



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME DA SILVA SILVESTRE

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VARIANTE 677C>T
(rs1801133) DO GENE *MTHFR* NA SUSCETIBILIDADE E
GRAVIDADE DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA
PERIFÉRICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS
SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

Londrina
2021

GUILHERME DA SILVA SILVESTRE

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VARIANTE 677C>T
(rs1801133) DO GENE *MTHFR* NA SUSCETIBILIDADE E
GRAVIDADE DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA
PERIFÉRICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS
SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão
Co-orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S587a Silvestre, Guilherme da Silva.

Avaliação do envolvimento da variante 677c>t (rs1801133) do gene mthfr na suscetibilidade e gravidade da doença arterial obstrutiva periférica e sua associação com os níveis séricos de homocisteína em uma população brasileira / Guilherme da Silva Silvestre. - Londrina, 2021.
76 f. : il.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.

Coorientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2021.

Inclui bibliografia.

1. doença arterial oclusiva periférica - Tese. 2. metilenotetrahidrofolato redutase - Tese. 3. homocisteína - Tese. 4. classificação de fontaine - Tese. I. Simão, Andréa Name Colado . II. Reiche, Edna Maria Vissoci . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 616-092

GUILHERME DA SILVA SILVESTRE

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VARIANTE 677C>T
(rs1801133) DO GENE *MTHFR* NA SUSCETIBILIDADE E
GRAVIDADE DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA
PERIFÉRICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS
SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado
Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 04 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e aos meus amigos pelo apoio e incentivo no cumprimento dessa importante fase da minha vida, especialmente à minha esposa, Gabriela Regina de Oliveira Silvestre, por ter sido uma fiel companheira durante toda essa longa jornada e ao meu pai, José Manoel da Silva Silvestre, que constantemente me encorajou a alcançar meus objetivos.

Uma menção especial à minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, que fez esse trabalho tornar-se realidade. Além de profissional extremamente capacitada, empenhada e determinada é igualmente paciente, generosa e humana, capaz de entender e respeitar as características individuais de seus alunos.

À Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, a quem tenho profundo respeito e admiração por toda sua trajetória profissional e pessoal. Continua demonstrando conhecimento imensurável e amor contagiante pela sua profissão.

À Dra. Tamires Flauzino, pelo auxílio com a análise estatística dos resultados.

À Iriana Moratto Carrara, pela participação fundamental na coleta de dados.

Aos professores e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da UEL, por todo suporte.

Ao Dr. Wander Eduardo Sardinha pelo incentivo à realização dessa etapa importante na minha formação.

À banca examinadora.

Aos pacientes que concordaram em participar desse estudo.

