose poderia ser responsável pela HHcy, uma vez que os rins são responsáveis por 70% da metabolização da Hcy plasmática (52).

Em 2002, Wald, Law e Morris, realizaram outra meta-análise que chegou a conclusões diferentes. Este análise incluiu estudos nos quais a prevalência do polimorfismo da MTHFR foi determinada em 16.849 pacientes e controles e estudos prospectivos (com 3.820 participantes) relacionando Hcy e risco de doenças vasculares (doença cardíaca isquêmica, trombose venosa profunda com e sem embolia pulmonar e derrame). Os resultados mostraram associação entre a concentração de Hcy plasmática e doenças cardiovasculares e que o polimorfismo no gene da enzima MTHFR está associado com um aumento moderado (20%) na Hcy plasmática. Este estudo mostra também um risco significativamente aumentado para doença cardíaca isquêmica e trombose venosa profunda (com ou sem embolia pulmonar) em pessoas portadoras desta mutação (13).

A HHcy, resultante de alterações genéticas ou nutricionais no metabolismo da Hcy, foi identificada como um fator de risco independente para doenças tromboembólicas. No entanto, as causas da HHcy e o seu significado no desenvolvimento de episódios trombóticos ainda não estão estabelecidos. Estudos sobre a relação do polimorfismo C677T da MTHFR com TV em vários países apresentam resultados divergentes. Existem poucas referências na literatura científica que apresentem dados relacionando a prevalência do polimorfismo C677T da MTHFR com risco de desenvolvimento de trombose venosa na população brasileira. Para o estado do Rio Grande do Sul não foram encontradas referências a este respeito.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar a frequência do polimorfismo C677T da enzima metilenotetraidrofolato redutase em indivíduos com e sem histórico de trombose venosa.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a frequência dos alelos C e T em indivíduos com episódio de trombose venosa (grupo caso) e em indivíduos sem histórico de trombose venosa (grupo controle).
- Determinar a frequência dos genótipos CC, CT e TT nos grupos estudados.
- Verificar se existe relação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e trombose venosa.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

A ser submetido ao periódico *Blood coagulation and fibrinolysis*

**Original Article****Full Title:**

**“Prevalence of the MTHFR C677T polymorphism in patients with venous thromboembolism from the south of Brazil”**

**Short Title:**

**“MTHFR C677T and VTE in the south of Brazil”**

**Authors:**

Amanda Lopes<sup>1,2</sup>, Terezinha P Munhoz<sup>2,3</sup>, Virgínia M Schmitt<sup>2,3</sup>

1PPGBCM, 2Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), 3Faculdade de Farmácia; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

**Corresponding author:**

Virgínia Minghelli Schmitt

Av. Ipiranga, 6681

Instituto de Pesquisas Biomédicas, 2º andar

Laboratório de Biologia Molecular

90610-000, Porto Alegre, Brazil

***Abstract***

Methylenetetrahydrofolate reductase is a key enzyme in homocysteine and folic acid metabolism. It catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, a cofactor for the methylation of homocysteine to methionine. A C→T base transition at the nucleotide 677 of the methylenetetrahydrofolate reductase gene results in an alanine to valine substitution generating a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. This variant presents a decreased enzymatic activity, leading to elevated plasma homocysteine levels. Mild hyperhomocysteinemia resulting from genetic and/or environmental factors is an established risk factor for venous thromboembolism. The correlation between the C677T polymorphism and venous thrombosis, however, remains unclear. The aim of this study was to determine the frequency of the C677T MTHFR gene single nucleotide polymorphism in 144 individuals (70 patients and 74 controls) from the south of Brazil and investigate whether this mutation is a risk factor for VTE in this population. The methylenetetrahydrofolate reductase genotyping was performed by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The prevalence of TT homozygous in patients was 31.4% and 17.5% in controls ( $P=0.08$ ; OR=2.15; 95%CI=0.98-4.70). The mutant allele (T) frequency was 46.0% and 38.0% in cases and controls, respectively ( $P=0.92$ , OR 0.72; 95%CI=0.45-1.15). In our study, T allele did not represent a risk for TVE, but there was a trend toward an increased risk for venous thromboembolism for the TT genotype.

Key Words: Venous thrombosis, polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR C677T, hyperhomocysteinemia, homocysteine.

## ***1. Introduction***

Venous thromboembolism (VTE) results from defects in the coagulation and anti-coagulation cascades, affecting 1-2/1000 individuals globally each year [1]. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism are the major clinical presentations of VTE, resulting from the interaction of hereditary and acquired factors like surgery, pregnancy, contraceptives, cancer and immobilization. Hereditary factors can be classified as classical (Protein C and S deficiency or dysfunctions) and polymorphisms [1-4].

Elevated plasma homocysteine levels have been associated with an increased risk of venous thromboembolism. Hyperhomocysteinemia may result from inadequate folic acid intake, renal insufficiency and some gene-based mechanisms [2, 5].

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme in homocysteine (Hcy) and folic acid metabolism. It catalyses the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, the circulating form of folate, which is needed for methionine synthase (MS) to convert homocysteine in methionine [6-8]. Several polymorphisms have been described as a cause of reduced activity of this enzyme, particularly a C→T transition at nucleotide 677, which results in an alanine to a valine substitution in the enzyme. This polymorphism is associated with reduced *in vitro* activity of the enzyme, its thermolability and hyperhomocysteinemia [2, 3, 6, 7, 9, 10]. The frequency of occurrence of the mutant allele (T) has been shown to vary among different ethnic groups around the world [11, 12].

The MTHFR C677T polymorphism is clearly associated with hyperhomocysteinemia and this condition is considered an established risk factor for venous thrombosis. However, the role of this polymorphism as an independent risk factor for venous thrombosis or as a modifier of thrombotic risk conferred by well-established thrombophilic disorders is controversial [2, 7, 3-15]. Although some studies have found an association between TT genotype and increased risk for venous thrombosis [16-23], others have failed to confirm this relationship [24-33].

Here, we present the results of a case-control study designed to evaluate the prevalence of the MTHFR C677T polymorphism in venous thromboembolism patients and controls with no history of VTE, and its relation with VTE in the study population.



## 2. Methods

### 2.1 Population

This case-control study included 70 patients and 74 controls recruited from 2001 through 2003. Case group individuals were patients attending the Cardiovascular Surgery or Hematology Ambulatory, and from the Coronarian Treatment Unit at Hospital São Lucas of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil); controls were recruited among Genesis Project participants (a cohort study of the Institute of Geriatrics and Gerontology – PUCRS), with no history of thromboembolic event. Subjects reporting surgery in the past year, malignant disorder or antiphospholipid syndrome were not eligible for the study.

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Research of this University and a written informed consent was obtained from all subjects.

### 2.2 Specimen Collection and Genotype Analysis

Peripheral blood was collected into EDTA-containing tubes. Genomic DNA was extracted with *GFX Genomic Blood DNA Purification kit* according to the manufacturer's protocol (Amersham Biosciences, EUA) and was stored at -20°C. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction enzyme digestion (RFLP - restriction fragment length polymorphism).

For PCR, about 1µg of genomic DNA was incubated in a total reaction volume of 30 µL containing DNA, 1.5 U *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, Brazil), 100 µM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 15 pmol of each forward (5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA - 3') and reverse (5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG - 3') primers. PCR amplification was accomplished using 30 cycles consisting of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 62°C and 2 min extension at 72°C (MJ Research PT200). An initial denaturation at 95°C for 5 min and a final extension step at 72°C for 10 min were performed. The PCR amplified product is a fragment of 198bp.

