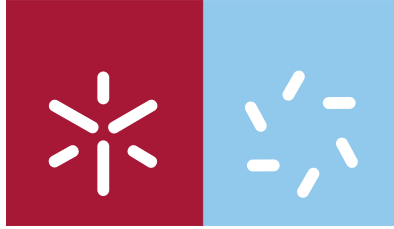


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Virgínia Maria Dinis Carvalhais

**Variabilidade genética das glicoproteínas
plaquetárias GPIb α e GPIIIa e a sua possível
associação com o risco trombótico em
doentes com Diabetes mellitus tipo 2**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Virgínia Maria Dinis Carvalhais

**Variabilidade genética das glicoproteínas
plaquetárias GPIb α e GPIIIa e a sua possível
associação com o risco trombótico em
doentes com Diabetes mellitus tipo 2**

Tese de Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efectuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria Begoña Criado Alonso
e do
Mestre Luís Bernardo Pina-Cabral

Outubro de 2009

DECLARAÇÃO

Nome: Virgínia Maria Dinis Carvalhais

Endereço electrónico: imagin@portugalmail.com Telefone: 914990714/ 234781338

Número do Bilhete de Identidade: 12782284

Título dissertação:

Variabilidade genética das glicoproteínas plaquetárias GPIb α e GPIIIa e a sua possível associação com o risco trombótico em doentes com Diabetes mellitus tipo 2

Orientador: Professora Doutora Maria Begoña Criado Alonso

Co-Orientador: Mestre Luís Bernardo Pina-Cabral

Ano de conclusão: 2009

Designação do Mestrado: Mestrado em Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO,
MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Begoña Criado pela sua orientação.

Ao meu co-orientador Mestre Luís Pina Cabral pelo apoio.

A todos os Professores envolvidos no mestrado de Genética Molecular.

À minha co-orientadora na Universidade do Minho, Professora Doutora Maria João Sousa.

À CESPU, nomeadamente ao Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde por ter financiado este projecto (AL/12/2006/CESPU).

Aos meus colegas da CESPU pelo apoio constante.

À minha família, por tudo.

MUITO OBRIGADO!

Variabilidade genética das glicoproteínas plaquetárias GPIb α e GPIIIa e a sua possível associação com o risco trombótico em doentes com Diabetes mellitus tipo 2

As patologias vasculares são a principal causa de mortalidade e morbidade na Diabetes mellitus tipo 2. Uma vez que um endotélio vascular íntegro é fundamental para a homeostasia, eventos isquémicos são frequentes nos indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2. Na isquemia arterial, a exposição do conteúdo da placa de ateroma leva à activação das plaquetas por intermédio das glicoproteínas existentes na superfície das mesmas.

O objectivo principal deste estudo é verificar se a presença de polimorfismos nas glicoproteínas plaquetárias poderão estar associados com o aparecimento de isquemia arterial do membro inferior nos indivíduos com DM tipo 2. Para isso, estudou-se por PCR-RFLP os SNPs HPA-2 e KOZAK na GPIb α , o PI^{A1/A2} na GPIIIa, e um VNTR na GPIb α .

Verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas para o polimorfismo VNTR entre o grupo controlo e o grupo com DM tipo 2. O polimorfismo KOZAK parece estar associado ao aparecimento de isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com DM tipo 2.

Estes resultados sugerem que o polimorfismo KOZAK poderá contribuir para um aumento da probabilidade de desenvolver isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com DM tipo 2. Os nossos resultados também evidenciam a importância do estudo dos polimorfismos plaquetários uma vez que podem contribuir para estabelecer um perfil genético de risco em indivíduos com DM tipo 2.

Palavras-chave: polimorfismos, glicoproteínas plaquetárias, Diabetes mellitus tipo 2, isquemia arterial do membro inferior

Genetic variability of platelet glycoproteins GPIb α and GPIIIa and their association with thrombotic risk in patients with type 2 diabetes mellitus

Vascular diseases are the most important cause of mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes mellitus. Once a functional endothelium is important for homeostasis, ischaemic events are frequent in patients with type 2 diabetes mellitus. In arterial ischaemia, an exposition to contents of atherome plaque leads to platelet activation by glycoproteins that exist in platelets.

The main goal of this study is to search if the presence of platelet glycoproteins polymorphisms are associated with arterial ischaemia of lower limbs in type 2 diabetes mellitus patients. It was analyzed the HPA-2 and KOZAK SNPs in GPIb α , the PI^{A1/A2} SNP in GPIIIa and a VNTR in GPIb α , by PCR-RFLP.

There were statistically significant differences for VNTR polymorphism between control group and type 2 diabetes mellitus group. It seems that the KOZAK polymorphism is associated with the presence of arterial ischaemia of lower limbs in type 2 diabetes mellitus patients.

These results suggest that KOZAK polymorphism could contribute for an increased probability of developing arterial ischaemia of lower limbs in type 2 diabetes mellitus patients. Our results also show the importance of the study of polymorphisms in platelets since it could establish a genetic risk profile in patients with type 2 diabetes mellitus.

Key-words: polymorphisms, platelet glycoproteins, type 2 diabetes mellitus, arterial ischaemia of lower limbs

Agradecimentos -----	iii
Resumo -----	v
Abstract-----	vii
Índice -----	ix
Lista de Abreviaturas-----	xi
Lista de Figuras -----	xiii
Lista de Gráficos -----	xv
Listas de Tabelas -----	xvii
Introdução-----	19

PARTE I.

CAPÍTULO 1. DIABETES MELLITUS TIPO 2 E ATEROSCLEROSE -----	25
1.1. Diabetes mellitus tipo 2 -----	25
1.2. Complicações vasculares na Diabetes mellitus -----	26
1.2.1. Endotélio -----	27
1.2.2. Aterosclerose -----	30
1.2.3. Placa de ateroma e activação plaquetária -----	32
1.2.4. Isquemia -----	34
CAPÍTULO 2. PLAQUETAS E POLIMORFISMOS -----	35
2.1. Plaqueta-----	35
2.2. Polimorfismos de glicoproteínas plaquetárias -----	37
2.2.1. Glicoproteína IIb-IIIa ou integrina α IIb β 3-----	39
2.2.2. Glicoproteína Ib-V-IX-----	41
CAPÍTULO 3. VARIABILIDADE GENÉTICA DAS PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 -----	45

PARTE II.

CAPÍTULO 4. OBJECTIVOS -----	51
CAPÍTULO 5. MATERIAL E MÉTODOS -----	53
5.1. Amostra -----	53
5.2. Amostra biológica-----	54
5.3. Métodos-----	55
5.3.1. Extração de DNA -----	55
5.3.2. Amplificação génica -----	55
5.3.2.1. Gene IIIa ou integrina β 3 -----	55
5.3.2.2. Gene Iba -----	56
5.3.3. Visualização dos produtos de amplificação -----	57
5.3.4. Digestão enzimática -----	57
5.3.5. Visualização e análise dos produtos de digestão ----	58
5.4. Análise e Tratamento dos Dados-----	58
CAPÍTULO 6. RESULTADOS -----	59
6.1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos-----	59
6.2. Distribuição das frequências genotípica e alélica -----	65
6.2.1. Comparação com outras populações -----	70
6.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg -----	71
6.4. Análise estatística-----	72
6.5. Análise de clusters-----	75
6.6. Regressão logística -----	78
6.7. Diferentes combinações dos 4 polimorfismos-----	80
CAPÍTULO 7. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES-----	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	89
ANEXOS -----	99

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGE – produtos finais da glicosilação
- AMPc - adenosina monofosfato cíclico
- bp – pares de bases
- CAD – doença arterial coronária
- CAMs – molécula de adesão das células vasculares
- DM – Diabetes mellitus
- DNA – ácido desoxiribonucleico
- dNTPs – desoxiribonucleótidos trifosfatados
- EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético
- eNOS – síntese de óxido nítrico endotelial
- GMPc – guanosina monofosfato cíclico
- GP – glicoproteína
- HbA1C – hemoglobina glicosilada
- HDL – high density lipoprotein
- HPA-2 - Human Platelet Antigen-2
- IMC – índice de massa corporal
- LDL – low density lipoprotein
- NF- κ B – factor nuclear κ B
- NO – óxido nítrico
- PAD – pressão arterial diastólica
- PAI-1 – inibidor do activador do plasminogénio
- PAS – pressão arterial sistólica
- PCR – reacção de polimerase em cadeia
- PCR-RFLP – polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism
- RAGE – receptor para os produtos finais da glicosilação
- RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
- ROS – espécies reactivas de oxigénio
- SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms
- T_m – temperatura de melting
- VNTR - Variable Number Tandem Repeat

vWf – factor de von Willebrand

WHO – World Health Organization

χ^2 – qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Metabolismo da glicose -----	25
Fig.2: Corte transversal de um vaso sanguíneo-----	27
Fig. 3: Efeitos da Diabetes mellitus sobre o endotélio e principais consequências-----	29
Fig. 4: Alterações plaquetárias na Diabetes mellitus tipo 2-----	30
Fig. 5: Desenvolvimento em 8 estágios de uma placa de ateroma-----	31
Fig. 6: Estrutura da plaqueta em circulação -----	35
Fig. 7: Principais glicoproteínas envolvidas nas interações plaqueta-plaqueta e plaqueta-matriz endotelial. -----	38
Fig. 8: Sequência do exão 2 da integrina β_3 , com a localização do polimorfismo -----	40
Fig. 9: Representação da GP $Ib\alpha$ -----	41
Fig. 10: Sequência dos exões 1 e 2, interrompidos pela informação do intrão da GP $Ib\alpha$, com a localização do polimorfismo KOZAK, do polimorfismo HPA-2 e da sequência que se repete originando um VNTR -----	42
Fig. 11: Gel de electroforese a 2% com produtos de digestão para o polimorfismo HPA-2 utilizando a ladder 100bp da Invitrogen-----	66
Fig. 12: Gel de electroforese a 2% com produtos de digestão para o polimorfismo $PI^{A1/A2}$ utilizando a ladder O'GeneRuler low-range da Fermentas-----	66
Fig. 13: Gel de electroforese a 3% com produtos de digestão para o polimorfismo KOZAK -5C/T utilizando a ladder 50bp da Invitrogen -----	67
Fig. 14: Gel de electroforese a 2% com os amplicões para o VNTR da GPIb α utilizando a ladder 100bp da Invitrogen à esquerda e a ladder 10bp da Invitrogen à direita -----	67

Fig. 15: Dendograma obtido pela medida de semelhança Pearson e pelo método de agregação distância média entre clusters ----- 75

Fig. 16: Dendograma obtido pela medida de semelhança Pearson e pelo método de agregação distância média dentro dos clusters----- 76

Fig. 17: Dendograma obtido pela medida de semelhança Pearson e pelo método de agregação de menor distância ----- 77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição gráfica das frequências genotípicas nos diferentes grupos ----- 69

Gráfico 2: Distribuição gráfica das frequências alélicas nos diferentes grupos----- 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Função e ligandos das glicoproteínas plaquetárias Ib-V-IX e IIb-IIIa -----	38
Tabela 2: Referências bibliográficas de alguns resultados respectivos aos polimorfismos nas glicoproteínas plaquetárias em estudo -----	39
Tabela 3: Características gerais dos primers forward (F) e reverse (R) usados no PCR para o polimorfismo PI ^{A1/A2} -----	55
Tabela 4: Características gerais dos primers forward (F) e reverse (R) usados nas reacções de PCR para os polimorfismos HPA-2, KOZAK e VNTR -----	56
Tabela 5: Condições relativas ao tempo e temperatura dos ciclos para amplificação dos polimorfismos da GP Iba estudados-----	57
Tabela 6: Padrão de restrição esperado para cada alelo -----	58
Tabela 7: Dados clínicos referentes aos grupos em estudo -----	61
Tabela 8: Dados provenientes da análise hematológica referente aos grupos em estudo -----	62
Tabela 9: Dados provenientes do perfil lipídico e dos níveis de glicose em jejum dos indivíduos que constituem os grupos em estudo -----	64
Tabela 10: Resultados referentes ao perfil de coagulação dos grupos estudados-----	65
Tabela 11: Frequências genótípicas obtidas nos diferentes grupos para os polimorfismos estudados, expressas em percentagem-----	68
Tabela 12: Frequências alélicas obtidas para os polimorfismos estudados nos diferentes grupos -----	69

Tabela 13: Comparação das frequências alélicas obtidas no grupo controlo com as frequências alélicas para os mesmos polimorfismos na população caucasiana de acordo com a bibliografia consultada ----- 70

Tabela 14: Comparação das frequências genóticas obtidas, em percentagem, no grupo controlo com as frequências genóticas obtidas para os polimorfismos HPA-2 e PI^{A1/A2} noutras populações caucasianas ----- 71

Tabela 15: Comparação das frequências genóticas obtidas, em percentagem, no grupo controlo com as frequências genóticas obtidas para os polimorfismos KOZAK e VNTR na população caucasiana----- 71

Tabela 16: Frequências observadas e esperadas (entre parêntesis) nos diferentes grupos para os polimorfismos estudados ----- 72

Tabela 17: Frequências genóticas observadas e esperadas (entre parêntesis) para os polimorfismos analisados nos diferentes grupos e sub-grupos estudados ----- 73

Tabela 18: Frequências genóticas observadas e esperadas (entre parêntesis) para os três SNPs estudados no grupo controlo e no grupo DM tipo 2, utilizando o teste χ^2 para comparar as frequências entre os grupos ----- 73

Tabela 19: Frequências genóticas observadas e esperadas (entre parêntesis) para os três SNPs estudados no sub-grupo DM tipo 2 não isquémico e no sub-grupo DM tipo 2 isquémico, utilizando o teste χ^2 para comparar as frequências entre os sub-grupos --- 74

Tabela 20: Valores de p obtidos pelo teste de Mann-Whitney ----- 74

Tabela 21: Resultado de *Exp* (β_i) ou *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de confiança (IC) para as variáveis estatisticamente significativas quando a variável dependente é DM tipo 2 ----- 79

Tabela 22: Diferentes combinações para os 4 polimorfismos nos grupos e sub-grupos estudados ----- 81

A Diabetes mellitus (DM) é um problema de saúde pública global. A World Health Organization (WHO) estima que mais de 180 milhões de pessoas no mundo sofrem da doença e é muito provável que este número duplique até 2030 (WHO). Mais de 3 milhões de pessoas morrem anualmente de problemas que derivam da Diabetes mellitus e pensa-se que nos próximos 10 anos, o total de mortes devido à DM aumente mais de 50% se não houver acções de prevenção urgentes (1).

A Diabetes mellitus é uma doença crónica, caracterizada por hiperglicemia crónica e responsável por variadas complicações que afectam o sistema nervoso e vascular.

Para que a glicose entre nas células é necessário que se verifiquem duas condições: que as células tenham um número suficiente de receptores activos para a insulina e que exista insulina suficiente para desbloquear os transportadores de glicose. Assim sendo, quando há insulina suficiente mas não há o número de receptores celulares suficiente que permitem a entrada da glicose nas células, ocorre a Diabetes mellitus tipo 2. Quando não há produção de insulina, os receptores celulares que permitem a entrada da glicose nas células não são desbloqueados, e ocorre a Diabetes mellitus tipo 1. Em ambas as situações, os níveis de glicose no sangue sobem, condição conhecida por hiperglicemia.

Os sintomas mais comuns associados à DM são sede, micções frequentes, fome, perda de peso, fadiga, alterações visuais, glicemia, glicosúria e maior dificuldade em cicatrizar pequenas feridas.

A hiperglicemia diabética induz um grande número de alterações no tecido vascular que promovem uma aceleração da aterosclerose. Os pacientes com DM tipo 2 apresentam uma maior frequência de complicações macrovasculares como aterosclerose e trombose, afectando as artérias coronárias, cerebrais e periféricas (2, 3). Em consequência disso, a principal causa de mortalidade e morbidade prematura dos indivíduos com DM tipo 2 são as doenças cardiovasculares (4). As alterações macrovasculares são principalmente causadas pelos depósitos de gorduras na parede

interior dos vasos sanguíneos que irrigam os órgãos, especialmente o coração, o cérebro e os membros inferiores, bloqueando a irrigação sanguínea dos mesmos. Nesta situação conhecida como aterosclerose, os vasos sanguíneos tornam-se menos flexíveis e mais estreitos. Eventualmente, pode ocorrer oclusão do vaso sanguíneo devido a aterosclerose obliterante ou à ruptura da placa de ateroma e exposição do seu conteúdo ao sangue activando as plaquetas e a cascata da coagulação, levando conseqüentemente à formação de trombos ricos em plaquetas. Ambas as situações causam isquemia que provoca danos nos tecidos adjacentes à oclusão do vaso sanguíneo.

As plaquetas têm um papel decisivo na formação de um trombo após a perda da integridade vascular. Por isso, plaquetas mais sensíveis ou reactivas a pequenas alterações de homeostasia podem formar trombos em circulação mais facilmente, dando origem a desordens oclusivas arteriais.

O que permite às plaquetas interagirem entre elas e com a matriz endotelial, são glicoproteínas na sua superfície que funcionam como receptores. Estudos recentes sugerem que os polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias são importantes factores genéticos que contribuem para o aumento de risco trombótico. Pensa-se que essas variações genéticas estarão associadas a um estado de hiper-agregabilidade das plaquetas (3). Assim, factores genéticos e ambientais fazem com que a extensão da resposta plaquetária face à ruptura da placa de ateroma varie entre indivíduos (5).

Desde a década de 80 se tem estudado alguns polimorfismos nos genes que codificam para estas glicoproteínas, sob suspeita de estes aumentarem o risco de isquemia arterial uma vez que tornariam as plaquetas mais reactivas, que levam mais facilmente à formação de trombos e à oclusão de pequenos vasos sanguíneos. Assim, estes polimorfismos são considerados um dos factores associados às alterações da funcionalidade das plaquetas em indivíduos com Diabetes mellitus (6).

Alguns Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) já descritos em glicoproteínas (GP) plaquetárias são o HPA-2 e KOZAK na glicoproteína Ib-V-IX e o $PI^{A1/A2}$ na glicoproteína IIb-IIIa. Também já foi descrito um Variable Number Tandem Repeat (VNTR) na glicoproteína Ib-V-IX.

A GPIb α forma parte do complexo GPIb-V-IX que medeia a adesão inicial das plaquetas ao endotélio lesado. Dada a importância deste receptor na adesão plaquetária, tem sido sugerido que pequenas alterações na estrutura da GPIb α podem influenciar a resposta funcional das plaquetas. Dois dos SNPs já descritos para a GPIb α , o “human

platelet antigen-2” (HPA-2) e o KOZAK, têm sido associados a uma maior reactividade plaquetária, no entanto, há discrepâncias quanto ao seu envolvimento no risco trombótico, dependendo dos grupos populacionais estudados (7, 8). O alelo B do VNTR descrito na GPIIb α foi associado a variados eventos trombóticos, sendo considerado um factor de risco de trombose coronária e enfarte do miocárdio (9, 10).

A glicoproteína GPIIIa forma parte do complexo GPIIb-IIIa que medeia a agregação plaquetária. Os principais ligandos para este complexo são o fibrinogénio e o factor de von Willebrand (vWf). O polimorfismo mais estudado na glicoproteína GPIIIa é o “human platelet antigen-1” (HPA-1 ou PI^{A1/A2}). Diversos trabalhos mostraram que este polimorfismo pode ter consequências funcionais na reactividade plaquetária, mas não há resultados conclusivos (11).

Estarão relacionados estes polimorfismos com a resposta a factores trombogénicos, sendo mais fácil a activação plaquetária em doentes com Diabetes mellitus tipo 2?

Continua a ser necessário o estudo do efeito destes polimorfismos em grupos específicos para poder esclarecer o seu papel no risco de eventos trombóticos. Apesar dos vários estudos já realizados, não há concordância nos resultados obtidos e são escassos os trabalhos desenvolvidos em indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2.

Assim, o principal objectivo proposto para este trabalho é determinar se a presença de polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias GPIIb α e GPIIIa estará associada com eventos trombóticos, nomeadamente isquemia arterial nos membros inferiores, em indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2.

A parte I deste trabalho compreende uma abordagem teórica ao tema. A parte II contém os objectivos do trabalho, a metodologia utilizada, os resultados e a discussão dos mesmos em paralelo com as conclusões.

PARTE I.

1.1. Diabetes mellitus tipo 2

A Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crónica que atinge entre 500 e 900 mil portugueses, segundo a Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal em 2009 (12). A prevalência mundial da diabetes em 2002 foi de 170 milhões, com uma previsão de 366 milhões até 2030 (13). Cerca de 90% dos diabéticos são do tipo 2 (14).

A Diabetes mellitus tipo 2 ocorre quando as células não conseguem utilizar adequadamente a insulina que o organismo produz ou quando esta é incorrectamente secretada. A insulina é a hormona produzida pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, que regula a concentração de glicose na corrente sanguínea, permitindo a incorporação da glicose nas células (figura 1) uma vez que activa os transportadores da

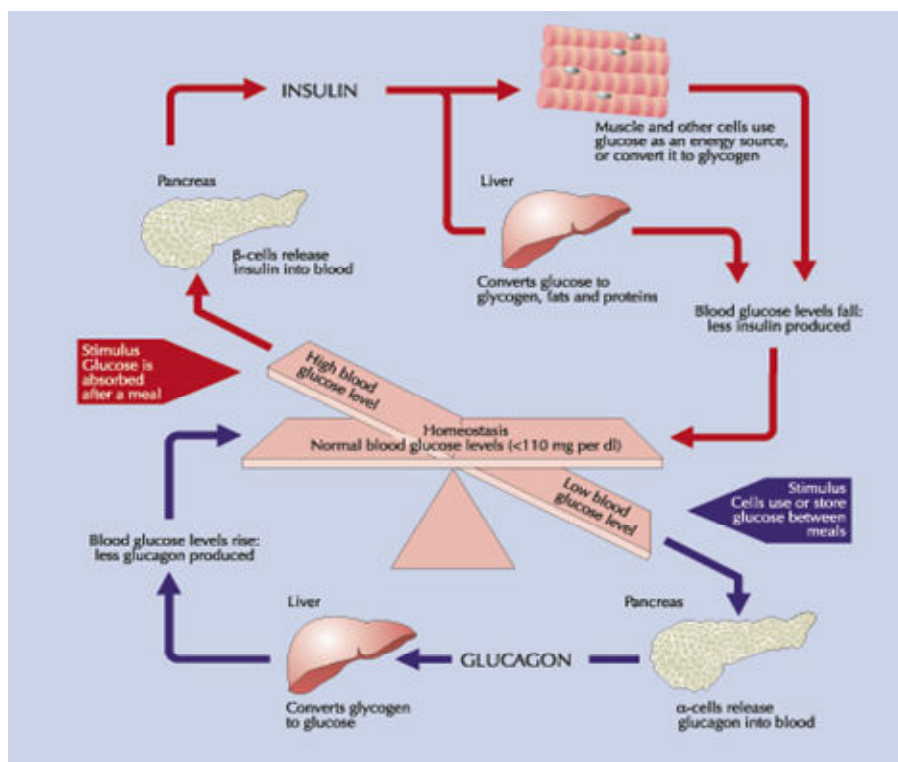


Fig. 1: Metabolismo da glicose.