SILVESTRE, Guilherme da Silva. **Avaliação do envolvimento da variante 677C>T (RS1801133) do gene *MTHFR* na suscetibilidade e gravidade da doença arterial obstrutiva periférica e sua associação com os níveis séricos de Homocisteína em uma população brasileira.** 2021. 73 f. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Introdução: A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) consiste na redução do suprimento sanguíneo para os órgãos e tecidos dos membros inferiores. A aterosclerose é responsável pela fisiopatologia da maioria dos casos de DAOP e a hiperhomocisteinemia (HHcy) é um fator de risco, podendo, esta, estar associada à variante 667C>T (rs1801133) do gene *MTHFR* que codifica a enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). **Objetivo:** Avaliar o envolvimento da variante 677C>T (rs1801133) do gene *MTHFR* na suscetibilidade e gravidade da DAOP, bem como sua associação com os níveis séricos de homocisteína (Hcy) em uma população brasileira. **Sujeitos e Métodos:** Estudo caso-controle com 157 pacientes diagnosticados com DAOP atendidos no Ambulatório de Angiorradiologia e Cirurgia Endovascular do Hospital Universitário de Londrina (HU), Paraná, Brasil, e 113 indivíduos saudáveis não aparentados (sem DAOP) atendidos no Hemocentro Regional de Londrina, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos. O diagnóstico de DAOP foi confirmado pelo índice tornozelo-braço (ITB) inferior a 0,9. A gravidade clínica dos pacientes com DAOP foi avaliada de acordo com a classificação de Fontaine e as categorias anatomorradiológicas pelo *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease* (TASC). A genotipagem da variante 677C>T do *MTHFR* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real e os níveis de Hcy, vitamina B12 e folato foram determinados por ensaio quimioluminescência em micropartículas. **Resultados:** Os pacientes com DAOP apresentaram maiores níveis de Hcy do que os controles ($p < 0,020$). No entanto, os níveis de Hcy não diferiram de acordo com a classificação de Fontaine ($p = 0,257$) e de TASC ($p = 0,678$). A frequência alélica e genotípica da variante 677C>T do *MTHFR* não diferiu entre os pacientes com DAOP e controles nos diferentes modelos genéticos avaliados. Não houve diferença na gravidade clínica ($p = 0,716$ e $p = 0,548$) e na extensão anatomorradiológica da doença ($p = 0,610$ e $p = 0,544$), de acordo com os genótipos avaliados nos modelos dominante e recessivo, respectivamente. No entanto, pacientes com DAOP portadores dos genótipos CT+TT (modelo dominante) apresentaram níveis aumentados de Hcy comparados com pacientes portadores do genótipo CC ($p = 0,008$), independentemente de fatores confundidores como sexo, etnia, idade, índice de massa corpórea (IMC), níveis de folato e vitamina B12 e dislipidemia. Esse dado foi corroborado pelo achado em pacientes com o genótipo TT (modelo recessivo) que também apresentaram níveis superiores de Hcy quando comparados aos genótipos CC+CT, independentemente das mesmas variáveis confundidoras avaliadas. **Conclusões:** A presença do alelo T da variante 677C>T do *MTHFR* foi associada à HHcy nos pacientes com DAOP, e não no grupo controle. Além disso, essa variante genética não foi associada aos diferentes estágios clínicos e anatomorradiológicos da DAOP. Nossos dados sugerem uma possível interação entre o alelo T da variante

677C>T do *MTHFR* e outros fatores genéticos, epigenéticos ou ainda ambientais associados à DAOP na modulação do metabolismo da Hcy nesses pacientes.

Palavras-chave: doença arterial oclusiva periférica; metilenotetrahidrofolato redutase; variante genética 677C>T; homocisteína; classificação de fontaine.