The C-T substitution at position 677 of MTHFR gene creates a *HinfI* restriction site at the T allele. The amplified product derived from the mutant gene is cleaved into fragments of 175 and 23bp. The wild-type gene product is not digested, so the 198 bp is

observed (Fig. 1). The restriction digestion was performed in a total volume of 30  $\mu$ l and consisted of 20  $\mu$ l PCR product, 10 units of *Hinf*I restriction enzyme (New England Biolabs, UK), 5 mM NaCl, 1 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM DTT. Reactions were incubated at 37°C for 4h. Restriction fragment size analysis was performed by PAGE (10%), staining with ethidium bromide and under UV light.

### 2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 11.0. The allele and genotype frequencies were obtained by direct count. The genotype distribution and allele frequencies were compared using the chi-square test. *Odds ratio* was estimated with 95% confidence interval as a measure of risk. All statistic tests were two sided and *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

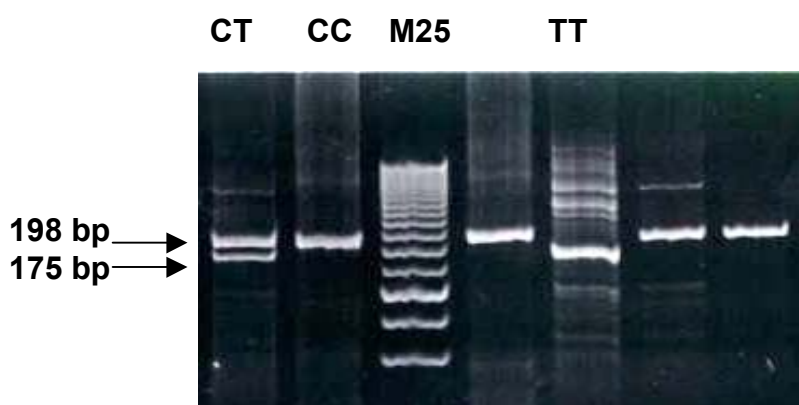


Figure 1- Ethidium bromide stained polyacrilamide gel electrophoresis (10%) observed under UV light representing C677T MTHFR genotypes. CC- Normal homozygous (wild-type), 198 bp; CT- Heterozygous, 198 and 175 bp; TT- Mutant homozygous, 175 bp; Ladder 25bp.

### **3. Results**

#### *3.1 Characteristics of participants*

Demographic, clinical and behavioral characteristics of participants are presented in Table 1. Mean age was 52.99 years ( $\pm 20.9$ ) for patients and 51.33 years ( $\pm 20.04$ ) for controls. No significant differences were observed in mean age, gender, ethnics or use of oral contraceptive. The number of individuals with cardiopathy, hypertension and sedentary life, and former or current smokers were significantly higher in the case group ( $P \leq 0.05$ ), despite being risk factors for arterial and not for venous thrombosis.

#### *3.2 Allele and genotype distribution*

The overall frequency for the T allele in the case group was 0.46 and 0.38 in the control group ( $P=0.92$ ). Although T allele frequency was higher in patients than in controls, the difference was not statistically significant. The associated risk (OR) for VTE of T allele was 0.72 (95%CI=0.45-1.15) (Table 2).

TT genotype was found in 22 individuals of case group and 13 of control group, CT genotype, in 20 cases and 30 controls, and CC genotype, in 28 cases and 31 controls. The difference of TT homozygosity frequency in patients and in controls was not statistically significant ( $P=0.08$ ) (Table 2).

The overall OR for the dominant hypothesis (CC *versus* CT+TT) was 0.92 ( $P=0.87$ ; 95%CI=0.47-1.79) and for the recessive hypothesis (TT *versus* CT+CC), 2.15 ( $P=0.08$ ; 95%CI=0.98-4.70). The *odds ratio* is presented as an estimate of the relative risk of the TT genotype in relation to the risk of the CT and CC genotypes for VTE.

Analysis of the Hardy-Weinberg equilibrium showed a significant genotype distribution for study population (chi-square 6.127;  $p < 0.05$ ) and patient group (chi-square 6.713;  $p < 0.05$ ), but not significant for control group (chi-square 0.766;  $p > 0.05$ ).

### **4. Discussion**

Hyperhomocysteinemia is an established risk factor for venous thromboembolism. Heterozygosity and/or homozygosity for mutations in enzymes involved in homocysteine

metabolism may confer an increased risk for VTE by causing hyperhomocysteinemia. The MTHFR C677T polymorphism has been shown to be related to increased plasma homocysteine levels, determining perhaps a predisposition to thrombosis [1-3, 7, 9, 34]. In our study we determined the prevalence of this polymorphism in a south Brazilian population and investigated its relationship with TVE in this population. As far as we are aware, this is the first study associating MTHFR polymorphism and VTE in south Brazilian population.

The frequency of the MTHFR C677T polymorphism in the global population is reported to vary greatly [5, 11, 12, 20, 24]. Our study group was predominantly of Caucasian origin, in consequence of an important European immigration in the past, especially from Italy, Portugal, Germany and Spain. Studies conducted with healthy individuals from Spain [35], Italy [36], Argentina [37] and North America (women with Mexican ancestry) [11] reported genotype and allele frequencies similar to our study (Table 3). It is known that Argentina and Mexico also had an important Italian and Spanish immigration, so the genetic background of Mexican and Argentinean individuals could be similar to our study group. This fact could partially explain the similar reported results. On the other hand, studies involving healthy populations from China (Hong Kong and Wuhan) [12, 38], Greece [39], and Australia [40] also reported frequencies similar to our study population, despite having a different genetic background from ours. Studies conducted with Brazilian Indians [12, 41] also reported frequencies similar to those observed in our study. This was an intriguing result, once no individual from our study reported indigenous ancestry.

Many studies on the MTHFR C677T polymorphism referred prevalence of T allele and TT genotype different from those observed in our study. Lower frequencies were reported in studies with Polynesian, Indonesian and other Asian populations [12], North American women with Asian or African ancestry [11] and in the United Kingdom [12]. Studies performed in different African countries showed very low frequencies of the T allele and TT genotype, being the former even close to zero [12] (Table 3).

The role of the MTHFR C677T polymorphism as a risk factor for cardiovascular diseases and thrombophilia remains controversial, but some studies suggest it is an independent risk factor for these diseases [16-19, 21-23]. Gallagher et al [42], studying an Irish population, demonstrated that the frequency of the homozygous thermolabile genotype

(TT) is significantly higher in patients with premature coronary heart disease than in controls. Two meta-analysis were presented by Wald et al [20], including 92 studies with patients with cardiovascular disease (stroke, ischemic heart disease and deep vein thrombosis), and by Den Heijer et al [43], including 53 studies with patients with venous thrombosis. Both analyzes concluded that the TT genotype significantly increases the risk for these diseases.

The results of the present study do not statistically demonstrate MTHFR C677T polymorphism as a risk factor for TVE, but suggest that this polymorphism tends to be associated with higher incidence of thrombotic episodes. We do acknowledge, however, that the sample is small to have enough statistical power to obtain sufficiently narrow confidence intervals. Furthermore, patient group was not in Hardy-Weinberg equilibrium, with a lower frequency of heterozygous and a higher frequency of TT homozygous than expected. This imbalance points to TT genotype as a risk factor for venous thrombosis in this population.

Several studies agree to say that the MTHFR genotypes *per se* are weakly or even not associated with TVE [27, 28, 30-32, 44]. In some studies, the TT genotype is considered to be risk factor for TVE only in synergy with other thrombophilic factors [25, 29]. Ramacciotti et al [33] found that TT genotype does not increase risk of venous thrombosis (VT) in cancer patients. Joseph et al [45] came to the same conclusion when analyzing patients with and without VT after undergoing lower limb arthroplasty. Mansilha et al [46] suggested that the C677T polymorphism is not associated with increased risk for recurrent TVE in young people. Other studies also demonstrated that this polymorphism is not an independent risk factor for other clinical situations, such as coronary artery disease [26] or spontaneous abortions [47]. Kalina & Geizel [48] suggested that TT genotype is not an independent risk for coronary heart disease (CHD), but T allele is more frequent in CHD cases who gotten over a myocardial infarction (MI) than in those CHD cases without MI.

