

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas

POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA
CORRELACIONADO COM DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA

PÂMELA ALEGRANCI

Araraquara - SP

2008

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas

POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA
CORRELACIONADO COM DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

Pâmela Alegranci

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

Araraquara - SP

2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^o Haroldo Wilson Moreira (orientador)

Prof. Dr^o Luiz Carlos de Mattos (membro da banca)

Prof. Dr^o Evandro José Cesarino (membro da banca)

Dissertação apresentada em 14 de Agosto de 2008.

DEDICATÓRIA

"Só há uma palavra suficientemente poderosa para vencer o desespero:
a fé."

(Emil Brunner)

Obrigada meu Deus.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a vocês que acreditaram que eu conseguiria realizar mais esta etapa da minha vida,

Meus pais ***Aparecido e Jeni***

Meu irmão ***Winston***

Meu namorado ***Adilson***

Minhas amigas ***Débora, Marta, Neocimar e Kate***

E meu orientador Prof^o Dr. ***Haroldo***.

Aos mesmos meus sinceros agradecimentos.

**“Um grande estímulo na vida é saber que alguém confia em nós e de nós
espera grandes coisas”**

(Orison Sweet Marden)

AGRADECIMENTOS

Aos laboratórios de Micologia, Citologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara-SP) e ao serviço de Hemodinâmica do Hospital de Base da FUNFARME (São José do Rio Preto-SP):

Bel da citologia que autoclavou os materiais,

As alunas da micologia que me ensinaram a utilizar os aparelhos,

Os profissionais (médicos e enfermeiros) do Setor de Hemodinâmica que coletaram o material,

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos do Departamento Biologia Molecular da FAMERP de São José do Rio Preto pelo auxílio no contato com os clínicos cardiologistas e pelas amostras de banco de sangue,

Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy do Departamento de Cardiologia e Cirurgia Vascular da FAMERP de São José do Rio Preto pela caracterização dos pacientes,

Prof. Dr. Romeu Magnani do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara da UNESP pela orientação na parte estatística,

Ana Cristina, bibliotecária, pelo auxílio com as referências bibliográficas,

Aos colegas de caminhada e distração durante este período

Apoio financeiro concedido pela FUNDUNESP
e a bolsa concedida pelo CNPq.

RESUMO

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente pelo fígado com atividade antioxidante e imunomodulatória. Sua principal função é a formação de um complexo estável com a hemoglobina livre, prevenindo a excreção de ferro pelos rins e danos causados pelo efeito oxidativo do mesmo. O polimorfismo desta proteína é caracterizado por três genótipos principais: Hp^1 / Hp^1 , Hp^2 / Hp^1 e Hp^2 / Hp^2 , sendo que estes apresentam subtipos na dependência das recombinações entre os alelos Hp^{1F} , Hp^{1S} , Hp^{2FS} , Hp^{2SF} , Hp^{2FF} e Hp^{2SS} . Apesar de contraditório, vários autores tentam correlacionar esses tipos e subtipos com doenças, na tentativa de responsabilizar algum deles como facilitador ou conferir resistência quanto às mesmas. Os objetivos deste estudo foram verificar as freqüências desse polimorfismo, suas freqüências alélicas e possíveis correlações em portadores e não portadores de doença arterial coronariana, bem como em doadores de sangue, pertencentes a uma parcela da população paulista. Dessa forma foram analisados 125 pacientes com DAC, 69 com ausência de DAC e 124 doadores de sangue. O material genético foi extraído, amplificado e após restrição enzimática com Dra I permitiu identificar os tipos e subtipos da haptoglobina. Os resultados permitiram concluir que essa caracterização pela técnica aplicada mostrou ser rápida e de fácil realização. Os portadores de DAC e os doadores de sangue evidenciaram maior freqüência do Hp^2 / Hp^2 e aqueles com ausência de DAC do genótipo heterozigoto, não sendo observada diferenças estatísticas significativas entre eles. Essa mesma observação era verificada quando estratificávamos os grupos quanto aos sexos. A freqüência alélica do Hp^2 se mostrou maior que o Hp^1 para os três grupos analisados. A distribuição dos subtipos da haptoglobina revelou que o prevalente em todos os grupos foi representado pelo Hp^{2FS} / Hp^{2FS} , seguidos pelo Hp^{2FS} / Hp^{1F} para os portadores de DAC e para os com ausência de DAC e do Hp^{2FF} / Hp^{2FF} para os doadores de sangue. O terceiro em expressão foi representado pelo Hp^{1S} / Hp^{1S} nos portadores de DAC, Hp^{2FS} / Hp^{1S} naqueles com ausência de DAC e Hp^{1F} / Hp^{1F} entre os doadores de sangue. Esses resultados, principalmente se considerarmos o subtipo expresso em segunda prevalência, parecem indicar um aumento do Hp^{2FS} associado com outro alelo nos indivíduos considerados como grupo de risco para DAC quando comparados aos doadores de sangue. As freqüências gênicas foram calculadas a partir das distribuições dos subtipos

observados para os grupos em estudo, revelando prevalência do alelo Hp^{2FS} para todos os grupos, seguidas do Hp^{1S} para os indivíduos com ausência de DAC e para os dos doadores de sangue, e do Hp^{1F} para os portadores de DAC. Apesar da comparação estatística entre todas as freqüências gênicas dos subtipos não se mostrar significativa, quando consideramos somente os alelos Hp^{2FS} e Hp^{2FF}, verificamos diferença estatística significativa, o que reforça para os portadores de DAC e com ausência de DAC maior freqüência do alelo Hp^{2FS} com relação aos doadores de sangue. Os portadores de DAC dos sexos masculino e feminino evidenciaram diferença estatística significativa quando comparados aos doadores de sangue do mesmo sexo, o que não foi evidenciado na comparação daqueles com ausência de DAC e doadores de sangue, considerando os sexos. Apesar de questionável, parece válido aplicar de forma rotineira a verificação e associação dos tipos e subtipos da haptoglobina com DAC na tentativa de responsabilizar um deles como responsável pela promoção de uma defesa ou uma susceptibilidade à mesma, sendo no presente trabalho possível considerar o alelo Hp^{2FS} como um diferencial nesse estudo.

Unitermos: Polimorfismo da haptoglobina, doença arterial coronariana, doadores de sangue, correlação polimorfismo doença, amplificação gênica – restrição enzimática.

ABSTRACT

Haptoglobin is a glycoprotein synthesized by liver with antioxidant and immunomodulatory properties. Its main function is the formation of a stable complex with free hemoglobin, preventing iron loss and damage caused by oxidative effects. The polymorphism of this protein is characterized by three main genotypes: Hp^1 / Hp^1 , Hp^2 / Hp^1 e Hp^2 / Hp^2 , and these have subtypes in dependence of the recombination among the alleles Hp^{1F} , Hp^{1S} , Hp^{2FS} , Hp^{2SF} , Hp^{2FF} e Hp^{2SS} . Despite contradictory, the authors try to associated types and subtypes with diseases, attempt to hold responsible for someone or to permit resistance to them. The purposes of our study were to find the frequencies of this polymorphism, their allelic frequencies and possible associations in patients with coronary artery disease and patients without coronary artery disease, as well as in blood donors, from one fraction of Brazilian population. We have analyzed 125 patients with CAD, 69 patients without CAD and 124 blood donors. Genomic DNA was extracted, amplified and after enzyme restriction with Dra I we could identify types and subtypes of haptoglobin. With the results we conclude that this applied technique is fast and it's easy to carry out. Patients with CAD and blood donors evidenced higher frequencies for Hp^2 / Hp^2 and patients without CAD from heterozygous genotypes, weren't observed significant statistical differences among them. The same observation was verified when we stratified the groups regarding genders. The allelic frequency of Hp^2 was shown higher than Hp^1 for the three groups analyzed. The distribution of haptoglobin subtypes revealed that the prevalent for all groups were represented by Hp^{2FS} / Hp^{2FS} , followed by Hp^{2FS} / Hp^{1F} in patients with CAD and without CAD and Hp^{2FF} / Hp^{2FF} in blood donors. The third in expression was represented by Hp^{1S} / Hp^{1S} in patients with CAD, Hp^{2FS} / Hp^{1S} in patients without CAD and Hp^{1F} / Hp^{1F} among blood donors. This results, mainly if we consider the expressed subtype in second prevalence, seem to indicate an increase of Hp^{2FS} associated with another allele in individuals if we consider as a risk group for CAD when compared to the blood donors. The allelic frequencies were calculated from observation of subtypes distributions in the groups analyzed, showing prevalence of the Hp^{2FS} , following Hp^{1S} for patients without CAD and blood donors, and Hp^{1F} for patients with CAD. Despite statistical comparisons among subtypes allelic frequencies don't show significance, when we consider only the alleles Hp^{2FS} and Hp^{2FF} , we verified significant statistical

differences, that reinforce for patients with CAD and without CAD higher frequency of Hp^{2FS} allele in regarding to blood donors. Patients with CAD, male or female gender, showed significant statistical differences when compared to blood donors of the same gender that was not observed in comparisons for patients without CAD and blood donors, considering the genders. In spite of questionable, it seems valid to apply in routine the verification and the association of haptoglobin types and subtypes with CAD in attempt to responsible one of them for the promotion of a defense or a susceptibility, being possible in this assignment to consider Hp^{2FS} allele as a differential in our study.

Key words: Haptoglobin polymorphism, coronary artery disease, blood donors, correlation polymorphism and disease, PCR - enzyme restriction.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	8
Lista de figuras	12
Lista de tabelas	13
Lista de abreviaturas	14
1. Introdução	15
1.1. Genética	15
1.2. Estrutura	18
1.3. Metabolismo	19
1.4. Função	21
1.5. Correlação com doenças	22
1.6. Doença arterial coronariana	23
1.7. Distribuição geográfica	25
2. Objetivos	30
3. Casuística	30
4. Metodologia	31
4.1. Quantificação do material genético	33
4.2. Procedimento de amplificação do material genético e tratamento do produto da amplificação para a caracterização dos genótipos e dos subtipos da haptoglobina.....	34
4.3. Análise estatística	37
5. Resultados	37

6. Discussão	52
7. Conclusões	59
8. Referencias bibliográficas	61
Apêndice	77
Anexo	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da eletroforese em gel de amido dos principais fenótipos da haptoglobina. 19
- Figura 2.** Representação esquemática da extração de DNA genômico a partir do kit de extração da GE Healthcare, ilustra blood genomicPrep Mini Spin Kit. 33
- Figura 3.** Representação esquemática da amplificação com os *primers* A → B seguidos da restrição enzimática com Dra I, evidenciando os fragmentos em pares de base para cada alelo. 35
- Figura 4.** Representação esquemática da amplificação com os *primers* E → D e *primers* C → F seguidos da restrição enzimática com Dra I, evidenciando os fragmentos em pares de bases para cada alelo. 36
- Figura 5.** Produtos das amplificações gênicas com *primers* A → B. 38
- Figura 6.** Produtos das amplificações gênicas com *primers* E → D e C → F. 39
- Figura 7.** Produtos dos homocigotos para o alelo Hp¹ tratados com Dra I. 44
- Figura 8.** Restrição enzimática com Dra I das amplificações gênicas com *primers* C → F (posições 2 a 5) e com os *primers* E → D (posições 6 a 9). As posições de 2 a 5 têm o mesmo material genético das posições de 6 a 9. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças nos aminoácidos das cadeias polipeptídicas do tipo α^{1F} e α^{1S} .	17
Tabela 2. Freqüências do alelo Hp ¹ em diferentes populações.	26
Tabela 3. Freqüência do alelo Hp ¹ e dos subtipos em povos que influenciaram a origem formadora da população brasileira.	28
Tabela 4. Freqüência do alelo Hp ¹ na população brasileira.	29
Tabela 5. Número de indivíduos observados em diferentes faixas etárias em cada grupo separado quanto aos sexos.	40
Tabela 6. Distribuição dos genótipos da haptoglobina em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto (SP).	41
Tabela 7. Freqüências dos genes Hp ¹ e Hp ² nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue.	42
Tabela 8. Distribuição dos genótipos da haptoglobina observados nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue quanto ao sexo.	43
Tabela 9. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto (SP).	46
Tabela 10. Freqüências gênicas dos subtipos encontrados nos pacientes com doença arterial coronariana, nos pacientes sem doença arterial coronariana e nos doadores de sangue.	47
Tabela 11. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto (SP), onde os subtipos observados em menores porcentagens foram agrupados como outros.	48
Tabela 12. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue quanto aos sexos.	50
Tabela 13. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue quanto aos sexos, onde os subtipos encontrados em menores porcentagens foram excluídos.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CD – Cluster of differentiation

Complexo Hp-Hb – Complexo haptoglobina - hemoglobina

DAC – Doença arterial coronariana

dNTP – Mistura de desoxinucleotídeo

Hb – Hemoglobina

Hp – Haptoglobina

Hp 2-1M – Haptoglobina 2-1 modificada

IL – Interleucina

Kbs – Kilobases

KDa – Kilodaltóns

LLA – Leucemia linfóide aguda

LMA – Leucemia mielóide aguda

LMC – Leucemia mielóide crônica

LPS – Lipopolissacarídeo

mM – Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

nm – Nanômetros

PCR – Polymerase chain reaction

u – Unidade

μl – Microlitros

umol/L - Micromol por litro

α – Alfa

β – Beta

1. INTRODUÇÃO

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente pelo fígado com atividade antioxidante e imunomodulatória (LANGLOIS e DELANGHE, 1996). A principal função da haptoglobina é a formação de um complexo estável com a hemoglobina livre liberada no interior dos vasos sanguíneos prevenindo desta forma a excreção de ferro pelos rins e os danos causados pelo efeito oxidativo do ferro ao permanecer livre (GUTTERIDGE, 1987; WANG et al., 1993; MELAMED-FRANK et al., 2001).

A haptoglobina apresenta um polimorfismo caracterizado por três fenótipos principais: Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2, sendo que estes apresentam subtipos. Outros fenótipos mais raros como o Hp 2-1 modificado, Hp Johnson e o Hp Calberg também foram identificados (BRUNE et al., 1984; WASSELL, 2000).

Vários autores tentam correlacionar esses fenótipos com doenças na tentativa de verificar suas distribuições em diferentes populações, suas associações e se alguns destes fenótipos podem ser facilitadores ou conferir resistência às mesmas. Entretanto, alguns resultados mostram-se bastante contraditórios os quais validam novos estudos e permite a obtenção do conhecimento da distribuição genotípica e os seus efeitos nos processos das doenças, podendo futuramente servir como um fator prognóstico e também auxiliar no melhor tratamento e acompanhamento de acordo com a necessidade de cada indivíduo (LANGLOIS e DELANGHE, 1996, WASSELL, 2000).

1.1. GENÉTICA

O gene estrutural da haptoglobina está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22), expressando seu produto protéico principalmente nos hepatócitos, sendo que nesse gene estão presentes os alelos codominantes, Hp¹ e Hp², que codificam os principais genótipos da haptoglobina em humanos (SCHULTZE e HEREMANS, 1966; BOWMAN, 1993). Estes genes são ligados, de modo que um único mRNA é sintetizado, gerando uma única cadeia polipeptídica que é então clivada para formar as duas cadeias distintas unidas por pontes de hidrogênio (RAUGEI et al., 1983; KOCH et al., 2003).

Em relação à expressão da haptoglobina em humanos os homozigotos para o alelo Hp¹ codificam polipeptídios para a cadeia α^1 e β (Hp 1 α e Hp β), caracterizando o genótipo Hp¹ / Hp¹. Por sua vez, os homozigotos para o alelo Hp² codificam polipeptídios de cadeia α^2 e β (Hp 2 α e Hp β) apresentando genótipo Hp² / Hp². Os heterozigotos codificam cadeias do tipo α^1 , α^2 e β , sendo seu genótipo Hp² / Hp¹ (SMITHIES e WALKER, 1955; SMITHIES et al., 1962a; PARKER e BEARN, 1963).

Após a dissociação e caracterização dos constituintes das cadeias polipeptídicas, demonstrou-se a existência de dois tipos de cadeias α^1 : α^{1F} e α^{1S} , sendo que a variação herdada nos polipeptídios desta cadeia reflete o polimorfismo das proteínas (SMITHIES et al., 1962a; CONNELL et al., 1962, 1966). Assim existem genes correspondentes a Hp^{1F} e Hp^{1S}, alelos de Hp¹, que codificam polipeptídeos de tamanhos iguais diferindo em dois aminoácidos.

O gene Hp¹ é formado por cinco exons, sendo que o exon 4 apresenta uma variação na sua seqüência de nucleotídeos com tradução de dois tipos de cadeia polipeptídicas do tipo α . Esta cadeia polipeptídica pode apresentar nas posições 52 e 53, respectivamente, ácido aspártico e lisina quando do tipo α^{1F} e asparagina e ácido glutâmico quando do tipo α^{1S} (**Tabela 1**). No gene Hp² esta mudança ocorre nas posições 111 e 112 da cadeia α^2 levando a uma variação eletroforética distinguível do produto gênico (MAEDA et al., 1984; VAN DER STRATEN et al., 1984; YANO et al., 1998).

Outras seqüências de nucleotídeos são diferentes dependendo do tipo da cadeia α^1 , no entanto, apesar dos códons codificarem os mesmos aminoácidos suas seqüências nas posições 47 e 51 são diferentes (**Tabela 1**) (CARTER e WORWOOD, 2007). Dos estudos realizados para os polipeptídios da cadeia β verificou-se que a mesma é codificada de maneira idêntica para os três genes Hp^{1F}, Hp^{1S} e Hp².

Tabela 1. Diferenças nos aminoácidos das cadeias polipeptídicas do tipo α^{1F} e α^{1S} .

Aminoácido	α^{1F}	α^{1S}
47	Valina (GTA)	Valina (GTG)
51	Asparagina (AAT)	Asparagina (AAC)
52	Ácido aspártico	Asparagina
53	Lisina	Ácido glutâmico

(Adaptada de CARTER e WORWOOD, 2007).

O gene Hp^2 apresenta 7 exons e acredita-se que ele tenha surgido após um *crossing-over* desigual entre os alelos Hp^{1F} e Hp^{1S} , onde os exons 3 e 4 destes alelos deram origem, respectivamente aos exons 5 e 6 do alelo da Hp^2 (BLACK e DIXON, 1968; MAEDA et al., 1984; KOCH et al., 2002).

Hoje, com base nos dados expostos, sabe-se que o polimorfismo da haptoglobina é caracterizado por três genótipos principais Hp^1 / Hp^1 , Hp^2 / Hp^2 e Hp^2 / Hp^1 , e estes possuem várias recombinações possíveis entre seus subtipos resultando os alelos existentes: Hp^{1F} , Hp^{1S} , Hp^{2FS} , Hp^{2SF} , Hp^{2FF} e Hp^{2SS} (BRUNE et al., 1984; KOCH et al., 2003).

Além dos principais genes existe um alelo Hp^0 no *locus* da haptoglobina responsável por uma herança fenotípica anormal, no entanto a origem deste genótipo ainda é discutida. Uma das hipóteses é que a existência de deleção alélica (Hp^{del}) seja responsável por este genótipo, sendo que em heterozigose (Hp^2 / Hp^{del}) os portadores apresentam hipohaptoglobinemia, enquanto os heterozigotos (Hp^1 / Hp^{del}) não apresentam este quadro (KODA et al., 1998). Quando em homozigose (Hp^{del} / Hp^{del}) este gene é responsável pela anaptoglobinemia (MAEDA et al., 1984; KODA et al., 1998).

No Brasil foram descritas substituições de bases no gene e que poderiam ser responsáveis por afetar a expressão gênica com conseqüente anaptoglobinemia (ZACCARIOTTO et al., 2006a).

Foram também observadas outras variantes consideradas raras, provavelmente ocorridas devido a alterações genéticas que geraram mudanças

estruturais, sendo que entre estas podemos citar a Hp 2-1 modificada (Hp 2-1M) (SCHULTZE e HEREMANS, 1966), a Hp Johnson (OLIVIERO et al., 1985) e a Hp Carlberg (GALATIUS-JENSEN, 1958). Na Hp 2-1 M, talvez a mais observada entre as consideradas raras, estudos relatam que a formação deste fenótipo provavelmente se deve a cadeia polipeptídica do Hp² em quantidades menores nos heterozigotos, sendo verificado na posição 61 do Hp² a ocorrência de mudança de citosina por adenina em região responsiva a interleucina 6 (KODA et al., 1998).

Outro gene conhecido como Hpr (proteína relacionada à haptoglobina) está presente em humanos, a proteína codificada apresenta 91% de homologia com a haptoglobina 1-1 e seu gene localiza-se em uma região de 30 Kbs do cromossomo 16q22.3 (MAEDA, 1985; NIELSEN et al., 2006).

1.2. ESTRUTURA

Os três tipos principais da haptoglobina foram caracterizados usando procedimento eletroforético em gel de amido em 1955 (SMITHIES, 1955). A eletroforese em gel de amido mostrou três bandas α : α^{1S} (S, de *slow* = lenta), α^{1F} (F, de *fast* = rápida) e a banda α^2 de migração lenta (SCHULTZE e HEREMANS, 1966). Assim o fenótipo Hp 1-1 é caracterizado por uma única banda de migração rápida na eletroforese em gel de amido, enquanto o fenótipo Hp 2-2 tem uma série de bandas de migração lenta e o fenótipo heterozigoto (Hp 2-1) exibe outras séries de bandas de migração lenta e uma banda fraca equivalente a da Hp1 (**Figura 1**).

As cadeias α^{1F} e α^{1S} apresentam pesos moleculares próximos a 8.900 daltons, sendo que os 83 aminoácidos que as constituem diferem apenas pela presença de dois aminoácidos já mencionados anteriormente (SMITHIES et al., 1962b; BLACK e DIXON, 1968). No que se refere à cadeia α^2 sabe-se que a mesma tem peso molecular ao redor de 17.000 daltons, sendo formada por 142 aminoácidos. A cadeia β possui 245 resíduos de aminoácidos e não apresenta nenhum polimorfismo genético.

Deste modo, os diferentes tipos da haptoglobina estariam condicionados estruturalmente aos polipeptídeos das cadeias alfas, pois os da cadeia beta apresentam configuração estrutural homogênea (CLEVE et al., 1967).

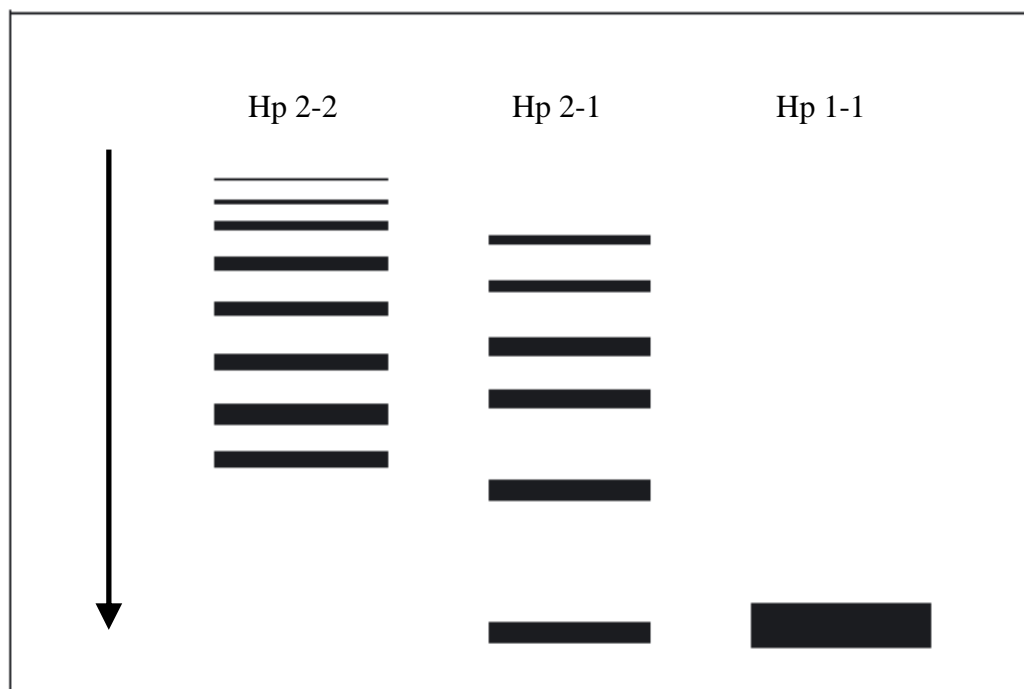


Figura 1. Representação esquemática da eletroforese em gel de amido dos principais fenótipos da haptoglobina (adaptada de CARTER e WORWOOD, 2007).