SILVESTRE, Guilherme da Silva. **Evaluation of 677C>T variant (1801133) of the *MTHFR* gene with the susceptibility and severity of the peripheral artery disease and its association with homocysteine levels in a brazilian population.** 2021. 73 f. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Introduction: Chronic peripheral arterial occlusive disease (PAOD) is a reduction in blood supply to the organs and tissues of the lower limbs. Atherosclerosis is responsible for the pathophysiology of most of the PAOD cases. Hiperhomocysteinemia (HHcy) is a non-classical risk factor for PAOD and may be associated with the 677C>T (rs1801133) variant of the *MTHFR* gene that encodes 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Objective:** To evaluate the involvement of the 677C>T (rs1801133) variant of *MTHFR* in the susceptibility and severity of PAOD, as well as its association with serum levels of homocysteine (Hcy) in the Brazilian population. **Subjects and Methods:** Case-control study with 157 patients diagnosed with PAOD enrolled at Outpatient Clinic of Angioradiology and Endovascular Surgery at the University Hospital of Londrina (HU), Brazil, and 113 healthy unrelated individuals (without PAOD) attended at the Londrina Regional Blood Center, of both sexes, aged between 18 and 70 years old. Diagnosed of PAOD was confirm with ankle-brachial index (ABI) lower than 0,9. The clinical severity was evaluated by Fontaine's classification and the anatomoradiological stages were assessed according to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC) classification. Genotyping of the *MTHFR* 677C>T variant was performed by real-time polymerase chain reaction and the levels of Hcy, vitamin B12 and folate were determined by microparticle chemiluminescence assay. **Results:** PAOD patients had higher levels of Hcy than controls ($p < 0.020$). However, in PAOD group, the Hcy did not differ according to Fontaine ($p = 0.257$) and TASC ($p = 0.678$) classifications. The allelic and genotypic frequency of the 677C>T variant of *MTHFR* did not differ between PAOD and control group in the different genetic models. There was no difference in disease severity ($p = 0.716$ and $p = 0.548$) and in the anatomoradiological stages ($p = 0.610$ and $p = 0.544$), according to genotypes in the dominant and recessive models respectively. However, patients with PAOD carrying the CT + TT genotypes (dominant model) showed higher Hcy levels than those carrying the CC genotype ($p = 0.008$), regardless confounding factors, such as sex, age, ethnicity, body mass index (BMI), folate and vitamin B12 levels. This result was corroborated by the finding that patients with the TT genotype (dominant model) also showed higher levels of Hcy than those with CC+CT genotypes, in despite of the same confounding variables. **Conclusions:** In conclusion, T allele of 677C>T *MTHFR* variant was associated with HHcy in PAOD patients, but not in controls. In addition, this variant was not associated with the clinical stage and the anatomoradiological categories of PAOD. Our data suggested a possible interaction between *MTHFR* 677C>T variant and a presence of other genetic, epigenetic and environment factors associated with PAOD on modulation of metabolism of Hcy.

Key Words: peripheral arterial occlusive disease; methylenetetrahydrofolate reductase; 677C>T genetic variant; homocysteine; fontaine classification.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Categorização dos pacientes diagnosticados com DAOP de acordo com as classificações de Fontaine e Rutherford14
- Quadro 2** – Valores de ITB para diagnóstico e classificação da gravidade da DAOP15

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fisiopatologia da DAOP	17
Figura 2 – Metabolismo da homocisteína e os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da aterogênese e da trombogênese	18
Figura 3 – As vias de remetilação e de transulfuração no metabolismo da homocisteína	20
Figura 4 – Representação esquemática de 41 variantes no gene <i>MTHFR</i> de acordo com sua localização na sequência de pares de bases (pb) no DNA humano.....	24
Figura 5 – Variações de um único nucleotídeo no gene <i>MTHFR</i> e a atividade enzimática da MTHFR associada às duas variantes mais comuns no gene <i>MTHFR</i>	25
Figura 6 – Classificação da DAOP no segmento aortoilíaco conforme <i>Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)</i>	28
Figura 7 – Classificação da DAOP no segmento infrainguinal conforme <i>Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
Ala	Alanina
ATP	Angioplastia transluminal percutânea
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
BHMT	Betaína-homocisteína metiltransferase
CBS	Cistationina beta-sintase
CI	Claudicação intermitente
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica crônica
DFA	Dinucleotídeo flavina/adenina
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMG	Dimetilglicina
ET-1	Endotelina-1
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hcy	Homocisteína
Hhcy	Hiperhomocisteinemia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HU	Hospital Universitário de Londrina
IC	Intervalo de confiança
IIQ	Intervalo interquartil
IMC	Índice de massa corporal
ITB	Índice de pressão tornozelo-braço
kb	Kilobases
kD	Kilodalton
LIPAD	<i>Linz Peripheral Aterial Disease</i>
OD	<i>Odds ratio</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
Met	Metionina
MMII	Membros inferiores
MS	Metionina sintetase
MTHFR	Enzima metilenotetrahydrofolato redutase
NO	Óxido nítrico