Adaptado de Dugi K em www.scienceschool.org

glicose GLUT4. O glucagon é a hormona com função oposta à insulina, isto é, enquanto que a insulina é produzida quando os níveis de glicose sanguínea são elevados de forma a que a glicose seja incorporada nas células, o glucagon leva à produção e libertação de glicose na corrente sanguínea (figura 1). É desta forma que se alcança a homeostasia, mantendo os níveis de glicose normais no sangue (<110mg/dL).

Alguns dos factores de risco conhecidos para a Diabetes mellitus tipo 2 são a predisposição genética, a idade avançada, a inactividade física ou sedentarismo, obesidade e hábitos alimentares pouco saudáveis com dietas ricas em calorias (15).

As alterações metabólicas causadas pela DM (hiperglicemia, aumento dos ácidos gordos livres e resistência à insulina, causada por defeitos na secreção de insulina e diminuição da sensibilidade das células à insulina) induzem disfunção vascular que predispõe o paciente para aterosclerose (16, 17). As complicações que advêm da hiperglicemia afectam os diversos sistemas do organismo humano. Alguns estudos indicam que a diminuição de hiperglicemia reduz o risco das complicações diabéticas (11).

Diversos trabalhos revelaram também que a hiperglicemia induz efeitos pró-coagulantes e anti-fibrinolíticos (18). Nos indivíduos com DM, a combinação do aumento de inibição de fibrinogénio com as alterações na reactividade plaquetária poderão levar a um risco aumentado de doença cardiovascular (2).

1.2. Complicações vasculares na Diabetes mellitus

Estudos demonstraram que um mau controlo glicémico está associado a um aumento das complicações micro- e macro-vasculares nos indivíduos com DM (19).

A DM está normalmente associada a complicações microvasculares e macrovasculares (20) que resultam quer de desordens nas células endoteliais quer de alterações da coagulação sanguínea, afectando vários órgãos como os rins, retina, nervos periféricos e compartimentos micro- e macro-vasculares (21).

As principais consequências das alterações microvasculares causadas pela alteração endotelial na DM tipo 2 são a retinopatia, a neuropatia e a nefropatia. Normalmente resultam das primeiras lesões endoteliais e alterações plaquetárias que

ocorrem no doente diabético (6). As complicações microvasculares também são causas importantes de morbidade e mortalidade em doentes diabéticos.

As doenças cardiovasculares são a principal consequência das alterações macrovasculares, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade prematura em pacientes com DM (4). Estas alterações compreendem doenças das artérias coronárias, das artérias periféricas (aórtica-iliaca e femuropopliteal) e das carótidas, sendo a principal manifestação a aterosclerose (17).

A fisiopatologia das doenças vasculares na Diabetes mellitus envolve anomalias no endotélio, nas células do músculo liso vascular e na função das plaquetas (17).

O risco de doença arterial coronária, enfarte do miocárdio e doença arterial periférica está aumentado duas a quatro vezes em diabéticos (22).

A maioria dos pacientes com Diabetes mellitus morre devido a complicações cardiovasculares, normalmente desencadeadas por eventos trombóticos agudos impostos por lesões ateroscleróticas na circulação arterial, uma vez que a hiperglicemia induz um grande número de alterações no endotélio vascular que promove a aceleração de aterosclerose.

1.2.1. Endotélio

O endotélio consiste numa monocamada de células endoteliais que revestem internamente os vasos sanguíneos, separando o sangue da restante parede celular (figura 2).

As células endoteliais sintetizam e libertam substâncias biologicamente activas que mantêm a homeostasia vascular, assegurando uma correcta fluidez sanguínea e distribuição de nutrientes, enquanto que impedem a coagulação sanguínea e previnem a trombose (16, 17, 23).

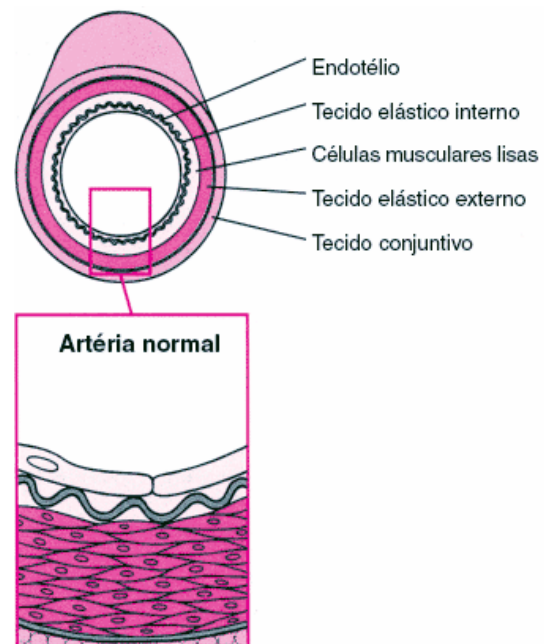


Fig.2: Corte transversal de um vaso sanguíneo. Adaptado de Manual Merck: de saúde para a família; pág. 121 (1997)

As principais substâncias libertadas pelas células endoteliais são: (a) o óxido nítrico e a prostaciclina (vasodilatadores e inibidores plaquetários uma vez que levam ao aumento de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelulares); (b) o factor de von Willebrand (transporta e estabiliza o factor VIII da coagulação sanguínea); (c) a endotelina-1 (vasoconstritor envolvido na resposta das células endoteliais a diferentes estímulos); (d) o inibidor do factor tecidual (anticoagulante, uma vez que inibe o factor tecidual, factor necessário para a activação da cascata de coagulação); (e) a proteína S (anticoagulante, pois inactiva juntamente com a proteína C, os factores V e VIII da cascata de coagulação e pró-fibrinolítico, uma vez que inibe a actividade do inibidor do activador do plasminogénio); (f) o activador tecidual do plasminogénio (fibrinolítico, uma vez que cliva o plasminogénio em plasmina e esta inicia a fibrinólise); (g) e o inibidor do activador do plasminogénio (anti-fibrinolítico, uma vez que inibe o activador tecidual do plasminogénio, evitando a clivagem do plasminogénio em plasmina e o início da fibrinólise) (24).

Assim sendo, um endotélio íntegro contribui para a regulação da função vascular e estrutural sendo a maior protecção para a trombose arterial, aterosclerose e vasoconstrição (23). As alterações funcionais do endotélio na Diabetes mellitus são causadas pela hiperglicemia, excesso de ácidos gordos e resistência à insulina (figura 3) que tornam as artérias dos diabéticos mais susceptíveis à aterosclerose (16, 22).

A hiperglicemia inibe a produção do óxido nítrico (NO) e aumenta a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) nas células endoteliais e nas células musculares lisas da parede vascular (16, 22).

A resistência à insulina leva a um excesso de libertação de ácidos gordos do tecido adiposo que activa a proteína Cinase C e aumenta a produção de espécies reactivas de oxigénio (16). Uma vez que as concentrações de NO são reduzidas na DM, há um aumento da produção de vasoconstritores, como a endotelina-1 e angiotensina II (16, 25). O aumento de endotelina-1 activa o receptor para os produtos finais da glicosilação (RAGE). Devido à hiperglicemia, há formação de produtos finais da glicosilação (AGE) em excesso (por exemplo, a hemoglobina glicosilada em que um produto da glicose se liga à hemoglobina e altera a sua função). Os AGE produzidos em excesso ligam-se ao RAGE, que aumenta a activação de factores de transcrição como o factor nuclear κ B (NF- κ B) e do activador da proteína-1, citoquinas pró-inflamatórias (26). Estes factores regulam a expressão de vários genes mediadores da aterogénese,

como por exemplo, as moléculas de adesão leucocitária na superfície das células endoteliais e proteínas quimiotácticas monocíticas que recrutam os linfócitos e monócitos para a parede vascular (16). O factor tecidual também encontrado na placa de ateroma, é produzido em maior quantidade pelas células endoteliais em indivíduos com DM, o que constitui um importante factor pró-coagulante (16).

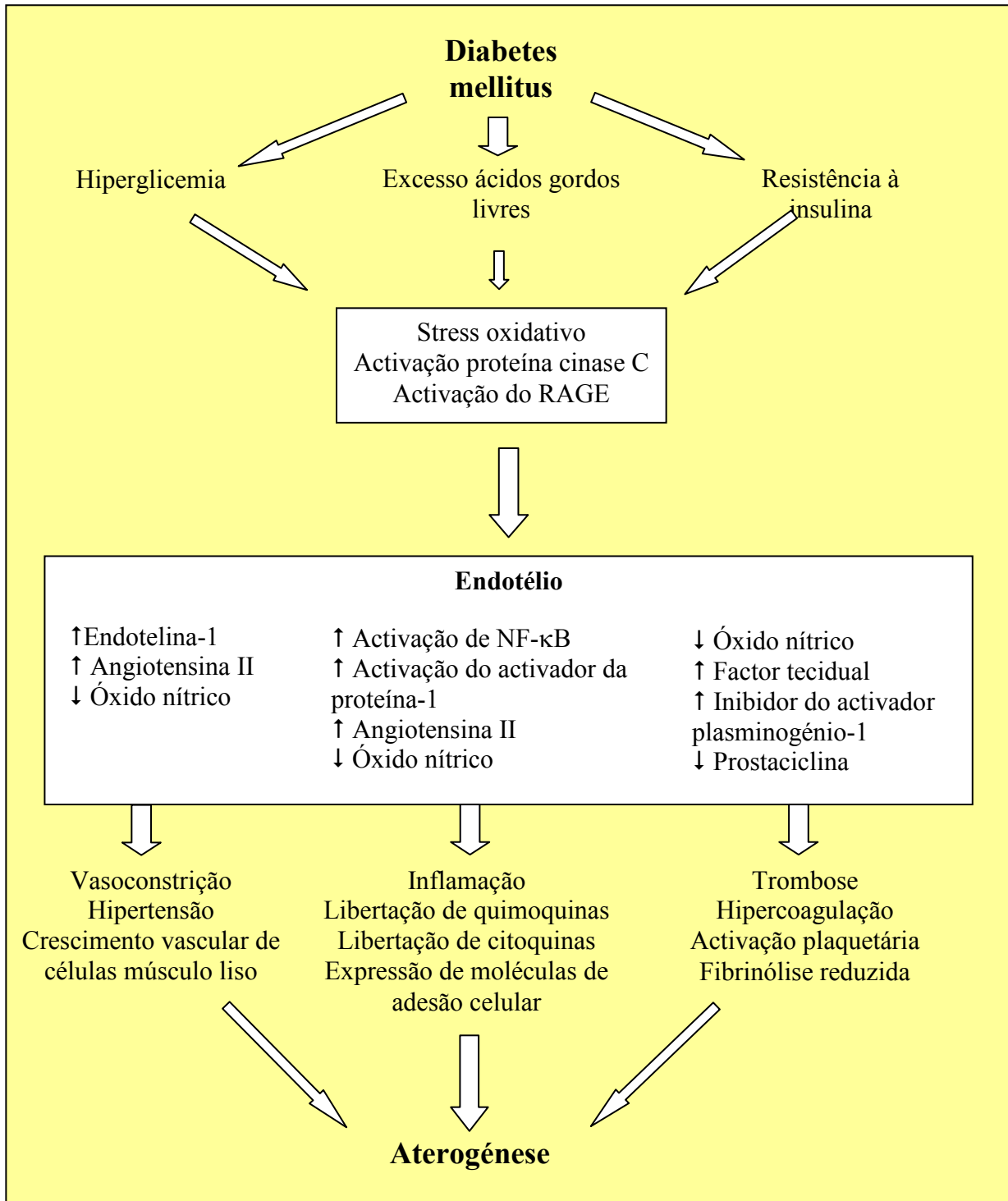


Fig. 3: Efeitos da Diabetes mellitus sobre o endotélio e principais consequências

Adaptado de Beckman et al. (2002)¹⁶

As plaquetas dos indivíduos com DM também sofrem alterações funcionais, que podem acentuar a progressão da aterosclerose e ter consequências após a ruptura das placas ateroscleróticas (figura 4).

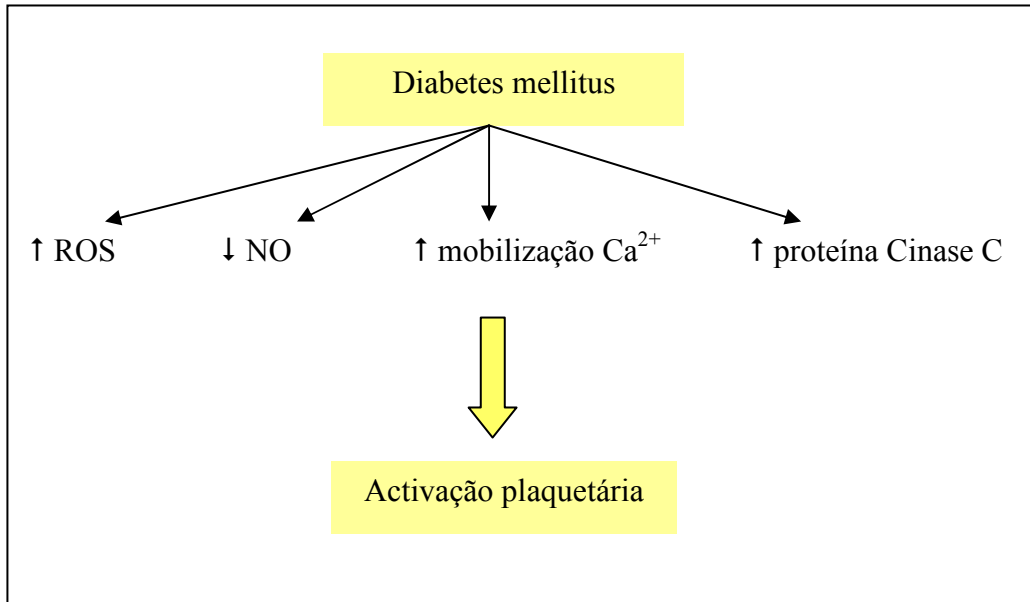


Fig. 4: Alterações plaquetárias na Diabetes mellitus tipo 2.

Adaptado de Haouari e Rosado (2008)²⁷

Tal como nas células endoteliais, níveis de glicose elevados também levam à activação da proteína cinase C, diminuição da produção de NO e aumento da formação de ROS nas plaquetas (27). Também provocam uma alteração na homeostasia do cálcio, com consequências na actividade normal das plaquetas, uma vez que o cálcio regula as alterações morfológicas, a secreção e a agregação plaquetária (16). Para além destes factos, indivíduos com DM também têm uma expressão aumentada de glicoproteínas na superfície das plaquetas que medeiam a interacção das plaquetas com o fibrinogénio e o factor de von Willebrand.

Todos estes mecanismos podem ser a explicação para um maior potencial trombótico nos indivíduos com DM tipo 2.

1.2.2. Aterosclerose

Designa-se por aterotrombose, a presença de aterosclerose e as complicações trombóticas derivadas.

A aterosclerose é uma patologia que afecta principalmente os países industrializados. Define-se como uma doença de evolução progressiva, na qual a gordura se acumula por baixo do revestimento interno da parede das artérias levando ao estreitamento das mesmas (figura 5).

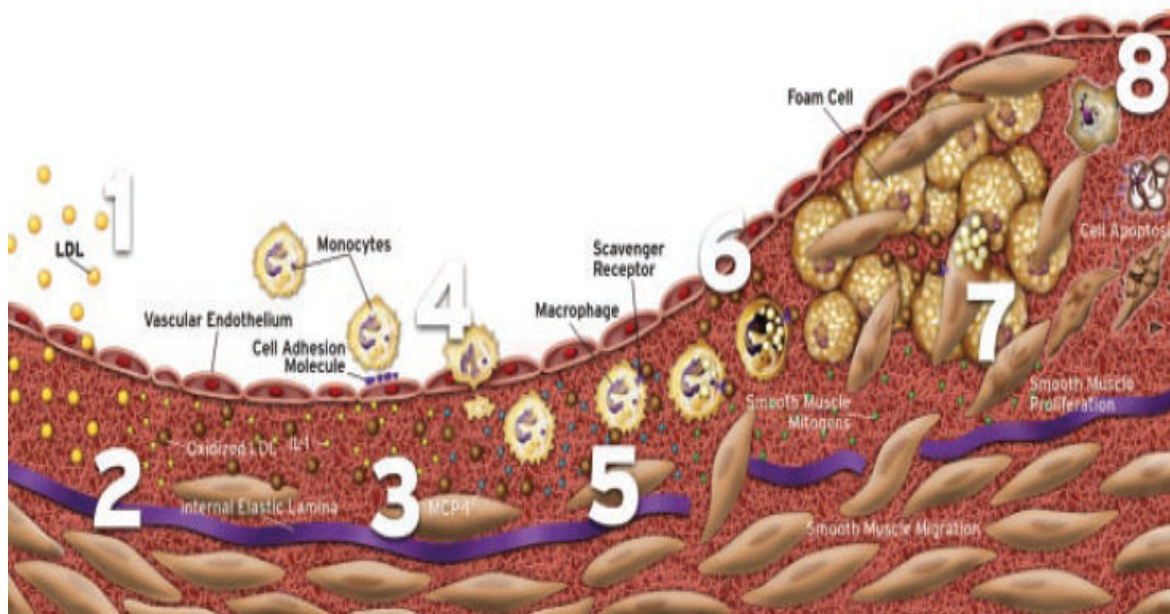


Fig. 5: Desenvolvimento em 8 estágios de uma placa de ateroma: 1) e 2) migração do LDL para o subendotélio e sua oxidação pelos macrófagos e células musculares lisas; 3) e 4) libertação de factores de crescimento e citocinas atraindo mais monócitos; 6), 7) e 8) promoção do crescimento da placa de ateroma com acumulação de células espumosas e proliferação de células musculares lisas.

Adaptado de Faxon et al. (2004)²⁸

Alguns factores de risco envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose são o tabagismo, a Diabetes mellitus, a dislipidemia (elevadas concentrações de triglicérides e LDL (low density lipoprotein) e baixas concentrações de HDL (high density lipoprotein) no sangue), a hipertensão arterial, inactividade física e a predisposição genética (28, 29, 30). A aterosclerose torna-se evidente quando já se encontra num estado patológico avançado, havendo dificuldade na detecção precoce da doença.

Os processos que levam ao aparecimento da aterosclerose são complexos e envolvem múltiplos sistemas interligados que regulam a actividade vascular, como a disfunção endotelial, a adesão de moléculas e os seus ligandos, o metabolismo dos lípidos, as cascatas da coagulação e fibrinolítica, a inflamação, o stress oxidativo e factores genéticos (figura 3) (28, 31). Mas o principal factor que desencadeia a aterosclerose é a perda de função do endotélio vascular com o aumento da sua permeabilidade (23).

As principais consequências da aterosclerose são: (a) estreitamento das artérias, sendo que o fluxo sanguíneo insuficiente origina uma diminuição da provisão de oxigénio (isquemia), que se pode manifestar subitamente (isquemia aguda) ou de forma gradual (isquemia crónica); (b) e activação plaquetária resultante da ruptura das placas de aterosclerose, levando à formação de trombos plaquetários.

1.2.3. Placa de ateroma e activação plaquetária

As placas de ateroma são constituídas fundamentalmente por macrófagos, lípidos, leucócitos e factor tecidual.

Inicialmente, células endoteliais disfuncionais (figura 5) recrutam monócitos e linfócitos T para a parede vascular arterial através de receptores de adesão. Os monócitos e linfócitos T acabam por se infiltrar na camada íntima da parede dos vasos sanguíneos por diapedese através de moléculas de adesão das células vasculares (CAMs). Há um aumento da permeabilidade endotelial para as lipoproteínas, leucócitos e outros mediadores inflamatórios. O aumento do número de lipoproteínas aterogénicas e linfócitos T na camada íntima estimula os monócitos a tornarem-se macrófagos. Estes ingerem partículas LDL oxidadas e tornam-se células espumosas (foam cells) (26). As células musculares lisas endoteliais migram também para a camada íntima do vaso sanguíneo onde proliferam e retêm lipoproteínas. Há um maior recrutamento de leucócitos e os agregados plaquetários passam a aderir ao endotélio lesado em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios que são secretados pelas células endoteliais disfuncionais que activam leucócitos, células do músculo liso e plaquetas. A inflamação é perpetuada pela constante produção de citocinas por parte dos linfócitos T e macrófagos existentes na placa de ateroma (32). O recrutamento constante de células inflamatórias para a área de lesão do endotélio é o fenómeno que permite o crescimento da placa de ateroma.

Existem evidências que sugerem que a hiper-lipoproteinemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, hiper-homocisteinemia, fumo do tabaco, entre outros, aumentam a inflamação, a resposta à lesão vascular e potenciam a cascata da coagulação, acelerando a trombogénese (32).

Dada a importância e consequências resultantes da ruptura da placa de ateroma, a estabilização das placas coronárias tornou-se uma estratégia na manutenção dos

pacientes com doença arterial coronária (CAD). A formação de trombos plaquetários junto aos locais de ruptura das placas de aterosclerose é a causa primária de angina instável e, quando resulta na oclusão do vaso, causa enfarte do miocárdio (33). As placas de ateroma mais instáveis e susceptíveis à ruptura são as que apresentam uma capa fibrosa com maior quantidade de lípidos (34). O conteúdo de lípidos na placa de ateroma é determinado pela quantidade de células espumosas (35).