A Hp 2-1M, Hp Johnson e Hp Carlberg podem também ser identificadas a partir de pequenas variações nos padrões das bandas eletroforéticas e aparecem em decorrência de possíveis mutações (GALATIUS-JENSEN, 1958; GIBLETT, 1959, 1961).

A molécula da haptoglobina possui uma estrutura tetramérica, consistindo de duas cadeias polipeptídicas do tipo α (leves) e duas cadeias do tipo β (pesadas), ligadas covalentemente entre si por pontes dissulfeto (S-S) (YANO et al., 1998).

Em relação ao peso molecular a menor molécula (86 KDa) é da proteína Hp 1-1 e a maior é da Hp 2-2 (170-900 KDa), enquanto Hp 2-1 possui um peso intermediário (86-300 KDa) (LANGLOIS e DELANGHE, 1996).

1.3. METABOLISMO

Os primeiros transplantes de fígado permitiram concluir que a síntese da haptoglobina ocorre nas células hepáticas, pois os pacientes transplantados apresentavam o fenótipo da haptoglobina do doador após a cirurgia (KASHIWAGI et

al., 1968). Esta síntese ocorre principalmente nas células parenquimatosas do fígado (KRAUSS e SARCIONE, 1964; PRUMIER et al., 1964).

Outros locais da síntese da haptoglobina seriam no sistema fagocitário mononuclear do baço, gânglios linfáticos e timo (WADA et al., 1970a/b). Recentemente foi encontrada a presença da haptoglobina nos grânulos específicos de granulócitos, mais especificamente em mielócitos, metamielócitos e neutrófilos da medula óssea e do sangue periférico (THEILGAARD-MÖNCH et al., 2006).

Há relatos da expressão desta proteína em macrófagos alveolares e eosinófilos em tecidos pulmonares inflamados, como por exemplo, no caso de uma alergia respiratória ou asma (YANG et al., 2000), podendo ser o pulmão um local de síntese extra-hepática da haptoglobina (YANG et al., 1995).

A concentração plasmática da haptoglobina é dependente do fenótipo, onde os níveis séricos dos fenótipos Hp 1-1 aparecem em maior concentração do que nos fenótipos Hp 2-2 e Hp 2-1 (NYMAN, 1959; DENSEM et al., 2004). Em recém-nascidos os níveis séricos são indetectáveis e somente após 1 ano é que se torna semelhante ao dos adultos (BOWMAN, 1993), sendo que este fato pode estar relacionado à imaturidade hepática ou ao consumo da haptoglobina devido à hemólise fisiológica observada nos recém-nascidos (GARBY et al., 1964).

Nos indivíduos adultos normais os níveis da haptoglobina permanecem quase que constantes sofrendo influências hormonais, onde hormônios paratireoidiano e corticosterona aumentam os níveis da haptoglobina e estrógenos o diminuem (BORGLIN e NYMAN, 1961). Citocinas como a IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral induzem a sua síntese hepática (BOWMAN, 1993; RAYNES et al., 1991). A IL-6 é uma interleucina pró-inflamatória que tem grande importância na produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, como é o caso da haptoglobina (GAULDIE et al., 1987).

O catabolismo da haptoglobina livre no plasma segue a via catabólica hepática das proteínas plasmáticas. Na forma de complexo haptoglobina-hemoglobina ocorre uma interação com o receptor CD163 presente na superfície celular de macrófagos e monócitos, assim o complexo é endocitado e o ferro presente na hemoglobina é transportado para a medula óssea para ser reutilizado (OSHIRO e NAKAJIMA, 1988; OSHIRO et al., 1992).

O receptor CD163 está presente em monócitos e macrófagos teciduais (fígado, baço e nódulos linfáticos) e sua expressão é regulada pela IL-6, IL-10 e

glicocorticóides que induzem a uma forte expressão, enquanto LPS (lipopolissacarídeo) e interferon- γ a reprimem (BUECHLER et al., 2000).

O fenótipo Hp 2-2 apresenta 10 vezes mais afinidade por este receptor do que o fenótipo Hp 1-1, esta afinidade por ser devido a vários sítios de ligações presentes na Hp 2-2 por ser uma proteína multimérica (KRISTIANSEN et al., 2001; ASLEH et al., 2003). O complexo Hp 1-1+Hb é mais rapidamente liberado do que complexos Hp 2-2+Hb, o que pode explicar o menor dano por stress oxidativo na parede dos vasos de indivíduos que apresentam fenótipo Hp 1-1 (ROGUIN et al., 2003; SULEIMAN et al., 2005).

1.4. FUNÇÃO

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática com atividade antioxidante e imunomodulatória, cuja principal função é ligar-se à hemoglobina livre formando um complexo haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb) evitando a oxidação e possíveis danos ao tecido renal (LEE et al., 1998).

Pacientes com baixos níveis de haptoglobina podem apresentar uma outra proteína (Hpr) que também é capaz de ligar-se à hemoglobina evitando dano oxidativo, no entanto o complexo formado pela proteína relacionada a haptoglobina e a hemoglobina (Hpr-Hb) não é reconhecido pelo receptor CD163 (NIELSEN et al., 2006).

A atividade antioxidante da Hp é fenótipo dependente, alguns experimentos demonstraram que há uma diferença funcional, sendo que a proteína Hp 1-1 *in vitro* pode conferir uma proteção maior contra danos oxidativos que a proteína Hp 2-2 (KODA et al., 1998; VAN VLIERBERGHE et al., 2004).

O fenótipo Hp 2-2 parece apresentar cinco vezes mais risco para a doença arterial coronariana comparado com o fenótipo Hp 1-1, enquanto os heterozigotos apresentam um risco intermediário (MELAMED-FRANK et al., 2001).

O complexo Hp-Hb é solúvel e estável, sua formação ocorre devido à presença de sítios específicos ligantes de haptoglobina presentes na molécula de hemoglobina. A cadeia beta da hemoglobina humana possui dois sítios localizados nos resíduos de aminoácidos β 11-25 e β 131-146, enquanto a cadeia alfa possui

apenas um domínio localizado nos resíduos de aminoácidos α 121-127, tornando possível desta maneira a interação entre as duas moléculas (haptoglobina e hemoglobina) (McCORMICK e ATASSI, 1990).

Existem relatos associando a haptoglobina a atividades imunomodulatórias, sabe-se que algumas células como neutrófilos e linfócitos B também possuem receptores para esta proteína e quando associados pode ocorrer a inibição do burst oxidativo nas primeiras e a inibição da transformação celular nas segundas (BASLER e BURREL, 1983; OH et al., 1990).

1. 5. CORRELAÇÃO COM DOENÇAS

A haptoglobina comporta-se como uma proteína de fase aguda assim sua concentração plasmática pode se apresentar elevada ou diminuída dependendo do processo patológico. Em casos de hemólise intravascular, reações imunes, infecções em que ocorre hemólise como malária, doenças hereditárias, desnutrição, doença hepática crônica e traumas como, por exemplo, causados por válvulas cardíacas ou endocardite suas concentrações séricas estão diminuídas (THOMAS, 1992; TIETZ, 1995). Outros estímulos como neoplasia, gravidez, infarto agudo do miocárdio e outras reações inflamatórias aumentam as concentrações plasmáticas da haptoglobina.

Através da observação destes dados, vários estudos correlacionando o polimorfismo da haptoglobina com doenças vêm sendo desenvolvidos e acredita-se que o fenótipo Hp 2-2 esteja mais relacionado às mesmas, porque seu produto está presente em menores concentrações quando comparado ao do fenótipo Hp 1-1, além disto, tem menor capacidade de penetrar no espaço extracelular (VAN VLIERBERGHE et al., 2004).

Indivíduos com o fenótipo Hp 1-1 apresentam maior propensão para o desenvolvimento de hepatite C crônica e a freqüência alélica do Hp¹ está relacionada à hepatite B crônica (PADMA e VALLI, 1988; LOUAGIE et al., 1996). Alta freqüência deste fenótipo também foi relatada em câncer de mama, carcinoma cervical, anemia falciforme (TSAMANTANIS et al., 1980; BARTEL et al., 1985; OSTROWSKI et al., 1987). Alguns dados da literatura associam a freqüência deste fenótipo com leucemia mielóide aguda, mielóide crônica e linfóide aguda (NEVO e

TATARSKY, 1986; MITCHELL et al., 1988), mas estes dados são conflitantes com estudos realizados em pacientes leucêmicos brasileiros que apresentaram prevalência para anaptoglobinemia (CAMPREGHER et al., 2004). O fenótipo Hp 2-2 foi relacionado com tuberculose mais agressiva e com capacidade de disseminação, maior mortalidade de pacientes com HIV e doenças auto-imunes (artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico) (RANTAPÄÄ et al., 1985, 1988; FEDOSEEVA et al., 1993).

Do mesmo modo o estudo da distribuição do polimorfismo da haptoglobina tem sido associado com várias doenças cardiovasculares tanto em pacientes com fatores de risco quanto naqueles que não apresentam os fatores clássicos de risco, citando-se fumantes, hipertensos, diabéticos, concentração aumentada de lipoproteínas e uso de anovulatórios (DELANGHE et al., 1997).

Indivíduos com sensibilidade a sódio são freqüentemente do fenótipo Hp 1-1 (KOJIMA et al., 1994), enquanto pacientes hipertensos com fenótipo Hp 2-2 são mais propensos a acumular lesões ateroscleróticas nas artérias coronarianas e periféricas do que portadores de outros fenótipos, sendo que esses apresentam maiores riscos de infarto do miocárdio, doença arterial coronariana, doença oclusiva arterial periférica e hipertensão refratária (DELANGHE et al., 1993; 1995). Também tem sido observado que hipertensos portadores do Hp 2-2 necessitam uma combinação mais complexa de drogas anti-hipertensivas do que os com fenótipo Hp 1-1. Homens portadores do fenótipo Hp 2-2 apresentam um risco maior de desenvolver doença arterial coronariana prematura (DELANGHE et al., 1997) e doença vascular periférica (DELANGHE et al., 1999) quando comparados a portadores de Hp 1-1. Gestantes com fenótipo Hp 2-2 apresentam maiores riscos de desenvolver hipertensão neonatal (CHANDRA et al., 1991). No entanto, esse mesmo fenótipo não mostrou associação com infarto agudo do miocárdio e lesões em pacientes que passaram por algum tipo de transplante cardíaco (CHAPELLE et al., 1982; DELANGHE et al., 1994).

1.6. DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A doença arterial coronariana (DAC) é um distúrbio caracterizado por acúmulo de depósito de gordura nas células que revestem a parede de uma artéria coronária,

com a possibilidade de obstruir o fluxo sanguíneo. Esses depósitos são formados de forma gradual nos grandes ramos das artérias coronárias principais que circundam o coração e que são os responsáveis pelo provimento de sangue e conseqüentemente pela oxigenação do músculo cardíaco (CECIL, 2001; ROSS, 1991).

O processo gradual de depósito de gordura é denominado de aterosclerose e o estabelecimento do acúmulo de gordura de ateromas ou placas. À medida que a obstrução de uma artéria coronariana evolui e se agrava, pode ocorrer uma irrigação inadequada de sangue ao coração, denominada de isquemia e com a possibilidade de lesão cardíaca. A DAC representa a causa mais comum de isquemia do miocárdio, sendo que as principais complicações são representadas pela angina pectoris e pelo infarto do miocárdio (CECIL, 2001; ROSS, 1991).

A DAC é considerada uma moléstia multifatorial causada tanto por defeitos genéticos quanto por fatores considerados como de risco, quer sejam intrínsecos ou ambientais envolvidos na patogênese da aterosclerose e suas complicações trombóticas (MARIAN, 1997; FLETCHER e KESSLING, 1998).

Estudos epidemiológicos permitiram identificar fatores de risco associados a DAC e a partir desses conhecimentos foi possível utilizá-los tendo como propósito à prevenção dessa doença. Dessa forma, a caracterização dos fatores de risco convencionais para a DAC está bem estabelecida e compreendem: o sexo, a idade, antecedentes familiares com história positiva para cardiopatia, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, hiperglicemia, sobrepeso ou obesidade, tabagismo e até mesmo nível sócio econômico (FLETCHER e KESSLING, 1998; ZAK et al., 2003; WALTON et al., 2004).

Desde a década de 90 os estudos demonstram que existem diferenças na abordagem DAC de acordo com o sexo, sabe-se que as mulheres são susceptíveis ao surgimento da doença arterial de 10 a 15 anos mais tarde que os homens (SMANIO, 2007).

A DAC é crítica no sexo feminino, pois cerca de 40% dos eventos coronarianos levam ao óbito e 67% das mortes súbitas não apresentam qualquer manifestação prévia. Por outro lado, nas pacientes que apresentam sintomas sugestivos de angina apenas 50% possui coronariopatia obstrutiva significativa na cinecoronariografia (DOUGLAS e GINSBURG, 1996; KANNEL et al., 1998).

O risco para o aparecimento da DAC, bem como de suas complicações, é de 25% para as mulheres de 40 anos aumentando para 50% após os 70 anos (MIERES

et al., 2003). A mortalidade no sexo feminino ocorre em 38% dos casos após infarto do miocárdio enquanto no sexo masculino a porcentagem é de 25% (KANDEL, 2002).

Essa doença afeta indivíduos de ambas as raças, sendo todavia observado que nos caucasóides a sua incidência é bastante elevada, enquanto que nos não caucasóides é mais elevada até os 60 anos para os homens e para as mulheres até os 75 anos. O mais importante desses fatores parece ser o estilo de vida, onde uma dieta rica em gorduras pode permitir o estabelecimento e agravar consideravelmente o aparecimento da DAC (GOTTO, 1991).

Além dos riscos convencionais, tem sido considerado de importância cada vez maior os riscos genéticos, bem como a associação de sistemas polimórficos humanos com a propensão a desenvolver uma determinada doença e a partir desses estudos foi possível imaginar a ocorrência dos denominados marcadores genéticos, onde os autores realizam uma tentativa com vistas às possibilidades de correlacionar esses marcadores com a doença analisada (FLETCHER e KESSLING, 1998; KIM e BECKER, 2003).

Esses estudos foram possíveis e mais facilmente realizados com o advento da biologia molecular, que permitiu analisar seqüências de bases do DNA, suas mutações e suas alterações em bases, com a possibilidade de estabelecer correlações entre mutações genéticas hereditárias ou sistema polimórficos e uma determinada freqüência aumentada ou não de uma doença (KIM e BECKER, 2003).

1.7. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As diferenças geográficas nas freqüências das haptoglobinas têm sido motivo de estudos populacionais, acreditando-se que o alelo Hp² pode ter surgido a aproximadamente 2 milhões de anos na Índia e desde então vem sendo distribuído pelo mundo, sugerindo uma vantagem seletiva (SCHULTZE e HEREMANS, 1966), entretanto existem diferenças geográficas marcantes.

Dos estudos nas populações européias a freqüência do alelo Hp¹ apresentou variações de 0,36 a 0,41 (NYMAN, 1959). Para os negros africanos constatam-se variações de 0,51 a 0,87 (BARNICOT et al., 1959, WELCH et al., 1979). Na Ásia a freqüência do gene Hp¹ é baixa (média de 0,47) (BARNICOT et al., 1959), sendo

que na região do Sudoeste da Ásia esta freqüência é ainda menor, representada por 0,10.

A distribuição do gene Hp¹ através do continente americano é bastante complexa, sendo que os índios da América do Norte apresentam variações de 0,43 a 0,59, enquanto os caucasóides 0,41 a 0,43 e os negróides 0,53 (SMITHIES e WALKER, 1955; SUTTON et al., 1959). Os índios da América Central variam de 0,33 a 0,70 e nas tribos da América do Sul a freqüência é de 0,21 a 0,80 (HOXTER et al., 1965; SALZANO e SUTTON, 1965). Em tribos do Amazonas brasileiro a freqüência foi de 0,91 (SANTOS e GUERREIRO, 1986). A **tabela 2** mostra a distribuição do alelo Hp¹ na população em geral.

Apesar das discrepâncias não serem explicadas de maneira convincente, sabe-se que as freqüências observadas do gene Hp¹ nas Américas parecem aumentar em direção ao Sul e que existem exceções provavelmente devidas as mudanças ou transições graduais no ambiente, como a inferência de um determinado genótipo como fundador de uma população, ou mesmo populações isoladas em determinadas regiões e que se desenvolveram de modo diferente do que outras (MOREIRA e NAOUM, 1990).

Tabela 2. Freqüência do alelo Hp¹ em diferentes populações.

Distribuição populacional	Freqüência do alelo Hp ¹
População européia	0,36 – 0,41
População asiática	0,47
Sudeste da Ásia	0,10
América do Norte	0,41 – 0,59
Índios	0,43 – 0,59
Caucasóides	0,41 – 0,43
Não-caucasóides	0,53
América Central	0,33 – 0,70
América do Sul	0,21 – 0,80

As freqüências alélicas parecem acompanhar aquelas observadas nos grupos formadores, assim os brancos têm as mesmas freqüências que os europeus e os negros as tendências típicas de sua origem africana, ficando os mestiços numa posição intermediária (MOREIRA e NAOUM, 1990).

A **Tabela 3** mostra as freqüências do alelo Hp^1 e dos subtipos nos povos que podem ter influenciado a origem formadora da população brasileira. As freqüências na África variam de 0,64 a 0,73 em Senegal e entre os povos Bantos a média é de 0,53. Com relação aos subtipos existem relatos apenas para os Bantos onde 0,36 representa o Hp^{1F} , 0,20 Hp^{1S} e 0,40 Hp^{2FS} (CONSTANS et. al, 1981; NABULSI et. al, 1993).

A população do leste da Ásia apresenta freqüência do alelo Hp^1 de 0,16 a 0,40 na China, 0,11 a 0,30 no Japão e 0,27 a 0,32 na Coreia, sendo que na última foram analisados apenas os subtipos Hp^{1F} e Hp^{1S} , os quais apresentaram freqüência de 0 e 0,32, respectivamente (SHIM e BEARN, 1964; ZHAO et. al, 1993). Outro país no qual foram analisados os subtipos é o Japão que apresentou em média 0,002 Hp^{1F} ; 0,26 Hp^{1S} ; 0,73 Hp^{2FS} e 0,001 Hp^{2SS} (NAKADA e ABE et. al, 1987; TEIGE et. al, 1992).

Países do Oriente Médio apresentam freqüência de 0,27 no Líbano e 0,30 em Israel para o alelo Hp^1 (LEFRANC et. al, 1981; NEVO e TATARSKY, 1986).

Na Itália a distribuição deste alelo varia de 0,29 a 0,41 e para os subtipos é de 0,13 para o Hp^{1F} e 0,22 para o Hp^{1S} . Portugal e Espanha apresentam média da freqüência de 0,39, sendo que nesse último país os subtipos apresentaram freqüência de 0,15 Hp^{1F} ; 0,23 Hp^{1S} ; 0,01 Hp^{2FF} ; 0,6 Hp^{2FS} e 0,07 Hp^{2SS} (SANTORO et. al, 1983; MAES et. al, 2001; TORRINHA, 1967; TEIGE et. al, 1992)

Tabela 3. Frequência do alelo Hp¹ e dos subtipos em povos que influenciaram a origem formadora da população brasileira.

População / Povos	Frequência do alelo e dos subtipos					
	Hp ¹	Hp ^{1F}	Hp ^{1S}	Hp ^{2FF}	Hp ^{2FS}	Hp ^{2SS}
África						
Senegal	0,64 – 0,73	-	-	-	-	-
Povos Bantos	0,56	0,36	0,20	0	0,40	0,044
Leste da Ásia						
China	0,16 – 0,40	-	-	-	-	-
Japão	0,11 – 0,30	0,002	0,26	0	0,73	0,001
Coréia	0,27 – 0,32	0	0,32	-	-	-
Oriente Médio						
Israel	0,30	-	-	-	-	-
Libano	0,27	-	-	-	-	-
Europa						
Itália	0,29 – 0,41	0,13	0,22	-	-	-
Portugal	0,39	-	-	-	-	-
Espanha	0,39	0,15	0,23	0,01	0,6	0,07

No Brasil destacam-se os trabalhos realizados nas cidades de São Paulo (HOXTER et al., 1965), Porto Alegre (TONDO et al., 1963), Rio de Janeiro (ROCHA et al., 1973) e São José do Rio Preto (MOREIRA e NAOUM, 1990), onde verificaram que as frequências do gene Hp¹ nos caucasóides das cidades citadas foram 0,38; 0,41; 0,49 e 0,39, respectivamente, enquanto que no grupo negróide as frequências foram de 0,60; 0,64; 0,56 e 0,57. Quanto à frequência do gene Hp² no estudo realizado em São José do Rio Preto entre os caucasóides a média foi de 0,61 e entre os negróides 0,43 (MOREIRA e NAOUM, 1990).

Na cidade de Campinas, Estado de São Paulo, as frequências dos genes Hp¹ e Hp² foi de 0,50, os quais ficaram distribuídos entre os fenótipos Hp 2-2 (22,3%), Hp 2-1 (54,8%) e Hp 1-1 (22,9%) (CAMPREGHER et al., 2004). Nessa mesma cidade, a frequência do gene Hp¹ encontrada foi de 0,46 e os fenótipos Hp 2-2, Hp 2-1 e Hp 1-

1 ficaram distribuídos com 32,4%; 42,2% e 25,3%, respectivamente (ZACCARIOTTO et al., 2006b) (**Tabela 4**).

Resultados observados em mestiços do Ceará evidenciaram freqüências do Hp¹ de 0,48 e na população geral de Belém (Pará) este índice foi de 0,47 (ARENDS e GALLANGO, 1964; AYRES et al., 1976). A **Tabela 4** mostra, de forma sucinta, as freqüências do alelo Hp¹ nos estudos realizados na população brasileira.

Tabela 4. Freqüências do alelo Hp¹ na população brasileira.

Cidade		Freqüências do alelo Hp ¹
São Paulo	(Caucasóide / Não-caucasóide)	0,38 / 0,60
Rio de Janeiro	(Caucasóide / Não-caucasóide)	0,49 / 0,56
S.J. do Rio Preto	(Caucasóide / Não-caucasóide)	0,39 / 0,57
Porto Alegre	(Caucasóide / Não-caucasóide)	0,41 / 0,64
Campinas		0,50
Campinas		0,46

Além dos três principais fenótipos da haptoglobina têm-se observado outros tipos com freqüências muito baixas, como o caso do fenótipo Hp 0-0 (anaptoglobinemia) que está presente na proporção de 1:1.000 em caucasianos, enquanto em não caucasianos, especialmente do oeste da África este fenótipo é mais freqüente (>30%) do que em não caucasóides dos Estados Unidos (4%). (ALLISON et al., 1958; GIBLETT, 1961; SCHULTZE e HEREMANS, 1966).

O fenótipo Hp 2-1M é raro nos caucasóides e orientais, mas ocorre em cerca de 10% em não caucasóides americanos (GIBLETT, 1959). Outros tipos como a Hp Johnson e Calberg são bastante raras nas populações (GALATIUS-JENSEN, 1958).

2. OBJETIVOS

No presente trabalho foi nosso propósito:

1. Verificar o polimorfismo da haptoglobina, no que se refere aos seus tipos e subtipos, em um grupo de doadores de sangue, assim como em indivíduos que através da cinecoronariografia foram caracterizados como portadores de doença arterial coronariana e não portadores de doença arterial coronariana.
2. Correlacionar à distribuição das frequências do polimorfismo da haptoglobina quanto aos tipos e subtipos, bem como as frequências gênicas observadas nessas populações com a suscetibilidade para desenvolver doença arterial coronariana em uma amostra da população da região centro-oeste do Estado de São Paulo.