PGI2	Prostaciclina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
THF	Tetrahidrofolato
TXA2	Tromboxano A2
Val	Valina
Vit B12	Vitamina B12
Vit B6	Vitamina B6
5,10-metilenoTHF	5,10-metilenotetrahidrofolato
5-metilTHF	5-metiltetrahidrofolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA	12
1.1.1	Aspectos Gerais e Epidemiológicos	12
1.1.2	Diagnóstico da Doença Arterial Obstrutiva Periférica	13
1.1.3	Etiopatogenia da Doença Arterial Obstrutiva Periférica	16
1.1.3.1	Variante genética 677C>T do <i>MTHFR</i> , Hiperhomocisteinemia e doença arterial obstrutiva periférica.....	22
1.1.4	Tratamento da Doença Arterial Obstrutiva Periférica	27
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM	33
4.3	COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAL	33
4.4	ANÁLISE DA VARIANTE 677C>T DO GENE <i>MTHFR</i>	34
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	36
6	CONCLUSÕES	58
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICES	66
	APÊNDICE A	67
	ANEXOS	69
	ANEXO A	70

1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA

4

5 1.1.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos

6

7 A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) consiste na redução do aporte
8 sanguíneo para os órgãos e tecidos dos membros inferiores (MMII), sendo resultado
9 da redução ou, até mesmo, oclusão da luz do vaso. Apresenta caráter progressivo,
10 com a instalação da doença já nas primeiras décadas de vida; porém, o surgimento
11 dos sintomas ocorre, na maioria dos casos, após a quinta década de vida
12 (ABOYANS *et al.*, 2018). As manifestações clínicas ocorrem conforme a localização
13 e a extensão da lesão arterial. Os tecidos supridos pelos vasos doentes sofrem
14 graus variados de isquemia e, por consequência, apresentam quadros clínicos
15 distintos, podendo variar desde pacientes assintomáticos até casos com presença
16 de gangrenas extensas e necessidade de amputação do membro (CAMPIA *et al.*,
17 2019). A aterosclerose é o principal fator para o desenvolvimento da DAOP e
18 acomete, além dos vasos dos MMII, as artérias coronarianas e intracranianas, sendo
19 a principal causa de morte e incapacidade no mundo ocidental (KATSIKI *et al.*,
20 2017).

21 A prevalência da DAOP é de difícil determinação, visto que a maioria dos
22 pacientes permanecem assintomáticos por longos períodos, sendo assim,
23 subestimada (PASTORI *et al.*, 2020). O estudo *Inter-Society Consensus for the*
24 *Management of Peripheral Arterial Disease* (TASC II) verificou que a prevalência da
25 DAOP na população mundial com idade superior a 70 anos era de 20,0%
26 (NORGREN *et al.*, 2007). Estima-se que a DAOP tenha acometido, em todo o
27 mundo, cerca de 200 milhões de indivíduos no ano de 2010 e, aproximadamente,
28 236 milhões no ano de 2015 (SONG *et al.*, 2019). No Brasil, um estudo transversal
29 multicêntrico realizado em 72 centros participantes do Projeto Corações do Brasil
30 avaliou a prevalência de DAOP em 1.159 pessoas com mais de 18 anos (média de
31 43,8 anos) pela medida do índice de pressão tornozelo-braço (ITB), considerando-a
32 presente caso esse índice fosse menor do que 0,90. A prevalência da doença foi de
33 10,5%, e, desses pacientes, apenas 9,0% apresentavam o sintoma de claudicação
34 intermitente (MAKDISSE *et al.*, 2008).

1

2 1.1.2 Diagnóstico da Doença Arterial Obstrutiva Periférica

3

4 Classicamente, o diagnóstico da DAOP é clínico. Os sinais e sintomas que
5 apresentam maior acurácia são a presença de claudicação intermitente (CI), pelo
6 menos um dos pulsos (femoral, poplíteo, tibial anterior e tibial posterior) dos MMII
7 ausentes ou diminuídos e a presença de sopro no trajeto das artérias femorais.
8 Esses conceitos foram reafirmados nos últimos consensos Europeu (ABOYANS *et*
9 *al.*, 2018) e Americano (CONTE *et al.*, 2019) sobre DAOP.