Segundo Virchow, a ocorrência de trombose arterial depende da parede vascular arterial, das características que afectam o fluxo sanguíneo local (como a elevada tensão local e estase local) e factores sistémicos do sangue em circulação (como factores hormonais ou metabólicos, factores da hemóstase e elementos celulares) (36).

A erosão ou ruptura da placa de ateroma leva à exposição do seu conteúdo ao sangue. A activação plaquetária é iniciada pela ligação de substâncias trombogénicas, como o colagénio, trombina, factor tecidual ou outros componentes libertados da placa de ateroma, a receptores localizados na superfície das plaquetas (37).

A agregação das plaquetas é imediata após a exposição a estes componentes.

Inicialmente, as plaquetas inactivadas em circulação reconhecem ligandos da matriz endotelial danificada, como o factor de von Willebrand e o colagénio, através de receptores glicoproteicos da sua membrana que permitem a aderência das plaquetas ao vaso sanguíneo.

A ligação entre a glicoproteína plaquetária Ib-V-IX e o factor de von Willebrand e a união da GP Ia-IIa com o colagénio exposto na lesão endotelial, activam um fluxo de sinais (hidrólise dos fosfolípidos da membrana, mobilização do cálcio intracelular, fosforilação de proteínas intracelulares e secreção dos grânulos plaquetários) que levam à modificação conformacional e à activação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ou glicoproteína IIb-IIIa, que passa a expôr locais de elevada afinidade para o fibrinogénio na superfície das plaquetas, necessário para a agregação plaquetária (18, 37). Após a libertação do conteúdo dos grânulos intracelulares plaquetários (serotonina, ADP, tromboxano A2) são activadas outras plaquetas, promovendo a activação e agregação de mais plaquetas.

Em condições normais há factores que limitam a progressão destes trombos como a reestruturação do endotélio (que produz prostaciclina e óxido nítrico que inibem a activação plaquetária) e a elevada actividade fibrinolítica (37). No entanto, o endotélio de indivíduos com DM sintetiza níveis diminuídos de prostaciclina e óxido nítrico (38), pelo que a formação do trombo continua.

1.2.4. Isquemia

A isquemia ocorre quando há uma interrupção do fluxo sanguíneo, impedindo a nutrição e oxigenação das células. Pode ser causada por aterosclerose obliterante ou pela formação de trombos.

Podem diferenciar-se dois tipos de isquemia, a arterial e a venosa.

Na isquemia arterial, a oclusão arterial pode ser causada quer por aterosclerose quer por formação de trombos sanguíneos (39, 40). Ocorre num contexto de elevada pressão, na qual a formação da placa de ateroma e a ruptura da mesma com a exposição de factor tecidual é provavelmente o estímulo inicial da formação de um coágulo (31). A composição deste trombo arterial consiste principalmente em plaquetas, colagénio e células musculares lisas que derivam da placa aterosclerótica (31). A trombose arterial ocorre principalmente na população mais idosa, causada por vários factores ambientais, como o tabaco, hipertensão arterial e colesterolemia, que podem agir sinergicamente com factores genéticos (41).

O aparecimento da isquemia arterial no membro inferior causado pela aterosclerose é conhecido por doença arterial periférica. A doença arterial periférica pode ser diferenciada em 5 fases que poderão culminar com a formação de úlcera isquémica. O sinal mais frequente e mais precoce da existência de isquemia arterial no membro inferior é a claudicação intermitente, que se manifesta através de dor no membro inferior durante o exercício físico e que diminui rapidamente com o repouso. A fase 2 é caracterizada por algia em repouso mas sem lesão. Esta evolui para a fase 3, onde surge cianose fixa, principalmente do hálux. As fases finais são a gangrena e a úlcera isquémica (42, 43).

A fisiopatologia da isquemia venosa é distinta da isquemia arterial (31). O início e a progressão de tromboembolismo venoso parece estar mais dependente da activação da cascata de coagulação do que da activação plaquetária (31). O trombo venoso é formado principalmente por fibrina (31) e é gerado pela activação da cascata de coagulação plasmática em locais de estase (baixa pressão sanguínea). A trombose venosa normalmente está associada a defeitos nas proteínas da coagulação e fibrinólise ou a anormalidade do fluxo sanguíneo (44).

2.1. Plaqueta

A plaqueta é uma célula sanguínea anucleada que se encontra na circulação sanguínea de forma não activada e que deriva da fragmentação do megacariócito (única célula poliplóide hematopoiética).

A plaqueta tem entre 2 a 5 μm de diâmetro e 0,5 μm de espessura, sendo por isso, a mais pequena célula sanguínea em circulação (24). Tem um volume médio de 6 a 10 fL e um tempo de semi-vida de 7 a 10 dias (24).

As plaquetas estão envolvidas em diferentes processos celulares como, a) activação da hemóstase, em caso de lesão dos vasos, b) processo inflamatório, c) defesa antimicrobiana, d) crescimento de tumores, metástases e angiogénese (24).

A plaqueta pode ser organizada em diferentes zonas, (A) a zona periférica, (B) a zona Sol-Gel, (C) a zona de organelos e (D) o sistema de membranas (figura 6) (24).

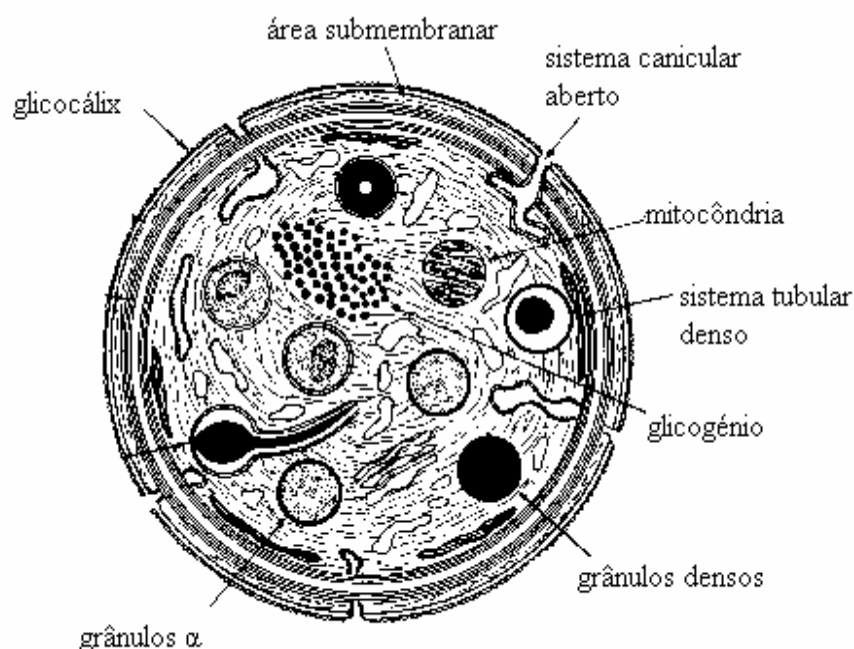


Fig. 6: Estrutura da plaqueta em circulação.

Adaptado de White (1979)⁴⁵

(A) Zona periférica composta pela membrana plasmática, com pequenas aberturas na superfície com contacto com o sistema canicular aberto, é constituída por:

- glicocálix: superfície exterior da plaqueta que serve como barreira para separar o conteúdo interno do meio externo, e é uma estrutura dinâmica que serve de primeiro contacto. O glicocálix é coberto de glicoproteínas necessárias para a adesão, activação e agregação da plaqueta, para a interacção com outros elementos celulares e para a aceleração do processo de formação de coágulo;
- área submembranar: área abaixo da membrana da zona periférica com importância na função da plaqueta.

(B) Zona Sol-Gel, também denominada de zona de estrutura, é constituída por:

- microtúbulos: com função no sistema de suporte do citoesqueleto, envolvidos na alteração de forma e transformação interna;
- microfilamentos: são filamentos de actina com função na fisiologia plaquetária. Em repouso, os filamentos de actina servem de matriz onde todos os organelos e outros componentes estruturais estão suspensos e os mantém afastados uns dos outros e da parede celular;
- glicogénio;
- vesículas lisas: observadas nos megacariócitos e difíceis de distinguir nas plaquetas.

(C) Zona de organelos, constituída pelos organelos secretórios:

- grânulos α : são os organelos mais abundantes na plaqueta variando entre 40-80 grânulos por plaqueta. O conteúdo dos grânulos α é rico em factor de von Willebrand (vWf), factor V, trombospondina, P-selectina e fibrinogénio;
- grânulos densos: apresentam grande variabilidade morfológica, são menores que os grânulos α e em menor número. Existem entre 1 a 1,4 por plaqueta. O seu conteúdo é rico em cálcio;
- lisossomas: existem entre 0 a 3 por plaqueta e acumulam fosfatase ácida. A função dos lisossomas plaquetários é desconhecida na hemóstase;
- mitocôndrias: intervêm no metabolismo energético;
- glicossomas: apresentam forma oval e contêm glicogénio.

(D) Sistema de membranas, constituído por:

- complexo de Golgi: é evidente nos megacariócitos;
- sistema canicular aberto: são invaginações da superfície da membrana formando túbulos através do citoplasma, que permitem a transferência de produtos entre a plaqueta e o plasma;
- sistema tubular denso: encontra-se disperso pelo citoplasma;
- complexos e membrana: pontos de intersecção entre o sistema canicular aberto e o sistema tubular denso;
- retículo endoplasmático rugoso: raramente encontrado nas plaquetas em circulação, pois desaparece com a formação dos grânulos.

A plaqueta possui pequenas quantidades de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) apesar de não ter núcleo. Por não ter núcleo, não pode transcrever RNAm para repôr os seus resíduos de RNAm derivados dos megacariócitos (44, 46). No entanto, após activação, as plaquetas podem traduzir o RNAm em proteínas, como é o exemplo da citocina IL-1 β (46). Todavia, a importância da síntese de proteínas na plaqueta ainda é um assunto pouco esclarecido e é possível que a maquinaria de tradução transite dos megacariócitos (44, 46).

No momento da activação das plaquetas, estas libertam o conteúdo intracelular dos seus grânulos com efeito na activação e agregação plaquetária. Acredita-se que as plaquetas tenham um papel mais importante no desenvolvimento de trombose arterial que trombose venosa (3, 44).

2.2. Polimorfismos de glicoproteínas plaquetárias

As glicoproteínas (GP) que se encontram no glicocálix das plaquetas funcionam como receptores que possibilitam a adesão, a activação e a agregação das plaquetas.

Dois dos principais receptores plaquetários envolvidos na hemóstase e trombose são a glicoproteína Ib-V-IX e a glicoproteína IIb-IIIa (tabela 1).

Tabela 1: Função e ligandos das glicoproteínas plaquetárias Ib-V-IX e IIb-IIIa.

Glicoproteína	Principal função	Ligandos
IIb-IIIa	Adesão e agregação plaquetária	Fibrinogénio, vWf, trombospondina, fibronectina, vitronectina
Ib-V-IX	Adesão plaquetária	Trombina, vWf

Como já referido no capítulo anterior, a exposição do subendotélio vascular resulta na imediata união da glicoproteína Ib-V-IX ao factor de von Willebrand e da adesão da glicoproteína Ia-IIa ao colagénio subendotelial. Estas ligações activam a GP IIb-IIIa que se liga ao fibrinogénio resultando na agregação plaquetária (figura 7).

Assim sendo, qualquer diferença genética que possa alterar a expressão ou a actividade das glicoproteínas na superfície das plaquetas, podem influenciar a hemóstase (47).

O impacto de alguns polimorfismos de glicoproteínas plaquetárias tem sido estudado como um eventual factor de risco de doenças trombóticas e hemorrágicas (tabela 2), no entanto os resultados dos vários estudos têm sido inconclusivos.

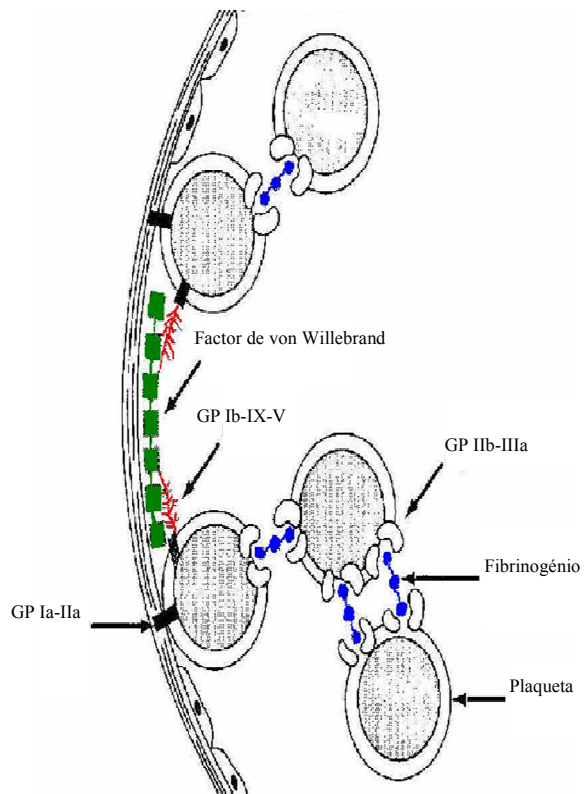


Fig. 7: Principais glicoproteínas envolvidas nas interações plaqueta-plaqueta e plaqueta-matriz endotelial.

Adaptado de Medicina Interna – Harrison; 15ª Edição; MacGrawHill; pág. 376 (2002)

Tabela 2: Referências bibliográficas de alguns resultados respectivos aos polimorfismos nas glicoproteínas plaquetárias em estudo

Glicoproteína	Polimorfismo	Alteração aminoacídica	Associação com isquemia arterial	Sem associação com isquemia arterial
IIIa	PI ^{A1/A2}	Leu33Pro	18, 48, 49	2, 7, 50, 51, 52, 53, 54, 55
	HPA-2	Thr145Met	8, 9, 54	7
Ib α	-5T/C	-	41, 54, 55, 56	57, 58
	VNTR	-	8, 9	48, 55, 59

Entende-se por polimorfismo as variações estáveis na sequência de ácido desoxiribonucleico (DNA) na qual dois ou mais alelos para um dado locus existe em mais de 1% dos cromossomas de uma população (54, 60).

Um polimorfismo que se localize na sequência nucleotídica codificante e modifique o aminoácido pode alterar a estrutura, a antigenicidade ou a função da proteína que codifica. Se a variação genética se localiza em sequências nucleotídicas reguladoras pode alterar a transcrição ou a tradução do gene, afectando o fenótipo do organismo (54, 60).

Os polimorfismos estudados no presente trabalho incluem os SNPs PI^{A1/A2} na GP IIIa e, o HPA-2 e o KOZAK na GP Ib α , e um VNTR na GP Ib α .

2.2.1. Glicoproteína I Ib-IIIa ou integrina α Ib β 3

A glicoproteína I Ib-IIIa (GP I Ib-IIIa) ou integrina α Ib β 3 faz parte da família das integrinas, proteínas da matriz extracelular envolvidas na adesão e sinalização. A GP I Ib-IIIa consiste em heterodímeros de subunidades α e β unidas por ligações não covalentes na proporção de 1:1 (61).

As integrinas normalmente existem num estado ou de baixa ou de elevada afinidade que é alterado pela sinalização do citoplasma e a fosforilação dos seus domínios citoplasmáticos (44). Numa plaqueta não activada, a GPIIb-IIIa terá baixa afinidade para os seus ligandos, passando a um estado de elevada afinidade após a fosforilação dos seus domínios citoplasmáticos.

As plaquetas expressam em repouso entre 50.000 e 80.000 GP I Ib-IIIa (61).

A função da GPIIb-IIIa é intervir nas interações plaqueta-plaqueta promovendo a agregação plaquetária, através dos seus ligando (tabela 1). A deficiência ou ausência da GP I Ib-IIIa denomina-se de Trombastenia de Glanzmann.

Estruturalmente, a integrina α Ib β 3 está acoplada à submembrana do citosqueleto pelas caudas de α Ib e β 3.

O gene da subunidade IIIa também denominado de integrina β 3 (ITGB3), encontra-se no cromossoma 17, é constituído por 15 exões e origina uma proteína formada por 762 aminoácidos (61). É na GPIIIa da GPIIb-IIIa que se localiza o polimorfismo PI^{A1/A2} ou HPA-1.

O polimorfismo PI^{A1/A2} encontra-se no exão 2 (figura 8) e corresponde à substituição nucleotídica de uma Timina por uma Citosina na posição 1565 (T1565C) da GPIIIa. Uma vez que a substituição ocorre na segunda posição do codão CTG isto causa uma substituição do aminoácido Leucina por Prolina na posição 33 (Leu33Pro) da proteína.

```

1  ttgggaagtg gtagggcctg caggaggtag agagtcgcca tagctctgat tgctggactt
61  ctctttgggc tctgtcttta cagggcctgc ctctgggctc acctcgtgtg gacctgaagg
121 agaatctgct gaaggataac tgtgccccag aatccatcga gttcccagtg agtgaggccc
181 aagtactaga ggacaggccc ctcagcgaca agggctctgg agacagctcc caggtcactc
241 aagtcagtcc ccagaggatt gcactcgggc tccggccagg tagggctggg actctttgcg
301 gggagagacc tgaagcaggt gg

```

Fig. 8: Sequência do exão 2 da integrina β 3, com a localização do polimorfismo.

Fonte: NCBI, referência DQ454156

O alelo PI^{A1}, o mais comum na população caucasiana, é aquele que na posição 1565 apresenta a Timina; o alelo PI^{A2}, o menos comum, é o que na posição 1565 tem uma Citosina.

O polimorfismo PI^{A2} tem sido associado a um fenótipo hiper-reactivo das plaquetas, implicado na trombose arterial e no desenvolvimento de síndromes coronários instáveis (61).

Foi pela primeira vez em 1996 que Weiss *et al.* identificaram que o fenótipo heterozigótico PI^{A1/A2} tinha um factor de risco significativo, levando à hiper-adesão plaquetária, logo a eventos trombóticos como enfarte do miocárdio e angina instável (18). No entanto, outros estudos demonstraram a falta de associação entre este polimorfismo e a presença de enfarte do miocárdio (53, 54). Alguns estudos posteriores apoiam a ideia de que o alelo PI^{A2} é um factor de risco pró-trombótico, consistente com a hiper-reactividade das plaquetas que apresentam este alelo para a GP I Ib-IIIa (54).

Em doentes com DM tipo 2 também foram encontrados resultados controversos. Tschoepe *et al.* (2003) encontraram uma alta associação do alelo PI^{A2} com a DM tipo 2, enquanto que März *et al.* (2004) não encontraram qualquer associação (49, 51).

2.2.2. Glicoproteína Ib-V-IX

A glicoproteína Ib-V-IX (GP Ib-V-IX) faz parte da família de proteínas com repetições ricas em leucina (leucine-rich repeat family). Esta glicoproteína é formada pelas subunidades GPIb α , GPIb β , GPIX e GPV numa proporção estequiométrica de 2:2:2:1. Todos estes polipéptidos são necessários para que a GP Ib-V-IX funcione (62).

As plaquetas em repouso expressam aproximadamente 25.000 a 30.000 cópias de GP Ib-V-IX. É o segundo receptor mais frequente na plaqueta depois da integrina α IIb β 3 (63).

A função da GP Ib-V-IX é intervir na activação da integrina α IIb β 3 e intervir nas interacções plaqueta- endotélio através do factor de von Willebrand, isto é, promover a adesão plaquetária ao endotélio lesado. A deficiência ou ausência de GP Ib-V-IX denomina-se de Síndrome de Bernard-Soulier.

Estruturalmente, a glicoproteína Iba está acoplada à submembrana do citosqueleto por filamina (figura 9). É nesta subunidade que se localiza a região que se liga ao factor de von Willebrand (62). Contém também, um local de elevada afinidade para a trombina no N-terminal (62).

O gene da GP Iba encontra-se no cromossoma 17 e é formado por 2 exões que são traduzidos numa proteína com 627 aminoácidos. É na subunidade Iba da GP Ib-V-IX que se encontram os polimorfismos HPA-2, KOZAK e um VNTR.

O polimorfismo KOZAK encontra-se na posição -5 “upstream” do codão de iniciação, ou seja, numa região muito próxima ao local onde

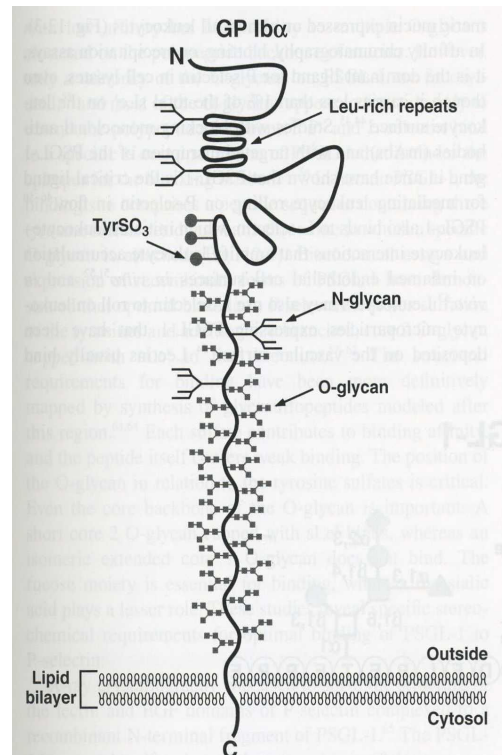


Fig. 9: Representação da GP Iba⁶³.

se inicia a transcrição. Corresponde à substituição nucleotídica de uma Timina por uma Citosina (figura 10). O alelo -5T é o mais frequente.