3. CASUÍSTICA

No presente estudo foram estabelecidos três grupos constituídos por moradores da região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sendo dois deles formados por indivíduos classificados como portadores de doença arterial coronariana e não portadores. Um terceiro grupo foi representado por doadores de sangue. Nossos critérios de exclusão para ambos os grupos foram faixa etária inferior a 18 anos ou estar grávida. A coleta do material foi realizada de agosto de 2007 a junho de 2008.

Os dois primeiros grupos foram estabelecidos pela equipe de cardiologistas intervencionistas do setor de hemodinâmica do Hospital de Base da FUNFARME da cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sendo para isso utilizado um teste padrão ouro, a cinecoronariografia, que caracteriza presença ou não presença de doença arterial coronariana.

A presença da DAC foi considerada nos pacientes que apresentaram coronariopatia obstrutiva por comprometimento importante (mais de 70% de obstrução), moderado (obstrução de 50 a 60%) e discreto (obstrução de 30 a 40%). Os não portadores foram aqueles que no resultado da cinecoronariografia, na sua maioria, não apresentaram qualquer alteração no exame, enquanto o restante nesse

grupo apresentavam comprometimento da função miocárdica ou presença de vasculopatia.

Dessa forma, o grupo de portadores de DAC foi constituído por 125 indivíduos cuja faixa etária variava dos 34 a 84 anos, sendo 85 do sexo masculino (34 a 76 anos) e 40 do feminino (41 a 84 anos). O grupo de não portadores de DAC foi constituído de 69 indivíduos cuja faixa etária variava de 32 a 80 anos, sendo 29 do sexo masculino (32 a 71 anos) e 40 do sexo feminino (37 a 80 anos).

O terceiro grupo, representado pelos doadores de sangue, foi constituído por 124 indivíduos cuja faixa etária variava dos 18 aos 53 anos, sendo 88 do sexo masculino e 36 do sexo feminino.

Esse trabalho foi aprovado pelo Conselho do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (São Paulo) de acordo com a resolução CNS 196/96 sob o número 2755/2007.

4. METODOLOGIA

As metodologias foram desenvolvidas no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas da FCF de Araraquara – UNESP.

A extração de DNA genômico foi realizada com Kit para extração de DNA da GE Healthcare (illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit), segundo as orientações do fornecedor descritas a seguir (**Figura 2**).

Lise de eritrócitos

- Adicionar solução de lise de eritrócitos 3X o volume da amostra em um micro tubo de 1,5 mL;
- Adicionar 300 µl da amostra de sangue a solução de lise de eritrócitos e misturar por inversão (8 a 10 vezes);
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugar 12000 rpm por 1 minuto para formar o sedimento de glóbulos brancos (*pellet*);
- Remover o sobrenadante (decantação ou aspiração, sem remover o *pellet*).

Extração

- Ressuspender o *pellet* no sobrenadante residual por agitação vigorosa em vortex;
- Antes de sedimentar, adicionar 500 μ l da solução de extração no *pellet* ressuspendido e misturar no vortex;
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente;
- Enquanto incuba, preparar a coluna GFX[®] colocando-a no tubo coletor de 2 ml para a purificação (colocar tampão de eluição para pré-aquecer a 70°C);

Ligação do DNA a matrix da coluna

- Transferir a mistura da extração para a coluna GFX[®] e centrifugar 8000 rpm por 1 minuto;
- Descartar o sobrenadante do tubo coletor e recolocar a coluna GFX[®] dentro dele;

Lavagem

- Adicionar 500 μ l de solução de extração na coluna. Centrifugar 8000 rpm por 1 minuto;
- Descartar novamente o sobrenadante do tubo coletor e recolocar a coluna GFX[®];
- Adicionar 500 μ l de solução de lavagem na coluna GFX[®]. Centrifugar 12000 rpm por 3 minutos;
- Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um micro tubo de 1,5 mL (onde ficará o DNA eluido);

Eluição

- Aplicar 100 a 200 μ l do tampão de eluição pré-aquecido ou água na coluna GFX[®]

(volumes menores que 50 μ l centrifugar 12000 rpm para recuperar o DNA da coluna)

- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto para recuperar o DNA.

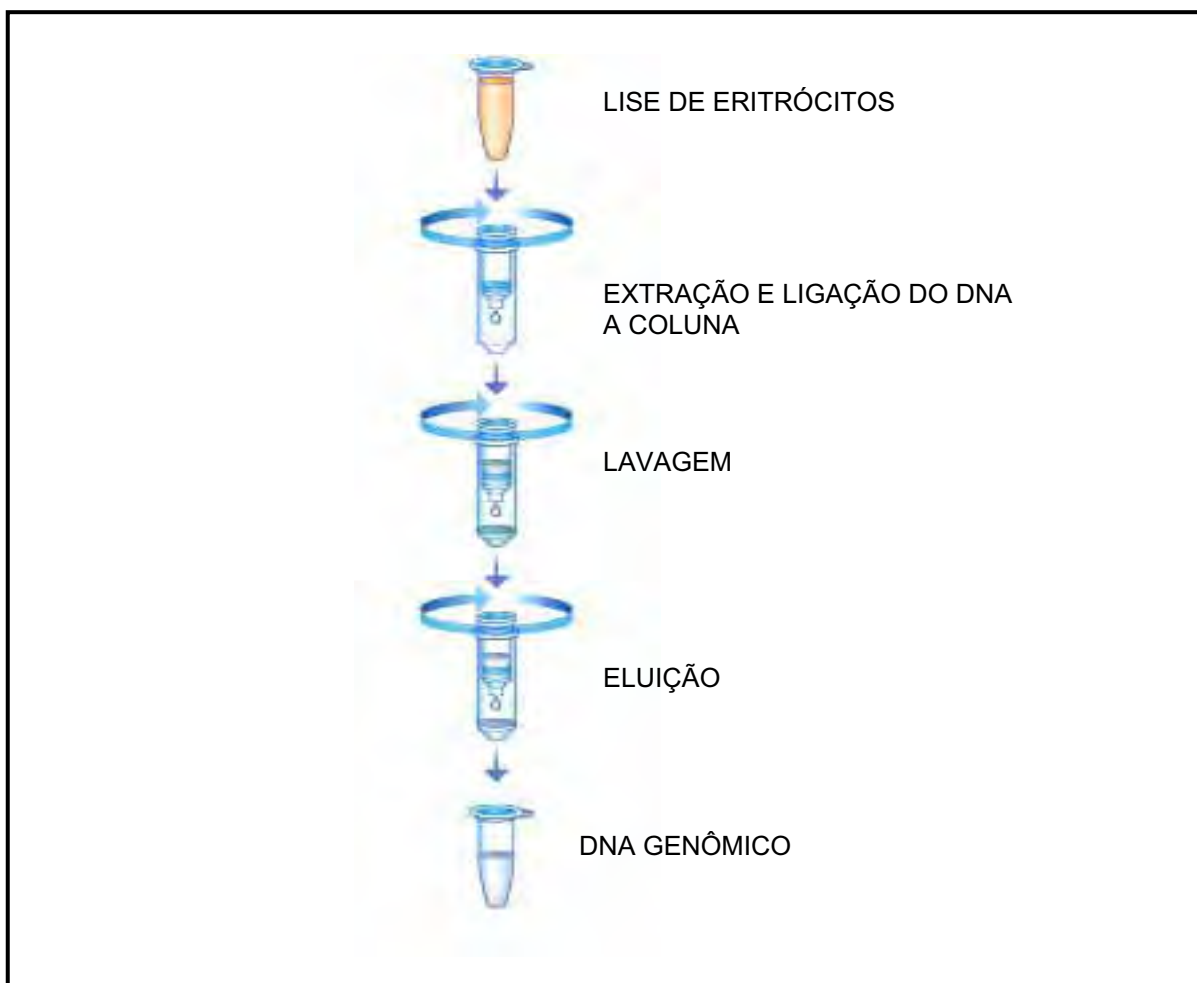


Figura 2. Representação esquemática da extração de DNA genômico a partir do kit de extração da GE Healthcare, ilustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (figura retirado do cartão de protocolo do fornecedor).

4.1. QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

O material genético foi diluído na proporção 1:100 em água ultra-pura, sendo em seguida determinada a densidade ótica em 260 e em 280 nm usando água ultra-pura como branco.

A concentração de DNA foi calculada pela fórmula:

$$\text{Concentração da amostra em } \mu\text{g/mL} = \text{DO } 260 \text{ nm} \times 50 \times 100$$

O grau de pureza da amostra foi verificado através da relação DO 260 / DO 280, o que permitiu verificar a presença de outras proteínas. As amostras de DNA a serem amplificadas pela PCR apresentaram relação entre 1,7 e 2,0.

4.2. PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO E TRATAMENTO DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E DOS SUBTIPOS DA HAPTOGLOBINA

No DNA genômico extraído foi realizada a reação de amplificação gênica conforme o seguinte protocolo: para um volume final de 50 μL de reação, acrescentar 10 μL de tampão da Go Taq DNA polimerase 5X adicionado de marcador laranja e verde e MgCl_2 (concentração final de 1,5 mM) (Promega); 1 μL de uma mistura de desoxinucleotídeo (dNTP) contendo 10 mM de cada uma das bases A, T, C e G (concentração final de 0,2 mM de cada dNTP); 0,25 μL de Go Taq DNA polimerase (5 u/ μL) (Promega) (concentração final de 1,25 u); 50 a 100 ng de DNA genômico na dependência de sua concentração; 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de cada *primer* sense e antisense e completar o final da reação para 50 μL com água livre de nuclease.

Nessa mistura foram realizadas três amplificações, sendo usados os seguintes conjuntos de primers A \rightarrow B; E \rightarrow D e C \rightarrow F, descritos abaixo (KOCH et al., 2002, 2003).

Primer A : 5'-gAggggAgCTTgCCTTTCCATTg-3'

Primer B : 5'-gAgATTTTTgAgCCCTggCTggT-3'

Primer C : 5'-CCTgCCTCgTATTAAGTgCACCAT-3'

Primer D : 5'-CCgAgTgCTCCACATAgCCATgT-3'

Primer E : 5'-gAggCgATgCCATgCAgCCTA-3'

Primer F : 5'-CATTCAggAAgTTTATCTCCA-3'

O processo de amplificação foi realizado conforme os seguintes ciclos:

- Desnaturação inicial de 2 minutos a 95° C,
- 35 ciclos de reação de PCR, sendo:
 - 1 minuto de desnaturação a 94° C,
 - 2 minutos de anelamento a 69° C (para os primers A \rightarrow B) ou 64° C (para os primers E \rightarrow D e primers C \rightarrow F)
 - 1 minuto de extensão a 72° C,
- Extensão final de 72° C por 7 minutos.

O produto dessas ampliações foi digerido com a enzima de restrição Dra I, de acordo com instruções do fabricante, seguido por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo os produtos obtidos corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador.

O gene Hp^1 (AC004682 – EMBL/GenBank data libraries) quando amplificado pelos primers A → B fornece um fragmento de 1757 pb se for do alelo Hp^{1S} e de 1766 pb se for do alelo Hp^{1F} , que após digestão enzimática com Dra I evidencia fragmentos de 930 + 788 + 39 pb quando representa o Hp^{1F} e de 1727 + 39 pb para o Hp^{1S} (**Figura 3**).

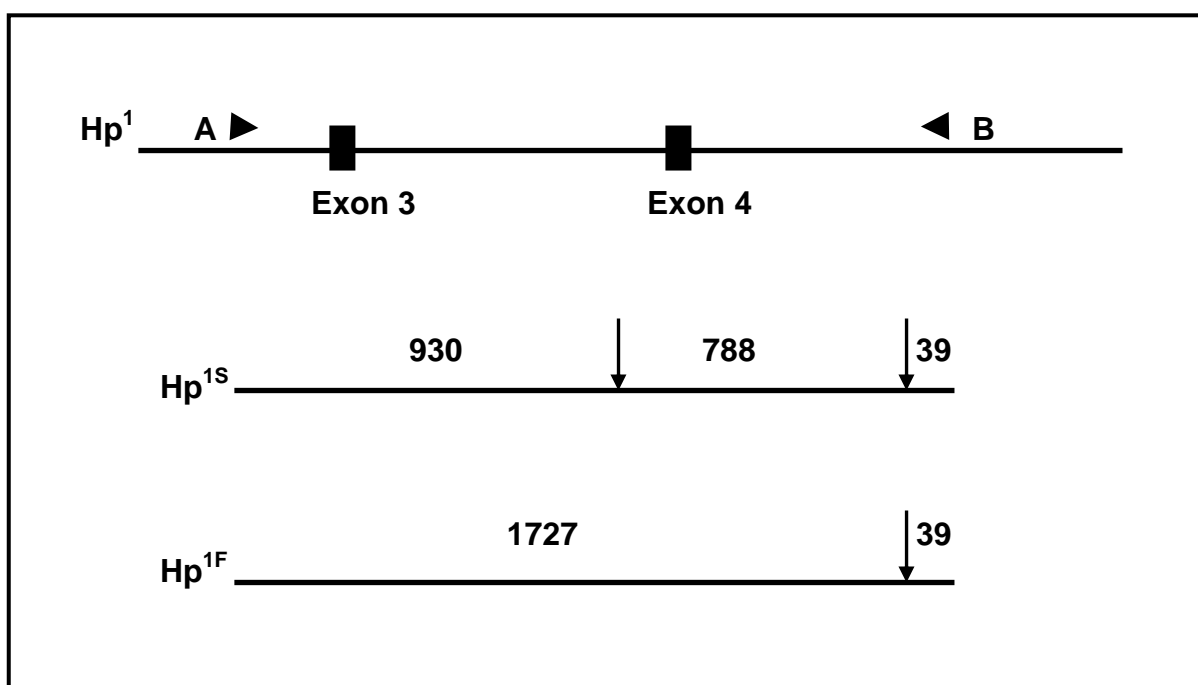


Figura 3. Representação esquemática da amplificação com os *primers* A → B seguidos da restrição enzimática com Dra I, evidenciando os fragmentos em pb para cada alelo (adaptada de CARTER e WORWOOD, 2007).

O gene Hp^2 (M69197 – EMBL/GenBank data libraries) quando amplificado pelos primers E → D fornece um fragmento de 1465 pb ou de 1456 pb, na dependência de seu subtipo, e que após digestão enzimática com Dra I evidencia fragmentos de 788 + 475 + 193 pb para os polimorfismos Hp^{2SF} ou Hp^{2SS} e de 1272 + 193 pb para os polimorfismos Hp^{2FF} ou Hp^{2FS} . Quando esse gene é amplificado pelos primers C → F fornece um fragmento de 1222 pb ou de 1224 pb, também na dependência de seu subtipo, e que após digestão enzimática com Dra I evidencia

fragmentos de 1068 + 156 pb para os polimorfismos Hp^{2SF} ou Hp^{2FF} e de 927 + 156 + 139 pb para os polimorfismos Hp^{2SS} ou Hp^{2FS} (Figura 4). A associação dessas informações permite diferenciar esses polimorfismo.

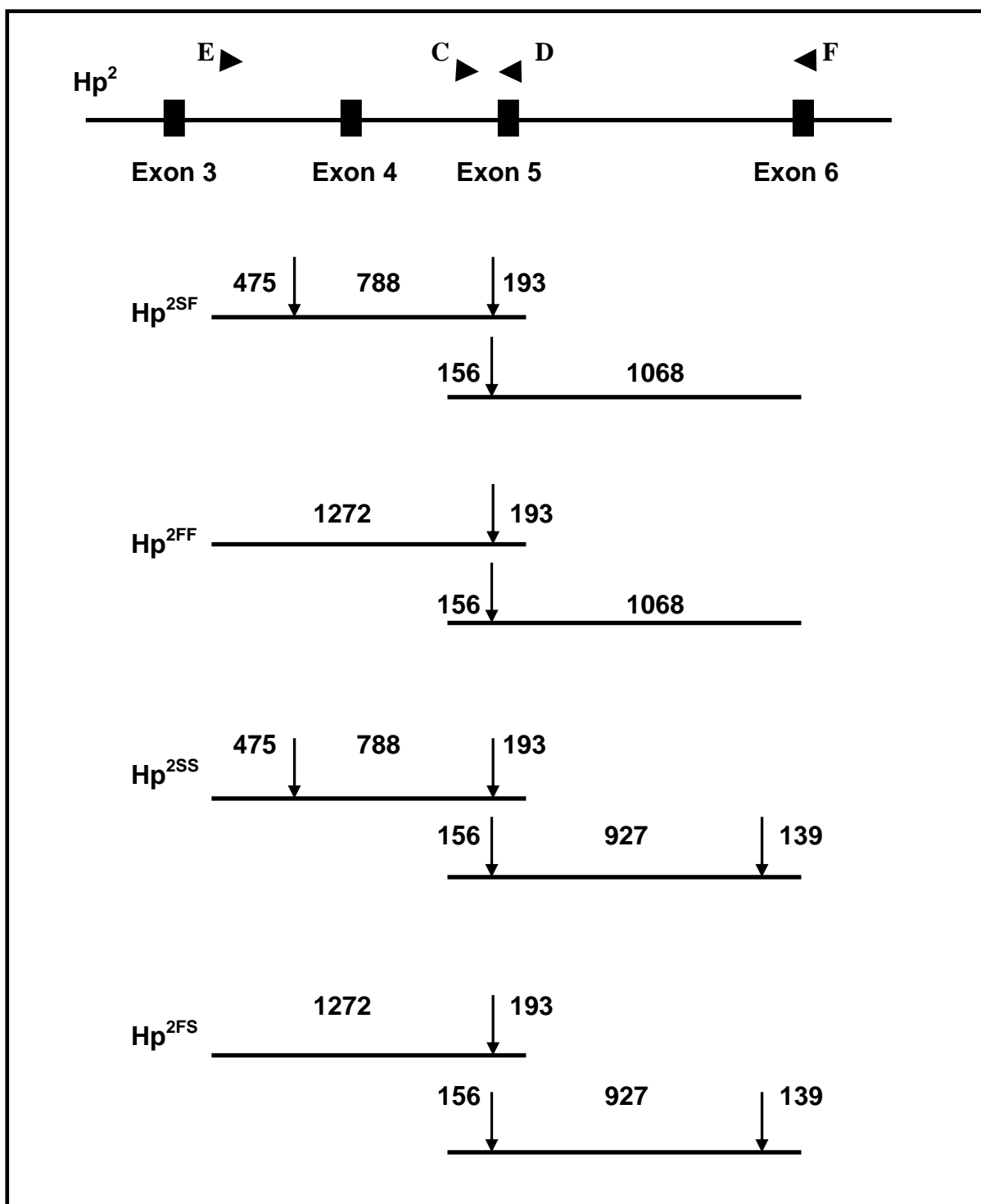


Figura 4. Representação esquemática da amplificação com os *primers* E → D e *primers* C → F seguidos da restrição enzimática com *Dra* I, evidenciando os fragmentos em pares de bases para cada alelo (adaptada de CARTER e WORWOOD, 2007).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências gênicas referentes ao Hp¹ e Hp² assim como de seus subtipos foram calculadas da maneira usual empregada nos casos de sistemas com dois alelos.

As comparações das distribuições e frequências genóticas foram realizadas através do teste do qui-quadrado (χ^2) entre os grupos em estudo, considerando-se um nível de significância 5% (SCHEFLER, 1969).

5. RESULTADOS

O presente estudo foi realizado em doadores de sangue do Hemonúcleo Regional de São José do Rio Preto e em pacientes que foram encaminhados ao serviço de hemodinâmica do Hospital de Base da FUNFARME e passaram por cinecoronariografia, sendo esses classificados como portadores de doença arterial coronariana e não portadores pela equipe de clínicos cardiologistas responsáveis.

Os resultados foram obtidos, considerando nossos propósitos, pela extração do material genético de cada paciente, seguidos da amplificação com o conjunto de *primers* A → B para verificar a presença dos alelos Hp¹ e Hp² que após atuação da enzima de restrição Dra I, nos portadores do alelo Hp¹ permitia evidenciar os subtipos Hp^{1S} e Hp^{1F}. Em seguida era realizada a amplificação com os *primers* E → D e *primers* C → F com o propósito de caracterizar o alelo Hp², que seguidos da restrição por Dra I permitia caracterizar os subtipos Hp^{2SF}, Hp^{2FF}, Hp^{2SS} e Hp^{2FS}.

Na **Figura 5** temos o exemplo do material amplificado com os *primers* A → B evidenciando a possibilidade da caracterização dos genótipos Hp¹ / Hp¹ quando da presença de banda de 1757 pb; Hp² / Hp¹ quando presente bandas de 3481 e 1757 pb e Hp² / Hp² com banda de 3481 pb.

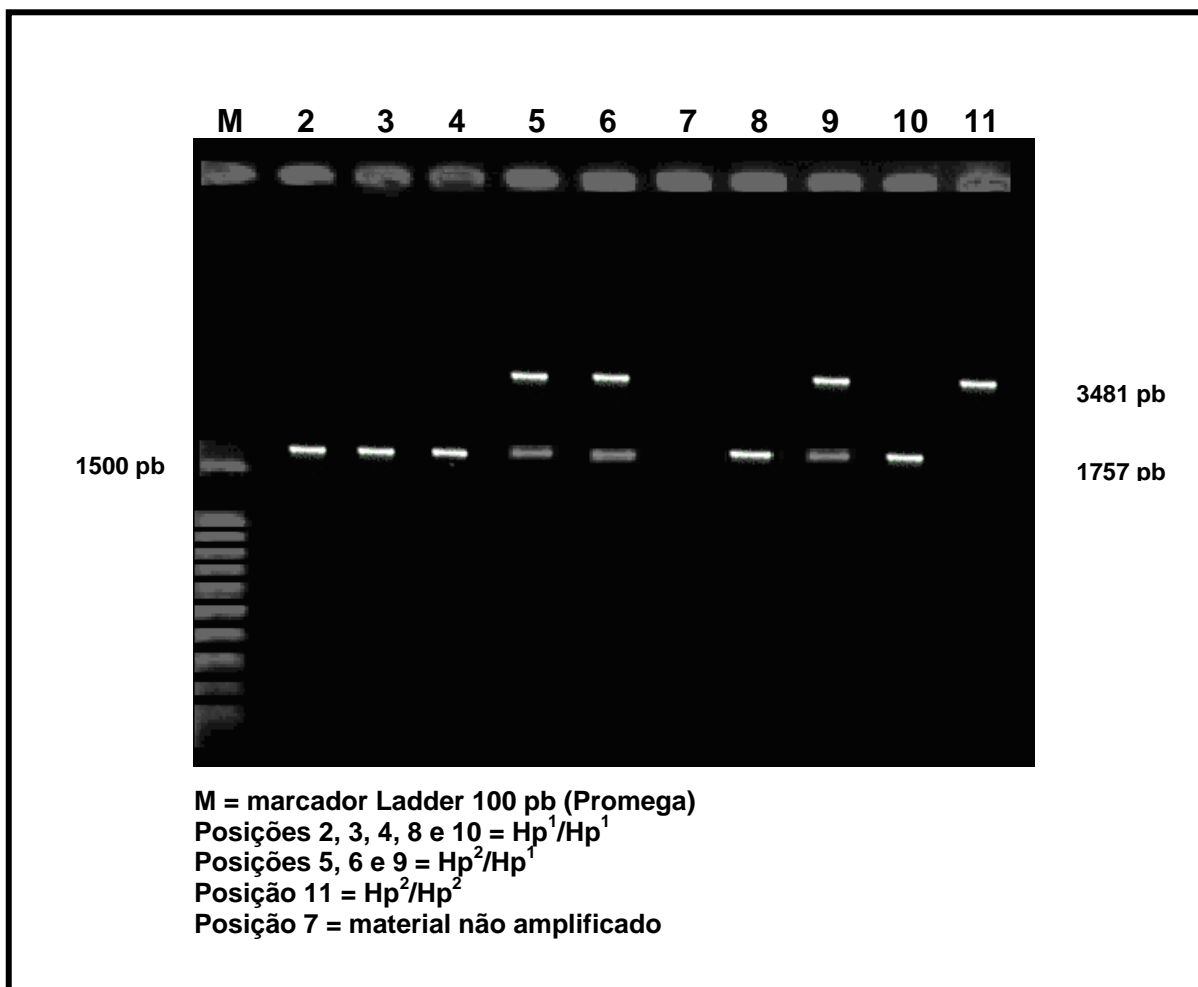


Figura 5. Produtos das ampliações gênicas com *primers* A → B.