The nutritional status has been reported to influence the homocysteine serum levels and consequently the risk for some associated diseases [6, 49, 50]. Brazil is a developing country, with part of the population living in poverty and conditions such as families with large number of individuals, unemployment and low *per capita* income. These situations may prevent the more underprivileged population from obtaining a diversified diet which could result in chronic nutritional deficiency [51]. While we did not measure either

homocysteine or folate levels, nutritional deficiency is likely to be common in these patients and controls, once the majority of our study population was from a disadvantaged layer.

In a recent study, Souto et al [52] performed a genomewide linkage scan for new genes affecting variation in plasma Hcy levels and found new candidate genes which could contribute as risk factors for VTE. According to this group, the MTHFR C677T polymorphism is not the major genetic determinant of the quantitative variation in Hcy plasma levels. They found evidence that another gene, *NNMT*, coding for nicotinamide N-methyltransferase enzyme, located in the region 11q23, also influences plasmatic Hcy levels, and is probably the major genetic determinant of this phenotype in the study population (Spanish subjects). Interestingly, this region (11q23) has been linked to the risk for TVE in a gene scan performed previously.

This new information, together with the controversial results presented in the past decade on this subject, shows that more and larger studies are needed to evaluate the role of genetic polymorphisms in the development of thromboembolic events and cardiovascular disease in general.

### ***5. Acknowledgements***

We wish to acknowledge the Hematology and Cardiovascular Surgery Departments and the Coronarian Treatment Unit of Hospital São Lucas (PUCRS). We also thank the staff and students of the Molecular Biology Laboratory (IPB-PUCRS) for their technical assistance.

Table 1 - Demographic data of case and control groups.

	Patients (%)	Controls (%)	<i>P</i>
Age - years ( $\pm$ SD)	52.99 ( $\pm$ 20.9)	51.33 ( $\pm$ 20.04)	—
Gender			
male	33 (47.1)	30 (40.5)	0.50
female	37 (52.8)	44 (59.4)	
Ethnic			
Caucasian	64 (91.4)	69 (93.2)	0.76
group			
Afro-	6 (8.5)	5 (6.7)	
descendents			
Smokers (current or former)	40 (57.1)	28 (37.8)	0.03*
Hypertension	25 (35.7)	7 (9.3)	0.04*
Cardiopathy	21 (30.0)	2 (2.6)	0.04*
Sedentary life	58 (82.8)	48 (64.8)	0.02*
OC use	11 (15.7)	20 (27.0)	1.83
Total	70	74	

OC- oral contraceptive use

\*statistically significant

Table 2 - Frequency of the MTHFR C677T genotypes in patients and control individuals.

	Patients n=70 (%)	Controls n=74 (%)	<i>P</i> *	OR (95% CI)
<b>Genotypes</b>				
CC	28 (40.0)	31 (41.9)	0.87	0.92 (0.47 – 1.79)
CT	20 (28.5)	30 (40.5)	0.16	0.58 (0.29 – 1.17)
TT	22 (31.4)	13 (17.5)	0.08	2.15 (0.98 – 4.70)
<b>Alleles</b>				
C	76 (54.0)	92 (62.0)	0.918	0.72 (0.45-1.15)
T	64 (46.0)	56 (38.0)		

\* Statistically significant when  $P \leq 0.05$

CC- homozygous for the wild-type allele; CT- heterozygous; TT- homozygous for the derivative allele ; C- wild-type allele; T- derivative allele



Table 3- Genotype and T allele frequency in healthy subjects worldwide.

Reference	Study Location ( <i>n</i> )	Genotype frequency CC/CT/TT (%)	T allele frequency (%)
Genoud et al, 2000 [37]	Argentina (418)	41.4 / 42.8 / 15.8	37.0
Almeida et al, 2005 [40]	Australia (240)	40.8 / 47.1 / 12.1	35.6
Motti et al, 1998 [36]	Italy (155)	29.3 / 54.8 / 16.1	44.0
Serra et al, 2002 [35]	Spain (214)	33.0 / 42.0 / 16.0	41.0
Dedoussis et al, 2004 [39]	Greece (574)	41.5 / 48.0 / 10.5	35.0
Esfahani et al, 2003 [11]	EUA Origin:		
	Mexican (193)	37.8 / 44.0 / 18.1	40.2
	Caucasian (139)	49.6 / 43.2 / 7.2	28.8
	Asian (53)	60.4 / 35.8 / 3.8	21.7
	African (48)	81.3 / 18.8 / 0.0	9.4
Sun et al, 2005 [38]	China (114)	55.3 / 27.2 / 17.5	38.0
Schneider et al, 1998 [12]	United Kingdom (94)	47.9 / 44.7 / 7.4	18.6
	Africa (234)	86.8 / 13.2 / 0.0	6.6
	Asia (279)	62.7 / 33.0 / 4.3	20.8
	Minor Asia (67)	91.0 / 8.9 / 0.0	4.5
	Australasia (85)	90.6 / 9.4 / 0.0	4.7
	Americas (76)	48.7 / 38.2 / 13.1	32.2

CC- homozygous for the wild-type allele; CT- heterozygous; TT- homozygous for the derivative allele ; C- wild-type allele; T- derivative allele

## 6. References

- [1] Press, RD, DeLoughery TG. Thrombotic Risk Assesment. Molecular and Conventional Testing for a Common, Treatable Genetic Disease. Clin Lab 2000; **1**:8-12.
- [2] Franco RF, Reitsma PH. Genetic Risk Factors of Venous Thrombosis. Hum Genet 2001; **109**:369-384.
- [3] Robetorye R, Rodgers GM. Update on Selected Inherited Venous Thrombotic Disorders. Am J Hematol 2001; **68**:256-268.
- [4] Simioni P. The molecular genetics of familial venous thrombosis. Baillieres Clin Haematol 1999; **12**(3): 479-503.
- [5] Ray JG, Shmorgun D, Chan WS. Common C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and the Risk of Venous Thrombosis: Meta-Analysis of 31 Studies. Pathophysiol Haemost Thromb 2002; **32**:51-58.
- [6] Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; **10**:111-113.
- [7] Makris M. Hyperhomocysteinemia and Thrombosis. Clin Lab Haem 2000; **22**: 133-143.
- [8] Bailey LB, Gregory JF. Folate Metabolism and Requirements. J Nutr 1999; **129**:779-782.
- [9] Merkel M. Homocysteine as a risk factor of cardiovascular disease. Int Congr Ser 2004; **1262**: 376-379.
- [10] D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and Thrombotic Disease. Blood 1997; **90**:1-11.
- [11] Esfahani ST, Cogger EA, Caudil MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. J Am Diet Assoc 2003; **103**:200-207.
- [12] Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide Distribution of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation. Am J Hum Genet 1998; **62**:1258-1260.

- [13] Simioni P, Prandoni P, Burlina A, Sardella C, Ferrari V, Benedetti L, et al. Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. A case-control study. *Thromb Haemost* 1996; **76**(6):883-886.
- [14] Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Boss GMJ, Briet E, Reitsma PH, et al. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Deep-vein Thrombosis. *N Engl J Med* 1996; **334**:759-762.
- [15] De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes and Management. *Blood* 1996; **87**:3536-3544.
- [16] Kluijtmans LAJ, Kastelein JJP, Lindemans J, Boers GHJ, Heil SG, Bruschke AVG, et al. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase in Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997; **96**:2573-2577.
- [17] Shmeleva VM, Kapustin SI, Papayan LP, Sobczynska-Malefora A, Harrington DJ, Savidge G. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. *Thromb Res* 2003; **111**:351-356.
- [18] Angeline T, Jeyaraj N, Granito S, Tsongalis GJ. Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians. *Exp Mol Pathol* 2004; **77**:85-88.
- [19] Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1993 Oct; **88**(4Pt1):1463-1469.
- [20] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; **325**:1202-1206.
- [21] Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frost P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; **58**(1):35-41.
- [22] Arruda VR, von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzachi JM, Costa FF. The mutation Ala677-->Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; **77**(5):818-821.