No.	Exon / Intron	Chr	Strand	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
1	ENSE00001299938 5' upstream sequence	17	1	4,776,680	4,777,930	0	0	1,251cctggggatgacgggggatccactcaaggctccctgcccacagttctc ATGCCTCTCCTCCTCTTGGCTGCTCCTGCTGCCAAGCCCTTACACCCACCCCATCTGT GAGGTCTCCAAAGTGGCCAGCCACTAGAAGTGAACCTGTGACAAAGGAAATCTGCAGGG CTGCCCTCAGACCTGCCGAAAGACACAACCATCTCCACCTGAGTGAGAACCTCTGTAC ACCTTCTCCCTGGCAACCTGATGCCTTACACTCGCCTCACTCAGCTGAACTAGATAGG TGGGAGCTCAACCAAGCTCCAGGTCGATGGGACGCTGCCAGTCTGGGGACCCTGGATCTA TCCCAAAATCAGCTGCAAAAGCTGCCTTGTAGGGCAGACACTGCCTGCTCAACCGCT CTGGACGCTCCTTCAACCGGCTGACCTCGCTCCTTGGTGCCTGCGTGGTCTTGGC CTCCAAAGAGCTCACTGAAAGGCAATGAGCTGAAGACCTGCCCCAGGGCTCCTG ACCCCACACCCAAAGCTGGAGAGCTCAGCTGGCTAACAACTTGACTGAGCTGCC CTGGGCTCTGAATGGCTGGAGAACTCGACACCTTCTCTCCAAAGAACTCGCTG TATACAAATACCAAGGGCTTTTTGGGTCCACCTCTGCCTTTTGTCTTTCTCCACGGG AACCCCTGGTTATGCAACTGTGAGATCCTCTATTTTGTGTGCTGGCTGACAGGAACTGT GAAAATGTCTACGTATGGAAGCAAGGTGTGGAAGCTCAAGGCCATGACCTCTAATGTGGCC AGTGTGCACTGTGACAATTCAGACAAGTTTCCGCTACAAAATACCCAGGAAAGGGGTGC CCCACCTTGTGTGATGAAGGTGACACAGACCTATATGATTAATACCCAGAAAGGACACT GAGGGCGATAAGGTGGTGGCCCAAGGACTGTGGTCAAGTTCCCAACCAAGGCCATACA ACCCCCTGGGGTCTTACTACTCATGGTCCACTGCTTCTAGACAGCCAAATGCGCTCC TCCTTGCATCCCAACACAAGAATCCACTAAGGAGCAGACCCATTTCCACCTAGATGGACC CCAAAATTCACACTTCACATGGAATCCATCACAATTCACAAAATCCAAAATCCACTACT GAACCAACCCCAAGCCGACCACTCAGAGCCGCTCCCGGAGCCCGCCCAACATGACC ACCTGGAGCCCACTCCAAGCCGACCAACCCAGAGCCCACTCAGAGCCG 36cccccaagcccagcccaccccagggagcccacctcagag
2	Intron 1-2 ENSE00001488421	17	1	4,777,931	4,777,966	0	0	633	CCGGCCCCAGCCCGACCACCCCGGAGCCCAACCCCAATCCCGACCATCGCCACAAGCCCG ACCATCTGGTGTCTGCCACAAGCCTGATCACTCCA AAAAGCACATTTTAACTACCACA AAACCCGTACTCTTAGAATCCACAAA AAAAACCTCCCTGACTGATCAGCCACCA AAGCTCCGTGGGTGCTCCAAGGGCATTGGAGAGCTCCAGAAAATGACCTTTTCTCCAC CCGACTTTTGTGCTCCTCCCTGGGCTCTATGTCTTGGTCTCTTCTGGTGTCTC TTTGCTCTGTGGTCTCATCTGCTGCTGAGCTGGGTGGGCATGTGAAAACCAAGGCC CTGGACTCTGGCAAGGTGCTGCTCTGACCAAGCCACAAAACACACACTGGAGCTG CAGAGGGACGGCAAGTGAAGTGGCCCGGGCTGGCTGCTTCTTCCAGAGGTCTGGCT CCAATTTCCGCTCCAGCTCTTCTGTGGGTACGGCTAATGGCCGTGGGGCTCTA GTGGCAGGAAGGGGCCCTCAGCTCTGAGTCAAGTCTGGTCTGGTCAAGGACTGCTGAGCACA GTGAGCATTAGGTACTCTGGCCACAGCCTCTGA ggggtggggaggttggggaccttgagagaagagcctgtgggctctcctatt.....
	3' downstream sequence								

Fig. 10: Sequência dos exões 1 e 2, interrompidos pela informação do intrão da GP Iba, com a localização do polimorfismo KOZAK (vermelho), do polimorfismo HPA-2 (verde) e da sequência que se repete originando um VNTR (amarelo).
 Fonte: Ensembl, referência ENST00000329125.

Vários trabalhos indicam que os nucleótidos que precedem o codão de iniciação AUG são importantes na eficiência da tradução nas células eucarióticas (64). Alguns investigadores acreditam que este polimorfismo se localiza numa zona importante para a ligação do ribossoma ao RNAm no momento da tradução do RNAm (65).

Há evidências que indicam que o alelo -5C não altera a estrutura mas está associado ao aumento da expressão de GPIba na superfície da plaqueta (52). É plausível que o aumento de densidade do receptor aumente a predisposição para se ligar ao factor von Willebrand, causando activação plaquetária (56). O alelo -5C também foi associado com eventos coronários agudos, mas não há resultados conclusivos (54). Apesar disso, tem sido consistente atribuir ao alelo -5C um factor de risco para eventos cerebrovasculares isquémicos (54).

O polimorfismo “human platelet antigen- 2” (HPA-2) encontra-se numa região rica em leucinas da subunidade Iba da glicoproteína Ib-V-IX, local correspondente à ligação com o factor de von Willebrand (figura 9) (57). Este polimorfismo situa-se na posição 482, no exão 1 do gene da GP Iba. Corresponde à substituição de uma Citosina por uma Timina na segunda posição do codão ACG (figura 10). Esta substituição leva à

transição do aminoácido Treonina por uma Metionina na posição 145 (Tre145Met) da GPIb α .

O alelo HPA-2a apresenta a base Citosina na posição 524 e é o mais frequente. O alelo HPA-2b apresenta a Timina e é o menos comum.

Ulrichs *et al.* (2003) determinou que o polimorfismo HPA-2 não afecta o local de ligação da glicoproteína Ib-V-IX à trombina, mas influencia a conformação da região que contém o local de ligação ao factor de von Willebrand (66). Assim, o alelo HPA-2b tem sido relacionado com aumento do risco de doença arterial coronária em indivíduos com menos de 60 anos de idade, enfarte agudo do miocárdio e trombose coronária (54).

O VNTR estudado na GP Ib α é uma repetição de 39 bp, originando uma repetição de 13 aminoácidos, que surge no fim do exão 1 e se prolonga para o intrão do gene da GP Ib α (figura 10). Este VNTR localiza-se na região de O-glicosilada (figura 9) denominada de região macroglicopeptídica rica em prolina, treonina e resíduos de serina (67). Como consequência, o local de ligação ao vWf estará mais distante da membrana da plaqueta e mais exposto em circulação, tornando-o mais acessível ao ligando, por isso pensa-se que este VNTR poderá estar associado a um risco aumentado de trombose (59).

Os alelos distinguem-se pelo número de repetições da sequência demonstrada na figura 10. O alelo A tem 4 repetições da sequência, o alelo B tem 3 repetições, o alelo C apresenta 2 repetições e o alelo D tem uma única repetição. O alelo E encontra-se quando não há uma única repetição.

A distribuição alélica varia consoante as populações estudadas, sendo o alelo C o mais comum na população caucasiana (54)

Alguns estudos sugeriram que pode existir uma associação entre o alelo B (9, 10, 45) e o risco de trombose arterial, assim como o alelo D (65) e o risco de trombose arterial.

Já foi descrito um “linkage desequilibrium” entre o VNTR da GPIb α e o HPA-2. Os alelos A e B deste VNTR com o HPA-2b, e os alelos C e D com o HPA-2a (68). Vários estudos sugerem que o alelo B do VNTR em conjunto com o HPA-2b pode ser considerado um factor de risco para CAD, enfarte do miocárdio e doença vascular cerebral (8, 9).

CAPÍTULO 3. VARIABILIDADE GENÉTICA DAS PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Como anteriormente referido, a isquemia arterial pode resultar ou da ruptura das placas de ateroma nas artérias e consequente formação de trombos, ou da presença de aterosclerose obliterante. No entanto, a extensão da resposta das plaquetas à ruptura da placa de ateroma varia entre indivíduos (5). Foi estimado que mais de 30% das variações naturais na reactividade, adesividade e agregabilidade plaquetárias estão relacionadas com herança genética, apesar de a trombose arterial resultar de interacções complexas entre factores ambientais e factores genéticos, que dependem da parede dos vasos sanguíneos e da reactividade das plaquetas (44, 69).

A actividade normal das plaquetas é dependente da existência de glicoproteínas na sua superfície que têm papel fundamental na adesão, activação e agregação das plaquetas (31), como referido no capítulo anterior. Está descrito que qualquer alteração da expressão ou função nas glicoproteínas plaquetárias podem levar a hemorragias ou formação de trombos em situações patológicas (70). Polimorfismos em glicoproteínas das plaquetas podem ter efeitos funcionais e consequências clínicas, uma vez que estas glicoproteínas têm um papel importante na adesão, activação e agregação das plaquetas.

Tem sido mais difícil associar variações genéticas ao aparecimento de trombose arterial do que a trombose venosa. No entanto, foram estudados polimorfismos no receptor plaquetário do fibrinogénio, a GP IIb-IIIa; nos receptores plaquetários do colágeno GP Ia-IIa e GP VI; em receptores plaquetários do factor de von Willebrand como a GP Ib-V-IX; em receptores plaquetários para o ADP, nomeadamente o receptor P2Y; no gene da síntese de óxido nítrico endotelial (eNOS); no gene da glutathione peroxidase (44).

As conclusões obtidas nos diversos estudos realizados para verificar a associação destes polimorfismos com a presença de eventos trombóticos têm sido inconsistentes. Existem alguns factores que poderão ser responsáveis pelas divergências observadas: (a) o efeito de um único polimorfismo poderá ter pouco significado; (b) o tamanho da amostra estudada; (c) a pluralidade clínica nas diferentes doenças associadas a eventos trombóticos, como enfarte do miocárdio, angina instável, doença

arterial coronária, entre outros; (d) a frequência polimórfica pode variar significativamente entre e dentro de populações; (e) selecção dos pacientes e do grupo controlo; (f) o efeito de um polimorfismo genético poderá estar na maior parte das vezes associado com alterações específicas do meio ambiente (31). Por estas razões, considera-se que são necessários estudos em grupos específicos.

Plaquetas obtidas de indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 apresentaram maior capacidade de adesão e agregação exagerada em resposta a agentes estimuladores (6). Verificou-se que nestes casos havia uma alteração da exposição e/ou abundância dos receptores glicoproteicos para agonistas (estimulantes) e proteínas de adesão na superfície da plaqueta (6).

Alguns estudos indicam que a disfunção plaquetária é mais evidente em diabéticos com macro- e micro-angiopatia, enquanto que outros estudos mostram que esta disfunção possa estar relacionada com a presença de DM por si só (6).

Um estudo desenvolvido por Tschoepe *et al.* demonstrou uma elevada associação entre o polimorfismo $PI^{A1/A2}$ e indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 após a análise de 215 casos (49). No entanto, um estudo posterior desenvolvido por Marz *et al.* demonstrou que numa população de 3298 indivíduos não existiu associação entre o alelo PI^{A2} do polimorfismo $PI^{A1/A2}$ e a presença de DM tipo 2 (51). Um estudo mais controverso foi realizado por Nomura *et al.*, em que na população de indivíduos japoneses com e sem Diabetes mellitus tipo 2, não foi encontrado um único alelo PI^{A2} , sendo a frequência deste de 0% na população japonesa estudada (71).

Sabe-se agora que a prevalência dos diferentes alelos varia entre populações, uma vez que reflectem a etnia, a localização geográfica, o tempo que a variação genética se instalou na população (54).

Na DM, os complexos mecanismos de regulação da actividade das plaquetas estão alterados: há um aumento de reactividade e adesão; a ligação entre agonista e receptor está amplificada; há aumento da capacidade para a formação de prostanóides; a formação de NO é menor; há resistência ao NO e às prostaciclina; há aumento da mobilização de cálcio citoplasmático; há aumento da desgranulação dos grânulos α ; o volume plaquetário é maior; o número de receptores de GP Ib e GP IIb-IIIa está aumentado; há aumento da glicosilação das proteínas de membrana e alteração da fluidez de membrana; são libertadas maiores quantidades de inibidor do activador do

plasminogénio (PAI-1) (22). Estas alterações estão ligadas às alterações funcionais provocadas pela DM.

Na população portuguesa não existem estudos relacionados com a presença de polimorfismos nas glicoproteínas plaquetárias em doentes com Diabetes mellitus tipo 2.

Sendo que as complicações macrovasculares, nomeadamente as cardiovasculares são a principal causa de morbilidade e mortalidade destes doentes, o principal objectivo deste trabalho será tentar esclarecer o papel que alguns polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias têm no aparecimento de isquemia arterial do membro inferior em doentes com Diabetes mellitus tipo 2.

Muitos dos receptores para agonistas nas plaquetas também têm sido usados como alvo dos fármacos para prevenir a formação de coágulos, nomeadamente, as integrinas e os receptores da trombina, ADP, prostaglandinas e lípidos. Assim, os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para o estabelecimento de grupos de risco que poderão beneficiar de terapêutica apropriada.

PARTE II.

CAPÍTULO 4. OBJECTIVOS

A população alvo deste estudo são indivíduos caucasianos com Diabetes mellitus tipo 2 com o objectivo de analisar se a presença de isquemia arterial do membro inferior está associada à variabilidade genética de algumas glicoproteínas das plaquetas.

Assim sendo, os objectivos específicos estabelecidos para este trabalho são:

(1) determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos $PI^{A1/A2}$, KOZAK e HPA-2, e do VNTR da GPIb α num grupo controlo representativo da população portuguesa;

(2) determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos $PI^{A1/A2}$, KOZAK e HPA-2, e do VNTR da GPIb α em indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior;

(3) determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos $PI^{A1/A2}$, KOZAK e HPA-2, e do VNTR da GPIb α num grupo de indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior;

(4) verificar a relação entre os quatro polimorfismos estudados e o aparecimento de Diabetes mellitus tipo 2;

(5) verificar a relação entre os quatro polimorfismos estudados e o aparecimento de isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2;

(5) estabelecer a frequência das diferentes combinações genotípicas dos polimorfismos estudados;

(6) estudar a relação dos polimorfismos com diferentes variáveis clínicas em ambos os grupos de estudo.

5.1. Amostra

A amostra é constituída por um grupo controlo e um grupo de estudo formado por indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2. O grupo de indivíduos com DM tipo 2 foi subdividido em 2 sub-grupos: o sub-grupo de indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior e o sub-grupo de indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 com isquemia arterial no membro inferior.

O grupo controlo é constituído por 121 indivíduos seleccionados ao acaso, que não apresentam nem Diabetes mellitus nem qualquer história de eventos trombóticos ou hemorrágicos, como enfarte do miocárdio, doença arterial periférica, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral, angina de peito, trombose venosa profunda ou sangramento excessivo. Apresentam idades compreendidas entre os 17 e 56 anos, sendo 76,5% dos indivíduos deste grupo do sexo feminino.

O grupo de indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 é formado por 122 indivíduos. Destes 122 casos, 57 não apresentam isquemia arterial do membro inferior e 25 apresentam isquemia arterial no membro inferior. Os restantes 40 casos não nos foi possível classificar quanto à presença ou ausência de isquemia arterial do membro inferior. A média de idades do grupo de indivíduos com DM tipo 2 é 65 ± 11 anos, sendo metade dos casos do sexo feminino.

Os indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 foram diferenciados no sub-grupo com isquemia arterial e sem isquemia arterial no membro inferior de acordo com os parâmetros seguidos pelo Podologista, nomeadamente, pulso fraco ou ausente e índice braquial-tibial $\leq 0,9$ (30). Outros factores foram usados para auxiliar no diagnóstico, como a pele fria, alteração da coloração cutânea (pálida, rubor, cianótica) e alteração do crescimento dos pêlos (pilificação), no entanto, estes factores não se verificando não excluem a doença arterial periférica (30, 32, 43).

A diferença na média de idades verificada entre os indivíduos que constituem o grupo controlo e os indivíduos que constituem o grupo DM tipo 2 deve-se ao facto de esta patologia ter especial incidência após a quarta década de vida.

5.2. Amostra biológica

De cada indivíduo foram obtidas células do epitélio bucal ou sangue venoso periférico por sistema de vácuo para 3 tubos com anticoagulante EDTA. Sempre que possível, para além da extracção de DNA, também foi feito o hemograma (tubo com anticoagulante EDTA), o doseamento do perfil lipídico dos indivíduos (tubo sem anticoagulante) e avaliação dos tempos de coagulação dos indivíduos (tubo com citrato trissódico 3,6%).

As amostras biológicas dos indivíduos pertencentes ao grupo controlo foram colhidas dentro das instalações da CESPU, crl.

A recolha das amostras dos indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 foi realizada nos Serviços de Podologia da CESPU, nomeadamente Hospital Nossa Senhora da Oliveira de Guimarães, Hospital Nossa Senhora da Conceição de Valongo e Unidade Clínica de Vila Nova de Famalicão.

Todos os indivíduos que fazem parte do estudo assinaram um consentimento informado (anexo I).

As questões éticas relacionadas com o estudo desenvolvido seguem os padrões estabelecidos pela Declaração de Helsínquia, adoptada em 1964 pela Associação Médica Mundial, que defende que «a investigação médica está sujeita a normas éticas que servem para promover o respeito por todos os seres humanos e para proteger a sua saúde e os seus direitos individuais», assim como o Decreto-Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro – «Informação genética pessoal e informação de saúde».

De todos os indivíduos que participaram no estudo foram também recolhidas outras variáveis, como a data de nascimento, índice de massa corporal, diâmetro abdominal, pressão arterial, hábitos tabágicos, história de eventos trombóticos e/ou hemorrágicos e história familiar de eventos trombóticos e/ou hemorrágicos.

5.3. Métodos

5.3.1. Extracção de DNA

O DNA foi extraído por um dos seguintes métodos, fenol-clorofórmio, kit INVITROGEN para extracção de DNA de sangue periférico (ref. K1820-02) ou kit Citogene para extracção de DNA a partir de células do epitélio bucal (ref. BUC100).

Após a extracção e diluição do DNA, foi feita a sua quantificação por espectrofotometria a 260nm e avaliação da pureza através do rácio Absorvância 260nm/Absorvância 280nm. Posteriormente, o DNA foi conservado a -20°C.

5.3.2. Amplificação génica

A reacção de polimerase em cadeia (PCR) foi usada para a amplificação de fragmentos de DNA nos genes *Ibα* e *IIIa*.

5.3.2.1. Gene *IIIa* ou integrina $\beta 3$

A sequência genética da glicoproteína *IIIa* foi retirada do NCBI (NM_000212).

Amplificou-se a zona adjacente ao polimorfismo $PI^{A1/A2}$ que se encontra no exão 2. Os primers foram desenhados no programa *Primer 3* e apresentam as características demonstradas na tabela 3.

Tabela 3: Características gerais dos primers forward (F) e reverse (R) usados no PCR para o polimorfismo $PI^{A1/A2}$.

Sequência 5'→3'	Temperatura melting (°C)	Amplicação
(F) GGACTTCTCTTTGGGCTCCT	59,82	172 bp
(R) CTGTCTCCAGAGCCCTTGTC	59,99	

Para o PCR usou-se uma “mix” formada por 2,5mM de desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTP's), tampão da reacção, 0,1-1 μ M de cada primer, 1,5mM de Magnésio, água sem nucleases e 0,25U de *Taq* DNA polimerase.

As condições de amplificação foram 1 ciclo de desnaturação durante 5 min a 94°C, 35 ciclos formados por desnaturação, 45seg a 94°C, emparelhamento ou “annealing”, 45seg a 57°C e extensão, 45seg a 72°C, e por fim um ciclo de extensão durante 7min a 72°C.

5.3.2.2. Gene *Ibα*

A sequência genética da glicoproteína *Ibα* foi retirada do NCBI (NM_000173).

Amplificou-se a região que contém o polimorfismo HPA-2 que se encontra no exão 1. Amplificou-se igualmente a zona que ladeia a posição -5 do codão de iniciação. Foi também amplificada a região que inclui o VNTR estudado (o amplicão apresenta diferentes tamanhos, dependendo do número de repetições).

Os primers foram desenhados no programa *Primer 3*. As características dos mesmos são apresentadas na tabela 4, incluindo a temperatura de melting (T_m).

Tabela 4: Características gerais dos primers forward (F) e reverse (R) usados nas reacções de PCR para os polimorfismos HPA-2, KOZAK e VNTR.

Polimorfismo	Sequência 5'→3'	T_m (°C)	Amplicão
HPA-2	(F) GCCAGCCACCTAGAAGTGAA	60,40	576 bp
	(R) AAAAGCAAAAGGCAGGAGGT	60,24	
KOZAK	(F) AGGGGGATCCACTCAAGG	59,85	257 bp
	(R) AGGCGAGTGTAAGGCATCAG	60,42	
VNTR	(F) CTGGAGCCCACTCCAAGC	61,97	variável
	(R) TTGTGGCAGACACCAGGAT	60,10	

Para o PCR fizeram-se “mixes” individuais para cada polimorfismo, formada por 2,5mM de dNTP's, tampão da reacção, 0,1-1μM de cada primer, 1,5mM de Magnésio, água sem nucleases e 0,25U de *Taq* DNA polimerase. As condições de amplificação para cada polimorfismo estudado na glicoproteína *Ibα* são resumidas na tabela 5, sabendo que a desnaturação inicial tem a duração de um ciclo, a desnaturação, emparelhamento e extensão formam uma sequência que ocorre 35 vezes nos

polimorfismos HPA-2 e KOZAK e 30 vezes no VNTR, e uma extensão final com a duração de um ciclo.

Tabela 5: Condições relativas ao tempo e temperatura dos ciclos para amplificação dos polimorfismos da GP Iba estudados.