Na **Figura 6** exemplo do material amplificado em pares de bases com os *primers* E → D e C → F, sendo essas necessárias na posterior caracterização dos subtipos Hp^{2SF}, Hp^{2FF}, Hp^{2SS} e Hp^{2FS}.

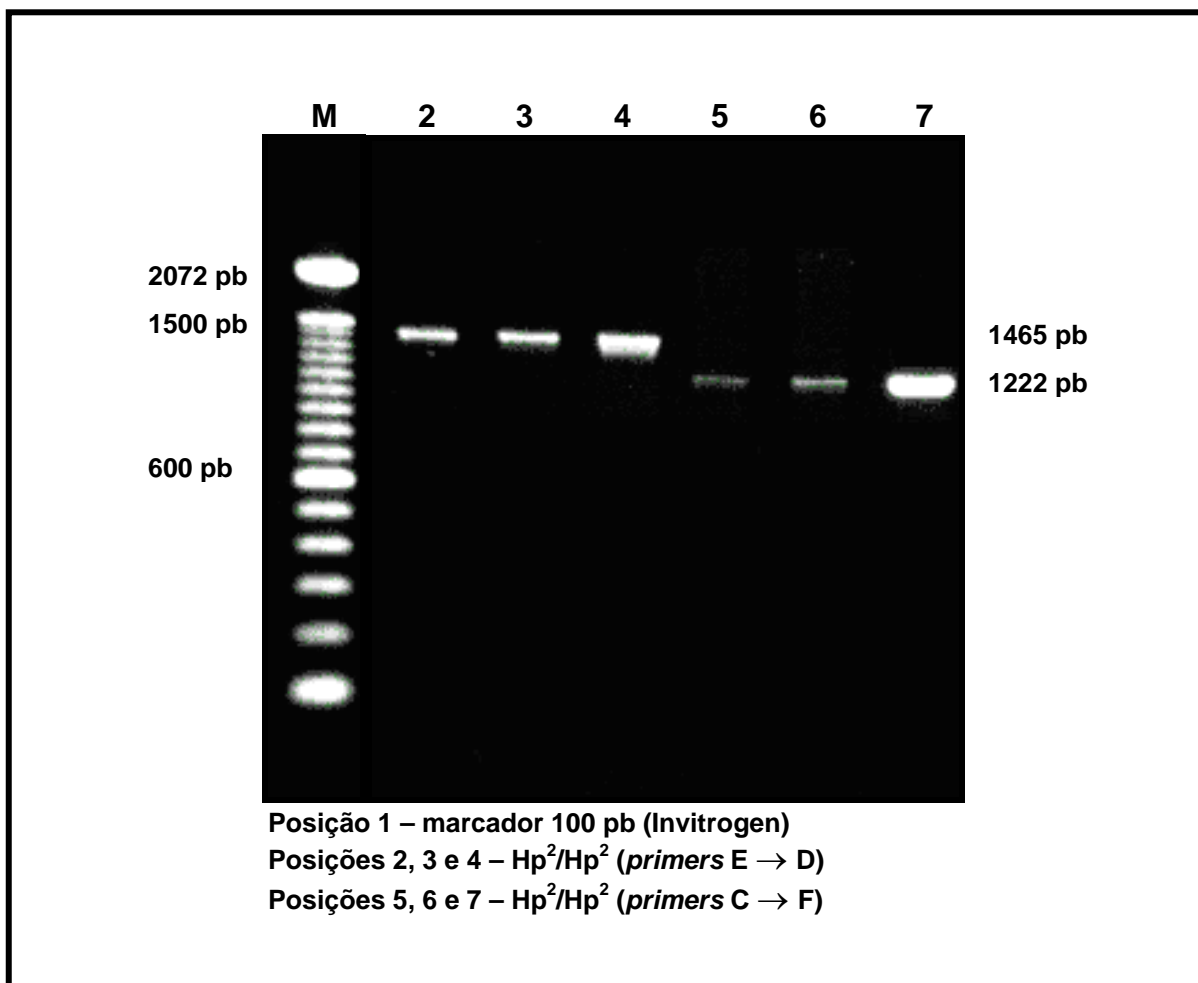


Figura 6. Produtos das ampliações gênicas com *primers* E → D e C → F.

Na **Tabela 5** apresentamos as distribuições das idades nos grupos analisados no presente trabalho, evidenciando que para o grupo considerado como portador de DAC do sexo masculino a concentração de pacientes encontra-se na faixa etária dos 50 aos 69 anos, enquanto para aqueles do sexo feminino no mesmo grupo, observa-se uma uniformidade de distribuição dos 40 aos 79 anos. Por sua vez, entre os considerados com ausência de DAC, apesar de o grupo ser pequeno, observa-se no grupo masculino um número semelhante entre as faixas etárias dos 30 aos 79 anos, enquanto para o sexo feminino essa mesma semelhança é observada entre as faixas etária dos 40 aos 69 anos. Entre os doadores de sangue de ambos os sexos, o maior número de indivíduos foi observado entre 18 a 29 anos.

Tabela 5. Número de indivíduos observados em diferentes faixas etárias em cada grupo separado quanto aos sexos.

Idade (anos)	DAC		Ausência de DAC		Doadores de Sangue	
	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.
18 – 29	0	0	0	0	50	24
30 – 39	4	0	4	1	17	4
40 – 49	14	9	6	13	16	5
50 – 59	29	10	9	11	5	3
60 – 69	25	9	6	11	0	0
70 – 79	13	10	4	3	0	0
80 – 89	0	2	0	1	0	0
Total	85	40	29	40	88	36

Na **Tabela 6** estão expressas as distribuições dos genótipos da haptoglobina observados entre os pacientes submetidos à cinecoronariografia e os doadores de sangue, sendo que na mesma verificamos que a distribuição dos genótipos da haptoglobina para o grupo total dos 318 indivíduos analisados evidencia que os homozigotos Hp^2 / Hp^2 e os heterozigotos Hp^2 / Hp^1 apresentam maior frequência quando comparados com os homozigotos Hp^1 / Hp^1 , sendo ainda encontrado em menor frequência o Hp^0 / Hp^0 .

Quando os grupos eram observados separadamente verificamos que para os doadores de sangue, 40,3% eram Hp^2 / Hp^2 , seguidos de 29,0% de Hp^2 / Hp^1 , 28,2% de Hp^1 / Hp^1 e 2,4% de Hp^0 / Hp^0 . Prevalências semelhantes foram observadas nos

portadores de coronariopatia obstrutiva, sendo 38,4% de Hp² / Hp², 35,2% de Hp² / Hp¹, 24,8% de Hp¹ / Hp¹ e 1,6% de Hp⁰ / Hp⁰. Já para o grupo de não portadores de doença arterial coronariana houve uma inversão sendo 40,6% de Hp² / Hp¹, seguidos de 33,3% de Hp² / Hp² e 26,1% de Hp¹ / Hp¹. Esses resultados evidenciam entre os doadores de sangue e os portadores de DAC prevalência do homozigoto Hp² / Hp², enquanto na ausência de DAC a prevalência foi do Hp² / Hp¹, sendo essas diferenças não significativas.

Tabela 6. Distribuição dos genótipos da haptoglobina em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto (SP).

Genótipos	DAC		Ausência de DAC		Doadores de Sangue		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hp ¹ / Hp ¹	31	24,8	18	26,1	35	28,2	84	26,4
Hp ² / Hp ¹	44	35,2	28	40,6	36	29,0	108	34,0
Hp ² / Hp ²	48	38,4	23	33,3	50	40,3	121	38,1
Hp ⁰ / Hp ⁰	2	1,6	0	0	3	2,4	5	1,6
Total	125	100	69	100	124	100	318	100

χ^2 DAC:Ausência de DAC = 0,673 P = 0,714 (ns)

χ^2 DAC:Doador = 1,067 P = 0,587 (ns)

χ^2 Ausência de DAC: Doador = 2,386 P = 0,303 (ns)

(ns) = não significativo

A **Tabela 7** apresenta as freqüências dos genes Hp¹ e Hp² nos grupos de doadores de sangue, portadores de DAC e não portadores de DAC. Na análise desta tabela observamos que tanto no grupo total, quanto nos grupos analisados, verificamos a prevalência do gene Hp² em relação ao gene Hp¹.

Tabela 7. Freqüências dos genes Hp¹ e Hp² nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue.

Alelos	DAC	Ausência de DAC	Doadores de Sangue	Total
Hp ¹	0,43	0,46	0,44	0,44
Hp ²	0,57	0,54	0,56	0,56

Os tipos da haptoglobina quando estratificados quanto aos sexos (**Tabela 8**) mostram que nos três grupos, o sexo masculino tem freqüência maior para o genótipo Hp² / Hp², sendo 40,9% no grupo de doadores de sangue, 44,8% para os não portadores de DAC e 38,8% para os portadores de coronariopatia. Já o sexo feminino apresenta para as doadoras de sangue e portadoras de coronariopatia maior freqüência para o genótipo Hp² / Hp² (38,9% e 37,5%, respectivamente), enquanto entre as não portadoras de DAC do sexo feminino, a maior freqüência é do genótipo Hp² / Hp¹ (42,5%). Esses resultados também não evidenciaram diferenças estatísticas significativas quando realizado o teste do qui-quadrado.

Tabela 8. Distribuição dos genótipos da haptoglobina observados nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue quanto ao sexo.

GENÓTIPOS	DAC				Ausência de DAC				Doadores de Sangue			
	Masc.		Fem.		Masc.		Fem.		Masc.		Fem.	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hp ¹ / Hp ¹	18	21,2	13	32,5	5	17,2	13	32,5	22	25,0	13	36,1
Hp ² / Hp ¹	32	37,6	12	30,0	11	37,9	17	42,5	27	30,7	9	25,0
Hp ² / Hp ²	33	38,8	15	37,5	13	44,8	10	25,9	36	40,9	14	38,9
Hp ⁰ / Hp ⁰	2	2,4	0	0	0	0	0	0	3	3,4	0	0
Total	85	100	40	100	29	100	40	100	88	100	36	100

χ^2 DAC Masc.: DAC Fem. = 1,840 P = 0,399 (ns)

χ^2 Aus. de DAC Masc.: Aus. de DAC Fem = 3,570 P = 0,168 (ns)

χ^2 Doador Masc: Doador Fem. = 1,377 P = 0,502 (ns)

(ns) = não significativo

Nessa tabela quando aplicamos o teste estatístico considerando os sexos separadamente para cada grupo não observamos diferenças estatísticas significativas, nem para o grupo masculino (χ^2 DAC Masc.: Aus. de DAC Masc. = 0,343 com P = 0,842; χ^2 DAC Masc.: Doador Masc. = 0,930 com P = 0,628 e χ^2 Aus. DAC Masc: Doador Masc. = 0,959 com P = 0,619), nem para o grupo feminino (χ^2 DAC Fem.: Aus. de DAC Fem. = 1,862 com P = 0,394; χ^2 DAC Fem.: Doador Fem. = 0,253 com P = 0,881 e χ^2 Aus. DAC Fem.: Doador Fem. = 2,926 com P = 0,232).

Na **Figura 7** apresentamos o produto da amplificação de homozigotos para o alelo Hp¹ tratado com enzima de restrição Dra I, o que permite caracterizar os subtipos da haptoglobina na dependência das bandas visualizadas. Dessa forma, bandas de 1727 pb caracterizam o subtipo Hp^{1S}, bandas de 930 e 788 pb caracterizam o subtipo Hp^{1F} e a presença das três bandas o subtipo Hp^{1F} / Hp^{1S}.

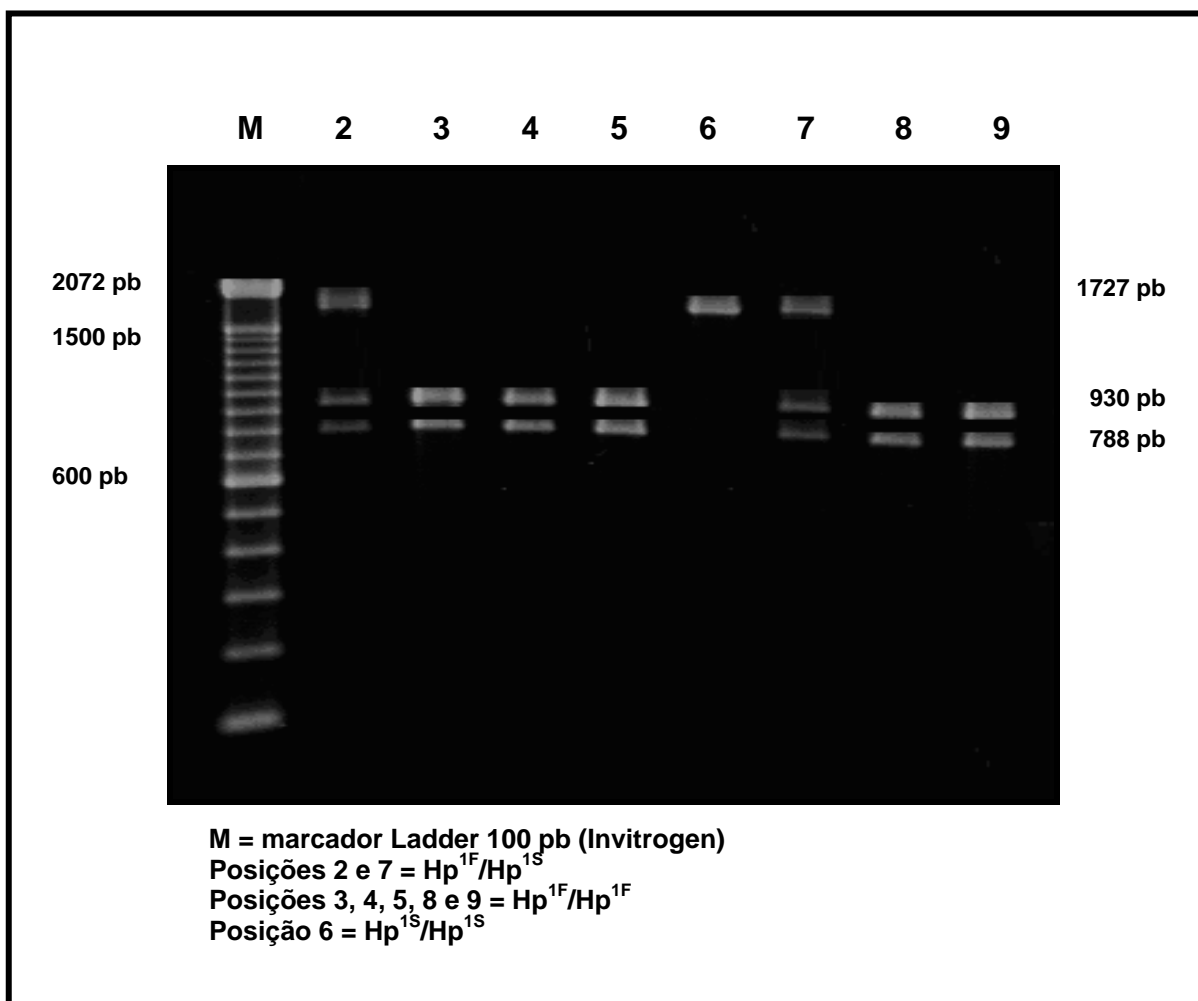


Figura 7. Produtos dos homozigotos para o alelo Hp¹ tratados com Dra I.

A **Figura 8** representa um exemplo do material amplificado com os *primers* E → D e C → F submetidos à restrição enzimática com Dra I, o que permite caracterizar os subtipos da haptoglobina na dependência das bandas visualizadas.

Nesse exemplo, os produtos das ampliações gênicas representam genótipos homozigotos para Hp² / Hp² que quando amplificados com os *primers* C → F e submetidos à restrição enzimática demonstraram bandas de 927, 156 e 139 pb, referentes aos subtipos Hp^{2SS} ou Hp^{2FS}. Por sua vez quando essas mesmas amostras foram amplificadas com os *primers* E → D e tratadas com Dra I, evidenciaram bandas de 1272 e de 193, sendo essas referentes aos subtipos Hp^{2FF} ou Hp^{2FS}. Ao compararmos os produtos dessas duas restrições enzimáticas verificamos que nestes exemplos tratavam-se dos subtipos Hp^{2FS} / Hp^{2FS}.

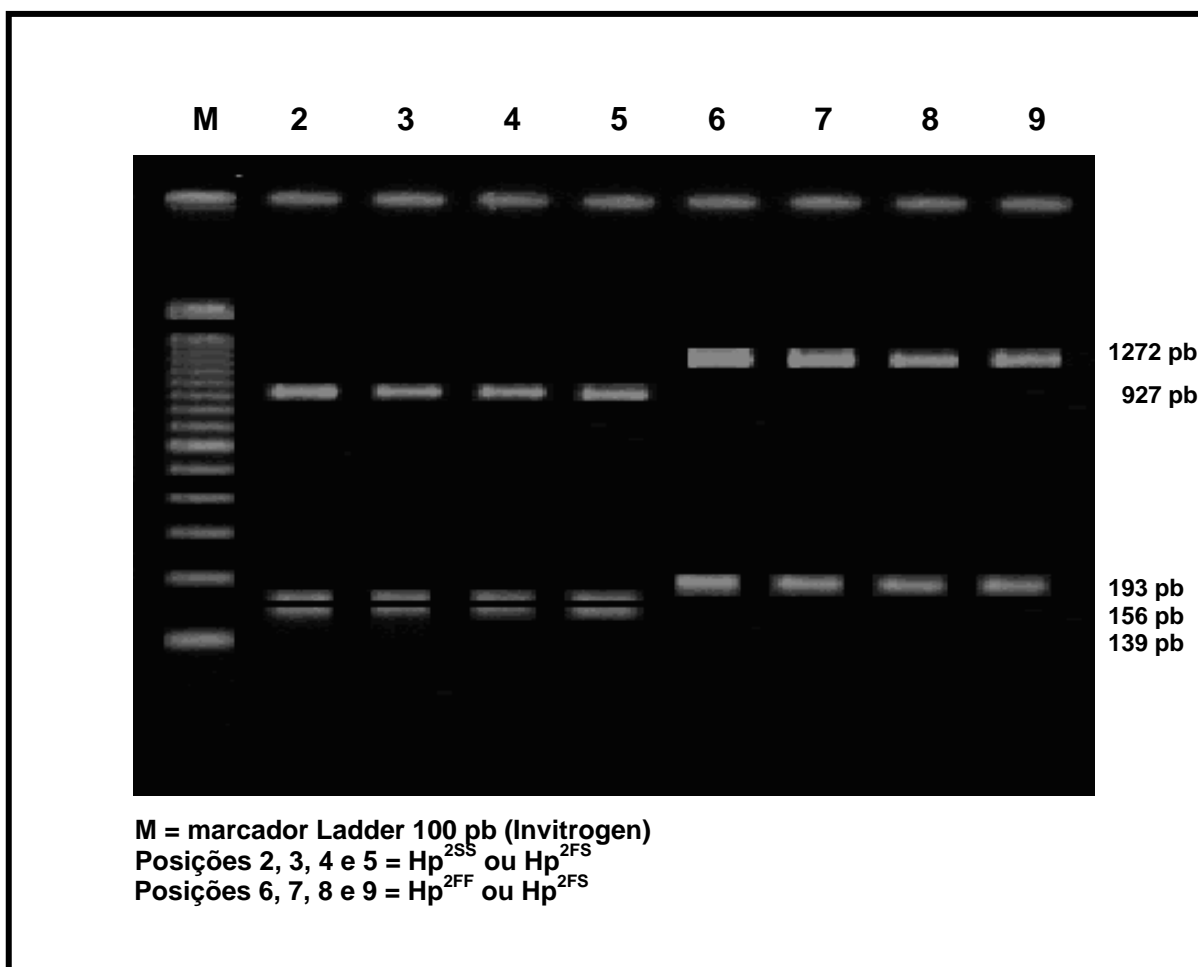


Figura 8. Restrição enzimática com Dra I das amplificações gênicas com *primers* C → F (posições 2 a 5) e com os *primers* E → D (posições 6 a 9). As posições de 2 a 5 têm o mesmo material genético das posições de 6 a 9.

As restrições enzimáticas com Dra I possibilitaram a verificação dos diferentes subtipos da haptoglobina e que se encontram expressos na **Tabela 9**. Nesta podemos observar que no grupo total de 313 subtipos analisados 27,5% são Hp^{2FS} / Hp^{2FS}, seguidos de 16,0% do Hp^{2FS} / Hp^{1F}, 11,5% do Hp^{2FS} / Hp^{1S}, 10,9% do Hp^{1S} / Hp^{1S} e outros subtipos em menores porcentagens.

Ao analisarmos os grupos estudados separadamente, podemos dizer que o subtipo Hp^{2FS} / Hp^{2FS} foi o mais freqüente entre todos, sendo para os doadores de sangue observado 24,8%, para os não portadores de DAC 24,6% e para os portadores de DAC 31,7%.

Nos doadores de sangue outros subtipos freqüentes foram Hp^{2FF} / Hp^{2FF} (14,1%), Hp^{1F} / Hp^{1F} (13,2%), Hp^{2FS} / Hp^{1S} (11,6%) e Hp^{2FS} / Hp^{1F} (10,7%). Por sua

vez, entre os não portadores de DAC outros subtipos foram Hp^{2FS} / Hp^{1F} (18,8%), Hp^{2FS} / Hp^{1S} (13,0%), Hp^{1S} / Hp^{1S} (11,6%), e Hp^{1F} / Hp^{1S} (10,1%). Entre os portadores de DAC outras maiores frequências foram Hp^{2FS} / Hp^{1F} (19,5%), Hp^{1S} / Hp^{1S} (12,2%) e Hp^{2FS} / Hp^{1S} (10,6%).

Tabela 9. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto (SP).

Subtipos	DAC		Ausência de DAC		Doadores de Sangue		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hp ^{1S} / Hp ^{1S}	15	12,2	8	11,6	11	9,1	34	10,9
Hp ^{1F} / Hp ^{1F}	7	5,7	3	4,3	16	13,2	26	8,3
Hp ^{1F} / Hp ^{1S}	9	7,3	7	10,1	8	6,6	24	7,7
Hp ^{2FS} / Hp ^{1F}	24	19,5	13	18,8	13	10,7	50	16,0
Hp ^{2FS} / Hp ^{1S}	13	10,6	9	13,0	14	11,6	36	11,5
Hp ^{2FF} / Hp ^{1F}	5	4,1	2	2,9	6	4,9	13	4,2
Hp ^{2FF} / Hp ^{1S}	2	1,6	0	0	3	2,5	5	1,6
Hp ^{2SS} / Hp ^{1F}	0	0	5	7,2	0	0	5	1,6
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FS}	39	31,7	17	24,6	30	24,8	86	27,5
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FF}	2	1,6	0	0	3	2,5	5	1,6
Hp ^{2FS} / Hp ^{2SS}	3	2,4	2	2,9	0	0	5	1,6
Hp ^{2FF} / Hp ^{2FF}	2	1,6	3	4,3	17	14,1	22	7,0
Hp ^{2SS} / Hp ^{2SS}	2	1,6	0	0	0	0	2	0,6
Total	123	100	69	100	121	100	313	100

A **Tabela 10** apresenta as freqüências gênicas dos subtipos encontrados nos grupos de doadores de sangue, portadores de DAC e não portadores de DAC, onde podemos observar que o subtipo prevalente em todos os grupos foi o Hp^{2FS}. Os demais subtipos apresentaram distribuições semelhantes entre os grupos analisados. A aplicação do teste estatístico não evidenciou diferença significativa entre esses subtipos, no entanto quando consideramos somente os alelos Hp^{2FS} e Hp^{2FF} verificamos diferenças estatísticas significativas quando comparamos os pacientes com DAC e pacientes com ausência de DAC com os doadores de sangue.