- [23] Margaglione M, D'Andrea G, d'Addeda M, Giuliani N, Cappucci G, Iannaccone L, et al. The Methylenetetrahydrofolate Reductase TT677 Genotype Is Associated with Venous Thrombosis independently of the Coexistence of the FV Leiden and the Prothrombin A 20210 Mutation. *Thromb Haemost* 1998; **79**(5):907-911.
- [24] Brattström L, Wilcken DEL, Öhrvik J, Brudin L. Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Mutation Leads to Hyperhomocysteinemia but not to Vascular Disease. *Circulation* 1998; **98**:2520-2526.
- [25] Akar N, Akar E, Misirhoglu M, Aveu F, Yalein A, Cin S. Search for Genetic Factors Favoring Thrombosis in Turkish Population. *Thromb Res* 1998; **92**:79-82.
- [26] Wilcken DEL, Wang XL, Sim AS, McCredie RM. Distribution in Healthy and Coronary Populations of the Methylenetrtrahydrofolate reductase (MTHFR) C<sub>677</sub>T Mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**:878-882.
- [27] Boncoraglio G, Carriero MR, Chiapparini L, Ciceri E, Ciusani E, Erbetta A, et al. Hyperhomocysteinemia and other thrombophilic risk factors in 26 patients with cerebral venous thrombosis. *Eur J Neurol* 2004; **11**: 405-409.
- [28] Hsu TS, Hsu LA, Chang CJ, Sun CF, Ko YL, Kuo CT, et al. Importance of Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Venous Thromboembolism in a Taiwanese Population. A Case-Control Study. *Thromb Res* 2001; **102**:387-395.
- [29] Fujimura H, Kawasaki T, Sakata T, Ariyoshi H, Kato H, Monden M et al. Common C677T Polymorphism in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Increases the Risk for Deep Vein Thrombosis in Patients with Predisposition of Thrombophilia. *Thromb Res* 2000; **98**:1-8.
- [30] Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, et al. Single and Combined Prothrombotic Factors in Patients With Idiopathic Venous Thromboembolism. Prevalence and Risk Assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**:511-518.
- [31] Kluijtmans LAJ, Den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ, Rosendaal FR. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase and Factor V Leiden in the Risk of Deep-Vein Thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; **79**(2):254-258.

- [32] Keijzer MB, Den Heijer M, Blom HJ, Bos GM, Wilems HP, Gerrits WB, et al. Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2002; **88**(5):723-728.
- [33] Ramacciotti E, Wolosker N, Puech-Leao P, Zeratti EA, Gusson PR, del Giglio A, et al. Prevalence of factor V Leiden, FII G20210A, FXIII Val34Leu and MTHFR C677T polymorphisms in cancer patients with and without venous thrombosis. *Thromb Res* 2003; **109**:171-174.
- [34] Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, Atherosclerosis and Thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; **81**(2):165-176.
- [35] Serra JD, Lorente BF, Alapont M, Domínguez G, Gomis RV, Piquer DC, et al. Concentración plasmática de homocisteína: relación con los niveles plasmáticos de ácido fólico y con el polimorfismo 677CT de la 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa. *An Esp Pediatr* 2002; **56**:409-415.
- [36] Motti C, Gnasso A, Bernardini S, Massoud R, Pastore A, Rampa P, et al. Common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease. *Atherosclerosis* 1998; **139**:377-383.
- [37] Genoud V, Castanon M, Annichino-Bizzachi J, Korin J, Kordich L. Prevalence of Three Prothrombotic Polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T in Argentina. *Thromb Res* 2000; **100**:127-131.
- [38] Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Hongyun L. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005; **229**:95-101.
- [39] Dedoussis GVZ, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Pitsavos C, Chrisohoou C, Skoumas J, et al. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2004; **7136**:1-6.
- [40] Almeida OP, Flicker L, Lautenschlager, Leedman P, Vasikaran S, van Bockxmeer FM. Contribution of the MTHFR gene to the causal pathway for depression, anxiety and cognitive impairment in later life. *Neurobiol Aging* 2005; **26**:251-257.

- [41] Tavares EF, Vieira-Filho JP, Andriolo A, Perez AB, Vergani N, Sanudo A, et al. Serum total homocysteine levels and the prevalence of folic acid deficiency and C677T mutation at the MTHFR gene in an indigenous population of Amazonia: the relationship of homocysteine with other cardiovascular risk factors. *Ethn Dis* 2004 Winter; **14**(1):49-56.
- [42] Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, Tan KS, McMaster D, Rozen R, et al. Homocysteine and risk of premature heart disease evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; **94**:2154-2158.
- [43] Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; Feb **3** (2):292-296.
- [44] Almawi WY, Tamim H, Kreid R, Timson J, Rahal E, Nabulsi M, et al. A case control study on the contribution of Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of Deep Venous Thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2005 Jun; **19** (3):189-196.
- [45] Joseph JE, Low J, Courtenay B, Neil MJ, McGrath M, Ma D. A single-center prospective study for venous thromboembolism following lower limb arthroplasty. *BJH* 2005; **129**:87-92.
- [46] Mansilha A, Araujo F, Severo M, Samapiao SM, Toledo T, Albuquerque R. Genetic polymorphisms and risk of recurrent deep venous thrombosis in young people: prospective cohort study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 Nov; **30**(5):545-549.
- [47] Couto E, Barini R, Zaccaria R, Annichino-Bizzachi JM, Pasini R Jr, Pereira BG, et al. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? *Sao Paulo Med J* 2005; **123**(1):15-20.
- [48] Kalina Á, Czeizel AE. The methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism (C677T) is associated with increased cardiovascular mortality in Hungary. *Int J Cardiol* 2004; **97**:333-334.
- [49] Saw SM, Yuan JM, Ong CN, Arakawa K, Lee HP, Coetzee GA, et al. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-

aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**:232–239.

- [50] Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation Between Folate Status, a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations. *Circulation* 1996; 93:7-9.
- [51] Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PHC, Yamasaki K, Terzi CA, D’Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *BJOG* 2002 July; **109**:784–791.
- [52] Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, Ordoñez-Llanos J, et al. A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am J Hum Genet* 2005 Jun; **76** (6):925-933.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliado o polimorfismo C677T da enzima MTHFR como fator de risco para desenvolvimento de trombose venosa em 70 indivíduos com episódio de TEV (TEP ou TV) (grupo caso) e 74 indivíduos sem histórico de TEV (grupo controle).

### *A prevalência do polimorfismo C677T da MTHFR em indivíduos sem histórico de trombose venosa*

A prevalência de homozigotos TT para o polimorfismo C677T da MTHFR entre os indivíduos do grupo controle encontrada no presente estudo foi 17,6% e a frequência do alelo T foi 38,0%. Os resultados aqui apresentados estão de acordo com as frequências encontradas em alguns estudos realizados em diversos países, porém bastante diferentes de outros. A maioria dos autores afirma que a prevalência deste polimorfismo é bastante variável entre a população mundial (Tabela 1).