Ciclos	HPA-2	KOZAK	VNTR
Desnaturação inicial	7min, 94°C	5min, 94°C	5min, 94°C
Desnaturação	45seg, 94°C	45seg, 94°C	45seg, 94°C
Emparelhamento	45seg, 58°C	45seg, 57°C	45seg, 58°C
Extensão	45seg, 72°C	45seg, 72°C	45seg, 72°C
Extensão final	7min, 72°C	10min, 72°C	10min, 72°C

5.3.3. Visualização dos produtos de amplificação

Após o PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose, onde se confirmou a presença do amplicão e o seu peso em pares de bases (bp) assim como a ausência de contaminações através do controlo negativo.

Como já indicado na tabela 3 e 4, os amplicões para o estudo do polimorfismo $PI^{A1/A2}$, HPA-2 e KOZAK têm 172bp, 576bp e 257bp, respectivamente.

Relativamente ao VNTR estudado da GPIba, é através do tamanho do amplicão que se distinguem os diferentes alelos. Assim, se o amplicão tiver 244bp trata-se do alelo A, o alelo B apresenta 205bp, o alelo C tem 166bp, o alelo D apresenta 127bp e o alelo E tem 88bp.

5.3.4. Digestão enzimática

Após a amplificação dos fragmentos de DNA de interesse para os SNPs estudados, os produtos de PCR ou amplicões foram digeridos com as enzimas *MspI*, *BsuRI* e *LweI*, para os polimorfismos $PI^{A1/A2}$, KOZAK e HPA-2, respectivamente.

A digestão enzimática possibilita a diferenciação dos alelos de cada polimorfismo, nomeadamente PI^{A1} e PI^{A2} , HPA-2a e HPA-2b, e -5C e -5T.

5.3.5. Visualização e análise dos produtos de digestão

Todos os produtos de digestão foram analisados por electroforese em gel de agarose de 2 a 3%, onde foi incorporado o brometo de etídeo. A leitura dos géis de agarose foi realizada no transiluminador GelDoc da BioRad.

Através da extrapolação dos tamanhos dos fragmentos observados no gel de agarose, usando uma ladder de 100bp (INVITROGEN, ref. 15628-019) e ladder low-range (Fermentas, ref. SM1203), os padrões de restrição esperados são os indicados na tabela 6.

Tabela 6: Padrão de restrição esperado para cada alelo.

Polimorfismo	Genótipos	Tamanho dos fragmentos (bp)
PI ^{A1/A2}	PI ^{A1/A1}	172
	PI ^{A1/A2}	172 + 133 + 39
	PI ^{A2/A2}	133 + 39
HPA-2	HPA-2a/a	460 + 116
	HPA-2a/b	460 + 279 + 181 + 116
	HPA-2b/b	279 + 181 + 116
KOZAK	-5T/T	142 + 115
	-5T/C	142 + 115 + 81 + 34
	-5C/C	142 + 81 + 34

5.4. Análise e Tratamento dos Dados

Os dados recolhidos para este estudo observacional do tipo caso-controlo foram tratados estatisticamente com o programa ‘Statistical Package for Social Sciences’ (SPSS) versão 16.0.

Os resultados foram descritos estatisticamente, sujeitos a análise de clusters, regressão logística, teste de Mann-Whitney e teste do Qui-quadrado (χ^2). Todos os resultados foram considerados significativos para um valor de $p < 0,05$.

A base de dados utilizada encontra-se em suporte informático.

Os 121 indivíduos que fazem parte do grupo controlo e os 122 casos com Diabetes mellitus tipo 2 pertencentes ao grupo de estudo foram analisados do ponto de vista genético para quatro polimorfismos, três SNPs e um VNTR. No grupo de estudo foi possível determinar dois sub-grupos quando caracterizados relativamente à isquemia arterial do membro inferior.

Para além das variáveis genéticas, também são apresentadas resultados relativos a variáveis clínicas e análises laboratoriais bioquímicas, hematológicas e da coagulação.

6.1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos

A tabela 7 expõe as características clínicas utilizadas para caracterização dos grupos em estudo. No anexo II encontram-se os valores de referências relativos aos parâmetros analisados.

O primeiro aspecto que deve ser comentado é o facto da média das idades entre os grupos em estudo ser diferente, o que se justifica pelo facto de a Diabetes mellitus tipo 2 ser uma patologia associada principalmente a idades acima da quarta década de vida.

Relativamente ao índice de massa corporal (IMC), os grupos de estudo com Diabetes mellitus tipo 2 apresentam maior percentagem de indivíduos com excesso de peso quando comparados com os indivíduos do grupo controlo, sendo que a maioria dos indivíduos do grupo controlo tem um peso normal de acordo com o cálculo do IMC.

Quanto aos parâmetros da pressão arterial sistólica e diastólica, nenhum dos indivíduos que constituem o grupo controlo apresenta valores superiores aos estabelecidos como referência. O mesmo já não se verifica nos indivíduos pertencentes ao grupo estudo que apresenta Diabetes mellitus tipo 2. Relativamente à pressão arterial sistólica, menos de metade dos indivíduos que constituem o grupo DM tipo 2 tem valores superiores a 140mmHg. No entanto, quando analisados os dois sub-grupos com

DM tipo 2 classificados de acordo com a isquemia arterial do membro inferior, verifica-se que a amostra que constitui o sub-grupo de DM tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior tem uma percentagem mais elevada de indivíduos com pressão arterial sistólica superior a 140mmHg. Esta situação não indica que estes indivíduos tenham hipertensão arterial visto que a medição da pressão arterial pode estar sujeita a factores secundários como o “síndrome da bata branca”.

Os valores relativos ao diâmetro abdominal apresentam-se em concordância com os resultados obtidos relativamente ao IMC.

Os indivíduos que constituem a nossa amostra são na sua maioria indivíduos não-fumadores.

Um dos critérios de inclusão para o grupo controlo era não apresentar qualquer doença hemorrágica e/ou trombótica, como angina de peito, enfarte do miocárdio, acidente vascular-cerebral, trombose venosa profunda, doença arterial periférica, embolia pulmonar, sangramento excessivo, por isso, 0 indivíduos apresentam doenças trombóticas e/ou hemorrágicas neste grupo. No entanto, observa-se que a percentagem de indivíduos pertencentes ao sub-grupo DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior apresenta uma percentagem menor relativamente à presença de doenças trombóticas e/ou hemorrágicas que não a doença arterial periférica comparativamente com o sub-grupo DM tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior.

A maior parte dos indivíduos pertencentes aos grupos de estudo não apresenta antecedentes familiares com doenças trombóticas e/ou hemorrágicas.

Tabela 7: Dados clínicos referentes aos grupos em estudo

Característica	Grupo Controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não isquémico	Sub-grupo DM isquémico
Sexo (%)				
Feminino	76,5	50	56,1	36,0
Masculino	23,5	50	43,9	64
Idade (anos)				
Média ± desvio padrão (X±δ)	23,9 ± 7,2	65 ± 11	65 ± 12	66 ± 11
Mínimo	17	27	27	47
Máximo	56	85	83	85
Moda	21	70,72	72	79
Índice de massa corporal (%)				
Baixo peso	13,3	0	0	0
Peso normal	69,4	19,8	17	16,7
Excesso de peso	14,3	50,5	53,2	55,6
Obeso	3,1	29,7	29,8	27,8
Pressão arterial sistólica (%)				
Inferior ou igual a 140	100	54,3	39,6	65,2
Superior a 140	0	47,7	60,4	34,8
Pressão arterial diastólica (%)				
Inferior ou igual a 90	100	88,8	90,6	82,6
Superior a 90	0	11,2	9,4	17,4
Diâmetro abdominal				
Média ± desvio padrão (X±δ)	81,6 ± 9,2	101 ± 13	103 ± 12	105 ± 13
Mínimo	65	78	83	78
Máximo	108	137	137	124
Moda	88	106,107,108	107	108
Hábitos tabágicos (%)				
Fumador	14,7	5,7	8,8	4
Ex-fumador	8,8	28,7	15,8	56
Não-fumador	76,5	65,6	75,4	40
Doenças trombóticas e/ou hemorrágicas (%)				
Sim	0	42,6	52,6	52
Não	100	57,4	47,4	48
Antecedentes familiares com doenças trombóticas e/ou hemorrágicas (%)				
Sim	46,1	39,3	29,8	52
Não	53,9	60,7	70,2	48

Na tabela 8, 9 e 10 apresentam-se as variáveis relacionadas com o perfil hematológico, parâmetros bioquímicos, incluindo o perfil lipídico e o perfil de coagulação. No anexo II encontram-se os valores de referências relativos aos parâmetros que permitem distribuir os indivíduos pertencentes a cada grupo nas diferentes categorias.

A tabela 8 apresenta os parâmetros hematológicos estudados nos indivíduos que constituem os diferentes grupos em estudo.

Verifica-se que a maioria dos indivíduos que constituem os diferentes grupos apresentam as características hematológicas analisadas dentro dos valores de referência.

Tabela 8: Dados provenientes da análise hematológica referente aos grupos em estudo.

Parâmetro	Grupo Controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não isquémico	Sub-grupo DM isquémico
GV (%)				
Baixo	2,8	14,7	12	21,1
Normal	91,5	79,4	86	73,7
Elevado	5,6	5,9	2	5,3
Hematócrito (%)				
Baixo	31	43,4	48	52,6
Normal	69	55,6	52	47,4
Elevado	0	1	0	0
Hemoglobina (%)				
Baixo	8,5	30,1	29,4	42,1
Normal	90,1	65	66,7	52,6
Elevado	1,4	4,9	3,9	5,3
Leucócitos (%)				
Baixo	0	9,7	11,8	15,8
Normal	93	87,4	84,3	84,2
Elevado	7	2,9	3,9	0
Plaquetas (%)				
Baixo	0	11,2	9,8	21,1
Normal	87,7	73,5	70,6	63,2
Elevado	12,3	15,3	19,6	15,8

A tabela 9 apresenta os resultados bioquímicos referentes ao perfil lipídico e níveis de glicose em jejum dos indivíduos que constituem os grupos estudados.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que 50% dos indivíduos que constituem o grupo controlo apresentarem níveis de colesterol elevados, sendo a média de idades deste grupo de aproximadamente 24 anos. Nos restantes grupos observa-se que a percentagem referente aos indivíduos com colesterol superior aos níveis normais é inferior ou igual a 40%.

Relativamente ao HDL colesterol (high density lipoprotein), grande parte dos indivíduos que constituem o grupo controlo apresentam baixo risco cardiovascular ao contrário do que se observa nos grupos constituídos por indivíduos com DM tipo 2 que apresentam risco cardiovascular intermédio.

Os parâmetros LDL colesterol (low density lipoprotein) e triglicérides encontram-se dentro dos parâmetros normais na maior parte dos indivíduos que constituem os diferentes grupos.

Como seria de esperar, existe uma maior percentagem de indivíduos com elevados níveis de glicose nos grupos constituídos por indivíduos com DM tipo 2 em relação aos indivíduos do grupo controlo.

O parâmetro de hemoglobina glicosilada (HbA1C) tem interesse neste estudo nos indivíduos com DM tipo 2 uma vez que reflecte a concentração sanguínea de glicose nas últimas 3 a 5 semanas. De acordo com os resultados observados, verifica-se que a maioria dos indivíduos com DM tipo 2 incluídos neste estudo apresenta valores de HbA1C superiores aos valores de referência (valor de referência <6,5% para indivíduos com DM tipo 2).

Tabela 9: Dados provenientes do perfil lipídico e dos níveis de glicose em jejum dos indivíduos que constituem os grupos em estudo.

Parâmetros	Grupo Controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não isquémico	Sub-grupo DM isquémico
Colesterol (%)				
Normal	50	65,1	63,2	60
Elevado	50	34,9	36,8	40
HDL colesterol (%)				
Risco cardiovascular elevado	15,4	30,9	35,1	15,4
Risco cardiovascular intermédio	38,5	64,2	64,9	69,2
Baixo risco cardiovascular	46,2	4,9	0	15,4
LDL colesterol (%)				
Normal	75	71	57,7	70
Elevado	25	29	42,3	30
Triglicéridos (%)				
Normal	80,5	67,9	59,5	71,4
Risco cardiovascular acrescentado	19,5	19,8	27	21,4
Risco cardiovascular elevado	0	12,3	13,5	7,1
Glicose (%)				
Normal	97,5	19,6	16,7	23,5
Elevado	2,5	80,4	83,3	76,5
Hb A1C (%)				
Média ± desvio padrão	-	8±2	7,8±1,8	7,1±1,8
Mínimo	-	4,5	5,1	4,5
Máximo	-	15,0	11,6	10,8

A tabela 10 apresenta os resultados referentes ao perfil de coagulação nos indivíduos incluídos no estudo, atendendo aos valores de referência dos parâmetros analisados (anexo II).

Relativamente ao tempo de protrombina verifica-se que à excepção do sub-grupo de indivíduos com DM tipo 2 e isquemia arterial do membro inferior, os valores se encontram dentro dos limites de referência. Uma possível explicação para 50% dos indivíduos apresentarem tempo de protrombina elevado é o número mais reduzido de indivíduos que constituem este grupo (n=25).

Os parâmetros referentes ao tempo de tromboplastina parcial activada e tempo de trombina encontram-se dentro dos intervalos normais na maioria dos indivíduos incluídos nos grupos estudados.

Tabela 10: Resultados referentes ao perfil de coagulação dos grupos estudados.

Parâmetro	Grupo Controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não isquémico	Sub-grupo DM isquémico
Tempo protrombina (%)				
Baixo	0	3,4	2,2	10
Normal	72,9	56,9	58,7	40
Elevado	27,1	39,7	39,1	50
Tempo tromboplastina parcial activada (%)				
Baixo	1,7	1,7	2,2	0
Normal	91,5	56,7	52,2	60
Elevado	6,8	41,7	45,7	40
Tempo trombina (%)				
Normal	100	98,2	97,9	100
Elevado	0	1,8	2,1	0

6.2. Distribuição das frequências genotípica e alélica

Atendendo que o objectivo principal deste estudo prende-se com a análise de polimorfismos genéticos, apresenta-se de seguida a descrição das frequências genotípicas (tabela 11) e alélicas (tabela 12) encontradas nos diferentes grupos e sub-grupos em estudo após observação e registo dos padrões de restrição dos polimorfismos (figura 11, 12, 13 e 14).

A figura 11 representa um gel de electroforese de 2% de agarose com os produtos de restrição de diferentes amostras biológicas após a digestão com a enzima de restrição *LweI*. Neste gel, encontram-se dois dos padrões de restrição possíveis para o polimorfismo HPA-2 e os respectivos pares de bases (bp) dos fragmentos, extrapolados com a ajuda de um marcador de peso molecular de 100bp.

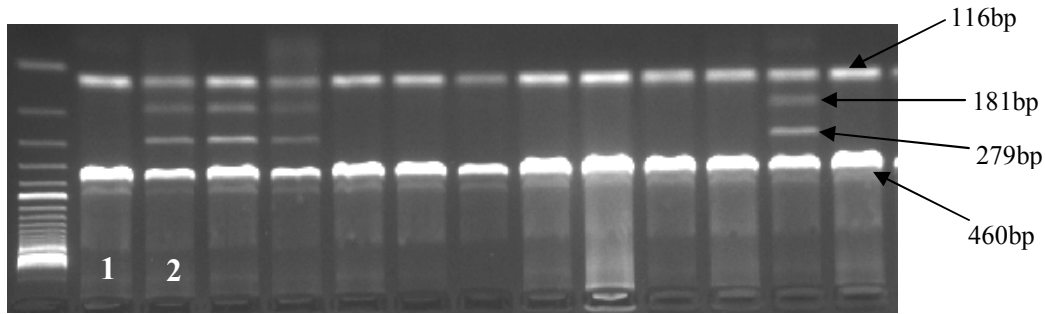


Fig. 11: Gel de electroforese a 2% com produtos de digestão para o polimorfismo HPA-2 utilizando a ladder 100bp da Invitrogen. Linha 1: genótipo HPA-2aa; Linha 2: genótipo HPA-2ab

A figura 12 representa um gel de electroforese a 2% de agarose com os produtos de restrição de diferentes amostras biológicas após a digestão com a enzima de restrição *MspI*. Neste gel, encontram-se os diferentes padrões de restrição possíveis para o polimorfismo $PI^{A1/A2}$ e os respectivos pares de bases (bp) dos fragmentos possíveis, extrapolados com a ajuda de um marcador de peso molecular.

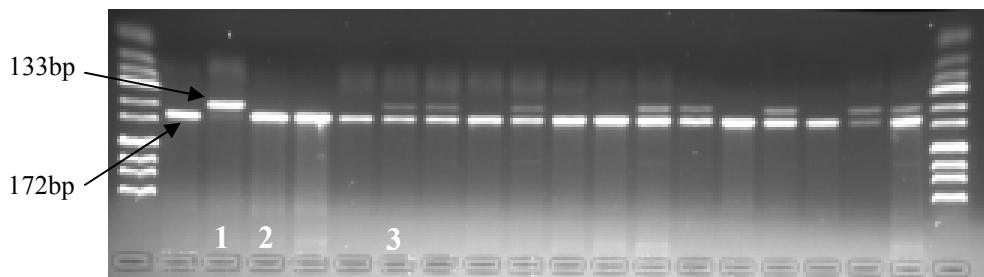


Fig. 12: Gel de electroforese a 2% com produtos de digestão para o polimorfismo $PI^{A1/A2}$ utilizando a ladder O'GeneRuler low-range da Fermentas. Linha 1: genótipo $PI^{A2/A2}$; Linha 2: genótipo $PI^{A1/A1}$; Linha 3: genótipo $PI^{A1/A2}$

A figura 13 representa um gel de electroforese de agarose a 3% com os produtos de restrição de diferentes amostras biológicas após a digestão com a enzima de restrição *BsuRI*. Neste gel, encontram-se os padrões de restrição esperados para o polimorfismo KOZAK e os respectivos pares de bases (bp) dos fragmentos possíveis, extrapolados com a ajuda de um marcador de peso molecular de 50bp.

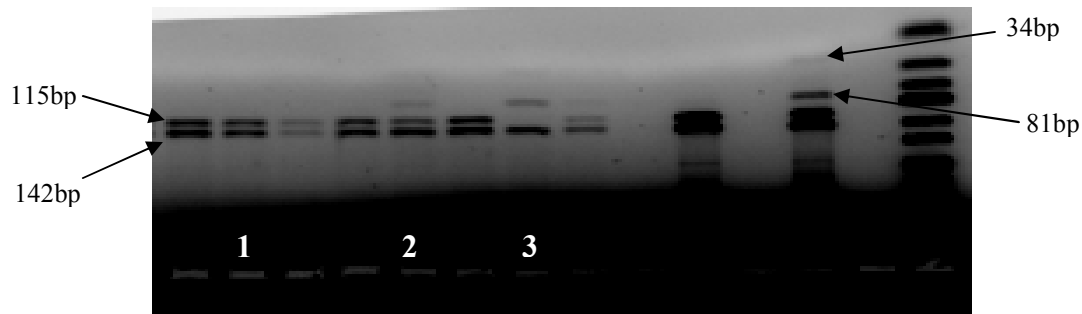


Fig. 13: Gel de electroforese a 3% com produtos de digestão para o polimorfismo KOZAK -5C/T utilizando a ladder 50bp da Invitrogen. Linha 1: genótipo -5T/T; Linha 2: genótipo -5T/C; Linha 3: genótipo -5C/C

A figura 14 representa um gel de electroforese de 2% de agarose com os produtos de amplificação de diferentes amostras biológicas após um PCR para a análise do VNTR estudado na GPIIb α . Neste gel, encontram-se algumas das bandas que podem surgir associadas a este VNTR quando utilizado um par de primers específico, e o respectivo par de bases (bp) de alguns desses amplicões, extrapolados com a ajuda de um marcador de peso molecular de 10 e 100bp.

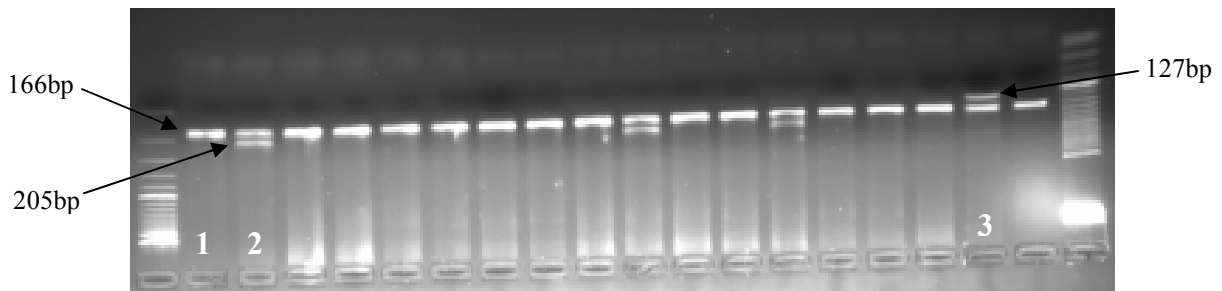


Fig. 14: Gel de electroforese a 2% com os amplicões para o VNTR da GPIIb α utilizando a ladder 100bp da Invitrogen à esquerda e a ladder 10bp da Invitrogen à direita. Linha 1: genótipo CC; Linha 2: genótipo BC; Linha 3: genótipo CD

As diferentes frequências genóticas observadas nos diferentes grupos e sub-grupos para os polimorfismos estudados apresentam-se na tabela 11 e no gráfico 1.

Em relação ao polimorfismo HPA-2 verifica-se que o genótipo homozigótico para o alelo a (HPA-2aa) é o mais frequente. Este genótipo apresenta valores percentuais inferiores no grupo controlo do que nos restantes grupos em estudo. Um outro aspecto a apontar neste polimorfismo é o facto de o genótipo HPA-2bb surgir apenas no grupo constituído por indivíduos com DM tipo 2, embora numa percentagem de 0,8% (tabela 11).

Relativamente ao polimorfismo $PI^{A1/A2}$ verifica-se que o genótipo $PI^{A1/A1}$ é o mais frequente. O genótipo $PI^{A2/A2}$ apresenta a percentagem mais baixa no grupo controlo. Os indivíduos pertencentes ao sub-grupo DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior são aqueles que apresentam maior proporção do genótipo $PI^{A2/A2}$.