Tabela 10. Freqüências gênicas dos subtipos encontrados nos pacientes com doença arterial coronariana, nos pacientes sem doença arterial coronariana e nos doadores de sangue.

Alelo	DAC	Ausência de DAC	Doadores de Sangue	Total
Hp ^{1F}	0,22	0,23	0,19	0,21
Hp ^{1S}	0,21	0,24	0,24	0,23
Hp ^{2FS}	0,49	0,42	0,37	0,43
Hp ^{2FF}	0,05	0,06	0,19	0,11
Hp ^{2SS}	0,03	0,05	0	0,02

χ^2 DAC : Ausência de DAC = 0,014 P = 1,000 (ns)

χ^2 DAC : Doador de Sangue = 0,133 P = 0,988 (ns)

χ^2 Ausência de DAC : Doador de Sangue = 0,125 P = 0,998 (ns)

χ^2 DAC : Doador de Sangue (Hp^{2FS} e Hp^{2FF}) = 3,983 P = 0,046 (*)

χ^2 Ausência de DAC : Doador de Sangue (Hp^{2FS} e Hp^{2FF}) = 4,189 P = 0,041 (*)

(ns) = não significativo (*) = significativo

A **Tabela 11** foi reorganizada a partir da **Tabela 9** com a intenção da aplicação de um teste do qui-quadrado mais “poderoso” do ponto de vista estatístico, sendo que nesta foi incluído um grupo classificado como outros, no qual foi constituído pela somatória de subtipos encontrados em pequenas porcentagens. Os

demais subtipos considerados apresentavam freqüência de pelo menos 10% em uma das caselas.

A partir desta, o qui-quadrado realizado entre os portadores de DAC e não portadores ($\chi^2 = 2,954$; $P = 1,000$) e entre não portadores de DAC e doadores ($\chi^2 = 10,934$; $P = 0,145$) não foram estatisticamente significativos. Por sua vez, entre portadores de DAC e doadores ($\chi^2 = 20,658$; $P = 0,004$) o mesmo evidenciou diferenças estatísticas significativas.

Tabela 11. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto (SP), onde os subtipos observados em menores porcentagens foram agrupados como outros.

Subtipos	DAC		Ausência de DAC		Doadores de Sangue		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hp ^{1S} / Hp ^{1S}	15	12,2	8	11,6	11	9,1	34	10,8
Hp ^{1F} / Hp ^{1F}	7	5,7	3	4,3	16	13,2	26	8,3
Hp ^{1F} / Hp ^{1S}	9	7,3	7	10,1	8	6,6	24	7,7
Hp ^{2FS} / Hp ^{1F}	24	19,5	13	18,8	13	10,7	50	16,0
Hp ^{2FS} / Hp ^{1S}	13	10,6	9	13,0	14	11,6	36	11,5
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FS}	39	31,7	17	24,6	30	24,8	86	27,5
Hp ^{2FF} / Hp ^{2FF}	2	1,6	3	4,3	17	14,1	22	7,0
Outros	14	11,4	9	13,0	12	9,9	35	11,2
Total	123	100	69	100	121	100	313	100

χ^2 DAC:Ausência de DAC = 2,954 P = 1,000 (ns)

χ^2 DAC:Doador = 20,658 P = 0,004 (*)

χ^2 Ausência de DAC: Doador = 10,934 P = 0,145 (ns)

(ns) = não significativo (*) = significativo

Os subtipos quando estratificados quanto aos sexos (**Tabela 12**) mostraram nos três grupos analisados que tanto para o sexo masculino como para feminino a maior frequência foi do Hp^{2FS} / Hp^{2FS} .

Ao nos reportamos ao sexo masculino verificamos outras frequências acima de 10%, sendo entre os doadores de sangue $Hp^{2FS} / Hp^{1S} > Hp^{2FF} / Hp^{2FF} > Hp^{1F} / Hp^{1F}$, nos não portadores de DAC $Hp^{2FS} / Hp^{1S} > Hp^{2FS} / Hp^{1F} > Hp^{2FF} / Hp^{2FF}$, enquanto no grupo de portadores de DAC $Hp^{2FS} / Hp^{1F} > Hp^{1S} / Hp^{1S} > Hp^{2FS} / Hp^{1S}$.

Quando essas mesmas considerações eram aplicadas ao sexo feminino evidenciavam entre as doadoras de sangue $Hp^{2FF} / Hp^{2FF} = Hp^{1F} / Hp^{1F} > Hp^{1S} / Hp^{1S} = Hp^{2FS} / Hp^{1F}$, entre as não portadoras de DAC $Hp^{1S} / Hp^{1S} > Hp^{1F} / Hp^{1S} > Hp^{2FS} / Hp^{1S}$ e nas portadoras de DAC $Hp^{1F} / Hp^{1S} > Hp^{1S} / Hp^{1S} = Hp^{2FS} / Hp^{1F} > Hp^{2FS} / Hp^{1S}$.

Nesses resultados o teste do qui-quadrado não foi aplicado entre os sexos considerando o pequeno número de indivíduos observado na maioria dos subtipos.

Tabela 12. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue quanto aos sexos.

Subtipos	DAC				Ausência de DAC				Doadores de Sangue			
	Masc.		Fem.		Masc.		Fem.		Masc.		Fem.	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hp ^{1S} / Hp ^{1S}	10	12,0	5	12,5	2	6,9	6	15,0	6	7,1	5	13,9
Hp ^{1F} / Hp ^{1F}	5	6,0	2	5,0	1	3,4	2	5,0	10	11,8	6	16,7
Hp ^{1F} / Hp ^{1S}	3	3,6	6	15,0	2	6,9	5	12,5	6	7,1	2	5,6
Hp ^{2FS} / Hp ^{1F}	19	22,9	5	12,5	4	13,8	9	22,5	8	9,4	5	13,9
Hp ^{2FS} / Hp ^{1S}	9	10,8	4	10,0	5	17,2	4	10,0	13	15,3	1	2,8
Hp ^{2FF} / Hp ^{1F}	2	2,4	3	7,5	1	3,4	1	2,5	3	3,5	3	8,3
Hp ^{2FF} / Hp ^{1S}	2	2,4	0	0	0	0	0	0	3	3,5	0	0
Hp ^{2SS} / Hp ^{1F}	0	0	0	0	2	6,9	3	7,5	0	0	0	0
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FS}	27	32,5	12	30,0	8	27,6	9	22,5	22	25,9	8	22,2
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FF}	1	1,2	1	2,5	0	0	0	0	3	3,5	0	0
Hp ^{2FS} / Hp ^{2SS}	1	1,2	2	5,0	1	3,4	1	2,5	0	0	0	0
Hp ^{2FF} / Hp ^{2FF}	2	2,4	0	0	3	10,3	0	0	11	12,9	6	16,7
Hp ^{2SS} / Hp ^{2SS}	2	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	83	100	40	100	29	100	40	100	85	100	36	100

Do mesmo modo que fizemos para os grupos não estratificados quanto aos sexos e na expectativa de obtermos um teste do qui-quadrado mais “poderoso”, agrupamos e retiramos da tabela os subtipos encontrados em porcentagens menores que 10% em todas as caselas (**Tabela 13**).

A partir desses resultados optamos por comparar o sexo masculino com o feminino no mesmo grupo e o mesmo sexo entre portadores de DAC e doadores de sangue e não portadores de DAC e doadores de sangue.

O teste do qui-quadrado não mostrou diferença estatística significativa quando usado para comparar os indivíduos de um mesmo grupo com relação aos sexos (**Tabela 13**). Por outro lado, na observação do sexo masculino houve diferença estatística significante (P = 0,016) entre os portadores de DAC e os doadores, assim como na observação para o sexo feminino também houve diferença estatística significante (P = 0,05) entre os mesmos grupos.

Tabela 13. Distribuição dos subtipos da haptoglobina observados nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue quanto aos sexos, onde os subtipos encontrados em menores porcentagens foram excluídos.

Subtipos	DAC				Ausência de DAC				Doadores de Sangue			
	Masc.		Fem.		Masc.		Fem.		Masc.		Fem.	
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hp ^{1S} / Hp ^{1S}	10	13,3	5	14,7	2	8,0	6	17,1	6	7,9	5	15,2
Hp ^{1F} / Hp ^{1F}	5	6,7	2	5,9	1	4,0	2	5,7	10	13,2	6	18,2
Hp ^{1F} / Hp ^{1S}	3	4,0	6	17,6	2	8,0	5	14,3	6	7,9	2	6,1
Hp ^{2FS} / Hp ^{1F}	19	25,3	5	14,7	4	16,0	9	25,7	8	10,5	5	15,2
Hp ^{2FS} / Hp ^{1S}	9	12,0	4	11,8	5	20,0	4	11,4	13	17,1	1	3,0
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FS}	27	36,0	12	35,3	8	32,0	9	25,7	22	28,9	8	24,2
Hp ^{2FF} / Hp ^{2FF}	2	2,7	0	0	3	12,0	0	0	11	14,5	6	18,2
Total	75	100	34	100	25	100	35	100	76	100	33	100

χ^2 DAC Masc. : DAC Fem. = 7,442 P = 0,282 (ns)

χ^2 Ausência de DAC Masc. : Ausência de DAC Fem. = 7,247 P = 0,299 (ns)

χ^2 : Doador Masc. : Doador Fem. = 6,051 P = 0,417 (ns)

χ^2 DAC Masc. : Doador Masc. = 15,610 P = 0,016 (*)

χ^2 : Ausência de DAC Masc. : Doador Masc. = 2,154 P = 0,905 (ns)

χ^2 DAC Fem. : Doador Fem. = 12,588 P = 0,050 (*)

χ^2 Ausência de DAC Fem. : Doador Fem. = 12,330 P = 0,055 (ns)

(ns) = não significativo (*) = significativo

6. DISCUSSÃO

O polimorfismo da haptoglobina favoreceu o aparecimento de numerosas investigações no sentido de verificar possíveis associações entre esta proteína e diferentes doenças. Os estudos, de modo geral, associam os fenótipos da haptoglobina com doenças de origem parasitária (ATKINSON et al., 2007; MINANG et al., 2004; QUAYE et al., 2000); infecciosa, como tuberculose e HIV (DELANGHE et al., 1998; KASVOSVE et al., 2000) e doenças não infecciosas, como obesidade, diabetes e doença arterial coronariana (CHIELLINI et al., 2004; LEVY, 2004; QUAYE et al., 2006).

Vários estudos têm associado o alelo Hp² à susceptibilidade ou algumas vezes à proteção contra determinadas doenças infecciosas e não infecciosas e segundo Quaye (2008) parece ser verificado uma vantagem seletiva deste alelo em várias populações.

O nosso propósito em verificar possíveis correlações dos tipos e subtipos da haptoglobina com portadores de doença arterial coronariana foi motivado basicamente pelos estudos de alguns autores que verificaram prevalência em um dos tipos da haptoglobina ou na freqüência gênica de um dos alelos com doenças cardiovasculares, enquanto outros autores não verificam essa correlação.

Hong et al. (1997) e Levy et al. (2004) não verificaram correlações dos tipos da haptoglobina com doenças cardiovasculares, do mesmo modo que Frohlander e Johnson (1989) e Chapelle et al. (1982) que não observaram correlações entre os tipos e freqüência alélica em indivíduos que tiveram infarto do miocárdio. Por sua vez, Golabi et al. (1999) relatam aumento da freqüência alélica do Hp¹ em doença arterial coronariana; De Bacquer et al. (2001) verificaram aumento do fenótipo Hp 1-1 com o aumento do fator de risco em relação à mortalidade ocasionada por doença arterial coronariana; Delanghe et al. (1993, 1999) observaram aumento do Hp 2-2 em pacientes com doença oclusiva arterial periférica e não observaram correlação entre a distribuição fenotípica e nem na freqüência alélica com portadores de hipertensão arterial e Surya et al. (1987) que observaram aumento do fenótipo Hp 2-2 na hipertensão essencial.

Alguns outros autores (HOCHBERG et al., 2002; LEVY, 2003; ROGUIN, et al., 2003; SULEIMAN et al., 2005) realizaram esse tipo de correlação em pacientes portadores de uma doença de fundo e que como conseqüência podem apresentar

doença cardiovascular, relatando prevalência do Hp 2-2 nesses indivíduos, sugerindo que esse fenótipo torna os indivíduos portadores de diabetes mais susceptíveis a doenças cardiovasculares.

Densem et al. (2004) observaram pacientes que haviam sido submetidos a transplantes cardíacos e compararam com doadores de sangue, sendo que os resultados não mostraram diferenças significativas da distribuição dos fenótipos da haptoglobina entre os grupos analisados. Entretanto, relatam que entre os transplantados a maior frequência foi de portadores do fenótipo Hp 2-1, acreditando ser esse fenótipo um importante prognóstico de doenças coronarianas sugestivas de transplante.

Em 2001, Schaer et al. propuseram que o complexo formado entre a haptoglobina e a hemoglobina ativava macrófagos através de um receptor específico, o CD163, que segundo Ratcliffe et al. (2001) é expresso na superfície das membranas dos monócitos e macrófagos na fase inicial das lesões ateroscleróticas, sendo um mediador do reconhecimento e ligação da hemoglobina livre. Após a interação Hp-Hb ocorre à liberação de citocinas pró-inflamatórias que levam a inflamação e proliferação de macrófagos o que caracteriza a progressão da lesão. Esses estudos demonstraram que a reconhecida alta afinidade do fenótipo Hp2-2 na formação do complexo com a hemoglobina induz a sinais maiores de resposta inflamatória, o que poderia explicar a associação deste fenótipo com a maior incidência de complicações vasculares.

Na literatura são raros os relatos da verificação dos subtipos da haptoglobina com esse tipo de doença, destacando o estudo de Koch et al. (2003) que verificaram as distribuições dos subtipos em uma população que tiveram algum efeito adverso após intervenção nas arteriais coronarianas, observando maiores frequências genótípicas do Hp^{2FS} / Hp^{2FS} , seguidas dos Hp^{2FS} / Hp^{1S} , Hp^{2FS} / Hp^{1F} , Hp^{1F} / Hp^{1S} , o que demonstrou aumento expressivo do subtipo alélico Hp^{2FS} .

Dessa forma, nossa pergunta inicial era se em uma amostra de nossa população portadora de doença arterial coronariana poderia existir uma correlação de genótipos da haptoglobina com essa doença e se algum subtipo da haptoglobina, em particular, poderia estar favorecendo ainda mais esta susceptibilidade.

Outra intenção no presente trabalho era estabelecer uma metodologia capaz de ser realizada em nosso laboratório, que apresentasse reprodutibilidade e

confiabilidade e que pudesse ser repetida em qualquer outro laboratório que se interessasse em realizar esse tipo de estudo.

Assim, optamos por realizar essa caracterização por biologia molecular, especificamente por amplificação do material genético (PCR), seguida de restrição enzimática, que dentre as técnicas moleculares tem se mostrado a mais rápida e com custos mais acessíveis.

A extração do material genético foi realizada através de kit comercial, sendo que o mesmo se mostrou de fácil realização, rápido e com excelente recuperação do DNA, principalmente seguindo as recomendações do fabricante que aconselha realizar esse procedimento em sangue total colhido até dois dias. Observamos que períodos maiores de armazenagem não impedem a extração, no entanto, diminuem a quantidade e qualidade do DNA genômico extraído. Outra vantagem detectada no uso de kit foi a rapidez da extração, pois enquanto métodos tradicionais levam 2 dias para completar o processo, os kits levam em torno de 5 horas para uma quantidade de 20 amostras, agilizando o processo de análise.

Os grupos analisados no presente trabalho foram oriundos da mesma região, ou seja, de uma população com a mesma origem antropológica e com o propósito de minimizar possíveis variabilidades genéticas na distribuição do polimorfismo analisado. O estabelecimento dos grupos portadores e não portadores de DAC foi realizado com o auxílio de clínicos cardiologistas do serviço de hemodinâmica do Hospital de Base da FUNFARME, da cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo.

Tivemos dificuldade em obter um número de indivíduos com ausência de DAC próximo aos nossos interesses, considerando que a maioria dos pacientes que procuravam o serviço, ou que eram aconselhados a realizar a cinecoronariografia, apresentava algum tipo de obstrução.

Em nosso estudo pudemos observar que a idade dos pacientes com DAC (**Tabela 5**) do sexo masculino variava de 34 a 76 anos e no sexo feminino de 41 a 84 anos.

É reconhecido que o sexo feminino teoricamente está “protegido” contra a doença cardiovascular durante a idade fértil pelo possível papel dos estrógenos, assim esta doença, em geral, se manifesta 10 anos mais tarde que no homem. Todavia se considerarmos a possibilidade do aumento de múltiplos fatores de risco e

a várias possíveis doenças em faixas etárias mais avançadas, o prognóstico dessa doença nesse sexo parece ser mais desfavorável (LUZ e SOLIMENE, 1999).

Esse fato talvez justifique em nosso grupo de estudo com DAC termos uma amostra maior do sexo masculino do que no feminino, enquanto no grupo com ausência de DAC o grupo feminino ser maior. Por outro lado, é reconhecido que apenas 50% das mulheres com sintomas sugestivos de angina apresentam lesão obstrutiva significativa na cinecoronariografia (SMANIO, 2007).

Os resultados observados quanto aos tipos da haptoglobina (**Tabela 6**) evidenciam que para o grupo total de indivíduos analisados o genótipo Hp^2 / Hp^2 apresenta maior frequência, seguidos dos Hp^2 / Hp^1 e do Hp^1 / Hp^1 . Essa mesma distribuição foi verificada para o grupo dos doadores de sangue e pacientes com DAC, sendo que para o grupo de pacientes considerados sem DAC ocorreu uma pequena inversão, sendo predominante o genótipo heterozigoto Hp^2 / Hp^1 , seguidos do Hp^2 / Hp^2 e do Hp^1 / Hp^1 . A anaptoglobinemias foi verificada em pequenas porcentagens para ambos os grupos.

O teste estatístico aplicado nesses grupos não evidenciou diferenças estáticas significativas, demonstrando que ambos os grupos apresentam distribuições muito semelhantes com relação aos tipos da haptoglobina, não sendo possível correlacionar algum dos genótipos com a presença ou ausência de DAC.

Moreira (1987) ao verificar a distribuição dos fenótipos da haptoglobina em uma população da região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, relata maior frequência do Hp^2 / Hp^1 , seguidos do Hp^2 / Hp^2 e do Hp^1 / Hp^1 , o que concorda com os resultados observados para o nosso grupo de não portadores de DAC, mas é discordante do apresentado para os grupos de doadores de sangue e dos portadores de DAC.

Outros trabalhos realizados no estado de São Paulo e que verificam essas distribuições afirmam algumas vezes prevalência do Hp^2 / Hp^1 em um grupo considerado normal (CAMPREGHER et al., 2004; ZACCARIOTTO et al. 2006b), enquanto um outro verifica prevalência do Hp^2 / Hp^2 (GROTTO et al. 1994).

A verificação da associação dos tipos da haptoglobina com doenças realizadas no Brasil, como leucemias; pacientes infectados pelo vírus HIV; beta talassemia heterozigota e anemia ferropriva (GROTTO et al., 1994; CAMPREGHER et al., 2004; ZACCARIOTTO et al., 2006b) também não evidenciam diferenças significativas na avaliação de seus resultados, ou seja, nas doenças verificadas não

se observa correlação com os tipos da haptoglobina e, portanto, do mesmo modo que no nosso trabalho, não se pode implicar um dos fenótipos como responsável pelo aparecimento das mesmas.

O cálculo das freqüências alélicas dos genes Hp^1 e do Hp^2 (**Tabela 7**) evidenciou distribuição gênica semelhante entre os grupos analisados em nosso estudo, com o Hp^2 maior que o Hp^1 , sendo esse último, no grupo total de 0,44.

Esse resultado é semelhante ao observado em trabalho realizado na cidade de Campinas (ZACCARIOTTO et al., 2006b) onde o Hp^1 evidenciou freqüência gênica de 0,46. Todavia, mostra-se discordante dos trabalhos realizados na população brasileira do Estado de São Paulo (CAMPREGHER et al., 2004) onde freqüência gênica do Hp^1 foi de 0,50, dos realizados nas populações de São José do Rio Preto (MOREIRA e NAOUM, 1990), do Rio de Janeiro (ROCHA et al., 1973) e da cidade de São Paulo (HOXTER et al., 1965) cujas freqüências do Hp^1 foram de 0,39, 0,49 e 0,38 respectivamente.

Com exceção do trabalho de Zaccariotto et al. (2006b) que verificaram os genótipos da haptoglobina por metodologia molecular, os demais realizaram outras metodologias, o que provavelmente poderia explicar essa discrepância.

Quando nossos resultados eram vistos com relação às diferenças sexuais (**Tabela 8**) era verificado que, apesar de algum dos grupos separados quanto aos sexos apresentarem diferenças numéricas quanto às distribuições observadas nos grupos não estratificados, os mesmos não demonstraram diferenças estatísticas significativas.

Na literatura brasileira não encontramos trabalhos que relatam a distribuição dos tipos da haptoglobina com relação aos sexos.

Com relação à distribuição dos subtipos da haptoglobina (**Tabela 9**) o prevalente em todos os grupos foi representado pelo Hp^{2FS} / Hp^{2FS} . Entretanto o segundo prevalente variava na dependência do grupo analisado, sendo para os grupos de portadores de DAC e de ausência de DAC representado pelo Hp^{2FS} / Hp^{1F} , enquanto que entre os doadores de sangue era o Hp^{2FF} / Hp^{2FF} . O terceiro em expressão era representado pelo Hp^{1S} / Hp^{1S} nos portadores de DAC, Hp^{2FS} / Hp^{1S} naqueles com ausência de DAC e Hp^{1F} / Hp^{1F} entre os doadores de sangue.

Os resultados verificados para a segunda prevalência evidenciam um aumento do Hp^{2FS} nos indivíduos que de algum modo procuravam o serviço de

hemodinâmica e poderiam ser considerados como um grupo de risco para DAC quando comparados aos doadores de sangue.

Esse fato pode ser somado ao verificado entre o terceiro e quarto em expressão para os portadores de DAC, onde temos 15 indivíduos com Hp^{1S} / Hp^{1S} e 13 indivíduos com Hp^{2FS} / Hp^{1S} , número esses próximos, o que nos leva a pensar que se a amostra nesse grupo fosse maior poderíamos ter outro tipo de conclusão. Essa mesma consideração pode ser realizada para o grupo com ausência de DAC, onde observamos com relação ao terceiro e quarto mais freqüentes, 8 indivíduos com Hp^{1S} / Hp^{1S} e 9 indivíduos com Hp^{2FS} / Hp^{1S} .

O cálculo das freqüências gênicas a partir das distribuições dos subtipos observados para os grupos em estudo (**Tabela 10**), revela prevalência do alelo Hp^{2FS} para todos os grupos, seguidas do Hp^{1S} para os indivíduos com ausência de DAC e para os dos doadores de sangue, mas do Hp^{1F} para os portadores de DAC.

Apesar da comparação estatística entre todas as freqüências gênicas dos subtipos não se mostrar significativa, a observação individual dos valores referentes ao Hp^{2FS} entre os portadores de DAC e os doadores de sangue apresentam uma diferença de 12 pontos a mais e para o Hp^{2FF} essa diferença é de 14 pontos a menos. Entre os com ausência de DAC quando comparados aos doadores de sangue essa diferença para o Hp^{2FS} foi de 5 pontos a mais e para o Hp^{2FF} foi de 13 pontos a menos. Quando consideramos somente esses dois alelos verificamos diferenças estatísticas significativas, o que evidencia para os portadores de DAC e com ausência de DAC maior freqüência do alelo Hp^{2FS} com relação aos doadores de sangue.

Resultados da literatura quanto a pacientes que tiveram algum efeito adverso após intervenção nas artérias coronarianas, mostram freqüência maior do subtipo Hp^{2FS} e uma baixa freqüência do subtipo Hp^{2FF} (KOCH et al., 2003), o que corrobora com nossos resultados.