Schneider et al, em 1998, apresentaram um levantamento mundial da prevalência dos genótipos CC, CT e TT e da frequência dos alelos C e T. A maioria das populações citadas neste levantamento apresentava frequências bem distintas das encontradas no presente estudo. Entre as mais discrepantes estão as das populações africanas, nas quais o genótipo TT é inexistente e a frequência do alelo T é apenas 6,0% (n=234; 95%CI=4,5-9,4), e a do Sri Lanka (Ásia Menor), onde também não foram encontrados homozigotos TT e a frequência alélica de T foi apenas 4,5% (n=67; 95%CI=1,6-9,7). Para os asiáticos, a



freqüência média de homozigotos foi 4,3% e a alélica T foi 20,8% (n=279; 95%CI=17,2-24,9), também abaixo das freqüências citadas no presente estudo. A amostra de índios brasileiros estudada apresentou 5,4% de homozigotos TT e o alelo T foi encontrado em 18,9% dos indivíduos (n=39; 95%CI=31,2-62,4). Não foi especificada qual a tribo indígena estudada (33).

Sun et al, em 2005 encontraram em 114 indivíduos chineses saudáveis as mesmas freqüências de homozigotos TT e do alelo T encontradas no presente estudo (17,5% e 38%, respectivamente). Tal semelhança não era esperada, uma vez que mais de 90% dos indivíduos do presente estudo eram de origem caucasiana e nenhum indivíduo relatou ascendência oriental (53).

Almeida et al estudaram 240 mulheres australianas, com 70 anos ou mais, e encontraram o alelo polimórfico T em cerca de 35,0% dessas mulheres, sendo 12,1% homozigotas TT. Este resultado também é bastante semelhante aos encontrados no presente estudo (22).

Esfahani et al, em 2003, avaliaram 433 mulheres norte-americanas saudáveis, divididas em quatro grupos de acordo com sua origem: mexicana (n=193), caucasiana (n=139), asiática (n=53) e afro-descendente (n=48). As freqüências encontradas para o alelo T foram 9,4% (afro-descendentes), 21,7% (asiáticas), 28,8% (caucasianas) e 40,2% (mexicanas), estando o genótipo TT presente em 0,0%, 3,8%, 7,2% e 18,1% das mulheres, respectivamente. A prevalência de homozigotos TT e a freqüência do alelo T entre as mulheres norte-americanas de origem mexicana foram bastante semelhante às encontradas no presente estudo, no entanto os números encontrados para as mulheres de origem caucasiana foram bastante diferentes (2).

**Tabela 1-** Estudos sobre freqüência dos genótipos e do alelo T da MTHFR em indivíduos saudáveis

Referência	Local do estudo (n)	Freqüência genótipos CC/CT/TT (%)	Freqüência alelo T (%)
Genoud et al, 2000 (10)	Argentina (418)	41,4 / 42,8 / 15,8	37,0
Almeida et al, 2005 (22)	Austrália (240)	40,8 / 47,1 / 12,1	35,6
Motti, et al, 1998 (28)	Itália (155)	29,3 / 54,8 / 16,1	44,0
Serra et al, 2002 (27)	Espanha (214)	33,0 / 42,0 / 16,0	41,0
Dedoussis et al, 2004 (29)	Grécia (574)	41,5 / 48,0 / 10,5	35,0
Esfahani et al, 2003 (2)	EUA Origem:		
	Mexicana (193)	37,8 / 44,0 / 18,1	40,2
	Caucasiana (139)	49,6 / 43,2 / 7,2	28,8
	Asiática (53)	60,4 / 35,8 / 3,8	21,7
	Africana (48)	81,3 / 18,8 / 0,0	9,4
Sun et al, 2005 (53)	China (114)	55,3 / 27,2 / 17,5	38,0
Schneider et al, 1998 (33)	Reino Unido (94)	47,9 / 44,7 / 7,4	18,6
	África (234)	86,8 / 13,2 / 0,0	6,6
	Ásia (279)	62,7 / 33,0 / 4,3	20,8
	Ásia Menor (67)	91,0 / 8,9 / 0,0	4,5
	Australásia (85)	90,6 / 9,4 / 0,0	4,7
	Américas (76)	48,7 / 38,2 / 13,1	32,2
Pereira et al, 2004 (34)	Brasil		
	Caucasianos (87)	42,3 / 45,9 / 11,0	35,0
	Mulatos (82)	57,0 / 39,2 / 3,8	24,0
	Afro-descendentes (40)	75,0 / 25,0 / 0,0	12,0

Dedoussis et al estudaram 322 homens e 252 mulheres saudáveis da Grécia e encontraram o alelo T em 35,0% da população, sendo 11,0% homozigotos TT. A frequência do alelo T encontrada no estudo grego é similar à encontrada no presente estudo, porém a prevalência de homozigotos é menor, mostrando uma maior prevalência de heterozigotos entre os indivíduos gregos estudados (29).

Dois estudos realizados na Itália (28) (n=155) e na Espanha (27) (n=105) mostraram resultados semelhantes ao presente estudo, com praticamente a mesma proporção de indivíduos homozigotos (16,1% e 17,1%, respectivamente). A frequência alélica de T, no entanto, foi um pouco mais alta: 44,0% e 42,0%, respectivamente, sugerindo uma maior prevalência de indivíduos heterozigotos destas duas populações.

Números muito semelhantes aos do presente estudo foram relatados em um estudo realizado na Argentina com 418 indivíduos de todo o país. A frequência do alelo T foi de 37,0% e a porcentagem de homozigotos TT foi de 15,8%. Esta semelhança era esperada, uma vez que a Argentina possui padrões de imigração muito semelhantes com os do Estado do Rio Grande do Sul, composto principalmente por imigrantes do sul da Europa (italianos, espanhóis e portugueses) (10).

Existem poucos dados sobre a prevalência deste polimorfismo na população brasileira. Pereira et al estudaram 209 indivíduos, entre caucasianos, mulatos e afro-descendentes. O alelo T foi encontrado em 12,0% dos afro-descendentes, 24,0% dos mulatos e 35,0% dos caucasianos. O genótipo TT foi encontrado em 0,0% dos afro-descendentes, 3,8% dos mulatos e 11,0% dos caucasianos (34). Arruda et al, por sua vez, avaliaram 327 indivíduos caucasianos, afro-descendentes e com ascendência indígena, encontrando 10,0% de homozigotos TT entre os indivíduos caucasianos, 1,4% entre os afro-descendentes e 1,2% entre os de origem indígena (35). Tavares et al estudaram 90 indivíduos de uma tribo

de índios Parkateje. O alelo T foi encontrado em 40,7% dos indivíduos da tribo e o genótipo TT em 14,0% (36).

Apesar de mais de 90% dos indivíduos do presente estudo serem de origem caucasiana, as freqüências encontradas diferem bastante das relatadas por Pereira et al e Arruda et al em indivíduos também caucasianos. Surpreendentemente, a população indígena estudada por Tavares et al apresentou freqüências muito semelhantes às do presente estudo, que não envolveu indivíduos de origem indígena.

#### ***O polimorfismo C677T da MTHFR e o risco de desenvolvimento de trombose venosa***

A prevalência de homozigotos para o alelo T, no presente estudo, foi 31,4% entre os pacientes e 17,6% entre os controles. A freqüência do alelo T foi de 46,0% entre os pacientes e 38,0% entre os controles. A Tabela 2 apresenta as freqüências dos genótipos e dos alelos encontradas no presente estudo. A análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou uma distribuição significativa dos genótipos para a população estudada ( $\chi^2=6,127$ ;  $p<0,05$ ) e para os pacientes ( $\chi^2=6,713$ ;  $p<0,05$ ), mas não significativa para o grupo controle ( $\chi^2=0,766$ ;  $p>0,05$ ). A razão de chance (*odds ratio*) para a hipótese dominante (CC *versus* CT+TT) foi 0,92 (95%IC=0,47-1,79;  $P=0,87$ ) e para a hipótese recessiva (TT *versus* CT+CC) foi 2,15 (95%CI=0,98-4,70;  $P=0,08$ ). Apesar de não existir diferença estatisticamente significativa entre a prevalência do genótipo TT e da freqüência alélica de T entre casos e controles, estes resultados apontam para uma tendência de associação entre o genótipo TT e o desenvolvimento de tromboembolismo venoso.