Quando analisados os resultados das frequências genótípicas para a distribuição do polimorfismo KOZAK nos diferentes grupos e sub-grupos observa-se que o genótipo TT é o mais frequente. O genótipo CC encontra-se em percentagens superiores nos indivíduos com DM tipo 2. Também se verifica que quando comparando os dois sub-grupos constituídos por indivíduos com DM tipo 2 com e sem isquemia arterial do membro inferior, a percentagem do genótipo CC é ainda maior no sub-grupo DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior.

De acordo com os resultados obtidos relativamente à frequência genotípica do VNTR estudado da $GPIb\alpha$, observa-se que o genótipo CC é o mais frequente em todos os grupos e sub-grupos estudados. No grupo controlo os genótipos CC e CB são os mais frequentes, enquanto que nos restantes grupos estudados os genótipos CC e CD são predominantes. Verifica-se que o genótipo DD só surge em indivíduos com DM tipo 2, assim como o genótipo CE só aparece em indivíduos pertencentes ao grupo controlo.

Tabela 11: Frequências genótípicas obtidas nos diferentes grupos para os polimorfismos estudados, expressas em percentagem.

Polimorfismo	Genótipos	Grupo controlo (%)	Grupo DM tipo 2 (%)	Sub-grupo DM não-isquémico (%)	Sub-grupo DM isquémico (%)
HPA-2	aa	80	88,3	91,2	92
	ab	20	10,8	8,8	8
	bb	0	0,8	0	0
$PI^{A1/A2}$	A1/A1	67,2	73,6	77,2	76
	A1/A2	30,3	23,1	19,3	20
	A2/A2	2,5	3,3	3,5	4
KOZAK	TT	73,6	75,8	71,9	88
	CT	25,6	20,8	26,3	4
	CC	0,8	3,3	1,8	8
	BC	17,4	6,6	7	4
VNTR	CC	70,2	76	75,4	80
	CD	11,6	15,7	15,8	16
	DD	0	1,7	1,8	0
	CE	0,8	0	0	0

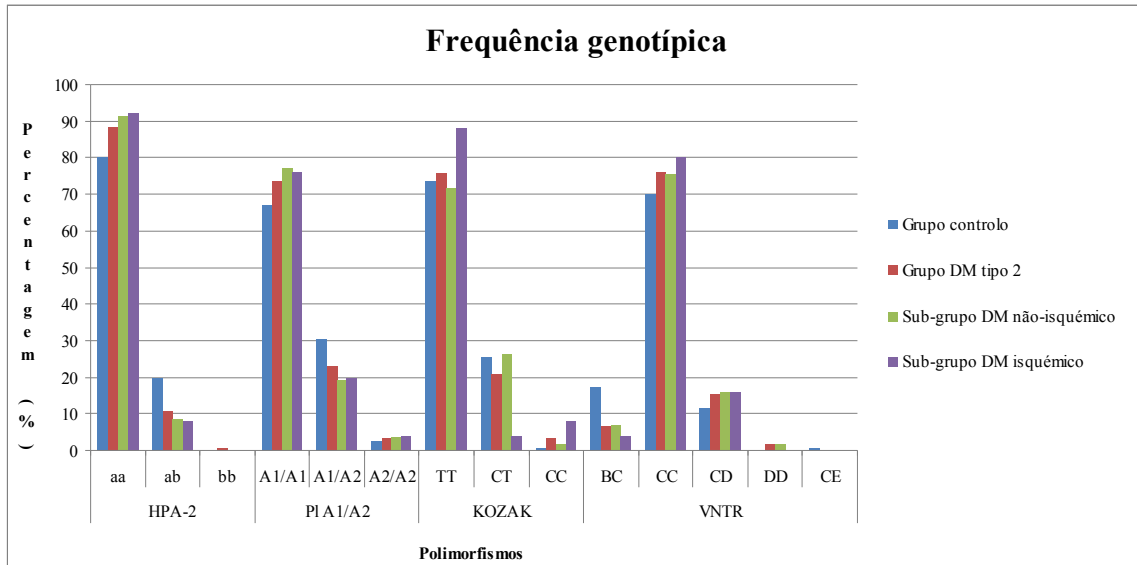


Gráfico 2: Distribuição gráfica das frequências genótípicas nos diferentes grupos.

À semelhança da análise feita para as frequências genótípicas foi analisada a distribuição das frequências de cada alelo para cada polimorfismo nos diferentes grupos e sub-grupos estudados (tabela 12 e gráfico 2).

Pode-se observar que os alelos mais frequentes nos grupos e sub-grupos estudados são o HPA-2a, PI^{A1} , -5T para o KOZAK e o alelo C do VNTR.

Destaca-se ainda o facto de o alelo -5C do polimorfismo KOZAK apresentar uma percentagem superior no sub-grupo DM tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior em comparação com o grupo controlo.

Da mesma forma se verifica que os dois alelos do VNTR mais frequentes no grupo controlo são o alelo C e B, ao contrário dos restantes grupos estudados em que os alelos C e D são os mais comuns.

Tabela 12: Frequências alélicas obtidas para os polimorfismos estudados nos diferentes grupos.

Polimorfismo	Alelos	Grupo controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não-isquémico	Sub-grupo DM isquémico
HPA-2	HPA-2a	0,9	0,94	0,96	0,96
	HPA-2b	0,1	0,06	0,04	0,04
PI $A1/A2$	PI^{A1}	0,82	0,85	0,87	0,86
	PI^{A2}	0,18	0,15	0,13	0,14
KOZAK	-5T	0,86	0,86	0,85	0,9
	-5C	0,14	0,14	0,15	0,1
VNTR	B	0,087	0,03	0,04	0,02
	C	0,851	0,87	0,87	0,9
	D	0,058	0,10	0,09	0,08
	E	0,004	0	0	0

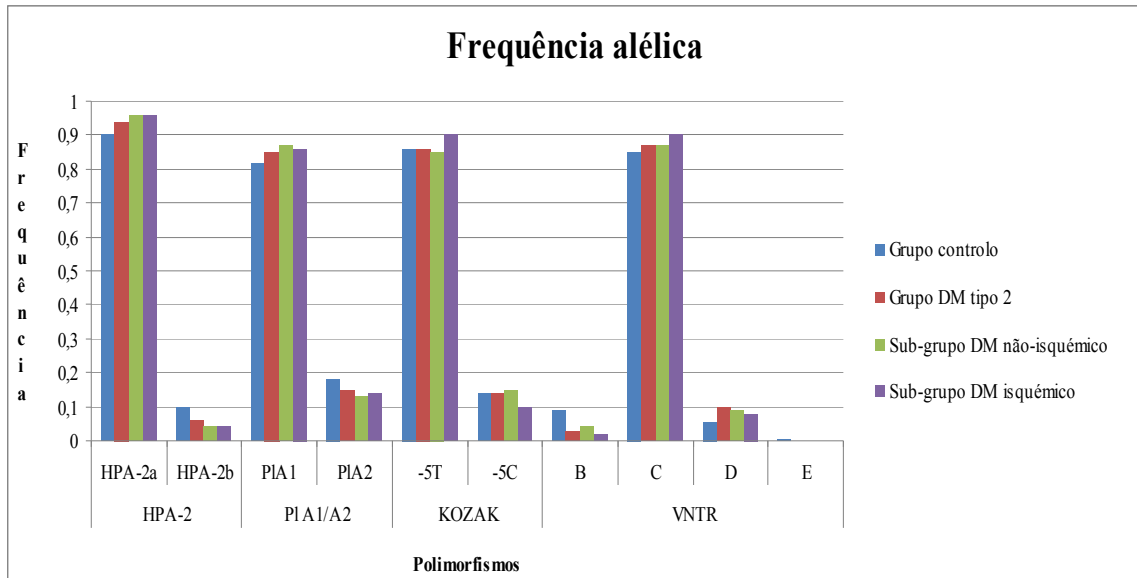


Gráfico 2: Distribuição gráfica das frequências alélicas nos diferentes grupos.

6.2.1. Comparação com outras populações

A tabela 13 mostra as frequências alélicas obtidas dos polimorfismos estudados no nosso grupo controlo representativo da população portuguesa, em comparação com as frequências alélicas para a população caucasiana determinada noutros estudos.

Quando comparados os resultados obtidos para o grupo controlo com as frequências relativas à população caucasiana, verifica-se que não há grandes diferenças entre elas.

Tabela 13: Comparação das frequências alélicas obtidas no grupo controlo com as frequências alélicas para os mesmos polimorfismos na população caucasiana, de acordo com a bibliografia consultada.

Polimorfismo	Alelos	Grupo controlo	População caucasiana
HPA-2	HPA-2a	0,9	0,91-0,93 (54)
	HPA-2b	0,1	0,06-0,09 (54)
PI ^{A1/A2}	PI ^{A1}	0,82	0,84-0,89 (54)
	PI ^{A2}	0,18	0,11-0,15 (54)
KOZAK	-5T	0,86	0,861 (72)
	-5C	0,14	0,139 (72)
VNTR	A	0	0,001 (54)
	B	0,087	0,07-0,1 (54)
	C	0,851	0,80-0,84 (54)
	D	0,058	0,08-0,11 (54)
	E	0,004	0,003 (72)

As tabelas 14 e 15 mostram as frequências genotípicas obtidas dos polimorfismos HPA-2, PI^{A1/A2}, KOZAK e VNTR no grupo controlo representativo da população portuguesa, e a comparação com as frequências genotípicas referentes à população caucasiana determinada noutros estudos. Os resultados obtidos não diferem muito em comparação com as diferentes amostras de população caucasiana. Para o VNTR da GPIb α verifica-se que no grupo controlo não foram encontrados todos os genótipos já descritos na população caucasiana.

Tabela 14: Comparação das frequências genotípicas obtidas, em percentagem, no grupo controlo com as frequências genotípicas obtidas para os polimorfismos HPA-2 e PI^{A1/A2} noutras populações caucasianas, de acordo com a bibliografia consultada.

Polimorfismo	Genótipos	Grupo controlo	População austríaca	População italiana (73)	População polaca (74)	População grega (75)
HPA-2	aa	80	83,7 (7)			
	ab	20	15,3 (7)			
	bb	0	1 (7)			
PI ^{A1/A2}	A1/A1	67,2	71,6 (51)	74,4	78,5	64
	A1/A2	30,3	25,7 (51)	23,3	18,2	31
	A2/A2	2,5	2,8 (51)	2,3	3,3	5

Tabela 15: Comparação das frequências genotípicas obtidas, em percentagem, no grupo controlo com as frequências genotípicas obtidas para os polimorfismos KOZAK e VNTR na população caucasiana.

Polimorfismo	Genótipos	Grupo controlo	População caucasiana (65)
KOZAK	-5T/T	73,6	77
	-5T/C	25,6	21,7
	-5C/C	0,8	1,3
	AC	0	0,1
	BB	0	0,7
VNTR	BC	17,4	13,4
	BD	0	1,3
	CC	70,2	72,6
	CD	11,6	11
	DD	0	0,8
	CE	0,8	0,1

6.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O princípio de equilíbrio de Hardy-Weinberg permite verificar se as frequências genotípicas observadas e esperadas estão em equilíbrio tendo em conta as características da população.

As frequências observadas e as frequências esperadas para cada um dos polimorfismos HPA-2, PI^{A1/A2}, KOZAK e VNTR nos diferentes grupos estão descritas na tabela 16.

Face aos resultados obtidos e descritos na tabela 16 no que diz respeito ao grupo controlo, verifica-se que os indivíduos deste grupo estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir destes resultados podem analisar-se os restantes grupos.

No sub-grupo Diabetes mellitus tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior denota-se que há um desequilíbrio para o polimorfismo KOZAK (tabela 16) ($\chi^2 > 3,84$, $p = 0,05$), o que significa que há diferenças estatisticamente significativas entre as frequências esperadas e observadas para este polimorfismo neste sub-grupo. As diferenças encontradas são principalmente causadas por uma frequência maior de observações no genótipo CC face ao esperado.

Tabela 16: Frequências observadas e esperadas (entre parêntesis) nos diferentes grupos para os polimorfismos estudados. *Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Polimorfismo	Genótipos	Grupo controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não-isquémico	Sub-grupo DM isquémico
HPA-2	aa	96 (97,2)	106 (105,6)	52 (52,44)	23 (23)
	ab	24 (21,6)	13 (13,2)	5 (4,39)	2 (1,92)
	bb	0 (1,2)	1 (1,2)	0 (0,17)	0 (0,08)
PI ^{A1/A2}	A1/A1	80 (79,73)	89 (87,12)	44 (43,32)	19 (18,5)
	A1/A2	36 (35,7)	28 (31,46)	11 (13,11)	5 (6)
	A2/A2	3 (3,57)	4 (2,42)	2 (0,57)	1 (0,5)
KOZAK	TT	89 (89,54)	91 (88,8)	41 (41,04)	22 (20,25) *
	CT	31 (29,04)	25 (28,8)	15 (14,82)	1 (4,5) *
	CC	1 (2,42)	4 (2,4)	1 (1,14)	2 (0,25) *
VNTR	BC	21 (18,15)	8 (6,05)	4 (3,99)	1 (0,9)
	CC	85 (87,12)	92 (91,96)	43 (43,32)	20 (20,25)
	CD	14 (11,98)	19 (21,05)	9 (9,12)	4 (4,05)
	CE	1 (0,85)	0	0	0
	DD	0 (0,363)	2 (1,21)	1 (0,46)	0 (0,20)

6.4. Análise estatística

Uma vez que as condições para a realização de um teste de associação ou independência do χ^2 não se verificarem por existir uma percentagem elevada de células com frequências esperadas inferior a 5 (tabela 17), não pode ser feito este teste estatístico para determinar se há ou não diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genóticas entres os diferentes grupos.

Tabela 17: Frequências genótípicas observadas e esperadas (entre parêntesis) para os polimorfismos analisados nos diferentes grupos e sub-grupos estudados.

Genótipos	Grupo Controlo	Grupo DM tipo 2	Sub-grupo DM não-isquémico	Sub-grupo DM isquémico
HPA-2aa	96 (101)	106 (101)	52 (52,13)	23 (22,87)
HPA-2ab	24 (18,5)	13 (18,5)	5 (4,87)	2 (2,13)
HPA-2bb	0 (0,5)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)
PI ^{A1/A1}	80 (83,80)	89 (85,20)	44 (43,79)	19 (19,21)
PI ^{A1/A2}	36 (31,73)	28 (32,27)	11 (11,12)	5 (4,88)
PI ^{A2/A2}	3 (3,47)	4 (3,53)	2 (2,09)	1 (0,91)
KOZAK -5T/T	89 (90,37)	91 (89,63)	41 (43,79)	22 (19,21)
KOZAK -5T/C	31 (28,12)	25 (27,88)	15 (11,12)	1 (4,88)
KOZAK -5C/C	1 (2,51)	4 (2,49)	1 (2,09)	2 (0,91)
VNTR BC	21 (14,5)	8 (14,5)	4 (3,48)	1 (1,52)
VNTR CC	85 (88,5)	92 (88,5)	43 (43,79)	20 (19,21)
VNTR CD	14 (16,5)	19 (16,5)	9 (9,04)	4 (3,96)
VNTR CE	1 (0,5)	0 (0,5)	-	-
VNTR DD	0 (1)	2 (1)	1 (0,70)	0 (0,30)

Executou-se um teste de independência do χ^2 com junção de classes (genótipos), nomeadamente, os genótipos que apresentavam o alelo polimórfico considerado de risco (genótipo homocigótico polimórfico e o genótipo heterocigótico) (tabela 18 e 19).

Verifica-se que não parece haver associação entre os genótipos com o alelo polimórfico em comparação com o genótipo que não apresenta esse alelo, quer quando analisados os grupos controlo e DM tipo 2 (tabela 18), quer quando comparados os indivíduos pertencentes aos dois sub-grupos de DM tipo 2 com e sem isquemia arterial do membro inferior (tabela 19).

Tabela 18: Frequências genótípicas observadas e esperadas (entre parêntesis) para os três SNPs estudados no grupo controlo e no grupo DM tipo 2, utilizando o teste χ^2 para comparar as frequências entre os grupos.

Genótipos	Grupo Controlo	Grupo DM tipo 2	p
HPA-2a/a	96 (101)	106 (101)	0,077
HPA-2a/b + HPA-2b/b	24 (19)	14 (19)	
PI ^{A1/A1}	80 (83,8)	89 (85,2)	0,283
PI ^{A1/A2} + PI ^{A2/A2}	39 (35,2)	32 (35,8)	
-5T/T	89 (90,4)	91 (89,6)	0,684
-5C/T + -5C/C	32 (30,6)	29 (30,4)	

Tabela 19: Frequências genótípicas observadas e esperadas (entre parêntesis) para os três SNPs estudados no sub-grupo DM tipo 2 não isquêmico e no sub-grupo DM tipo 2 isquêmico, utilizando o teste χ^2 para comparar as frequências entre os sub-grupos.

Genótipos	Grupo DM não isquêmico	Grupo DM isquêmico	p
HPA-2a/a	52 (52,1)	23 (22,9)	0,908
HPA-2a/b + HPA-2b/b	5 (4,9)	2 (2,1)	
PI ^{A1/A1}	44 (43,8)	19 (19,2)	0,906
PI ^{A1/A2} + PI ^{A2/A2}	13 (13,2)	6 (5,8)	
-5T/T	41 (43,8)	22 (19,2)	0,112
-5C/T + -5C/C	16 (13,2)	3 (5,8)	

Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney que permite comparar dois grupos independentes, detectando diferenças entre eles (76). Foram analisadas as diferenças para os quatro polimorfismos estudados comparando os indivíduos pertencentes ao grupo controlo e indivíduos pertencentes ao grupo com DM tipo 2. Foi realizado o mesmo método estatístico para comparação dos resultados dos quatro polimorfismos entre os sub-grupos com DM tipo 2 com ou sem isquemia arterial do membro inferior. A tabela 20 mostra os valores de p obtidos pelo teste de Mann-Whitney em todos os casos.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas para o polimorfismo VNTR quando comparados os grupos controlo e DM tipo 2 ($p < 0,05$). Quando comparados os indivíduos pertencentes aos grupos DM tipo 2 com e sem isquemia arterial do membro inferior não se encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa para nenhum dos polimorfismos estudados.

Tabela 20: Valores de p obtidos pelo teste de Mann-Whitney. *Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Variável	PI ^{A1/A2}	HPA-2	KOZAK	VNTR
DM tipo 2	0,336	0,111	0,790	0,021*
p				
Isquemia arterial do membro inferior	0,935	1,0	0,163	0,980

6.5. Análise de clusters

A análise de clusters permite detectar grupos homogêneos das variáveis analisadas.

Foi empregue a medida de Pearson para agrupar as variáveis uma vez que na sua maioria são variáveis nominais e ordinais (77). Uma vez que não há nenhum método hierárquico recomendado na literatura (77) realizaram-se e compararam-se vários métodos.

Os três métodos de agregação utilizados foram o da distância média entre clusters ou “Average linkage between groups” (figura 15), o da distância média dentro dos clusters ou “Average linkage within groups” (figura 16) e o de menor distância ou “Single linkage” ou “Nearest neighbor” (figura 17).

Relativamente à informação visível no dendrograma da distância média entre clusters (figura 15) parece poder-se afirmar que este é formado por 2 clusters principais, sendo que cada um destes dá origem a vários clusters menores.

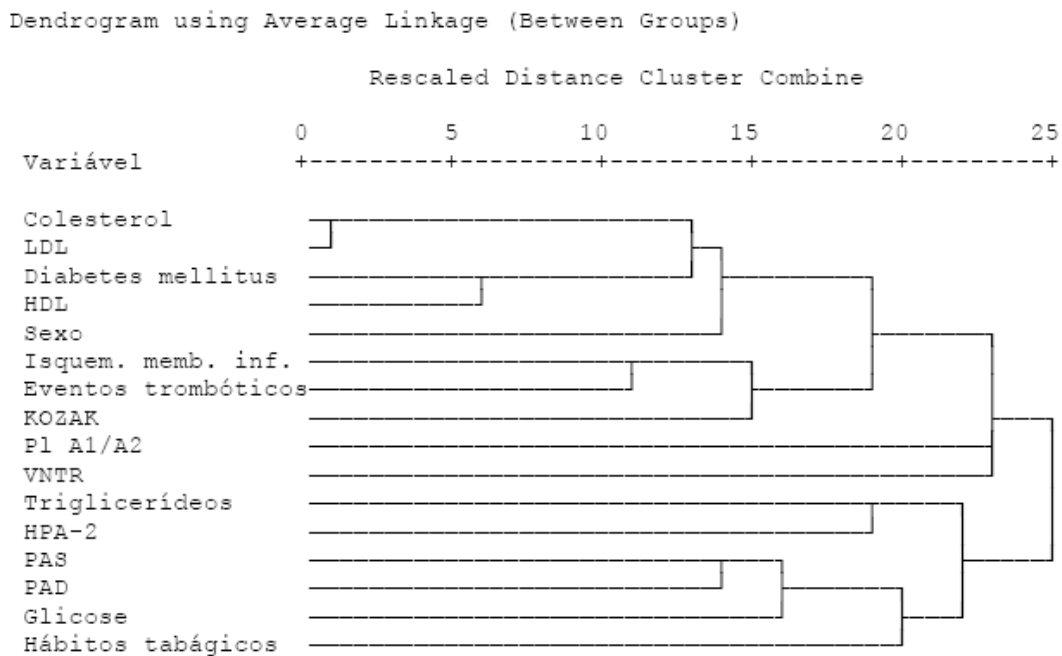


Fig. 15: Dendrograma obtido pela medida de semelhança Pearson e pelo método de agregação distância média entre clusters.

De acordo com o dendograma da distância média dentro dos clusters (figura 16) existem 2 clusters principais que ao se dividirem dão origem a 3 clusters com menor representação face ao total.