10 Os pacientes com DAOP podem ser assintomáticos ou sintomáticos.
11 Embora os primeiros ainda não apresentem nenhum sintoma da doença, já é
12 possível identificar os sinais da doença instalada, tais como ausência ou redução
13 dos pulsos nos MMII, presença de sopro no trajeto das artérias femorais, a
14 visualização das placas de ateroma por meio de exames de imagem e a presença
15 do ITB menor do que 0,9.

16 Já o grupo dos pacientes sintomáticos apresenta sinais e sintomas
17 resultantes da perfusão tecidual inadequada por um período prolongado. O sintoma
18 mais frequente da DAOP é a CI, na qual o paciente apresenta dor muscular de forte
19 intensidade no território referente à artéria doente, que é desencadeada pela
20 deambulação, e apresenta resolução do quadro com a interrupção da marcha. Esse
21 quadro é resultante da incapacidade do sistema arterial em suprir a demanda de
22 sangue/oxigênio que foi gerada com o início do trabalho muscular durante a marcha.
23 Com a progressão da doença obstrutiva os pacientes reduzem a distância da
24 marcha, passando a apresentar dor isquêmica mesmo em repouso. Nos estágios
25 mais avançados, os pacientes apresentarão lesões tróficas (úlceras e necrose) com
26 elevado risco de perda do membro (ABOYANS *et al.*, 2018; CONTE *et al.*, 2019).

27 Com a finalidade de homogeneizar as categorias clínicas e,
28 consequentemente, padronizar as condutas, os pacientes com DAOP são
29 classificados de acordo com o que foi proposto por Fontaine e por Rutherford
30 (Quadro 1) (CONTE *et al.*, 2019).

31

32

- 1 **Quadro 1** – Categorização dos pacientes diagnosticados com DAOP de acordo com
2 as classificações de Fontaine e Rutherford

CLASSIFICAÇÃO DE FONTAINE	CLASSIFICAÇÃO DE RUTHERFORD
Estágio I Assintomático	Categoria 0 Assintomático
Estágio II a) Claudicação intermitente não limitante	Categoria 1 Claudicação leve
	Categoria 2 Claudicação moderada
Estágio II b) Claudicação intermitente limitante	Categoria 3 Claudicação grave
Estágio III Dor isquêmica em repouso	Categoria 4 Dor em repouso
Estágio IV Lesões tróficas	Categoria 5 Lesão trófica pequena
	Categoria 6 Necrose extensa

- 3 **Fonte:** Adaptado de Presti e colaboradores (2015)

4 Como ferramenta auxiliar no diagnóstico e na classificação da gravidade da
5 DAOP, pode-se utilizar o ITB. Esse exame consiste na aferição das pressões
6 sistólicas no tornozelo (artéria tibial anterior e artéria tibial posterior) e na artéria
7 braquial, com o uso de um ultrassom portátil de ondas contínuas. Após as aferições,
8 é realizada a divisão da maior pressão sistólica obtida no membro inferior a ser
9 estudado pela maior pressão sistólica obtida em ambos os membros superiores
10 (ABOYANS *et al.*, 2018). O resultado obtido é interpretado conforme apresentado no
11 Quadro 2.

12

13

14

15

16

17

18

19

1 **Quadro 2** – Valores de ITB para diagnóstico e classificação da gravidade da DAOP

ITB	Gravidade da DAOP	Alteração
0,9 a 1,3	Normal	-
0,7 a 0,9	Leve	Claudicação
0,4 a 0,89	Moderada	Dor em repouso
Menor do que 0,4	Grave	Gangrena
Maior do que 1,3	-	Não compressível

2 **Fonte:** Adaptado de Pimenta e colaboradores (2016)

3 Além dos métodos já citados, para realizar a avaliação anatômica acurada e,
 4 conseqüentemente, o planejamento da revascularização do membro, faz-se o uso
 5 de exames de imagem, sendo os mais utilizados a ecografia vascular com *doppler*, a
 6 angiotomografia, a angiorressonância e a arteriografia, essa considerada o padrão
 7 ouro (CONTE *et al.*, 2019).