**Tabela 2-** Frequência dos genótipos e alelos da MTHFR em pacientes e no grupo controle

	Pacientes (n= 70) %	Controles (n=74) %	<i>P</i>	OR (95% CI)
<b>Genótipos</b>				
CC	40,0 (28)	41,8 (31)	0,87	0,92 (0,47-1,79)
CT	28,5 (20)	40,5 (30)	0,16	0,58 (0,29-1,17)
TT	31,4 (22)	17,5 (13)	0,08	2,15 (0,98-4,70)
<b>Alelos</b>				
C	54,0 (76)	62,0 (92)		
T	46,0 (64)	38,0 (56)	0,92	0,72 (0,45-1,15)

Estatisticamente significativo quando  $P \leq 0,05$

A Tabela 3 apresenta os resultados de alguns trabalhos encontrados na literatura que estudaram o polimorfismo C677T da MTHFR como fator de risco para doenças tromboembólicas e cardiovasculares.

Akar et al, na Turquia, avaliaram 52 indivíduos diagnosticados com trombose venosa profunda e 106 controles para os polimorfismos MTHFR C677T, CBS 844Ins68, MS A2756G e FV G1691A, todos possíveis fatores de risco para doenças trombóticas. Estes autores encontraram uma boa correlação entre trombose e a presença do polimorfismo do Fator V e um efeito apenas sinérgico do polimorfismo C677T da MTHFR (32).

Wilken et al compararam 565 pacientes com doença arterial coronária e 225 indivíduos saudáveis de Sydney, Austrália, e não encontraram relação entre a presença do genótipo TT ou do alelo T e o aparecimento ou gravidade de doença coronária: 40,8% dos pacientes e 39,1% dos controles apresentaram genótipo TT ( $\chi^2=0,35$ ,  $df=2$ ,  $P=0,84$ ) e a frequência do alelo T foi de 65,0% entre os pacientes e 64,0% entre os controles (30).

Em 1998, Kluijymans et al sugeriram que apesar do genótipo TT aumentar os níveis de homocisteína plasmática, o polimorfismo por si só não pode ser considerado como um fator de risco genético para o desenvolvimento de trombose venosa profunda. Eles avaliaram 471 pacientes com trombose venosa profunda e 474 controles e encontraram homozigose para o alelo T em 10,0% dos pacientes e 9,9% dos controles (OR 1,01; 95%CI=0,7-1,5) (54).

**Tabela 3-** Artigos publicados sobre a relação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e o aumento no risco para doenças cardiovasculares e tromboembólicas.

Referência	Tipo de estudo*	Local do estudo (n)	Doenças estudadas	Relação polimorfismo/ aumento no risco para doença
Schmeleva et al, 2003 (11)	1	Rússia (114)	TV e TA	Existente
Wald et al, 2002 (13)	2	NM (16849 (1)/ 3820(3))	DCI, TVP, EP e AVC	Existente
DenHeijer et al, 2005 (14)	2	NM (2389 (1)/ 476(3))	TV	Existente
Waallagher et al, 2005 (15)	1	Irlanda (216)	DCC prematura	Existente
Margaglione et al, 1998 (12)	1	Itália (708)	TVP	Existente
Arruda et al, 1997 (40)	1	Brasil (1108)	TV e TA	Existente
Angeline et al, 2004 (31)	1	Índia (72)	IAM	Existente

Kluijtmans et al, 1996 (39)	1	Países Baixos (171)	DCV	Existente
Ray et al, 2002 (16)	2	NM (12787)	TEV	Fraca
Salomon et al, 1999 (17)	1	Israel (498)	TEV	Inexistente
Fugimura et al, 2000 (18)	1	Japão (157)	TVP	Fraca
Hsu et al, 2001 (19)	1	Taiwan (202)	TVP	Inexistente
Kluijtmans et al, 1998 (54)	1	NM (945)	TVP	Inexistente
Wilken et al, 1996 (30)	1	Austrália (790)	DAC	Inexistente
Mansilha et al, 2005 (56)	3	Portugal (87)	TVP recorrente	Inexistente
Almawi et al, 2005 (55)	1	Or. Médio (895)	TVP	Fraca
Akar et al, 1998 (32)	1	Turquia (158)	TVP	Fraca
Brattatröm et al, 1998 (52)	2	NM (12.513)	DCV	Inexistente

\*1- caso-controle, 2- meta-análise, 3- estudo de coorte prospectivo; NM – Não mencionado; AVC- acidente vascular cerebral; DAC- doença arterial coronariana; DCC- doença cardíaca coronariana; DCI- Doença cardíaca isquêmica; DCV- doença cardiovascular; EP- embolismo pulmonar; IAM- infarto agudo do miocárdio; TA- trombose arterial; TEV- tromboembolismo venoso; TV- trombose venosa; TVP, trombose venosa profunda.

Salomon et al estudaram 162 indivíduos com tromboembolismo venoso idiopático e 336 controles, em Tel-Aviv, Israel. Os autores avaliaram isoladamente o polimorfismo C677T da MTHFR e não encontraram prevalência significativamente maior do alelo T em pacientes com TEV do que no grupo controle. O grupo sugere que a presença de mais de um fator genético combinado aumenta o risco da doença (17).

Fugimura et al, no Japão, avaliaram 72 pacientes com TEV e /ou TEP e 85 indivíduos sem histórico de TEV ou TEP. A diferença da frequência de homozigotos TT encontrada entre pacientes e controles não foi significativa, apesar da frequência ser um pouco mais alta entre os pacientes (OR 2,12; 95%CI=0,73-6,16;  $P=0,19$ ). O grupo sugere que o genótipo TT da MTHFR somente pode ser considerado como um fator de risco para TVP quando associado a outros fatores predisponentes (18).

Um estudo com uma população taiwanesa, em 2001, concluiu que a homozigose para o alelo T não estava associada com trombose nesta população, apesar dos homozigotos TT apresentarem níveis mais altos de Hcy, sugerindo que o polimorfismo contribui apenas indiretamente para a trombose, influenciando os níveis de Hcy. Foram avaliados 101 pacientes com trombose venosa profunda e 101 controles pareados por gênero e idade não diagnosticados com TEV ou doença cardiovascular aterosclerótica. Entre os pacientes, 7 eram homozigotos TT e a frequência do alelo T foi 25,0%. Todos os pacientes apresentaram níveis de Hcy plasmática mais altos que os controles (14,1 vs 9,9  $\mu\text{M}$ ). Entre os controles, 6 eram homozigotos TT e a frequência do alelo T foi 22,0% (19).

Ray, Shmorgun e Chan, em 2002, realizaram uma meta-análise de 31 estudos sobre o papel do polimorfismo C677T da MTHFR no desenvolvimento de tromboembolismo venoso, com cerca de 13.000 indivíduos. Os autores concluíram que este polimorfismo está apenas fracamente associado com um aumento no risco de TEV e que é improvável que a



relação entre TEV e HHcy seja mediada de forma substancial por este polimorfismo, devendo existir outro polimorfismo genético que possa explicar esta associação. Os autores ainda afirmam que não recomendam a análise do polimorfismo C677T da MTHFR como parte da rotina de qualquer avaliação clínica de trombofilia. Apenas 4 dos 31 estudos demonstraram associação significativa entre o genótipo TT e o TEV. A prevalência do genótipo TT foi maior entre os casos (14,3%; 95%CI=12,0-16,9%) do que entre os controles (11,7%; 95%CI=10,0-13,5%) (OR 1,2; 95%CI=1,1-1,4), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (16).