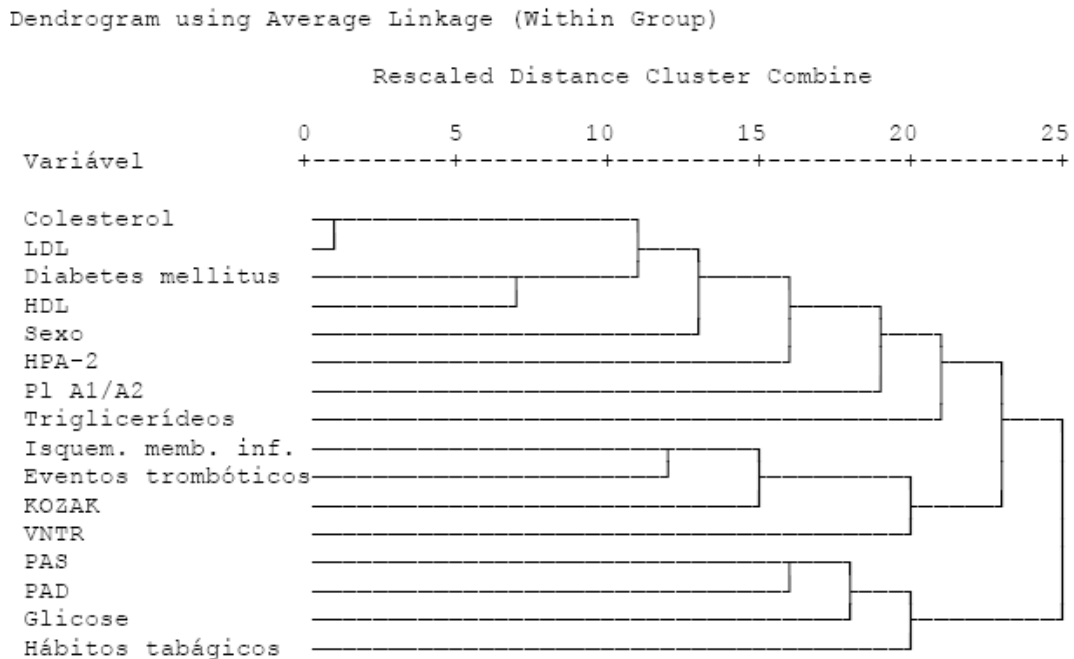


Fig. 16: Dendograma obtido pela medida de semelhança Pearson e pelo método de agregação distância média dentro dos clusters.

Relativamente ao dendograma obtido pela menor distância (figura 17) é mais difícil determinar quantos clusters se formam, uma vez que este método se baseia na formação de um cluster de referência em função do qual posteriormente é determinada a menor distância de cada uma das variáveis deste cluster de referência às restantes variáveis.

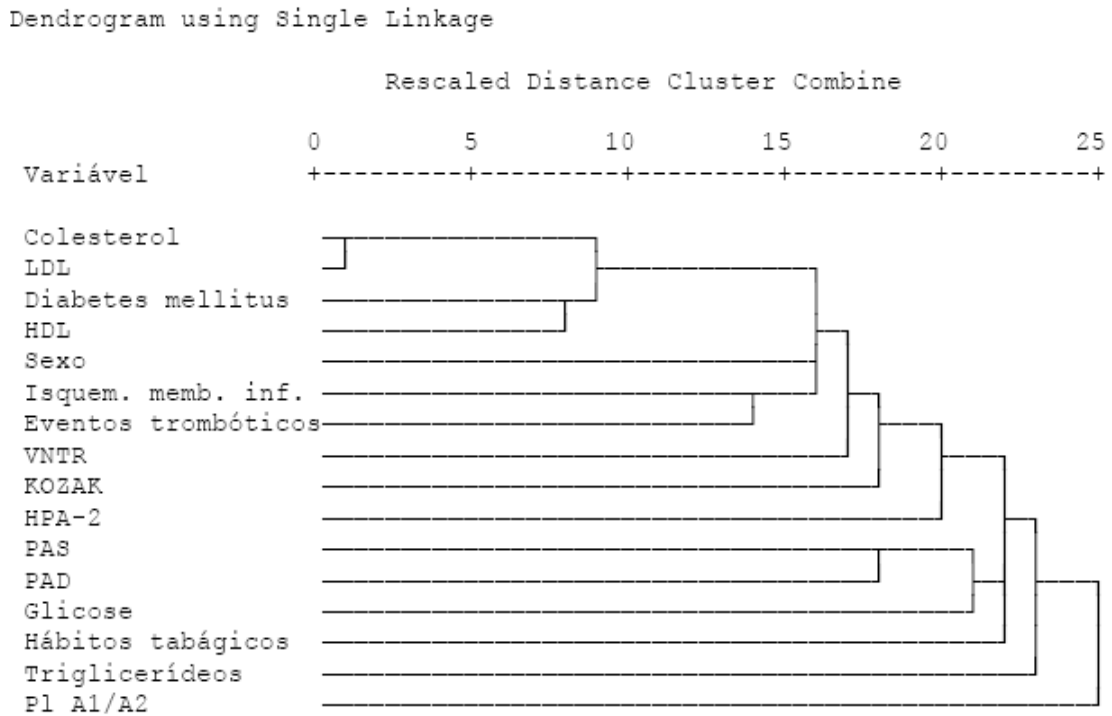


Fig. 17: Dendrograma obtido pela medida de semelhança Pearson e pelo método de agregação de menor distância.

Atendendo às representações visíveis nos dendogramas, os resultados que mais se aproximam são os clusters definidos pela distância média entre clusters (figura 15) e os clusters definidos pela distância média dentro dos clusters (figura 16). Nestes dois métodos verifica-se a existência de três conjuntos de agregação em comum: um entre as variáveis colesterol, LDL, HDL, diabetes mellitus e sexo que se encontram no mesmo subcluster; um outro conjunto de agregação com a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), glicose e hábitos tabágicos; e o terceiro conjunto de agregação constituído pelas variáveis isquemia arterial do membro inferior, eventos trombóticos e KOZAK.

Há algumas variáveis que se comportam da mesma forma nos três métodos de agregação, nomeadamente: LDL e colesterol; diabetes mellitus e HDL; isquemia do membro inferior e eventos trombóticos e/ou hemorrágicos anteriores; PAS, PAD e os níveis de glicose no sangue.

No entanto, os polimorfismos estudados nem sempre apresentam o mesmo comportamento nos vários métodos. O KOZAK e o VNTR encontram-se sempre no

mesmo cluster nos 3 métodos de agregação. Relativamente ao polimorfismo HPA-2 e $PI^{A1/A2}$, estes consoante o método variam de posição e de clusters, verificando-se até que o $PI^{A1/A2}$ se encontra num cluster isolado de qualquer outra variável pelo método de agregação de menor distância (figura 17).

6.6. Regressão logística

Este tipo de análise é usado para prever o comportamento de uma variável em função de outra variável (78).

Esta análise foi realizada numa primeira fase considerando a variável Diabetes mellitus tipo 2 como dependente (tabela 21).

Verifica-se que o sexo, o índice de massa corporal (IMC), o diâmetro abdominal, os hábitos tabágicos, os eventos trombóticos e/ou hemorrágicos anteriores, os eritrócitos, a hemoglobina, o HDL, a glicose e o polimorfismo VNTR são variáveis que influenciam o aparecimento DM tipo 2, uma vez que as diferenças encontradas são estatisticamente significativas. De acordo com os resultados obtidos, ser do sexo feminino, ter excesso de peso ou obesidade (de acordo com o cálculo do IMC), apresentar níveis de glicose séricos elevados e apresentar o genótipo CC ou CD para o VNTR são factores estatisticamente significativos que aumentam a probabilidade de apresentar DM tipo 2. Ao contrário destes resultados, não apresentar eventos trombóticos e/ou hemorrágicos anteriores, apresentar contagens eritrocitárias normais e baixo risco cardiovascular (HDL) diminui a probabilidade de desenvolver DM tipo 2, apresentando resultados estatisticamente significativos. Relativamente às variáveis quantitativas que apresentam diferenças estatisticamente significativas, verifica-se que quer o aumento da idade quer o aumento do diâmetro abdominal estão associados a maior probabilidade de desenvolver DM tipo 2.

Relativamente aos polimorfismos estudados, o único que permite explicar a presença de DM tipo 2 é o VNTR. Observando o comportamento dos outros polimorfismos face à variável dependente DM tipo 2, nenhum parece estar associado à presença de DM tipo 2.

Tabela 21: Resultado de $Exp(\beta_i)$ ou Odds Ratio (OR) e Intervalo de confiança (IC) para as variáveis estatisticamente significativas quando a variável dependente é DM tipo 2. *Resultado estatisticamente significativo

Variável	$Exp(\beta_i)$	IC 95%
Sexo		
Masculino	1	-
Feminino	3,259	1,865-5,697*
Idade	1,350	1,197-1,521
Índice de massa corporal		
Normal	1	-
Baixo peso	-	-
Excesso peso	12,386	5,715-26,844*
Obeso	34	9,385-123,180*
Diâmetro abdominal	1,176	1,109-1,248*
Hábitos tabágicos		
Fumador	1	-
Não fumador	2,198	0,850-5,682
Ex fumador	8,333	2,617-26,535*
Eventos trombóticos e/ou hemorrágicos anteriores		
Sim	1	-
Não	0,013	0,002-0,097*
Eritrócitos		
Baixo	1	-
Normal	0,166	0,037-0,753*
Elevado	0,029	0,029-1,397
Hemoglobina		
Baixo	1	-
Normal	0,209	0,082-0,535*
Elevado	0,968	0,095-9,829
HDL		
Risco cardiovascular elevado	1	-
Risco cardiovascular intermédio	0,832	0,288-2,402
Baixo risco cardiovascular	0,053	0,013-0,217*
Glicose		
Normal	1	-
Elevado	160,333	20,626-1246,299*
VNTR		
BC	1	-
CC	2,810	1,182-6,683*
CD	3,562	1,225-10,361*
DD	-	-
CE	-	-

Para identificar possíveis associações entre as variáveis estudadas e a variável isquemia arterial do membro inferior, seleccionou-se só o grupo de casos que apresenta DM tipo 2 e aplicou-se o teste estatístico da regressão logística, sendo a variável isquemia arterial do membro inferior considerada dependente.

Verifica-se que há diferenças estatisticamente significativas relativamente à variável pressão arterial sistólica (OR=0,350, IC95%=(0,126-0,970)). De acordo com os resultados obtidos, nenhuma das outras variáveis estudadas deste teste parecem

conseguir ser explicativas para o aparecimento de isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com DM tipo 2.

6.7. Diferentes combinações dos 4 polimorfismos

A tabela 22 mostra a distribuição em percentagem das diferentes combinações genótípicas encontradas nos grupos em estudo.

Os resultados obtidos mostram que a combinação aa – A1A1 – TT – CC é a mais frequente, quer para o grupo controlo (28,57%) quer no grupo constituído por indivíduos com DM tipo 2 (33,33%).

As combinações aa – A1A1 – TT – DD, aa – A2A2 – CT – CC, aa – A1A1 – CT – DD, aa – A1A2 – CC – CD e aa – A1A2 – CT – CD parecem ser exclusivos dos indivíduos que constituem o grupo com DM tipo 2.

As combinações aa – A1A1 – TT – CE, aa – A2A2 – CT – BC, aa – A2A2 – CT – CD, aa – A1A2 – CT – BC e ab – A1A2 – CT – BC parecem ser exclusivas para os indivíduos que se incluem no grupo controlo, sendo que não aparecem nos indivíduos pertencentes ao grupo com DM tipo 2.

Verificou-se que a combinação aa – A1A1 – CC – CC embora apareça em todos os grupos estudados, é mais frequente no grupo com DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior.

A combinação ab – A1A2 – TT – CC não aparece nos indivíduos pertencentes ao grupo com DM tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior, no entanto apresenta uma percentagem superior no grupo com DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior comparativamente aos indivíduos que constituem o grupo com DM tipo 2.

Existem variadas combinações que não se encontram nos indivíduos com DM tipo 2 e com isquemia arterial do membro inferior em comparação com os indivíduos DM tipo 2 sem isquemia arterial do membro inferior.

Tabela 22: Diferentes combinações para os 4 polimorfismos nos grupos e sub-grupos estudados.

Combinação (HPA-2/PI ^{A1/A2} /KOZAK/VNTR)	Grupo Controlo (%)	Grupo DM tipo 2 (%)	Sub-grupo DM não isquémico (%)	Sub-grupo DM isquémico (%)
aa – A1A1 – TT – CC	28,57	33,33	36,84	11
aa – A1A2 – TT – CC	17,65	15,79	12,28	16
aa – A1A1 – TT – CD	7,56	12,28	14,04	16
aa – A1A1 – CT – CC	12,61	11,40	14,04	4
aa – A1A2 – CT – CC	5,04	3,51	5,26	
ab – A1A1 – TT – BC	9,24	2,63	1,75	4
ab – A1A1 – TT – CC	2,52	3,51	1,75	
aa – A2A2 – TT – CC	0,84	3,51	1,75	4
ab – A1A1 – CT – BC	2,52	1,75	3,51	
aa – A1A1 – CT – CD	0,84	0,88	1,75	
ab – A1A1 – CT – CC	0,84	0,88		
aa – A1A2 – TT – CD	2,52	1,75		
ab – A1A2 – CT – BC	1,68			
ab – A1A2 – TT – BC	2,52	0,88	1,75	
aa – A2A2 – CT – BC	0,84			
aa – A2A2 – CT – CD	0,84			
aa – A1A2 – CT – BC	0,84			
ab – A1A2 – TT – CC	0,84	0,88		4
aa – A1A1 – CC – CC	0,84	2,63	1,75	8
aa – A1A1 – TT – CE	0,84			
aa – A1A1 – TT – DD		0,88	1,75	
aa – A2A2 – CT – CC		0,88	1,75	
aa – A1A1 – CT – DD		0,88		
aa – A1A2 – CC – CD		0,88		
aa – A1A2 – CT – CD		0,88		

CAPÍTULO 7. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A doença arterial periférica é frequentemente associada a doença aterosclerótica sistémica avançada e é frequentemente acompanhada de isquemia sintomática ou assintomática. Embora as doenças cardiovasculares sejam actualmente uma das causas mais comuns de morbilidade e mortalidade prematura, a doença arterial periférica é a situação que mais diminui a qualidade de vida do doente com DM tipo 2.

Relativamente à DM sabe-se que existem múltiplos factores de risco ambientais e genéticos associados ao seu aparecimento.

A doença aterosclerótica tem uma natureza multifactorial (ambiental, dietética, metabólica, hemodinâmica, inflamatória e genética). Assim sendo, este estudo tem como objectivo principal investigar a influência de factores genéticos que poderão estar por trás do aparecimento da doença ao nível do membro inferior, nomeadamente, polimorfismos das glicoproteínas das plaquetas. Estes polimorfismos poderão estar associados a uma maior reactividade das plaquetas e maior adesividade ao endotélio vascular exposto após a ruptura das placas de ateroma. Como consequência, poderiam formar-se mais facilmente trombos plaquetários que impedem a passagem da corrente sanguínea e oxigenação dos tecidos.

Não se conhecem estudos genéticos realizados em populações que apresentam simultaneamente Diabetes mellitus tipo 2 e doença arterial periférica. No entanto, existem estudos acerca de polimorfismos plaquetários e a sua relação com a isquemia arterial, como CAD e derrame cerebral, embora estes sejam contraditórios. Assim é importante clarificar a importância deste factores genéticos no desenvolvimento de isquemia arterial do membro inferior.

Os polimorfismos propostos neste estudo estão presentes em duas das principais glicoproteínas que surgem na superfície das plaquetas: são os SNPs $PI^{A1/A2}$ da GPIIIa e, HPA-2 e KOZAK da GPIIb α , e o VNTR da GPIIb α . Pretende-se portanto verificar se existe alguma associação entre o aparecimento de isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com DM tipo 2, tendo como grupo controlo indivíduos saudáveis, sem DM e sem qualquer evento trombótico e/ou isquémico anterior.

De acordo com os resultados do nosso trabalho, verifica-se que as frequências alélicas e genótípicas obtidas não se diferenciam das frequências alélicas e fenotípicas referenciadas para a população caucasiana (tabela 13, 14 e 15).

Relativamente ao alelo A do VNTR, inicialmente acreditava-se que este era restrito às populações do este asiático, no entanto, foi detectado este alelo em índios americanos e caucasianos do sul de Espanha mas em frequências muito mais baixas que nas populações asiáticas (54, 79, 80). De facto, na nossa população não foi encontrado nenhum indivíduo com este alelo. O alelo E foi relatado pela primeira vez em 2004 por Ozelo *et al.*, sendo este um alelo raro, visto que não tem nenhuma repetição característica deste VNTR (72). A frequência para o alelo E encontrada na amostra controlo é referente a um único indivíduo, o que está de acordo com o encontrado por outros autores (72).

Relativamente às frequências genótípicas verificou-se que o nosso grupo controlo se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os quatro polimorfismos estudados.

No que respeita às frequências genótípicas relativas ao grupo constituído por indivíduos com DM tipo 2, há poucas referências bibliográficas que as descrevam. März *et al.* obtiveram frequências para o $PI^{A1/A1}$, $PI^{A1/A2}$ e $PI^{A2/A2}$ de 71,4%, 26% e 2,7% , respectivamente para uma amostra de 1051 casos com DM tipo 2 (51). Os resultados obtidos no nosso trabalho não diferem significativamente dos encontrados por este autor, embora se tenha encontrado uma frequência mais alta de indivíduos com o genótipo $PI^{A2/A2}$.

Relativamente à possível associação das variáveis genéticas estudadas com a presença de DM tipo 2, não foram encontradas na bibliografia qualquer estudo sobre a possível associação entre os polimorfismos KOZAK e VNTR e a presença de DM tipo 2. No entanto, no nosso trabalho verificamos a existência de diferenças estatisticamente significativas entre o nosso grupo controlo e o grupo constituído por diabéticos do tipo 2 relativamente ao polimorfismo VNTR (tabela 20).

Quanto ao alelo PI^{A2} , Tschoepe *et al.* em 2003 verificaram que este alelo se associava com o aparecimento de DM tipo2 (49). No entanto, no nosso trabalho não foram encontradas evidências que apontem para esta associação. Os resultados obtidos são concordantes com os encontrados por Carter *et al.* (1998), assim como Marz *et al.*

(2004) e Koziaradzka *et al.* (2007) que concluíram que o polimorfismo PI^{A1/A2} não parece estar associado ao aparecimento de DM tipo 2 (51, 74, 81).

No que respeita ao HPA-2, os nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Sperr *et al.* (1998) relativamente às frequências genóticas observadas para este polimorfismo (7). Em 2007, Corsetti *et al.* concluíram que o alelo HPA-2b estava associado a riscos coronários recorrentes em diabéticos pós-infarte mas não a pacientes não diabéticos pós-infarte (82).

Quando utilizadas todas as variáveis analisadas neste estudo para investigar a sua possível associação com a presença de DM tipo 2, por regressão logística, os resultados revelaram várias variáveis associadas ao aparecimento de DM tipo 2, nomeadamente, sexo, IMC, diâmetro abdominal, hábitos tabágicos, eventos trombóticos e/ou hemorrágicos anteriores, eritrócitos, hemoglobina, glicose e o polimorfismo VNTR (tabela 21). Os hábitos tabágicos e a obesidade são conhecidos factores de risco que aumentam a incidência de DM tipo 2 (15, 83, 84, 85). Relativamente ao polimorfismo VNTR, os resultados da regressão logística estão de acordo com os resultados obtidos quando comparados os grupos controlo e DM tipo 2, apontando evidências no sentido de uma possível associação entre o polimorfismo VNTR e a presença de Diabetes mellitus tipo 2.

Vários estudos têm descrito uma possível associação entre a isquemia arterial e os alelos com risco trombótico, como doença arterial coronária, angina, enfarte do miocárdio, derrame cerebral e trombose aguda coronária. Não foram encontradas referências bibliográficas relativas a uma possível associação entre estes alelos e a doença arterial periférica.

O PI^{A2} foi associado com isquemia arterial (18, 48, 49) mas outros estudos publicados não associaram o PI^{A2} com o aumento do risco de sofrer eventos isquémicos arteriais (2, 7, 50, 51, 52, 55, 74,81) nem trombose venosa (50). Um estudo realizado por Zotz *et al.* em 2005 identificou uma associação do PI^{A2} com enfarte do miocárdio prematuro mas não com doença arterial coronária (86).

O HPA-2b em alguns estudos não foi associado com o aparecimento de eventos isquémicos arteriais (7) nem trombose venosa (8). Contrariamente, houveram outros em que se demonstrou associação deste alelo com aumento da probabilidade de vir a desenvolver eventos isquémicos (8, 9).

Quanto ao polimorfismo KOZAK prediz os níveis de receptor expresso na superfície das plaquetas (62). Assim, o alelo C na posição -5 está associado a maior expressão de GP Ib-V-IX. Este polimorfismo já foi considerado um factor de risco independente para derrame isquémico (56), doença arterial coronária e trombose coronária (41), risco de enfarte do miocárdio em indivíduos com síndrome coronário instável (65), risco trombótico (55, 65). Noutros estudos, o polimorfismo KOZAK não foi associado a eventos isquémicos arteriais (48, 57, 58).

O genótipo CB do VNTR da GPIb α foi associado a um risco aumentado de doença coronária cardíaca e doença vascular cerebral (8, 9), assim como o alelo D (65) e o alelo B (9, 10, 45). Mas noutros estudos, o VNTR desta glicoproteína não foi associado nem a derrame, nem a mortalidade pós-derrame (59) nem a outros eventos isquémicos (48, 55).

Também já foi demonstrado que o alelo P1^{A2} (18), o alelo HPA-2b (9) e o alelo B do VNTR (9) têm uma forte associação com pacientes com eventos coronários em idades inferiores a 60 anos.

Relativamente aos polimorfismos HPA-2 e o VNTR, Ishida *et al.* (68, 87) descreveu um “linkage desequilibrium”, em que o alelo HPA-2b só surge associado aos alelos A e B do VNTR da GPIb α , enquanto que o HPA-2a está mais associado aos alelos C e D do VNTR (68, 87), não impedindo que o alelo C também pudesse surgir associado ao alelo HPA-2b (88) ou o alelo B não associado ao HPA-2b (80).

Quando investigado o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois sub-grupos constituídos por indivíduos com DM tipo 2, encontrou-se diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos observados e esperados relativamente aos alelos do KOZAK no sub-grupo com DM tipo 2 e com isquemia arterial do membro inferior. O genótipo que mais contribuiu para este desequilíbrio foi o homozigótico CC.