Ao reorganizarmos a **Tabela 9** com o interesse de agruparmos subtipos com menores freqüências (**Tabela 11**), foi observada diferença estatística significativa entre os pacientes com DAC quando comparado aos doadores de sangue, muito provavelmente pelo aumento do Hp^{2FS} / Hp^{2FS} e a diminuição do Hp^{2FF} / Hp^{2FF} entre os pacientes com DAC e do aumento do Hp^{2FS} / Hp^{2FS} e diminuição do Hp^{1F} / Hp^{1S} entre os doadores de sangue.

Grotto et al. (1993) em um estudo entre grupos caucasóides e não-caucasóides de indivíduos normais da cidade de Campinas, Estado de São Paulo, identificaram, por causa da metodologia aplicada, apenas os subtipos Hp^{1F} e Hp^{1S}, relatando não observarem diferenças significativas entre os analisados. Nossos resultados para os alelos Hp^{1F} e Hp^{1S} também se mostraram bastante semelhantes quanto a sua distribuição para os três grupos analisados (**Tabela 10**).

A estratificação dos subtipos quanto aos sexos evidenciou, para os três grupos analisados e tanto para o sexo masculino como para o feminino de cada grupo, a mesma prevalência do Hp^{2FS} / Hp^{2FS} observada para esses grupos quando não estratificados.

Na **tabela 12** verificamos alguns subtipos com número muito pequeno de representante dos mesmos, o que fez optarmos pela verificação dessa distribuição eliminando esses subtipos (**Tabela 13**). Nessa, os portadores de DAC do sexo masculino e do sexo feminino evidenciaram diferenças estatísticas significativas quando comparados aos doadores de sangue do mesmo sexo, o que não foi evidenciado na comparação daqueles com ausência de DAC com os doadores de sangue, considerando os sexos.

A verificação da associação dos genótipos da haptoglobina com doença arterial coronariana e a tentativa de responsabilizar um deles como responsável pela promoção de uma defesa ou uma susceptibilidade à mesma, ainda é questionável se considerarmos os tipos da haptoglobina, o que tem sido relatado em alguns trabalhos e verificado no nosso. Entretanto, a verificação dos subtipos, realizado raramente, e com a caracterização dos subtipos do Hp² parece indicar uma correlação entre esses e a presença da doença, podendo-se, pelos resultados apresentados, considerar o alelo Hp^{2FS} como um diferencial nesse estudo, motivo pelo quais outros estudos são necessários.

7. CONCLUSÕES

Os resultados no presente trabalho permitiram concluir:

1. A caracterização dos tipos e subtipos da haptoglobina por amplificação do material genético (PCR), seguida de restrição enzimática, mostrou ser uma técnica rápida e de fácil realização.
2. A extração do material genético através de kit comercial mostrou ser de fácil realização, rápida, com excelente quantidade e qualidade do DNA e com a vantagem de poder ser aplicada concomitantemente a um grande número de amostras.
3. A verificação dos tipos de haptoglobina nos grupos analisados não apresentou diferenças estatísticas significativas, sendo que os indivíduos caracterizados como portadores de doença arterial coronariana e os doadores de sangue evidenciaram maior frequência do genótipo Hp^2 / Hp^2 do que aqueles que não apresentam essa doença.
4. Os pacientes caracterizados como não portadores de DAC apresentaram maior frequência para o genótipo heterozigoto, sendo que a mesma não revelou diferenças estatísticas significativas com relação aos outros grupos analisados.
5. A frequência alélica do Hp^2 se mostrou maior que o Hp^1 para os três grupos analisados, sendo esse resultado semelhante à maioria dos trabalhos realizados no Brasil, não importando o grupo populacional analisado.
6. As distribuições dos tipos da haptoglobina estratificadas quanto aos sexos, apesar de algum dos grupos apresentarem diferenças numéricas com relação àquelas observadas nos grupos não estratificados, não demonstraram diferenças estatísticas significativas.
7. A distribuição dos subtipos da haptoglobina revelou que o prevalente em todos os grupos foi representado pelo Hp^{2FS} / Hp^{2FS} , seguidos pelo $Hp^{2FS} /$

Hp^{1F} para o grupo de portadores de DAC e para os com ausência de DAC e do Hp^{2FF} / Hp^{2FF} para os doadores de sangue. O terceiro em expressão foi representado pelo Hp^{1S} / Hp^{1S} nos portadores de DAC, Hp^{2FS} / Hp^{1S} naqueles com ausência de DAC e Hp^{1F} / Hp^{1F} entre os doadores de sangue.

8. Esses resultados, principalmente se considerarmos o subtipo expresso em segunda prevalência, parecem indicar um aumento do Hp^{2FS} associado a outro alelo nos indivíduos considerados como grupo de risco para DAC quando comparados aos doadores de sangue.
9. As frequências gênicas calculadas a partir das distribuições dos subtipos observados para os grupos em estudo, revelam prevalência do alelo Hp^{2FS} para todos os grupos, seguidas do Hp^{1S} para os indivíduos com ausência de DAC e para os dos doadores de sangue, mas do Hp^{1F} para os portadores de DAC.
10. Apesar da comparação estatística entre todas as frequências gênicas dos subtipos não se mostrar significativa, quando consideramos somente os alelos Hp^{2FS} e Hp^{2FF}, verificamos diferenças estatísticas significativas, o que reforça para os portadores de DAC e com ausência de DAC maior frequência do alelo Hp^{2FS} com relação aos doadores de sangue.
11. Os portadores de DAC dos sexos masculino e feminino evidenciaram diferenças estatísticas significativas quando comparados aos doadores de sangue do mesmo sexo, o que não foi evidenciado na comparação daqueles com ausência de DAC com os doadores de sangue, considerando os sexos.
12. Apesar de questionável, parece válido aplicar de forma rotineira a verificação e associação dos tipos e subtipos da haptoglobina com doença arterial coronariana na tentativa de responsabilizar um deles como responsável pela promoção de uma defesa ou uma susceptibilidade à mesma, sendo no presente trabalho possível responsabilizar o alelo Hp^{2FS} como um diferencial nesse estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, A.C.; BLUMBERG, B.S.; REES, A.P. Haptoglobin types in British, Spanish basque and Nigerian African population. **Nature**, v. 181, p. 824-825, 1958.

ARENDS, T.; GALLANGO, M.L. Frequencies of haptoglobins types in various South American populations. **Bibl. Haematol.**, v. 19, p. 463-471, 1964.

ASLEH, R.; MARSH, S.; SHILKRUT, M.; BINAH, O.; GUETTA, J.; LEJBKOWICZ, F.; ENAV, B.; SHEHADEH, N.; KANTER, Y.; LACHE, O.; COHEN, O.; LEVY, N.S.; LEVY, A.P. Genetically determined heterogeneity in haemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. **Circ. Res.**, v.92, p.1193-1200, 2003.

ATKINSON, S.H.; MWANGI, T.W.; UYOGA, S.M.; OGADA, E.; MACHARIA, A.W.; MARSH, K.; PRENTICE, A.M.; WILLIAMS, T.N. The haptoglobin 2-2 genotype is associated with a reduced incidence of Plasmodium falciparum malaria in children on the coast of Kenya. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 802-809, 2007.

AYRES, M.; SALZANO, F.M.; HELENA, M.; FRANCO, L.P.; DE SOUZA BARROS, R.M. The association of blood groups, ABO secretion, haptoglobins and hemoglobins with filariasis. **Hum. Hered.**, v. 26, p. 105-109, 1976.

BARNICOT, N. A.; GARLICK, J.P.; SINGER R.; WEINER, J.S. Haptoglobin and transferrin variants in Bushmen and some other South African people. **Nature**, v. 184, p. 2042, 1959.

BARTEL, U.; ELLING, D.; GESERICK, G. Distribution of haptoglobin phenotypes in gynecologic tumors. **Zentralbl Gynäkol**, v. 107, p. 1492-1495, 1985.

BASLER, M.W.; BURREL R. Purification of haptoglobin and its effects on lymphocytes and alveolar lymphocyte responses. **Inflammation**, v. 7, p. 387-400, 1983.

BLACK, J.A.; DIXON, G.H. Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobins. **Nature**, v. 218, p. 736-741, 1968.

BORGLIN, N.E.; NYMAN, M. Effect of estrogens on the haptoglobin level in the blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 13, p. 107-115, 1961.

BOWMAN, B.H. Haptoglobin. In: _____. **Hepatic plasma proteins**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 159-167.

BRUNE, J.L.; YANG, F.; BARNETT, D.R.; BOWMAN, B.H. Evolution of haptoglobin: comparison of complementary DNA encoding $Hp\alpha^{1S}$ and $Hp\alpha^{2FS}$. **Nuc. Acids Res.**, v. 12, p. 4531-4538, 1984.

BUECHLER, C.; RITTER, M.; ORSÓ, E.; LANGMANN, T.; KLUCKEN, J.; SCHMITZ, G.J. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. **Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 1, p. 97-103, 2000.

CAMPREGHER, P.V.; LORAND-METZE, I.; GROTTTO, H.Z.W.; SONATI, M.F. Haptoglobins phenotypes in Brazilian patients with leukemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, p. 307-309, 2004.

CARTER, K.; WORWOOD, M. Haptoglobin: a review of major allele frequencies worldwide and their association with diseases. **Int. Jnl. Lab. Hem.**, v. 29, p. 92-110, 2007.

CECIL, R. **Medicina interna básica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 323-353.

CHANDRA, T.; LAKSHMI, C.N.; PADMA, T.; VIDYAVATHI, M.; SATAPATHY, M. Haptoglobin phenotypes in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 347-350, 1991.

CHAPELLE, J.P.; ALBERT, A.; SMEETS, J.P.; HEUSGHEM, C.; KULBERTUS, H.E. Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct. **N. Engl. J. Med.**, v. 307, p. 457-463, 1982.

CHIELLINI, C.; SANTINI, F.; MARSILI, A.; BERTI, P.; BERTACCA, A.; PELOSINI, C.; SCARTABELLI, G.; PARDINI, E.; LOPEZ-SORIANO, J.; CENTONI, R.; CICCARONE, A.M.; BENZI, L.; VITTI, P.; DEL PRATO, S.; PINCHERA, A.; MAFFEI, M. Serum haptoglobin: a novel marker of adiposity in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 2678-2683, 2004.

CLEVE, H.; GORDON, S.; BOWMAN, B.H.; BEARM, A.G. Comparison of the tryptic peptides and amino acid composition of the beta polipeptide chains of the three common haptoglobin phenotypes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 19, p. 713-721, 1967.

CONNELL, G.E.; DIXON, G.H.; SMITHIES, O. Subdivision of the three common haptoglobin types based on "hidden" differences. **Nature**, v.193, p. 505-506, 1962.

CONNELL, G.E.; SMITHIES, O.; DIXON, G.H. Gene action in the human haptoglobins. II. Isolation and physical characterization of alpha polypeptide chains. **J. Mol. Biol.**, v. 21, p. 225-229, 1966.

CONSTANS, J.; VIAU, M.; GOUAILLARD, C.; CLERC, A. Haptoglobin polymorphism among Saharian and West African groups. Haptoglobin phenotype determination by radioimmuno-electrophoresis on Hp⁰ samples. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 33, p. 606-616, 1981.

DE BACQUER, D.; DE BACKER, G.; LANGLOIS, M.; DELANGHE, J.; KESTELOOT, H.; KORNITZER, M. Haptoglobin polymorphism as a risk factor for coronary heart disease mortality. **Atherosclerosis**, v. 157, p. 161-166, 2001.

DELANGHE, J.; CAMBIER, B.; DE BUYZERE, M.; CLAEYS, L.; VAN CAUWELAERT, P. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary bypass surgery. **Acta Cardiol.**, v. 49, p. 66, 1994.

DELANGHE, J.; CAMBIER, B.; LANGLOIS, M.; DE BUYZERE, M.; NEELS, H.; DE BACQUER, D.; VAN CAUWELAERT, P. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. **Atherosclerosis**, v. 132, p. 215-219, 1997.

DELANGHE, J.; DUPREZ, D.; DE BUYZERE, M.; BERGEZ, B.; CALLENS, B.; LEROUX-ROELS, G. Haptoglobin polymorphism and complications in established essential hypertension. **J. Hypertens.**, v. 11, p. 861-867, 1993.

DELANGHE, J.; DUPREZ, D.; DE BUYZERE, M.; BERGEZ, B.; CLAEYS, L.; LEROUX-ROELS, G.; CLEMENT, D. Refractory hypertension is associated with the haptoglobin 2-2 phenotype. **J. Cardiovasc. Risk.**, v. 2, p. 131-136, 1995.

DELANGHE, J.R.; LANGLOIS, M.R.; BOELAERT, J.R.; VAN ACKER, J.; VAN WANZEELE, F.; VAN DER GROEN, G.; HEMMER, R.; VERHOFSTEDDE, C.; DE BUYZERE, M.; DE BACQUER, D.; ARENDT, V.; PLUM, J. Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. **AIDS**, v. 12, p. 1027-1032, 1998.

DELANGHE, J.; LANGLOIS, M.; DUPREZ, D.; DE BUYZERE, M.; CLEMENT, D. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. **Atherosclerosis**, v. 145, p. 287-292, 1999.

DENSEM, C.G.; WASSEL, J.; COOPER, A.; YONAN, N.; BROOKS, N.H.; KEEVIL, B. Haptoglobin phenotype correlates with development of cardiac transplant vasculopathy. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 23, p. 43-49, 2004.

DOUGLAS, P.S.; GINSBURG, G.S. The evaluation of chest pain in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 1311-1315, 1996.

FEDOSEEVA, S.V.; LUSOPOVA, M.M.; CHUKANOVA, V.P.; POSPELOV, L.E. Course of infiltrating pulmonary tuberculosis depending on the patient's genotype. **Probl. Tuberk.**, v. 12 p. 8-10, 1993.

FLETCHER, O.; KESSLING, A.M. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease?. **Hum. Genet.**, v. 103, p. 11-21, 1998.

FROHLANDER, N.; JOHNSON, O. Haptoglobin groups in acute myocardial infarction. **Hum. Hered.**, v. 39, p. 345-350, 1989.

GALATIUS-JENSEN, F. Rare phenotype in the Hp system. **Acta Genet.**, v. 8, p. 248-255, 1958.

GARBY, L.; SJOELIN, S.; VUILLE, J.C. Studies on erythro-kinetics in infancy. v. estimations of the life span of red cells in the newborn. **Acta Paediatr.**, v. 53, p. 165-171, 1964.

GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D.; LANSDORP, P.; BAUMANN, H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 20, p. 7251-7255, 1987.

GIBLETT, E.R. Haptoglobin types in American Negroes. **Nature.**, v. 183, p. 192, 1959.

GIBLETT, E.R. Haptoglobin: a review. **Vox Sang.**, v. 6, p. 513-524, 1961.

GOLABI, P.; KSHATRIYA, G.K.; KAPOOR, A.K. Association of genetic markers with coronary heart disease (myocardial infarction) – a case control study. **J. Indian Med. Ass.**, v. 97, p. 6-7, 1999.

GOTTO, A.M. Fatores de risco para coronariopatia. In: Braunwald E. **Tratado de medicina cardiovascular**. 3 ed., vol 2. São Paulo: Roca, 1991. p. 1208-1242.

GROTTO, H.Z.W.; KIMURA, E.M.; CARNEIRO, M.V.; DEZOTTI, B.H.C.; GERVASIO, S.A. Subtipos de haptoglobina (Hp) na anemia ferropriva e β talassemia heterozigota (β tal hetero). **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 30, n. 2, p. 109, 1994.

GROTTO, H.Z.W.; SONATI, M.F.; PARTEL, C.D.; KIMURA, E.M.; OLIVEIRA, F.M. Subtipos de haptoglobina em uma população brasileira. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 29, n. 4, p. 176, 1993.

GUTTERIDGE, J.M. The antioxidant activity of haptoglobin towards hemoglobin-stimulated lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 917, p. 219-223, 1987.

HOCHBERG, I.; ROGUIN, A.; NIKOLSKY, E.; CHANDERASKEKHAR, P.V.; COHEN, S.; LEVY, A.P. Haptoglobin phenotype and coronary artery collaterals in diabetic patients. **Atherosclerosis**, v. 161, p. 441-446, 2002.

HONG, S.H.; KANG, B.Y.; LIM, J.H.; NAMKOONG, Y.; OH, M.Y.; KIM, J.Q.; LEE, C.C. Haptoglobin polymorphism in Korean patients with cardiovascular diseases. **Hum. Hered.**, v. 47, p. 283-287, 1997.

HOXTER, G.; ARAUJO, J.T.; JAMRA, M. Incidência dos tipos de haptoglobinas na cidade de São Paulo – Brasil. **J. Bras. Med.**, v. 9, p. 1287-1290, 1965.

KANNEL, W.B. The Framingham study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. **J. Gen. Specif. Med.**, v. 5, p. 27-37, 2002.

KANNEL, W.B.; WILSON, P.W.; D'AGOSTINO, R.B.; COBB, J. Sudden coronary death in women. **Am. Heart J.**, v. 136, p. 205-212, 1998.

KASHIWAGI, N.; GROTH, C.G.; STARZL, T.E. Changes in serum haptoglobin and group specific component after orthotopic liver homotransplantations in humans. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 128, n. 1, p. 247-250, 1968.

KASVOSVE, I.; GOMO, Z.A.; MVUNDURA, E.; MOYO, V.M.; SAUNGWEME, T.; KHUMALO, H.; GORDEUK, V.R.; BOELAERT, J.R.; DELANGHE, J.R.; DE BACQUER, D.; GANGAIDZO, I.T. Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 4, p. 771-775, 2000.

KIM, R.J.; BECKER, R.C. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. **Am. Heart J.**, v. 146, p. 948-957, 2003.

KIMURA, E.M.; PARTEL, C.D.; GERVASIO, S.A.; BARROS MAZON, S.; MADUREIRA, F.O.; SONATI, M.F. Subtipagem da haptoglobina sérica em pacientes HIV⁺ e de grupo de risco. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 30, n. 2, p. 109, 1994.

KOCH, W.; LATZ, W.; EICHINGER, M.; GSCHWENDNER, C.; TEIGE, B.; SCHÖMIG, A.; KASTRATII, A. Haptoglobin gene subtyping by restriction enzyme analysis. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1937-1940, 2003.

KOCH, W.; LATZ, W.; EICHINGER, M.; ROGUIN, A.; LEVY, A.P.; SCHÖMIG, A.; KASTRAT, A. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. **Clin. Chem.**, v. 48, p. 1377-1382, 2002.

KODA, Y.; SOEJIMA, M.; YOSHIOKA, N.; KIMURA, H. The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaploglobinemia. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 62, p. 245-252, 1998.

KOJIMA, S.; INENAGA, T.; MATSUOKA, H.; KURAMOCHI, M.; OMAE, T.; NARA, V.; VAMORI, V. The association between salt-sensitivity of blood pressure and some polymorphic factors. **J. Hypertens.**, v. 12, p. 797-801, 1994.

KRAUSS, S.; SARCIONE, E.J. Synthesis of serum haptoglobin by the isolated perfused rat liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 90, p. 301-308, 1964.

KRISTIANSEN, M.; GRAVERSEN, J.H.; JACOBSEN, C.; SONNE, O.; HOFFMAN, H.J.; LAW, S.K.; MOESTRUP, S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, p. 198-201, 2001.

LANGLOIS, M.; DELANGHE, J. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clin. Chem.**, v. 46, p.1589-1600, 1996.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe hematologia clinica**. São Paulo: Manole, 1998. p. 219-221.

LEFRANC, G.; LEFRANC, M.P.; SEGER, J.; SALIER, J.P.; CHAKHACHIRO, L.; LOISELET, J. Sex limited ahaptoglobinaemia. **Hum. Genet.**, v. 58, p. 294-297, 1981.

LEVY, A.P. Genetics of diabetes cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. **Acta Diabetol.**, v. 40, p. S330-S333, 2003.

LEVY, A.P. Haptoglobin: a major susceptibility gene for diabetic cardiovascular disease. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 6, p. 308-310, 2004.

LEVY, A.P.; LARSON, M.G.; COREY, D.; LOTAN, R.; VITA, J.A.; BENJAMIN, E.J. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. **Atherosclerosis**, v. 172, p. 361-365, 2004.

LOUAGIE, H.K.; BROUWER, J.T.; DELANGHE, J.R.; DE BUYZERE, M.L.; LEROUX-ROELS, G.G. Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. **J. Hepatol.**, v. 25, p. 10-14, 1996.

LUZ, P.L.; SOLIMENE, M.C. Peculiaridades da doença arterial coronária na mulher. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 45, n. 1, p. 45-54, 1999.

MAEDA, N. Nucleotide-sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair – the haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 6698-6709, 1985.

MAEDA, N.; YANG, F.; BARNETT, D.R.; BOWMAN, B.H.; SMITHIES, O. Duplication within the haptoglobin Hp² gene. **Nature**, v. 309, p. 131-135, 1984.

MAES, M.; DELANGHE, J.R.; BOCCHIO CHIAVETTO, L.; BIGNOTTI, S.; TURA, G.B.; PIOLO, R.; ZANARDINI, R.; ALTAMURA, C.A. Haptoglobin polymorphism and schizophrenia: genetic variation on chromosome 16. **Psychiatry Res.**, v. 104, p. 1-9, 2001.

MARIAN, A.J. Genetic markers: genes involved in atherosclerosis. **J. Cardiovasc. Risk**, v. 4, p. 333-339, 1997.

McCORMICK, D.I.; ATASSI, M.Z. Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human hemoglobin. **J. Protein. Chem.**, v. 9, p. 735-742, 1990.

MELAMED-FRANK, M.; LANCHE, O.; ENAV, B.I.; SZAFRANEK, T.; LEVY, N.S.; RICKLIS, R.M.; LEVY, A.P. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3693-3698, 2001.

MIERES, J.H.; SHAW, L.J.; HENDEL, R.C.; MILLER, D.D.; BONOW, R.O.; BERMAN, D.S.; HELLER, G.V.; MIERES, J.H.; BAIREY-MERZ, C.N.; BERMAN, D.S.; BONOW, R.O.; CACCIABAUDO, J.M.; HELLER, G.V.; HENDEL, R.C.; KIESS, M.C.; MILLER, D.D.; POLK, D.M.; SHAW, L.J.; SMANIO, P.E.; WALSH, M.N. American Society of Nuclear Cardiology consensus statement: Task Force on Women and Coronary Artery Disease — the role of myocardial perfusion imaging in the clinical evaluation of coronary artery disease in women. **J. Nucl. Cardiol.**, v. 10, p. 95-101, 2003.

MINANG, J.T.; GYAN, B.A.; ANCHANG, J.K.; TROYE-BLOMBERG, M.; PERLMANN, H.; ACHIDI, E.A. Haptoglobin phenotypes and malaria infection in pregnant women at delivery in western Cameroon. **Acta Trop.**, v. 90, p. 107-114, 2004.

MITCHELL, R.I.; CARZINO, R.; JANARDHANA, V. Associations between the two serum proteins haptoglobin and transferrin and leukemia. **Hum. Hered.**, v. 38, p. 144-150, 1988.

MOREIRA, H.W. **Freqüência dos fenótipos da haptoglobina em portadores de hemoglobinas normais e anormais, especialmente falcemias e talassemias.** 1987. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 1987.

MOREIRA, H.W.; NAOUM, P.C. Serum haptoglobin types in patients with hemoglobinopathies. **Hereditas**, v. 113, p. 227-231, 1990.

NABULSI, A.; EMMERICH, E.; CLEVE, W.; GURTLER, L.G.; CLEVE, H. Haptoglobin (HP), transferrin (TF) and group-specific component (GC) subtype distribution in Bantu-speaking people from Malawi. **Hum. Hered.**, v. 43, p. 323-325, 1993.

NAKADA, N.; ABE, K. Genetic polymorphism of haptoglobin subtypes in a Japanese population. **Hum. Hered.**, v. 37, p. 376-380, 1987.

NEVO, S.; TATARSKY, I. Serum haptoglobin types and leukemia. **Hum. Hered.**, v. 73, p. 240-244, 1986.