8 A DAOP é uma doença complexa que envolve a aorta abdominal infrarrenal e
 9 as artérias distais à bifurcação da aorta de maneira não uniforme, e alguns estudos
 10 sugerem que o prognóstico dos pacientes com DAOP varia de acordo com a
 11 extensão e a localização da doença (ABOYANS *et al.*, 2007; DIEHM *et al.*, 2006).

12 Segundo Chen e colaboradores (2013), dois amplos subtipos de DAOP,
 13 proximal e distal, estão associados a fatores de risco e perfis de comorbidade
 14 distintos. Sexo feminino, tabagismo, hipertensão, dislipidemia, doença
 15 cardiovascular e doença pulmonar obstrutiva crônica foram significativamente
 16 associados com a doença proximal, enquanto idade avançada, sexo masculino,
 17 *diabetes mellitus* (DM), insuficiência cardíaca e isquemia crítica de membro foram
 18 associados de forma significativa com a doença distal. Estes autores verificaram que
 19 os pacientes com doença distal tinham pior prognóstico em comparação com
 20 pacientes sem doença distal, independente de idade, sexo, comorbidades, do uso
 21 de hipolipemiantes e antiagregantes plaquetários e do ITB em repouso. De maneira
 22 similar, as estenoses e/ou oclusões mais longas ou em maior quantidade estão
 23 associadas à evolução desfavorável da doença, principalmente quando há
 24 necessidade de revascularização do membro (NORGREN *et al.*, 2007).

25

26

1 1.1.3 Etiopatogenia da Doença Arterial Obstrutiva Periférica

2

3 A redução da luz arterial pode ser desencadeada por diferentes etiologias.
4 Vasculites, aneurismas e compressões extrínsecas são responsáveis por um
5 pequeno número de casos, porém o desenvolvimento de placas de ateroma,
6 resultado da etiopatogenia da aterosclerose, é a principal causa de DAOP em todo o
7 mundo (CONTE *et al.*, 2019).

8 A aterosclerose é uma doença sistêmica que acomete, preferencialmente,
9 artérias de médio e grande calibres. O seu desenvolvimento resulta da interação
10 entre os fatores de risco, adquiridos e/ou hereditários, e o endotélio vascular
11 (CHACRA; SANTOS-FILHO, 2016). O endotélio saudável é fundamental na
12 manutenção da homeostasia arterial, regulando a produção de agentes
13 vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), e vasopressores
14 como o tromboxano A₂ (TXA₂), a endotelina-1 (ET-1) e ânions superóxido e, em
15 condições fisiológicas, a produção dos agentes vasodilatadores é superior à dos
16 agentes vasopressores. Com a instalação das placas de ateroma, este equilíbrio é
17 alterado e a produção dos vasopressores supera a dos vasodilatadores,
18 comprometendo a perfusão dos tecidos supridos por esses vasos. Com a
19 progressão da doença, a luz arterial residual torna-se cada vez menor e os
20 estímulos vasopressores mais acentuados, fazendo com que o paciente,
21 inicialmente assintomático, desenvolva os sintomas relacionados à doença (CAMPPIA
22 *et al.*, 2019). A Figura 1 sumariza a fisiopatologia da DAOP.