Para identificar quais das variáveis analisadas no nosso estudo se associam à presença de isquemia arterial do membro inferior nos indivíduos com DM tipo 2, foi realizada uma regressão logística tomando como variável dependente a isquemia arterial do membro inferior. Assim, verificamos que a pressão arterial sistólica (PAS) é a variável que mediante este teste, explica o aparecimento de isquemia arterial do membro inferior. Sabe-se que a hipertensão arterial aumenta o risco de isquemia arterial do membro periférico em 10% (28), sendo o principal factor que contribui para o desenvolvimento de complicações vasculares na DM (89). Relativamente às variáveis

genéticas estudadas, não foram encontrados resultados significativos, mediante a regressão logística. No entanto, os resultados encontrados relativamente ao desequilíbrio para o polimorfismo KOZAK no sub-grupo DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior (tabela 16) podem evidenciar uma possível associação entre a presença de um alelo C e a presença de isquemia arterial do membro inferior. Uma possível explicação para o facto de não serem encontradas diferenças estatísticas significativas relativamente ao KOZAK mediante a regressão logística, pode dever-se ao número reduzido de indivíduos que constituem o sub-grupo DM tipo 2 com isquemia arterial do membro inferior (n=25).

Para o estudo de associação de variáveis também foi utilizado o método de agregação de variáveis em clusters. Através desta metodologia foi encontrada uma associação entre PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), glicose e os hábitos tabágicos. Na análise dos clusters de variáveis utilizadas no estudo, também foi encontrada uma associação entre a isquemia arterial do membro inferior, a presença de outros eventos trombóticos e/ou hemorrágicos e o polimorfismo KOZAK (figura 15 e 16), o que apoia a ideia de que, dos polimorfismos estudados neste trabalho, será o KOZAK o que parece ter maior contribuição para a presença de isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com DM tipo 2. Na análise de clusters também se verificou que as variáveis KOZAK e VNTR, ambos polimorfismos da GPIb α , são aqueles que se encontram mais próximos, posicionando-se no mesmo cluster principal.

Quando analisadas as combinações dos quatro polimorfismos estudados (tabela 22), aquelas que estão presentes exclusivamente no grupo DM tipo 2 apresentam pelo menos um alelo D ou o alelo C em homozigotia para o VNTR. Em alguns estudos, o alelo D deste VNTR já foi associado a doença arterial (65).

A combinação presente no sub-grupo de DM tipo 2 isquémicos que apresenta maior diferença relativamente aos grupos controlo e DM tipo 2 não isquémico corresponde a aa-A1A1-CC-CC (HPA-2/PI^{A1/A2}/KOZAK/VNTR), mostrando evidências de que a presença do alelo C do polimorfismo KOZAK, poderá conferir um fenótipo de maior risco para a presença de isquemia arterial do membro inferior em doentes com Diabetes melitus tipo 2.

Tanto o polimorfismo VNTR como o KOZAK encontram-se na proteína GPIb α . Esta proteína tem um papel importante na adesão das plaquetas ao endotélio. Os alelos C e D do VNTR produzem GPIb α de menor tamanho face aos alelos A e B, dado que os

alelos C e D apresentam menor número de repetições. O alelo C do polimorfismo KOZAK está associado a uma maior expressão da GPIb-V-IX. A influência destes dois polimorfismos nas vias de sinalização intracelular durante a activação e agregação plaquetária, parece ser importante para a atribuição de um fenótipo de risco trombótico.

Tanto a DM tipo 2 como a doença arterial periférica são patologias multifactoriais, com factores genéticos e ambientais que contribuem para o seu aparecimento. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho mostram evidências que apoiam a ideia da relevância do estudo das variantes genéticas das glicoproteínas plaquetárias, associadas à presença de Diabetes mellitus tipo 2, uma vez que o polimorfismo VNTR da GPIb α parece contribuir para a presença de Diabetes mellitus tipo 2.

Os nossos resultados também evidenciam a importância do estudo dos polimorfismos plaquetários uma vez que podem contribuir para estabelecer um perfil genético de risco em indivíduos com DM tipo 2. Neste sentido, o estudo do polimorfismo KOZAK da glicoproteína GPIb α mostrou uma possível associação com a presença de isquemia arterial do membro inferior em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Para confirmar os resultados obtidos no presente trabalho será importante, para além de sequenciar os amplicões obtidos, aumentar a amostra de doentes que apresentam DM tipo 2 com e sem isquemia arterial do membro inferior. O presente trabalho será alargado com o estudo de outras glicoproteínas plaquetárias de forma a estabelecer um “perfil genético” de risco trombótico em doentes com DM tipo 2. Assim, os resultados deste trabalho podem contribuir no estabelecimento de grupos de risco, que possam beneficiar de uma terapêutica adequada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Mathers CD, Loncar D (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS.Med*; vol.3 (11): 2011-2030
- 2) Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE (1998). Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: Human Platelet Antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost*; vol.79: 731-735
- 3) Kessler L, Wiesel ML, Attali P, Mossard JM, Cazenave JP, Pinget M (1998). Von Willebrand factor in diabetic angiopathy. *Diabetes & Metabolism*; vol.24: 327-336
- 4) Nathan DM (1993). Long-term complications of diabetes mellitus. *New England Journal Medicine*; vol.328: 1676-1685
- 5) Ouwehand WH on behalf of the bloodomics and welcome trust case control consortia (2007). Platelet genomics and the risk of atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; vol.5 (1): 188-195
- 6) Sobol AB, Watala C (2000). The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*; vol. 50: 1-16
- 7) Sperr WR, Huber K, Roden M, Janisiw M, Lang T, Graf S, Maurer G, Mayr WR, Panzer S (1998). Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. *Thrombosis Research*; vol.90:117-123
- 8) Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vicente V (1998). Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Iba associated with arterial thrombotic disease. *Blood*; vol.92 (8): 2771-2776

- 9) Mikkelsen J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ (2001). Platelet glycoprotein Ib α HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Circulation*; vol. 104: 876-880
- 10) Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD (2000). Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. *American Society of Hematology*; vol.1:222-240
- 11) Marre M (1999). Genetics and the prediction of complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care*; vol.22 (Suplemento 2): B53-B58
- 12) Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (2009). Disponível em: www.apdp.pt/diabetes.asp
- 13) Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes*; vol.27: 1047-1053
- 14) Jay D, Hitomi H, Griendling KK (2006). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology & Medicine*; vol.40: 183-192
- 15) Leahy JL (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of Medical Research*; vol.36: 197-209
- 16) Beckman JA, Creager MA, Libby P (2002). Diabetes and atherosclerosis Epidemiology, Pathophysiology and management. *JAMA*; vol.287: 2570-2581
- 17) Creager MA, Lüscher TF, Consentino F, Beckman JA (2003). Diabetes and Vascular Disease Pathophysiology, clinical consequences and medical therapy: Part 1. *Circulation*; vol. 108: 1527:1532
- 18) Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ (1996). A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *The New England Journal of Medicine*; vol.334 (17): 1090-1094

- 19) Stettler C, Allemann S, Juni P, Cull CA, Holman RR, Egger M, Krahenbuhl S, Diem P (2006). Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: meta-analysis of randomized trials. *American Heart Journal*; vol.152: 27-38
- 20) Lüscher TF, Greager MA, Beckman JA, Cosentino F (2003). Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences and medical therapy. *Circulation*; vol.108 (12): 1655- 1661
- 21) Elalamy I, Chakroun T, Gerotziapas GT, Petropoulou A, Robert F, Karroum A, Elgrably F, Samama MM, Hatmi M (2007). Circulating platelet-leukocyte aggregates: A marker of microvascular injury in diabetes patients. *Thrombosis Research*; vol.121 (6): 843-848
- 22) Stratmann B, Menart B, Tschoepe D. Diabetes Mellitus. In: Michelson AD, Platelets. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 38, pp. 697-711
- 23) Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V (1992). Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl*; vol.10 (2): S43-50
- 24) White JG. Platelet structure. In Michelson AD, Platelets. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 3, pp. 45-73
- 25) Stolar MW, Chilton RJ (2003). Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance. *Clinical Therapeutics*; vol.25: B4-B31
- 26) Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*; vol.105: 1135-1143
- 27) Haouari ME, Rosado JA (2008). Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: A review. *Blood cells, molecules and diseases*; vol.41: 119-123
- 28) Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J (2004). Atherosclerotic vascular disease conference. *Circulation*; vol.109: 2617-2625

- 29) Goldschmidt PJ, Lopes N, Crawford LE, Becker RC. Atherothrombosis and Coronary artery disease. In Michelson AD, Platelets. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 35, pp. 629- 655
- 30) Rutherford RB. Artery wall pathology in atherosclerosis. In Rutherford RB, Vascular surgery. Fifth edition. WB Saunders Company, 2000. Cap.18, pp.313-333
- 31) Lane DA, Grant PJ (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*; vol.95 (5): 1517-1532
- 32) Wasserman EJ, Shipley NM (2006). Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *The Mount Sinai Journal of Medicine*; vol.73 (1): 431-439
- 33) Nurden AT (1996). Polymorphisms of platelet receptors as risk factors in coronary thrombosis. *European Heart Journal*; vol.17: 1293-1294
- 34) Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF (2000). Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation*; vol.102: 2180-2184
- 35) Carter AM (2005). Inflammation, thrombosis and acute coronary syndromes. *Diabetes Vasc Dis Res*; vol.2: 113-121
- 36) Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z Chesebro JH (2001). Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Annals of Internal Medicine*; vol.134: 224-238
- 37) Colwell JA, Nesto RW (2003). The platelet in diabetes. *Diabetes Care*; vol.26 (7): 2181-2188
- 38) Klein RL, Colwell JA. Altered endothelial function in diabetes mellitus: an overview. In Sowers JR, Contemporary Endocrinology: Endocrinology of the Vasculature. Humana Press, 1996. Cap.9, pp. 125-134

- 39) Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA (1986). Platelet activation in unstable coronary artery disease. *N Engl J Med*; vol.315: 983-989
- 40) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*; vol.326: 242-250
- 41) Douglas H, Michaelides K, Gorog DA, Durante-Mangoni E, Ahmed N, Davies GJ, Tuddenham EGD (2002). Platelet membrane glycoprotein Ib α gene -5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor for the occurrence of coronary thrombosis. *Heart*; vol.87: 70-74
- 42) Júnior FLA, Guimarães AV. Isquemia dos membros inferiores. In Pitta GBB, Castro AA, Burihan E, *Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado*. Maceió:UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. Disponível em: www.lava.med.br/livro
- 43) Sontheimer DL (2008). Doença arterial periférica: diagnóstico e tratamento. *American Family Physician*; vol.5: 23-28
- 44) Freedman JE (2005). Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation*; vol.112: 2725-2734
- 45) White JG (1979). Current concepts of platelet structure. *Am J Clin Pathol*; vol.71: 363
- 46) García A, Senis Y, Tomlinson MG, Watson SP. Platelet genomics and proteomics. In Michelson AD, *Platelets*. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 5, pp. 99-116
- 47) Kunicki TJ (2002). The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; vol.22: 14-20
- 48) Streifler JY, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela BA, Dardik R, Zivelin A, Ravid B, Davidson J, Seligsohn U, Inbal A (2001). Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism. *Stroke*; vol. 32: 2753-2758

- 49) Tschoepe D, Menart B, Ferber P, Altmann, Haude M, Haastert B, Roesen P (2003). Genetic variation of the platelet- surface integrin GPIIb-IIIa (PIA1/A2-SNP) shows a high association with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*; vol.46: 984-989
- 50) Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K (1997). PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *The lancet*; vol. 349: 345-388
- 51) März W, Boehm BO, Winkelmann BR, Hoffmann MM (2004). The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with the risk of type 2 diabetes. The Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Diabetologia*; vol.47: 1969-1973
- 52) Aleksic N, Juneja H, Folsom AR, Ahn C, Boerwinkle E, Chambless LE, Wu KK (2000). Platelet PIA2 allele and incidence of coronary heart disease Results from the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation*; vol.102: 1901:1905
- 53) Chen CH, Lo YK, Ke D, Liu CK, Liou CW, Wu HL, Lai ML for the Southern Taiwan Young Stroke Study Group (2004). Platelet glycoprotein Ia C807T, Ib C3550T, and IIa PIA1/A2 polymorphisms and ischemic stroke in young Taiwanese. *Journal of the Neurological Sciences*; vol.227: 1-5
- 54) Afshar-Kharghan V, Vijayan KV, Bray PF. Platelet Polymorphisms. In: Michelson AD, Platelets. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 14, pp. 281-307
- 55) Cadroy Y, Sakariassen KS, Charlet JP, Thalamas C, Boneu B, Sie P (2001). Role of 4 platelet membrane glycoprotein polymorphisms on experimental arterial thrombus formation in men. *Blood*; vol. 98 (10): 3159-3161
- 56) Baker RI, Eikelboom J, Lofthouse E, Staples N, Afshar-Kharghan V, López JA, Shen Y, Berndt MC, Hankey G (2001). Platelet glycoprotein Ib α Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke. *Blood*; vol.98 (1): 36-40
- 57) Frank MB, Reiner AP, Schwartz SM, Kumar PN, Pearce RM, Arbogast PG, Longstreth Jr WT, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS (2001). The Kozak sequence

polymorphism of platelet glycoprotein Ib α and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women. *Blood*; vol.97 (4): 875-879

58) Ishida F, Ito T, Takei M, Shimodaira S, Kitano K, Kiyosawa K (2000). Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib α with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease. *British J Haemat*; vol.111: 1247-1249

59) Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ (1998). Platelet GP IIIa P1^A and GP Ib variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; vol. 18: 1124-1131

60) Vijayan KV, Bray PF (2006). Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: enhanced outside-in signalling through the Pro33 variant of integrin β 3. *Exp Biol Med*; vol.231: 505-513

61) Plow EF, Pesho MM, Ma YQ. Integrin α IIb β 3. In Michelson AD, Platelets. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 8, pp. 165-178

62) Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, López JA (1999). Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ib α gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood*; vol.94 (1): 186-191

63) Andrews RK, Berndt MC, López JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex. In Michelson AD, Platelets. Second Edition. Academic Press, 2007. Cap. 7, pp. 145- 163

64) Kozak M (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*; vol.15: 8125-8148

65) Kenny D, Muckian C, Fitzgerald DJ, Cannon CP, Shields DC (2002). Platelet Glycoprotein Ib α receptor polymorphisms and recurrent ischaemic events in acute coronary syndrome patients. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*; vol.13 (1): 13-19

66) Ulrichs H, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs S, Vauterin S, Kroll H, Santoso S, Deckmyn H (2003). Von Willebrand factor but not α -thrombin binding to platelet

glycoprotein Ib α is influenced by the HPA-2 polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; vol.23: 1302-1307

67) López JA, Ludwig EH, McCarthy BJ (1992). Polymorphism of human glycoprotein Ib α results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. *The journal of Biological Chemistry*; vol.267(14): 10055-10061

68) Ishida F, Saji H, Maruya E, Furihata K (1991). Human platelet-specific antigen, Sib", is associated with the molecular weight polymorphism of glycoprotein Iba. *Blood*; vol.78(7): 1722-1729

69) Rozalski M, Boncler M, Luzak B, Watala C (2005). Genetic factors underlying differential blood platelet sensitivity to inhibitors. *Pharmacological Reports*; vol.57: 1-13

70) Furihata K, Nugent DJ, Kunicki TJ (2002). Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med*; vol.126: 305-309

71) Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Matsuzaki T, Yamaoka M, Abe M, Hosokawa M, Nishikawa M, Iwasaka T, Fukuhara S (2006). Genetic analysis of HLA, NA and HPA typing in type 2 diabetes and ASO. *International Journal of Immunogenetics*; vol.33: 117-122

72) Ozelo MC, Costa DSP, Siqueira LH, Machado TMF, Castro V, Gonçalves MS, Menezes RC, Soares M, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Arruda VR (2004). Genetic variability of platelet glycoprotein Ib α gene. *American Journal of Hematology*; vol.77: 107-116

73) Pucci L, Lucchesi D, Fotino C, Grupillo M, Miccoli R, Penno G, Del Prato S (2003). Integrin beta 3 P1A1/A2 polymorphism does not contribute to complications in both type 1 and type 2 diabetes. *G Ital Nefrol*; vol.20 (5): 461-469

74) Kozieradzka A, Kamiński K, Pepiński W, Janica J, Korecki J, Szepietowska B, Musiał WJ (2007). The association between type 2 diabetes mellitus and A1/A2

polymorphism of glycoprotein IIIa gene. *Acta Diabetol*; vol.44: 30-33

75) Gialeraki A, Politou M, Rallidis L, Merkouri E, Markatos C, Kremastinos D, Travlou A (2008). Prevalence of Prothrombotic Polymorphisms in Greece. *Genetic Testing*; vol.12(4): 541-547

76) Maroco J. Testes não paramétricos para comparar populações a partir de amostras independentes. In: Maroco J – *Análise estatística: com utilização do SPSS*. 3ª Edição. Edições Sílabo, 2007. Cap. 7, pp. 214-265

77) Maroco J. Análises de clusters. In: Maroco J – *Análise estatística: com utilização do SPSS*. 3ª Edição. Edições Sílabo, 2007. Cap. 11, pp. 417-454

78) Maroco J. Regressão categorial. In: Maroco J – *Análise estatística: com utilização do SPSS*. 3ª Edição. Edições Sílabo, 2007. Cap.15 , pp. 684-797

79) Aramaki KM, Reiner AP (1999). A novel isoform of platelet glycoprotein Iba is prevalent in African Americans. *Am J Hematol*; vol.60: 77-79

80) Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML (1998). New alleles of the platelet glycoprotein Iba gene. *British J Haematol*; vol.103: 997-1003

81) Carter AM, Mansfield MW, Grant PJ (1998). Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*; vol.15(4): 315-319

82) Corsetti JP, Ryan D, Moss AJ, Rainwater DL, Zareba W, Sparks CE (2007). Glycoprotein Iba polymorphism T145M, elevated lipoprotein-associated phospholipase A2, and hypertriglyceridemia predict risk for recurrent coronary events in diabetes postinfarction patients. *Diabetes*; vol.56: 1429-1435

83) Maric C (2009). Sex, diabetes and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*; vol.296 (4): F680-F688

84) Xie XT, Liu Q, Wu J, Wakui M (2009). Impact of cigarette smoking in type 2 diabetes development. *Acta Pharmacol Sin*; vol.30(6):784-787

- 85) Campbell PJ, Carlson MG (1993). Impact of obesity on insulin action in NIDDM. *Diabetes*; vol.42: 405-410
- 86) Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE (2005). Association of polymorphisms of platelet membrane integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (HPA-1b/PIA2) and $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ (α2807TT) with premature myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; vol.3: 1522-1529
- 87) F Ishida, K Furihata, K Ishida, J Yan, K Kitano, K Kiyosawa, S Furuta (1995). The largest variant of platelet glycoprotein Ib alpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine145. *Blood*; vol.86 (4): 1357-1360
- 88) Simsek S, Bleeker PM, van der Schoot CE, von dem Borne AE (1994). Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib alpha and HPA-2 alloantigens. *Throm Haemost*; vol.72 (5): 757-761
- 89) Hsueh WA, Anderson PW (1992). Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension*; vol.20: 253-263

ANEXOS

Anexo I_ Consentimento informado

Estudo da influência de polimorfismos em genes de glicoproteínas plaquetárias no aparecimento de isquemia em diabéticos

A Diabetes *mellitus* tipo 2 é uma doença crónica muito frequente em Portugal. Um dos problemas associados a esta patologia é a alteração da camada superficial interna dos vasos sanguíneos, com possível formação de placas de ateroma.

O objectivo deste estudo é estudar a influência de polimorfismos em genes da glicoproteína plaquetária IIb-IIIa e Ib-V-IX no aparecimento de problemas cardiovasculares nos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2.

Para realizar os objectivos propostos neste estudo são necessários 3 tubos de sangue com anticoagulante EDTA, 1 tubo com citrato e um tubo sem anticoagulante. O paciente necessita de estar em jejum na altura da colheita.

Uma vez que se vai ter acesso a informação contida nos seus genes, as normas aconselham a assinatura do consentimento informado. A utilização dos dados fornecidos através do preenchimento do consentimento informado poderá ser anulada em qualquer altura do estudo, desde que esse seja o seu desejo.

(Nome) _____

portador(a) do bilhete de identidade _____ emitido pelo
arquivo de identificação de _____ em ___ / ___ / ___ , dá o seu
acordo para que se proceda à recolha de sangue para análise genética. Permite
igualmente, a utilização dos seus dados clínicos, de forma anónima, após a leitura deste
texto e esclarecimento de eventuais dúvidas relacionadas com os procedimentos
envolvidos.

Assinatura

Data

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo II_ Valores de referência para os parâmetros analisados

Parâmetro	Valor de referência
Índice de massa corporal (IMC)	
Baixo peso	<18,5
Peso normal	18,5 – 24,9
Excesso de peso	25,0 – 29,9
Obeso	>30
Eritrócitos	
Sexo Feminino	4,1 – 5,1 x 10 ¹² /L
Sexo Masculino	4,2 – 5,4 x 10 ¹² /L
Hematócrito	
Sexo Feminino	38 – 46%
Sexo Masculino	42 – 54%
Hemoglobina	
Sexo Feminino	12,3 – 15,3g/L
Sexo Masculino	14 – 17,5g/L
Leucócitos	5 – 10 x 10 ⁹ /L
Plaquetas	150 – 300 x 10 ⁹ /L
Colesterol	≤200 mg/dL
HDL colesterol	
Risco cardiovascular elevado	<40 mg/dL
Risco cardiovascular intermédio	40 - 60 mg/dL
Baixo risco cardiovascular	>60 mg/dL
LDL colesterol	<130 mg/dL
Triglicerídeos	
Normal	<150 mg/dL
Risco acrescentado	150 – 200 mg/dL
Risco elevado	>200 mg/dL
Glicose	60 - 110 mg/dL
Hb A1C	<6,5%
Tempo protrombina	10 – 14 seg
Tempo tromboplastina parcial activada	25 – 45 seg
Tempo trombina	0 – 18 seg