NIELSEN, M.J.; PETERSEN, S.V.; JACOBSEN, C.; OXVIG, C.; REES, D.; MOLLER, H.J.; MOESTRUP, S.K. Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin-binding plasma protein. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2846-2849, 2006.

NYMAN, M. Serum haptoglobin methodological and clinical studies. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 11, n. 39, p. 1-169, 1959.

OH, S.K.; PAVLOTSKI, N.; TAUBER, A.L. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. **J. Leukoc. Biol.**, v. 47, p. 142-148, 1990.

OLIVIERO, S.; DEMARCHI, M.; CARBONARA, A.O.; BERNINI, L.F.; BENSI, G.; RAUGEI, G. Molecular evidence of triplication in the haptoglobin Johnson variant gene. **Hum. Genet.**, v. 71, n. 1, p. 49-52, 1985.

OSHIRO, S.; NAKAJIMA, H. Intrahepatocellular site of the catabolism of heme and globin moiety of hemoglobin haptoglobin after intravenous administration to rats. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 16032-16038, 1988.

OSHIRO, S.; YAJIMA, Y.; KAWAMURA, K.; KUBOTA, M.; YOKOFUJITA, J.; NISHIBE, Y.; TAKAHAMA, M.; NAKAJIMA, H. Catabolism of haemoglobin-

haptoglobin complex in microsome subfractions. **Chem. Pharm. Bull**, v. 40, p. 1847-1851, 1992.

OSTROWSKI, R.S.; TRAVIS, J.C.; TAILEY, E.S. The association of Hpl and sickle cell disease. **Hum. Hered.**, v. 37, p. 193-195, 1987.

PADMA, T.; VALLI, W. ABO blood groups, intestinal alkaline phosphatase and haptoglobin types in patients with serum hepatitis. **Hum Hered.**, v. 38, p. 367-371, 1988.

PARKER, W.C.; BEARN, A.G. Control gene mutation as a possible explanation of certain haptoglobin phenotypes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 15, p. 159-181, 1963.

PRUMIER, J.H.; BEARN, A.G.; CLEVE, H. Site of formation of the group-specific component and certain other proteins. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 115, p. 1005-1007, 1964.

QUAYE, I.K., Haptoglobin, inflammation and disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 8, p. 735-742, 2008.

QUAYE, I.K.; ABABIO, G.; AMOAH, A.G. Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 13, p. 90-94, 2006.

QUAYE, I.K.; EKUBAN, F.A.; GOKA, B.Q.; ADABAYERI, V.; KURTZHALS, J.A.; GYAN, B.; ANKRAH, N.A.; HVIID, L.; AKANMORI, B.D. Haptoglobin 1-1 is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, p. 216-219, 2000.

RANTAPÄÄ, D.S.; DAHLQVIST, S.; FRÖHLANDER, N. Haptoglobin groups and rheumatoid arthritis. **Hum. Hered.**, v. 35, p. 207-211, 1985.

RANTAPÄÄ, D.S.; DAHLQVIST, S.; BECKMAN, G.; BECKMAN, L. Serum protein markers in systemic lupus erythematosus. **Hum. Hered.**, v. 38, p. 44-47, 1988.

RATCLIFFE, N.R.; KENNEDY, S.M.; MORGANELLI, P.M. Immunocytochemical detection of Fc γ receptors in human atherosclerotic lesions. **Immunol. Lett.**, v. 77, p. 169-174, 2001.

RAUGEI, G.; BENSI, G.; COLANTUONI, V.; ROMANO, V.; SANTORO, C.; COSTANZO, F.; CORTESE, R. Sequence of human haptoglobin cDNA: evidence that the alpha and beta subunits are coded by the same mRNA. **Nucleic Acids Res.** v. 11, n. 17, p. 5811-5819, 1983.

RAYNES, J.G.; EAGLING, S.; McADAM, K.P. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 83, n. 3, p. 488-491, 1991.

ROCHA, A.M.A.; FRAGOSO, S.C.; JUNQUEIRA, P.C. Tipos de haptoglobinas: sua incidência em doadores de sangue do Estado da Guanabara. **B. Inst. Est. Hemat. Arthur de Siqueira Cavalcanti**, Rio de Janeiro, p. 13-14, 1973.

ROGUIN, A.; KOCH, W.; KASTRATI, A.; ARONSON, D.; SCHOMIG, A.; LEVY, A.P. Haptoglobin genotype is predictive of major adverse cardiac events in the 1-year period after percutaneous transluminal coronary angioplasty in individuals with diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 9, p. 2628-2631, 2003.

ROSS, R. Patogênese da aterosclerose. In: Braunwald E. **Tratado de medicina cardiovascular**. 3 ed., vol 2. São Paulo: Roca, 1991. p. 1184-1205.

SALZANO, F.M.; SUTTON, H.E. Haptoglobin and transferrin types of indians from Santa Catarina, Brazil. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 17, p. 280-289, 1965.

SANTORO, C.; OLIVETTI, E.; CARBONARA, A.O. Distribution of haptoglobin subtypes in continental Italy and Sardinia. **Hum. Hered.**, v. 33, p. 195-198, 1983.

SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F. Polimorfismos genéticos em indígenas da Amazônia. In: Reunião anual da S.B.P.C. **Apud Cienc. e Cult.**, v. 38, p. 863-864, 1986.

SCHAER, D.J.; BORETTI, F.S.; HONGEGGER, A.; POEHLER, D.; LINNSCHEID, P.; STAEGE, H.; MULLER, C.; SCHOEDON, G.; SCHAFFNER, A. Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. **Immunogenetics**, v. 53, p. 170-177, 2001.

SCHEFLER, W.C. **Statistics for the biological sciences**. Massachusetts: Addison-Wesley, 1969, p. 93-97.

SCHULTZE, H.E.; HEREMANS, J.F. **Molecular biology of human proteins: Nature and metabolism of extracellular proteins**. Amsterdam: Elsevier, 1966. p. 384-402.

SHIM, B.S.; BEARN, A.G. The distribution of haptoglobin subtypes in various populations, including subtype patterns in some nonhuman primates. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 16, p. 477-483, 1964.

SMANIO, P. Doença cardiovascular em mulheres diabéticas assintomáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 2, p. 305-311, 2007.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem. J.**, v. 61, p. 629-641, 1955.

SMITHIES, O.; CONNELL, G.E.; DIXON, G.H. Inheritance of haptoglobina subtypes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 14-21, 1962 (a).

SMITHIES, O.; CONNELL, G.E.; DIXON, G.H.. Chromosomal rearrangements and evolution of haptoglobin genes. **Nature**, v. 192, p. 232-236, 1962 (b).

SMITHIES, O.; WALKER, N.F. Genetic control of some serum proteins in normal humans. **Nature**, v. 176, p. 1265-1266, 1955.

SULEIMAN, M.; ARONSON, D.; ASLEH, R.; KAPELIOVICH, M.R.; ROGUIN, A.; MEISEL, S.R.; SHOCHAT, M.; SULIEMAN, A.; REISNER, S.A.; MARKIEWICZ, W.; HAMMERMAN, H.; LOTAN, R.; LEVY, N.S.; LEVY, A.P. Haptoglobin polymorphism predicts 30-day mortality and heart failure in patients with diabetes and acute myocardial infarction. **Diabetes**, v. 54, n. 9, p. 2802-2806, 2005.

SURYA, P.P.; PADMA, T.; RAMASWAMY, M. Haptoglobin patterns in essential hypertension and associated conditions – increased risk for Hp2-2. **Hum. Hered.**; v. 37, p. 345-348, 1987.

SUTTON, H.E.; NEEL, J.U.; LIVINGSTONE, F.B.; BINSON, G.; KUNSTADTER, P.; TROMBLEY, L.E. The frequency of haptoglobin types in five population. **Ann. Hum. Genetic.**, v. 23, p. 175-183, 1959.

TEIGE, B.; OLAISEN, B.; TEISBERG, P. Haptoglobin subtypes in Norway and a review of HP subtypes in various populations. **Hum. Hered.**, v. 42, p. 93-106, 1992.

THEILGAARD-MÖNCH, K.; JACOBSEN, L.C.; NIELSEN, M.J.; RASMUSSEN, T.; UDBY, L.; GHARIB, M.; ARKWRIGHT, P.D.; GOMBART, A.F.; CALAFAT, J.; MOESTRUP, S.K.; PORSE, B.T.; BORREGAARD, N. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 353-361, 2006.

THOMAS, L. Haptoglobin/Hamopexin. In: _____ **Labor und Diagnose**, 4th ed. Marburg: Medizinische Verlags, 1992. p. 813-820.

TIETZ, N.W. **Clinical guide to laboratory tests**, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995, p. 306-309.

TONDO, C.V.; MUNDT, C.; SALZANO, F.M. Haptoglobin types in Brazilian negroes. **Ann. Hum. Genet.**, v. 26, p. 325-331, 1963.

TORRINHA, J.A.F. Haptoglobin frequencies in the north of Portugal. **Acta Genet. Statist. Med.**, v. 17, p. 74-76, 1967.

TSAMANTANIS, C.; DELINASSIOS, J.G.; KOTTARIDIS, S.; CHRISTODOULOU, C. Haptoglobin types in breast carcinoma. **Hum. Hered.**, v. 30, p. 44-45, 1980.

VAN DER STRATEN, A.; HERZOG, A.; CABEZÓN, T.; BOLLEN, A. Characterization of human haptoglobin cDNAs coding for $\alpha^{2FS}\beta$ and $\alpha^{1S}\beta$ variants. **FEBS Lett.**, v. 168, p. 103-107, 1984.

VAN VLIERBERGHE, H.; LANGLOIS, M.; DELANGHE, J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. **Clin. Chim. Acta**, v. 345, p. 35-42, 2004.

WADA, T.; OARA, H.; WATANABE, K.; KINOSHITA, H.; NISHIO, H. Studies on haptoglobin synthesis in reticuloendothelial tissues. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 8, n. 3, p. 195-207, 1970 (a).

WADA, T.; OARA, H.; WATANABE, K.; YACHI, A. Autoradiographic study on the site of uptake of haptoglobin-hemoglobin complex. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 8, p. 183-193, 1970 (b).

WALTON, K.G.; SCHNEIDER, R.H.; NIDICH, S. Review of controlled research on the transcendental meditation program and cardiovascular disease. Risk factors, morbidity, and mortality. **Cardiol. Rev.**, v. 12, n. 5, p. 262-266, 2004.

WANG, Y.; KINZIE, E.; BERGER, F.G.; LIM, S.K.; BAUMANN, H. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. **Redox Rep.**, v. 6, p. 379-385, 1993.

WASSELL, J. Haptoglobin: function and polymorphism. **Clin. Lab.**, v. 46, p. 547-552, 2000.

WELCH, S.G.; SWINDLEHURST, C.A.; MCGREGOR, I.A.; WILLIAMS, K. Serum protein polymorphism in a village community from the Gambia, West Africa (Hp, Tf, and Gc). **Hum. Genet.**, v. 48, p. 81-84, 1979.

YANG, F.; FRIEDRICH, W.E.; NAVARIJO-ASHBAUGH, A.L.; DEGRAFFENRIED, L.A.; BOWMAN, B.H.; COALSON, J.J. Inflammatory induction and cell type specific expression of haptoglobin gene in baboon and mouse lung. **Lab. Invest.**, v. 73, p. 433-440, 1995.

YANG, F.; GHIO, A.J.; HERBERT, D.C.; WEAKER, F.J.; WALTER, C.A.; COALSON, J.J. Pulmonary expression of the human haptoglobin gene. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 23, n. 3, p. 277-282, 2000.

YANO, A.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S.; ISHIZU, H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. **Acta Med. Okayama**, v. 52, n. 4, p. 173-181, 1998.

ZACCARIOTTO, T.R.; ROSIM, E.T.; ASSIS, A.M.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. Bases genéticas do fenótipo Hp⁰ na população brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoterap.**, v. 28, n. 2, p. 45, 2006 (a).

ZACCARIOTTO, T.R.; ROSIM, E.T.; MELO, D.; GARCIA, P.M.D.; MUNHOZ, R.R.; AOKI, F.H.; SONATI, M.F. Haptoglobin polymorphism in a HIV seropositive Brazilian population. **J. Clin. Pathol.**, v. 59, p. 550-553, 2006 (b).

ZAK, I.; NIEMIEC, P.; SARECKA, B.; BALCERZYK, A.; CIEMNEWSKI, Z.; RUDOWSKA, E.; DYLAG, S. Carrier-state of D allele in ACE gene insertion/deletion polymorphism is associated with coronary artery disease, in contrast to the C667→T transition in the MTHFR gene. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 527-539, 2003.

ZHAO, H.; ZHANG, G. Haptoglobin groups and cirrhosis of the liver. **Hum. Hered.**, v. 43, p. 134-136, 1993.

APÊNDICE

Seqüência de nucleotídeos referentes a amplificação do gene Hp¹ (mais especificamente Hp^{1S}) com os oligonucleotídeos sintéticos A (em vermelho) e B (em azul), de acordo com a seqüência contida no EMBL/GenBank Data Libraries sob o número de acesso AC004682. Grifado em amarelo os sítios de restrição da enzima Dra I.

```

186721 tgtcactgct gcgtaaagta gaaagattta aatgctttgc ccttaccacc tgctgatctc
186781 atttccaata gttgcagttt taaaataaatt ctgtttttta aattgtttac attacaaaaa
186841 gctctatttc ccacttttct aacaaaggaa gtgggaaata ctgagatttt tgagccctgg
186901 ctggtgaact gtattatatt taaacaatta tcccaataaa ggaatttcca caattccctg
186961 aaattcattg aaagggctag gggctacaat aattcattct ctctaaagaa agatgaatct
187021 agagcagcac tggctggagc tcagattttg tagatggtgc agttaatacg aggcaggttg
187081 gcatttccac accagtaaga gcagaagagg ctgggccttt gcctcttgtt ctgagaatga
187141 aaggagagag caacagctcc tcctaataac gagaagcagg agttccagcc catgtccagc
187201 ctctctgtag gcttccatgg attaagattt tatgtcattc cttgacttgtt tctccctgga
187261 gcttgcttct ccttagaccc agggctctct agcaggctct ctgtatgcac aggctctct
187321 aatctgtggg cgatgtagac aatggattca gccagtgccc ttcaggccc aatgaacaag
187381 acccttggtg acccttaggg agtcatcacc taactgctta agtctctccc tggccagctg
187441 cggttctccc acatccctcc tcctggctct tgtgtgctca gaggaagccg cactggaagg
187501 ctgtgcctct aggacgttcc ccgtggagc cctgcctgct ctcttaagtg ctcagacc
187561 acctgcttca cattcaggaa gtttatctcc aacagcctta tttatccact gcttctcatt
187621 gtttaaggtg tacactcctg aaacaaaagg caagaagtga gccaaaggag aagtcaagtc
187681 tagaccccgt gcagagtgag aaggcattta aagagagaa ctaaaggaa gaggaaaagg
187741 ggacaaaaag gaaggggaaa aggagagagt atatgagaag gaggaaggga aagagtgctg
187801 tgctggaagc caagtgcctg gatgccagtt aagcccagca gaacacactg tggtcatggc
187861 ggtcacagcc aagcagtaca gggagggctc agggttcaaa tcctgactct gcctcttaca
187921 ggctgcctga atttgggcaa gatactcaac ctgtctgtgc ctgagttcc ttatcagcaa
187981 agtgaaaaca ataaactctg ttcagaggga tactgtgagg actaagtgag caaataagta
188041 taaagccctt agagcagtgc caggacagca agactcacta ggtgagggtg acatcatcat
188101 cagcattcct tcttttccca catctgctgg agatgtaaat gtgactctga gatttacatg
188161 aggtaggctg catggcatcg cctcccctta acaaaacaga aaacttgagg ctgacaaaag
188221 ttagtctgcc caaagggcca tggctactgg cgacaaaacg cttattagaa tctaaatctc
188281 ctggctccaa ggagagcaac gaactttctg gcaatcacc tcagcaccac ccatcatgga
188341 aatgtcagag aagggggttgg tatgtagggc atggagacag ttgtccacat cttaccatct
188401 ccttctgtgc gcagtttgta gtagtctta cactggtagc gaaccgagtg ctccacatag
188461 ccatgtgcaa tctcggggggg cttcgggcag ccgtcatctg caaagagaga gaagccagag
188521 agtttgctat ttggaaattg ttcccagtga accgtgaaa gtcagatgag cgggagctgc
188581 tctgcacatc aatctccttc caccccgaat agaagccaat ggaaaggcaa gctcccctca
188641 tttctggcag gaaccccaat gttctttatg gtctgaaag cccagaggtc gagataagaa
188701 gggggaattg ggtgttctca gagagagtgc agaccgaga gggtcagagt gggatgcaca
188761 ctctaccca accaaagact gacctgcgat atccgtgaca tcattgctg agtccactgc
188821 aaaaagctgt cccagagca ggagggcaat gacagctccc agggcactgc agagagaaga
188881 caaggaggag tggaaagcta gtctccctgc ttcacagcac atgcatgcat ccacacacac
188941 atgcatgtac acacacacac acacacatgc atacacacac actcctccca cttagcagcc
189001 agaaaagaaa gtcgatatat ggaagtgcta ggaccaagaa attgccccca cacctgcca
189061 tacacacttt agcagcttct gagcatacca agcttcagc aagccctgct ctgctgggaa
189121 ttctgcagaa gctt

```

Seqüência de nucleotídeos referentes a amplificação do gene Hp² (mais especificamente Hp^{2FS}) com os oligonucleotídeos sintéticos C (em vermelho) e F (em azul), de acordo com a seqüência contida no EMBL/GenBank Data Libraries sob o número de acesso M69197. Grifado em amarelo os sítios de restrição da enzima Dra I.

```
4261 tattaggagg agctgttgct ctctcctttc attctcagaa ccagaggcaa agaccagcc
4321 tcttctgctc ttactggtgt ggaaatgcc acctgcctcg tattaactgc accatctaca
4381 aaatctgagc tccagccagt gctgctctag attcatcttt ctttagagag aatgaattat
4441 tgtagcccct agccctttca atgaatttca ggggaattgtg gaaattcctt tattgggata
4501 attgtttaaa tataatacag ttcgcgagct tctattcggg gtggaaggag attgatgtgc
4561 agagcagctc ccgctcatct gacttttcac ggttcactgg gaacaatttc caaatagcaa
4621 actctctggc ttctctctct ttgcagatga cggctgcccg aagcccccg agattgcaca
4681 tggctatgtg gagcactcgg ttcgctacca gtgtaagaac tactacaaac tgcgcacaga
4741 aggagatggt aagatgtgga caactgtctc catgccctac atacaacccc cttctctgac
4801 atttccatga tgggtggtgc tgaggtgatt cgccagaaag ttcgttgctc tccttgagc
4861 caggagattt agattctaata aagcgttttg tccagtag ccatggccct ttgggcagac
4921 taacttttgt cagcctcaag ttttctgttt tgtaagggg aggcgatgcc atgcagccta
4981 cctcatgtaa atctcagagt cagatttaca tctccagcag atgtgggaaa agaaggaatg
5041 ctgatgatga tgtcaccctc acctagttag tcttgctgtc ctggcactgc tctaaggct
5101 ttatacttat ttgctcactt agtcctcaca gtatccctct gaacagagtt tattgttttc
5161 actttgctga taaggaaact gaggcacaga caggttgagt atcttgccca aattcaggca
5221 gcctgtaaga ggcagagtca ggatttgaac cctgagccct ccctgtactg cttggctgtg
5281 accgccatga ccacagtgtg ttctgctggg cttaactggc atccaggcac ttggcttcca
5341 gcacagcaact ctttcccttc ctcttctca tatactctct cttttcccc ttctttttg
5401 tccccttttc ctcttcttt tagttcttct ctttaaatgc cttctcactc tgcacggggt
5461 ctagacttga cttctccttt ggctcacttc ttgccttttg tttcaggagt gtacacctta
5521 aacaatgaga agcagtggat aaataaggct gttggagata aacttcctga atgtgaagca
5581 ggtgggtgct gagcacttaa gagagcaggc aggcgtccag cggggaacgt cctagaggca
5641 cagccttcca gtgcggcttc ctctgagcac acaagagcca ggaggagga tgtgggagaa
```



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 084/2007

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 2755/2007 sob a responsabilidade **Haroldo Wilson Moreira** com o título "Polimorfismo da haptoglobina correlacionadas com doença arterial coronariana", está de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP. Solicitamos a correção do número de sujeitos.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 07 de maio de 2007.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____,
RG _____, estado civil _____, idade _____,
residente na _____, nº _____,
bairro _____, cidade _____, telefone _____.

Concordo em participar do estudo, "**Polimorfismo da haptoglobina correlacionado com doença arterial coronariana**", como voluntário e declaro ser esclarecido sobre os seguintes pontos:

- Compreendi que o trabalho terá como objetivo avaliar uma relação entre a possibilidade de desenvolver doença arterial coronariana e a proteína haptoglobina;
- Autorizo a utilização do meu sangue para a realização deste trabalho de pesquisa;
- Fui informado que o desenvolvimento da pesquisa será feito de forma confidencial, revelando os resultados ao indivíduo e/ou familiares, se desejarem;
- Não haverá riscos e desconforto adicionais para mim, visto que não sofrerei danos a minha saúde;
- Não haverá utilização de nenhuma terapia para essa pesquisa e não estarei sujeita a nenhum tipo de tratamento;
- Com os resultados obtidos, será possível futuramente contribuir para o melhor entendimento da distribuição dos polimorfismo (tipos) da haptoglobina e associar com a suscetibilidade para desenvolver doença arterial coronariana;
- Todas as minhas dúvidas serão prontamente esclarecidas pela equipe responsável pelo desenvolvimento da pesquisa (Pâmela ou Prof. Dr. Haroldo);
- Poderei me recusar a participar, ou retirar meu consentimento a qualquer momento da realização do trabalho proposto, não havendo qualquer penalização ou prejuízo para mim;
- Será garantido o sigilo dos resultados obtidos neste trabalho, assegurando a minha privacidade e, portanto, os resultados serão confidenciais;

- Não haverá qualquer despesa adicional para mim que sou voluntário, sendo que os custos da coleta de sangue serão financiados pelo responsável desta pesquisa;
- Não haverá qualquer procedimento que possa causar em mim danos físicos ou financeiros;
- Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei contatar a equipe científica no número (016) 9155 2724 ou (016) 3301 6545 (Pâmela ou Haroldo);
- Para notificação de qualquer anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;
- Todas as informações acima foram a mim explicadas, verbal e detalhadamente, pelo pesquisador.

São José do Rio Preto, _____ de _____ de 200__.

Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira
Pesquisador Responsável

Pâmela Alegranci
Pós-Graduada responsável

Voluntário e/ou familiar do voluntário

ANEXO

Artigo submetido à revista *Archives of Medical Science* (índice de impacto 2,44).

Haptoglobin polymorphism correlated with coronary artery disease

Pâmela Alegranci¹, Luiz Carlos de Mattos², Moacir Fernandes de Godoy³, Haroldo Wilson Moreira¹

¹ Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP. ² Department of Molecular Biology, São José do Rio Preto University School of Medicine – FAMERP. ³ Department of Cardiology and Vascular Surgery, São José do Rio Preto University School of Medicine - FAMERP.

Corresponding author:

Pâmela Alegranci

Avenida Expedicionários do Brasil, 1621.

Araraquara, SP – Brazil

Zip code: 14 801 902

Phone: +55 16 3301 6545

Fax: +55 16 3301 6559

E-mail: palegranci@yahoo.com.br

Running head: Hp polymorphism correlated with CAD

Abstract

Introduction - The haptoglobin polymorphism has been correlated with diseases and some studies associate Hp² allele to the susceptibility or defense of the same ones.

Materials and Methods – Haptoglobin types and subtypes were analyzed by DNA amplification and enzyme restriction in 125 patients with coronary artery disease characterized by coronary angiography and 124 blood donors.

Results - The haptoglobin genotypes distribution in the analyzed groups showed prevalence of Hp²/Hp² followed by Hp²/Hp¹ and Hp¹/Hp¹, the allele frequency of Hp² was higher than Hp¹. The subtype Hp^{2FS}/Hp^{2FS} showed to be the prevalent for all groups and the less frequent among patients with CAD was Hp^{2FF}/Hp^{2FF} and among the blood donors was Hp^{1F}/Hp^{1S}. The subtypes allele frequencies presented higher prevalence for Hp^{2FS} and smaller for Hp^{2FF}, and the comparison among them evidenced significant statistical difference.