Mais recentemente, no Oriente Médio, Almawi et al realizaram um estudo em 198 indivíduos com TVP e 697 indivíduos sem TVP, avaliando a prevalência dos polimorfismos C677T da MTHFR, G20210A da protrombina e G1691A do Fator V (Fator V de Leiden). Os resultados deste estudo mostram que os polimorfismos do Fator V (prevalência de heterozigotos e homozigotos: 52,02 vs 14,78%; RR 6,28) e da protrombina (19,2 vs 3,6%; RR 3,38) são fatores de risco para TEV mais importantes que o polimorfismo da MTHFR (20,7 vs 11,0%; RR 1,49), que este apresenta apenas uma fraca relação com o risco para TEV e, ainda, que a presença de mais de um polimorfismo estava associada com um aumento significativo do risco (55).

Mansilha et al, em 2005, avaliaram a presença do polimorfismo em indivíduos jovens com episódios recorrentes de TVP e não encontraram relação entre o genótipo TT e o risco de TVP recorrente. Durante dois anos, 87 indivíduos com primeiro episódio de TVP confirmado antes da idade de 40 anos foram avaliados, todos caucasianos provenientes do norte de Portugal. A presença ou ausência do alelo T da MTHFR não teve nenhum impacto na recorrência de episódios trombóticos (OR 1,26; 95%CI=0,56-2,81;  $P=0,58$ ) (56).

Contradizendo os estudos acima, um estudo publicado em 1996 por Kluijtmans et al concluiu que o genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR está associado com um risco 3 vezes maior de desenvolvimento prematuro de doenças cardiovasculares. Este grupo avaliou a presença dos polimorfismos C677T da MTHFR e T833C da CBS em 60 indivíduos com doença cardiovascular e 111 controles. Foi encontrada homozigose para o alelo T do polimorfismo da MTHFR em 15% dos pacientes e em 5% dos controles (OR 3,1; 95%CI=1,0–9,2) (39).

Arruda et al, em 1997, determinaram a frequência do genótipo TT em 191 pacientes com trombose arterial, 127 pacientes com trombose venosa e 296 controles. Seus resultados apóiam a hipótese de que portadores deste genótipo apresentam maior risco para desenvolver episódios trombóticos, tanto arteriais como venosos: 19,0% dos indivíduos com trombose arterial e 11,0% dos indivíduos com trombose venosa foram homozigotos TT, enquanto que no grupo controle apenas 4,0% apresentaram este genótipo (40).

Margaglione et al, em 1998, investigaram a frequência do genótipo TT em 277 pacientes com TVP e em 431 controles saudáveis e verificaram que o genótipo TT era significativamente mais frequente nos pacientes do que nos controles (25,6% e 18,1%, respectivamente;  $P=0,02$ ). O risco estimado para trombose associado com o genótipo TT foi 2,0 (95%CI=1,3–3,1). Após ajustes para gênero e outros fatores de risco (fator V e mutações da protrombina), o risco estimado foi 1,7 (95%CI=1,2–2,6), sugerindo que o genótipo TT está independentemente associado com trombose venosa, principalmente entre indivíduos com um perfil de alto risco (12).

Os dados de um estudo prospectivo realizado em 2003 com 84 pacientes com trombose venosa e/ou arterial (TA) e 30 controles, no Norte da Rússia, sugerem que exista uma associação entre a mutação C677T da MTHFR e o aumento no risco de eventos

trombóticos na população em questão. Os portadores do alelo T apresentaram um risco quase 2 vezes maior para o aparecimento de TV e 2,5 vezes maior para o aparecimento de TV+TA (11).

Em 1996, Gallagher et al avaliaram o risco de doença cardíaca coronariana prematura para portadores do genótipo TT do polimorfismo da MTHFR e encontraram um número significativamente maior de portadores da MTHFR termolábil entre os pacientes do que nos controles. Foram estudados 111 pacientes com doença cardíaca coronariana e 105 indivíduos controle, sendo verificada a presença do alelo T em 7 % dos controles e em 17% dos pacientes (OR 2,9; 95%CI=1,2–7,2;  $P=0,02$ ) (15).

Em 2005, Den Heijer, Levington e Clarke realizaram uma meta-análise que incluiu 24 estudos retrospectivos ( $n= 3289$  casos) e 3 estudos prospectivos ( $n= 476$  casos) sobre homocisteína, genótipo da MTHFR e risco de trombose venosa, e ainda 53 meta-análises ( $n= 8364$  casos) sobre a associação entre o genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR e a trombose venosa, a fim de determinar se essa associação é causal. Os autores concluíram que a homozigose para o polimorfismo da MTHFR conferia um risco 20% mais alto de desenvolvimento de TV quando comparado com o genótipo normal (CC) (OR 1,2; 95%CI=1,08–1,32) (14).

Em um estudo de 2000, Rozen discutiu uma possibilidade para estas discrepâncias e afirmou que as descobertas das variantes genéticas que causam alterações no ciclo da metionina/Hcy são relativamente recentes e sugeriu que investigações adicionais seriam necessárias para determinar o significado clínico da HHcy em doenças vasculares como a TV (57).

Robertoye e Rodgers, em um artigo de revisão de 2001, sugeriram que o genótipo TT deste polimorfismo não parece estar associado com risco para TV e que o aumento nos níveis de Hcy provocado pela mutação não é suficiente para causar trombose, além de reafirmar que a HHcy sozinha não leva à TV (6).

Em um recente estudo na Espanha, Souto et al realizaram um mapa de ligação de genoma completo (*genomewide linkage scan*) na busca de novos genes que afetem os níveis de Hcy no plasma e, conseqüentemente, novos candidatos a fatores de risco para TEV. De acordo com estes autores, o polimorfismo C677T da MTHFR não é o principal determinante genético da variação de Hcy plasmática. Os autores encontraram um outro gene, *NNMT*, que codifica a enzima nicotinamida-N-metiltransferase, localizado na região 11q23 que também influencia os níveis de Hcy plasmática e que é, provavelmente, o principal determinante genético para a HHcy na população por eles estudada (58).

Os resultados aqui apresentados suportam a hipótese de que o alelo T sozinho não representa risco para o desenvolvimento de trombose venosa. Apenas a homozigose TT parece estar associada com um modesto aumento no risco para esta doença, reforçando a idéia da teoria recessiva. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram existir uma fraca associação entre a presença do genótipo TT e o desenvolvimento de TEV. Apesar de existir uma razão de chance de 2,15 para os portadores do genótipo TT, a diferença na distribuição dos genótipos entre pacientes e controles não é estatisticamente significativa. Além disto, o grupo de pacientes não estava em Equilíbrio Hardy-Weinberg, apresentando uma freqüência mais baixa de heterozigotos e mais alta de homozigotos TT do que o esperado. Este desequilíbrio também aponta o genótipo TT como fator de risco para tromboembolismo venoso nesta população.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A prevalência dos genótipos da MTHFR entre os pacientes foi 40,0% de homozigotos normais (CC), 28,6% de heterozigotos e 31,4% de homozigotos para o polimorfismo C677T (TT).
- A prevalência dos genótipos da MTHFR entre os controles foi 41,9% de homozigotos normais (CC), 40,5% de heterozigotos e 17,6% de homozigotos para o polimorfismo C677T (TT).
- A frequência do alelo T do polimorfismo C677T da MTHFR foi 0,46 nos pacientes e 0,38 nos controles.
- O risco associado para o genótipo TT foi 2,15, mostrando uma tendência de associação entre o genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR e o desenvolvimento de tromboembolismo venoso, porém essa associação não foi estatisticamente significativa ( $P=0,08$ ), provavelmente devido ao tamanho da amostra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) De Bree A, Verschuren WM, Bjorke-Monsen AL, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 CT mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:687-93.
- (2) Esfahani ST, Cogger EA, Caudil MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003; 103:200-7.
- (3) Bailey LB, Gregory JF. Folate Metabolism and Requirements. *J Nutr* 1999; 129:779-82.
- (4) Merkel M. Homocysteine as a risk factor of cardiovascular disease. *Int Congr Ser* 2004; 1262:376-79.
- (5) D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and Thrombotic Disease. *Blood* 1997; 90:1-11.
- (6) Robetorye R, Rodgers GM. Update on Selected Inherited Venous Thrombotic Disorders. *Am J Hematol* 2001; 68:256-68.
- (7) Franco RF, Reitsma PH. Genetic Risk Factors of Venous Thrombosis. *Hum Genet* 2001; 109:369-84.