Conclusion - The subtype Hp^{2FF}/Hp^{2FF} showed to be the least frequent among the patients with CAD that wasn't observed among the blood donors, which can implicate this subtype as favorable the coronary artery disease, which has high mortality rate and a consequent decrease of individuals with CAD of the same among populations.

Key words: Haptoglobin polymorphism, coronary artery disease, blood donors, correlation polymorphism and disease, PCR - enzyme restriction.

Introduction

The haptoglobin polymorphism has been correlated with parasitic diseases, infectious diseases, obesity, diabetes, coronary artery disease (CAD), among others [1].

Some studies associate the Hp² allele with the susceptibility or sometimes with the protection against certain infectious and non-infectious diseases, according to Quaye [1] it seems to occur a selective advantage of this allele in various populations.

Our purpose in verifying possible correlations of haptoglobin types and subtypes in patients with CAD was basically motivated by the studies of Delanghe et al. [2,3], Golabi et al. [4], Bacquer et al. [5] who verified prevalence of one of haptoglobin types or one of the alleles with cardiovascular diseases, while other authors don't verify this correlation [6,7]. Thus, in this assignment we made the verification in patients with CAD and in blood donors, an attempt to correlate the haptoglobin genotypes and their allele frequencies with the susceptibility in developing CAD in a sample of Brazilian population.

Materials and Methods

Two groups were established by residents of São José do Rio Preto and surrounding, São Paulo State, Brazil, we analyzed 125 individuals classified by coronary angiography as patients with CAD and 124 blood donors. The Institutional Ethical Committee approved this study and the consent obtained from all participants. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes with use of the GE Healthcare kit [8]. The mixture reaction of the amplification was made in final volume of 50 µL containing 10 µL of buffer, 1,5 mM of MgCl₂, 10 mM of dNTPs, 5 U/µL of Go Taq DNA polymerase (Promega), 50-100 ng of DNA and 0,2 µmol/L of each primer of the groups A→B; E→D or C→F [9,10], as described below.

Primer A: 5'-gAggggAgCTTgCCTTTCCATTg-3'

Primer B: 5'-gAgATTTTTgAgCCCTggCTggT-3'

Primer C: 5'-CCTgCCTCgTATTAActgCACCAT-3'

Primer D: 5'-CCgAgTgCTCCACATAgCCATgT-3'

Primer D: 5'-gAggCgATgCCATgCAgCCTA-3'

Primer F: 5'-CATTCAggAAgTTTATCTCCA-3'

The amplification was realized by a previous denaturation of 95 °C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 minute, 69 °C (A→B) or 64 °C (E→D or C→F) for 2 minutes, 72 °C for 1 minute and a final extension of 72 °C for 7 minutes.

PCR products were digested with restriction enzyme Dral (Invitrogen), applied in electrophoresis in 1,5 % agarose gel, staining with ethidium bromide solution and identified by transillumination with ultraviolet light. The haptoglobin types and subtypes were verified in agreement with the size of fragments obtained (**Table I**).

Table I. Haptoglobin types and subtypes according to the fragments obtained in dependence of primers groups and restriction enzyme analysis with Dra I.

Primers Restriction	Size of fragment (pb)				Haptoglobin types (in bold type) and subtypes
A→B	3481				Hp²
	1757				Hp¹
A→B+Dral	-	930	788	39	Hp ^{1F}
A→B+Dral	1727	-	-	39	Hp ^{1S}
E→D	1465				Hp²
E→D+Dral	-	788	475	193	Hp ^{2SS} ou Hp ^{2SF}
E→D+Dral	1272	-	-	193	Hp ^{2FF} ou Hp ^{2FS}
C→F	1222				Hp²
C→F+Dral	1068	-	156	-	Hp ^{2FF} ou Hp ^{2SF}
C→F+Dral	-	927	156	139	Hp ^{2SS} ou Hp ^{2FS}

The allele frequencies were calculated generally for a system of two alleles, being the comparisons of the distributions and of the allele frequencies of the types and subtypes accomplished through the test of the qui-square (χ^2) among the analyzed groups ($\alpha \leq 0,05$) [11].

Results

In **figure 1** amplified products with the *primers* A → B that in dependence of the fragments observed could be initially characterized the genotypes Hp¹/Hp¹, Hp²/Hp¹, Hp²/Hp² and when didn't have amplification the Hp⁰/Hp⁰. The primers groups E → D and C → F allowed the characterization of Hp²/Hp². These amplifications were necessary for subsequent verification of haptoglobin subtypes (**Figure 2**). The subtypes of Hp² were correctly characterized by the association of fragments obtained with the primers E → D and C → F treated by the enzyme restriction DraI.

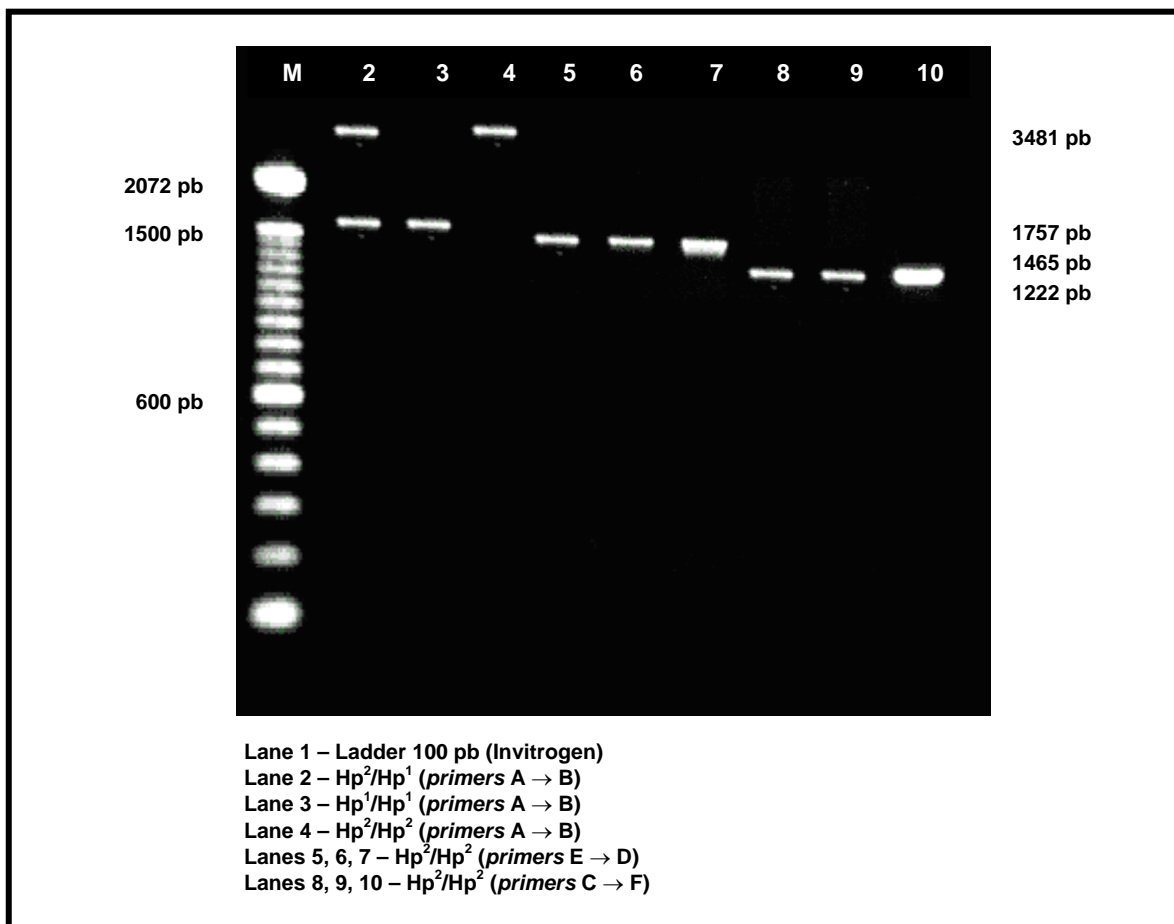


Figure 1. Amplification products with *primers* A → B, E → D and C → F.

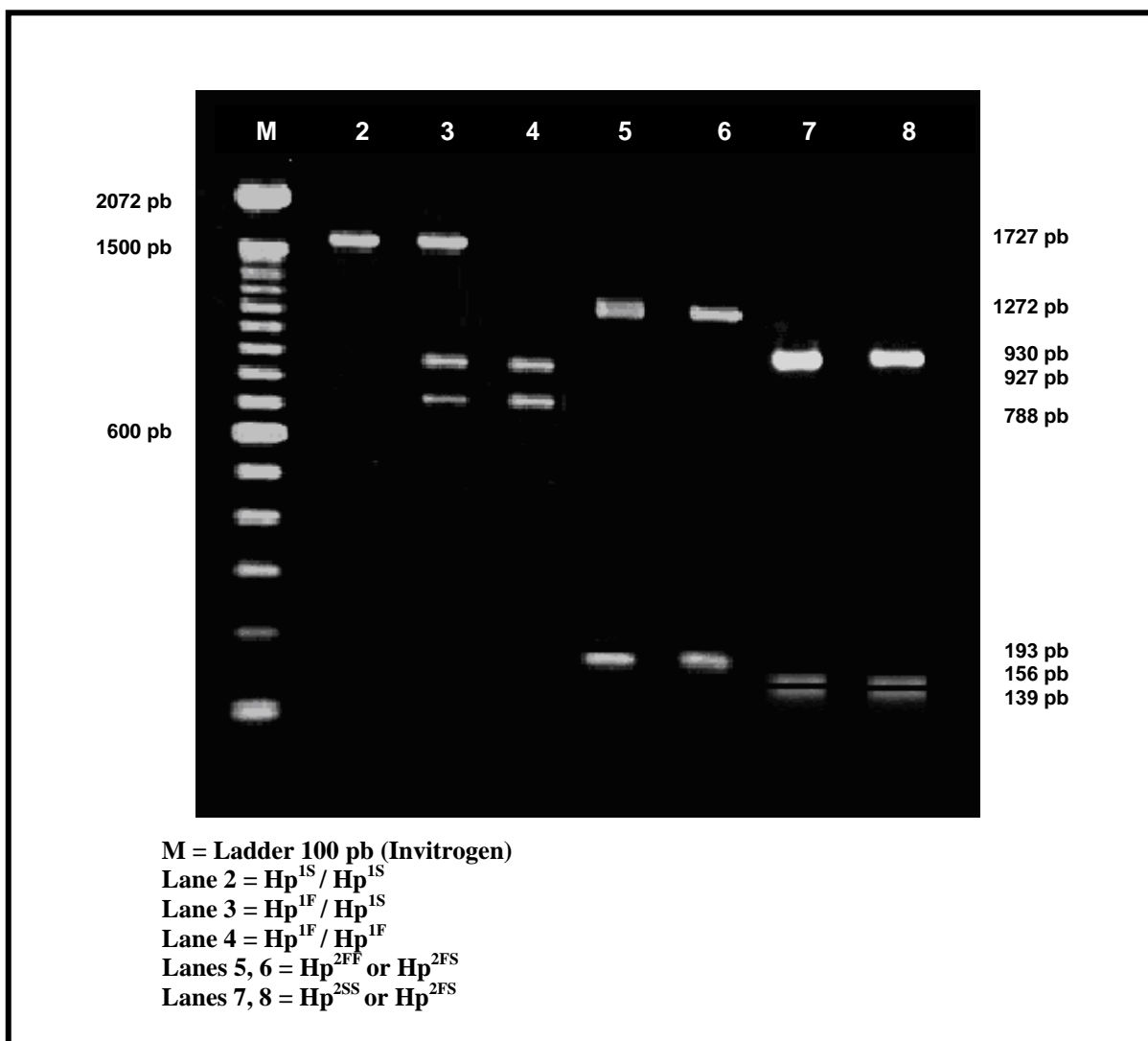


Figure 2. Restriction enzyme analysis with Dra I from amplifications products with *primers A → B* (lanes 2, 3 and 4), *primers E → D* (lanes 5 and 6) and *primers C → F* (lanes 7 and 8). Lanes 5 and 6, 7 and 8 have the same material allowing the correct characterization of subtypes.

The haptoglobin genotypes distribution observed among patients with CAD and blood donors (**Table II**) evidences for both groups and for the total group prevalence of Hp²/Hp² followed by Hp²/Hp¹ and Hp¹/Hp¹, and we also found inexpressive frequencies of Hp⁰/Hp⁰. The comparison among patients with CAD and blood donors, excluding the Hp⁰/Hp⁰, doesn't evidence significant statistical difference. The allele frequencies calculated from these results were similar for all of the groups, with prevalence for Hp² in relation to Hp¹.

Table II. Types distribution and allele frequencies of haptoglobin observed in patients with coronary artery disease and blood donors.

Types and allele frequencies	CAD		Blood donors		Total	
	n	%	n	%	n	%
Hp ¹ / Hp ¹	31	24,8	35	28,2	66	26,5
Hp ² / Hp ¹	44	35,2	36	29,0	80	32,1
Hp ² / Hp ²	48	38,4	50	40,3	98	39,4
Hp ⁰ / Hp ⁰	2	1,6	3	2,4	5	2,0
Total	125	100	124	100	249	100
Hp ¹		0,43		0,44		0,43
Hp ²		0,57		0,56		0,57

$$\chi^2_{(CAD:Blood\ donors)} = 1,067; P = 0,587 \text{ (ns)}$$

(ns) = no significant

The products amplified after restriction enzyme analysis with DraI made possible the verification of different haptoglobin subtypes. In **Table III** are presented the ones that we found expressive percentages for each group analyzed. Some other subtypes, different from those presented were observed, because of they small percentages were excluded of our results.

Table III. Subtypes distribution and allele frequencies of haptoglobin subtypes observed in patients with coronary artery disease and blood donors.

Subtypes and allele frequencies	CAD		Blood donors		Total	
	n	%	n	%	n	%
Hp ^{1S} / Hp ^{1S}	15	12,2	11	9,1	26	10,6
Hp ^{1F} / Hp ^{1F}	7	5,7	16	13,2	23	9,4
Hp ^{1F} / Hp ^{1S}	9	7,3	8	6,6	17	7,0
Hp ^{2FS} / Hp ^{1F}	24	19,5	13	10,7	37	15,2
Hp ^{2FS} / Hp ^{1S}	13	10,6	14	11,6	27	11,1
Hp ^{2FS} / Hp ^{2FS}	39	31,7	30	24,8	69	28,3
Hp ^{2FF} / Hp ^{2FF}	2	1,6	17	14,1	19	7,8
Total	109	100	109	100	218	100
Hp ^{1S}	0,24		0,20		0,22	
Hp ^{1F}	0,21		0,24		0,23	
Hp ^{2FS}	0,53		0,40		0,46	
Hp ^{2FF}	0,02		0,16		0,09	

χ^2 (subtypes CAD:Blood donors) = 20,519; P = 0,002 (*)

χ^2 (allele frequencies CAD:Blood donors) = 0,133; P = 1,000 (ns)

χ^2 (allele frequencies 2FS e 2FF CAD:Blood donors) = 4,923; P = 0,027 (*)

(ns) = no significant; (*) = significant

In **Table III**, Hp^{2FS}/Hp^{2FS} showed to be the prevalent for all of the groups, but the second in prevalence was Hp^{2FS}/Hp^{1F} for patients with CAD and Hp^{2FF}/Hp^{2FF} for the blood donors. The last one showed to be the smaller in expression among CAD

patients. The results comparison observed among the two groups analyzed evidenced significant statistical difference. The subtypes allele frequencies for the both groups presented higher prevalence for Hp^{2FS}, and the comparison among the groups didn't show significant statistical difference, however when we consider only the alleles Hp^{2FS} and Hp^{2FF} significant statistics difference was observed.

Discussion and conclusions

Our purpose in verifying possible correlations of haptoglobin types and subtypes in patients with CAD was motivated basically by studies of some authors that verified prevalence in one of haptoglobin types or one of allele frequency with cardiovascular diseases, while other authors don't verified this correlation.

Hong et al. [6] and Levy et al. [7] didn't find correlations of haptoglobin types with cardiovascular diseases, in the same way that Chapelle et al. [12] and Frohlander and Johnson [13] didn't observe correlations among types and allele frequency in individuals that had myocardial infarct. In turn, Golabi et al. [4] related the increasing of Hp¹ allele frequency in the coronary artery disease; De Bacquer et al. [5] verified the increase of Hp 1-1 phenotype in patients with risk factor in relation to the mortality caused by coronary artery disease; Delanghe et al. [2,3] observed Hp 2-2 increase in patients with peripheral arterial occlusive disease and didn't observed correlation among phenotypes distribution and neither in allele frequency with patients with essential arterial hypertension and Surya et al. [14] observed Hp 2-2 increase in essential hypertension.

Other authors [15,16,17,18] realized this type correlation in patients with others diseases which had as consequence cardiovascular disease, relating prevalence of Hp 2-2 in these individuals, suggesting this phenotype becomes, for example, the patients with diabetes more susceptible to cardiovascular diseases.

Densem et al. [19] observed patients that had been submitted to heart transplants and they compared with blood donors, but the results didn't show significant differences on phenotypes distribution among the analyzed groups. However, they relate that among transplanted individuals the largest frequency was Hp 2-1 phenotype, believing to be this phenotype an important prognostic for coronary diseases suggestive of transplant.

The groups analyzed in the present assignment were originated from the same place, in other words, a population with same anthropological origin and with the purpose of minimizing possible genetics variabilities in distribution of the polymorphism analyzed.

Our results regarding haptoglobin types and for allele frequency calculated from the same, reveal that Hp^2 was shown higher than Hp^1 for both analyzed groups, so wasn't possible to implicate one genotypes in correlation with the presence or absence of coronary artery disease.

Moreira and Naoum [20] verified haptoglobin phenotypes distribution in a population sample of the same area, they related higher frequency of Hp^2/Hp^1 , followed by Hp^2/Hp^2 and Hp^1/Hp^1 , that disagree with results observed in this assignment .

Other works realized in the same State in populations with similar characteristics as ours sometimes affirm higher prevalence of Hp^2/Hp^1 in a group considered normal [21,22], while in another verifies higher prevalence of Hp^2/Hp^2 [23].

Zaccariotto et al. [22] verified haptoglobin genotypes by molecular methodology, while the others realized other methodologies that probably could explain this discrepancy.

The haptoglobin subtype distribution showed that the most prevalent in all groups was represented by Hp^{2FS}/Hp^{2FS} . However, the second more prevalent varied in dependence of the analyzed group, for patients with CAD was Hp^{2FS}/Hp^{1F} , while for blood donors was Hp^{2FF}/Hp^{2FF} . We can emphasize the fact that the second in expression for blood donors was the smaller in percentage among patients with CAD. This distribution evidenced significant statistical difference revealing that the relationship among higher genotype in expression (Hp^{2FS}/Hp^{2FS}) and one in smaller expression (Hp^{2FF}/Hp^{2FF}) observed for patients with CAD is different from the observed for blood donors, which could imply the last one in a correlation with CAD. The allele frequencies calculation reveals prevalence for Hp^{2FS} allele for all groups, being smaller prevalence the Hp^{2FF} , but with percentages that among patients with CAD were much smaller than in blood donors, with significant statistical difference, that reinforces the implication of Hp^{2FF} in appearance of DAC.

These results agree with Koch [10] results that related in patients who had some adverse effect after coronary arteries intervention, higher frequency of Hp^{2FS} subtype and lower frequency of Hp^{2FF} subtype.

This allele, when homozygous, can have favored the CAD, a disease with higher mortality rate and with consequent decrease of carriers in the same populations. However, the attempt to make responsible one of haptoglobin genotypes in CAD defense or susceptibility it's still questionable and it could stay in the dependence of number of individuals analyzed.

Acknowledgments

We thank doctors and nurses of hemodynamic service of FUNFARME (São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil). Financial support from FUNDUNESP (0010507) and CNPq (134089/2006-5) (São Paulo State, Brazil).

References

1. Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102 (8): 735-42.
2. Delanghe J, Duprez D, De Buyzere M, Bergez B, Callens B, Leroux-Roels G. Haptoglobin polymorphism and complications in established essential hypertension. *J Hypertens* 1993; 11: 861-7.
3. Delanghe J, Langlois M, Duprez D, De Buyzere M, Clement D. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 1999; 145: 287-92.
4. Golabi P, Kshatriya GK, Kapoor AK. Association of genetic markers with coronary heart disease (myocardial infarction) - a case control study. *J Indian Med Ass* 1999; 97: 6-7.
5. De Bacquer D, De Backer G, Langlois M, Delanghe J, Kesteloot H, Kornitzer M. Haptoglobin polymorphism as a risk factor for coronary heart disease mortality. *Atherosclerosis* 2001; 157: 161-6.
6. Hong SH, Kang BY, Lim JH, et al. Haptoglobin polymorphism in Korean patients with cardiovascular diseases. *Hum Hered* 1997; 47: 283-7.
7. Levy AP, Larson MG, Corey D, Lotan R, Vita JA, Benjamin EJ. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. *Atherosclerosis* 2004; 172: 361-5.

8. Company GE. Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit. Buckinghamshire (UK): GE Healthcare; 2006. p. 14-8.
9. Koch W, Latz W, Eichinger M, et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 2002; 48: 1377-82.
10. Koch W, Latz W, Eichinger M, et al. Haptoglobin gene subtyping by restriction enzyme analysis. *Clin Chem* 2003; 49: 1937-40.
11. Scheffler WC. *Statistics for the biological sciences*. Massachusetts: Addison-Wesley; 1969. p. 93-7.
12. Chapelle JP, Albert A, Smeets JP, Heusghem C, Kulbertus HE. Effect of the haptoglobin phenotype on the size of the myocardial infarct. *N Engl J Med* 1982; 307: 457-63.
13. Frohlander N, Johnson O. Haptoglobin groups in acute myocardial infarction. *Hum Hered* 1989; 39: 345-50.
14. Surya PP, Padma T, Ramaswamy M. Haptoglobin patterns in essential hypertension and associated conditions – increased risk for Hp2-2. *Hum Hered* 1987; 37: 345-8.
15. Hochberg I, Roguin A, Nikolsky E, Chandrasekhar PV, Cohen S, Levy AP. Haptoglobin phenotype and coronary artery collaterals in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2002; 161: 441-6.
16. Roguin A, Koch W, Kastrati A, Aronson D, Schomig A, Levy AP. Haptoglobin genotype is predictive of major cardiac events in the 1-year period after percutaneous transluminal coronary angioplasty in individuals with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26 (9): 2628-31.
17. Levy AP. Haptoglobin: A major susceptibility gene for diabetic cardiovascular disease. *Isr Med Assoc J* 2004; 6: 308-10.
18. Suleiman M, Aronson D, Asleh R, et al. Haptoglobin polymorphism predicts 30-day mortality and heart failure in patients with diabetes and acute myocardial infarction. *Diabetes* 2005; 54 (9): 2802-6.
19. Densem CG, Wassel J, Cooper A, Yonan N, Brooks NH, Keevil B. Haptoglobin phenotype correlates with development of cardiac transplant vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 43-9.
20. Moreira HW, Naoum PC. Serum haptoglobin types in patients with hemoglobinopathies. *Hereditas* 1990; 113: 227-31.

21. Campregher PV, Lorand-Metze I, Grotto HZW, Sonati MF. Haptoglobins phenotypes in Brazilian patients with leukemia. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40: 307-9.
22. Zaccariotto TR, Rosim ET, Melo D, et al. Haptoglobin polymorphism in a HIV seropositive Brazilian population. *J Clin Pathol* 2006; 59: 550-3.
23. Grotto HZW, Kimura EM, Carneiro MV, Dezotti BHC, Gervasio SA. Subtipos de haptoglobina (Hp) na anemia ferropriva e β talassemia heterozigota (β tal hetero). *Rev Bras Pat Clin* 1994; 30 (2): 109.