- (8) Frost P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-13.
- (9) Press, RD, DeLoughery TG. Thrombotic Risk Assessment. Molecular and Conventional Testing for a Common, Treatable Genetic Disease. *Clin Lab* 2000; 1:8-12.
- (10) Genoud V, Castanon M, Annichino-Bizzachi J, et al. Prevalence of Three Prothrombotic Polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T in Argentina. *Thromb Res* 2000; 100:238-31.
- (11) Shmeleva VM, Kapustin SI, Papayan LP, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. *Thromb Res* 2003; 111:351-56.
- (12) Margaglione M, D'Andrea G, d'Addeda M, et al. The Methylenetetrahydrofolate Reductase TT677 Genotype Is Associated with Venous Thrombosis independently of the Coexistence of the FV Leiden and the Prothrombin A 20210 Mutation. *Thromb Haemost* 1998; 79(5):907-11.
- (13) Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325:1202-6.
- (14) Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; Feb3(2):292-96.

- (15) Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, et al. Homocysteine and risk of premature heart disease evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94:2154-8.
- (16) Ray JG, Shmorgun D, Chan WS. Common C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and the Risk of Venous Thrombosis: Meta-Analysis of 31 Studies. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:51-8.
- (17) Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, et al. Single and Combined Prothrombotic Factors in Patients with Idiopathic Venous Thromboembolism. Prevalence and Risk Assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:511-18.
- (18) Fujimura H, Kawasaki T, Sakata T, et al. Common C677T Polymorphism in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Increases the Risk for Deep Vein Thrombosis in Patients with Predisposition of Thrombophilia. *Thromb Res* 2000; 98:1-8.
- (19) Hsu TS, Hsu LA, Chang CJ, et al. Importance of Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Venous Thromboembolism in a Taiwanese Population. A Case-Control Study. *Thromb Res* 2001; 102:387-95.
- (20) Makris M. Hyperhomocysteinemia and Thrombosis. *Clin Lab Haem* 2000; 22:133-43.
- (21) Selhub J. Homocysteine Metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:217-46.
- (22) Almeida OP, Flicker L, Lautenschlager, et al. Contribution of the MTHFR gene to the causal pathway for depression, anxiety and cognitive impairment in later life. *Neurobiol Aging* 2005; 26:251-57.



- (23) Miller AL, Kelly GS. Homocysteine Metabolism and Impact on Health and Disease. *Alt Med Rev* 1997; 2(4):234-54.
- (24) De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes and Management. *Blood* 1996; 87:3536-44.
- (25) Simioni P, Prandoni P, Burlina A, et al. Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. A case-control study. *Thromb Haemost* 1996; 76(6):883-86.
- (26) Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7(2):195-200.
- (27) Serra JD, Lorente BF, Alapont M, et al. Concentración plasmática de homocisteína: relación con los niveles plasmáticos de ácido fólico y con el polimorfismo 677CT de la 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa. *An Esp Pediatr* 2002; 56:409-15.
- (28) Motti C, Gnasso A, Bernardini S, et al. Common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease. *Atherosclerosis* 1998; 139:377-83.
- (29) Dedoussis GVZ, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2004; 7136:1-6.
- (30) Wilcken DEL, Wang XL, Sim AS, et al. Distribution in Healthy and Coronary Populations of the Methylenetrtrahydrofolate reductase (MTHFR) C<sub>677</sub>T Mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:878-82.

- (31) Angeline T, Jeyaraj N, Granito S, et al. Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians. *Exp Mol Pathol* 2004; 77:85-88.
- (32) Akar N, Akar E, Misirhoglu M, et al. Search for Genetic Factors Favoring Thrombosis in Turkish Population. *Thromb Res* 1998; 92:79-82.
- (33) Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al. Worldwide Distribution of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1258-60.
- (34) Pereira AC, Schettert IT, Morandini F<sup>o</sup> AAF, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta* 2004; 340:99-105.
- (35) Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, et al. Prevalence of the mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998; 78:332-35.
- (36) Tavares EF, Vieira-Filho JP, Andriolo A, et al. Serum total homocysteine levels and the prevalence of folic acid deficiency and C677T mutation at the MTHFR gene in an indigenous population of Amazonia: the relationship of homocysteine with other cardiovascular risk factors. *Ethn Dis* 2004 Winter; 14(1):49-56.
- (37) Fernandez LL. Estudo de polimorfismos como fatores de risco em Demência da Alzheimer. 2002. 59f. Dissertação (Mestrado) Programa Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- (38) Kang SS, Passen EL, Ruggie N, et al. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1993 Oct;88(4Pt1):1463-9.
- (39) Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58(1):35-41.
- (40) Arruda VR, von Zuben PM, Chiapparini LC, et al. The mutation Ala677-->Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 77(5):818-21.
- (41) Spannagl M, Heinemann LAJ, DoMinh T, et al. Compariosn of incidence/risk of venous thromboembolism (VTE) among selected clinical and hereditary risk markers: A community-based cohort study. *Thromb J* 2005, 3:8.
- (42) Boncoraglio G, Carriero MR, Chiapparini L, et al. Hyperhomocysteinemia and other thrombophilic risk factors in 26 pacients with cerebral venous thrombosis. *Eur J Neurol* 2004; 11:405-9.
- (43) Castro Silva M, Epidemiologia do tromboembolismo venoso. *J Vasc Br* 2002; 1(2):83-84.
- (44) Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease: Probable Benefits of Increasing Folic Acid Intakes. *JAMA* 1995; 274 (13):1049-57.

- (45) Starkebaum G, Harian JM. Endothelial Cell Injury Due to Cooper-catalized Hydrogen Peroxide Generation from Homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77:1370-76.
- (46) Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, et al. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *PNAS* 2001; 98(22):12503-08.
- (47) Simioni P. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillieres Clin Haematol* 1999; 12(3):479-503.
- (48) Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Deep-vein Thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:759-62.
- (49) Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, et al. Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; 8 345(8954):882-85.
- (50) Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia and Venous thrombosis: a Meta-Analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80(6):874-7.
- (51) Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, Atherosclerosis and Thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81(2):165-76
- (52) Brattström L, Wilcken DEL, Öhrvik J, et al. Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Mutation Leads to Hyperhomocysteinemia but not to Vascular Disease. *Circulation* 1998; 98:2520-26.
- (53) Sun J, Xu Y, Xue J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005, 229:95-101.

- (54) Kluijtmans LAJ, Heijer M, Reitsma PH, et al. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase and Factor V Leiden in the Risk of Deep-Vein Thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 79(2):254-58.
- (55) Almawi WY, Tamim H, Kreid R, et al. A case control study on the contribution of Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of Deep Venous Thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2005 Jun; 19 (3):189-96.
- (56) Mansilha A, Araujo F, Severo M, et al. Genetic polymorphisms and risk of recurrent deep venous thrombosis in young people: prospective cohort study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 Nov; 30(5):545-9.
- (57) Rozen R. Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3):255-61.
- (58) Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, et al. A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am J Hum Genet* 2005 Jun; 76 (6):925-33.