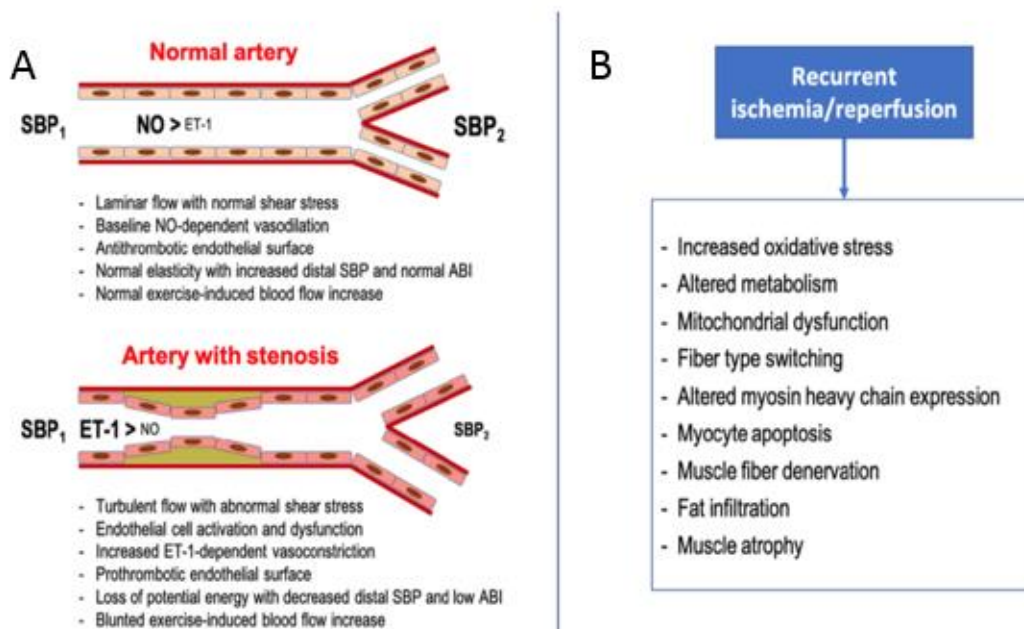
23 Tabagismo, DM, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia são,
24 classicamente, os fatores de maior relevância para a aterosclerose. Outras
25 condições como idade avançada, obesidade e síndrome metabólica também já
26 estão bem estabelecidas. O manejo adequado desses fatores é fundamental para a
27 prevenção, para o controle da doença já instalada e para o sucesso do tratamento
28 (CONTE *et al.*, 2019; DOSLUOGLU, 2016). Visto a fundamental importância dos
29 fatores de risco para a instalação da aterosclerose e, conseqüentemente, para o
30 desenvolvimento da DAOP, discute-se a participação de outras condições que
31 favoreçam o surgimento e a progressão da doença.

32

33

34

1

2 **Figura 1 – Fisiopatologia da DAOP**

3

4 **A)** Na artéria normal, o endotélio saudável mantém a homeostasia arterial por meio do
 5 equilíbrio na produção de óxido nítrico (NO) e endotelina-1 (ET-1). Durante a realização de
 6 atividade física há uma vasodilatação fisiológica, permitindo aumento significativo do fluxo
 7 sanguíneo para suprir o aumento na demanda gerada pelo esforço físico. Na presença da
 8 aterosclerose, há uma ativação inadequada do endotélio, levando à sua disfunção, gerando
 9 uma vasoconstrição basal, mediado pela ET-1, e um estado pró-trombótico. Os efeitos
 10 hemodinâmicos da estenose incluem a geração de um fluxo turbilhonado, tensão de
 11 cisalhamento anormal e perda de energia potencial determinando a queda da pressão
 12 arterial sistólica nas artérias do tornozelo e, conseqüentemente, redução do índice
 13 tornozelo-braço. Durante o exercício, a incapacidade de aumentar o fluxo sanguíneo,
 14 causado pela estenose, leva ao quadro de isquemia muscular. **B)** Efeitos dos ciclos
 15 recorrentes de isquemia e reperfusão nos músculos esqueléticos dos membros inferiores
 16 com doença arterial obstrutiva periférica. ABI: índice tornozelo-braço; ET-1: endotelina-1;
 17 NO: óxido nítrico; SBP: pressão arterial sistólica.

18 **Fonte:** Campia e colaboradores (2019)

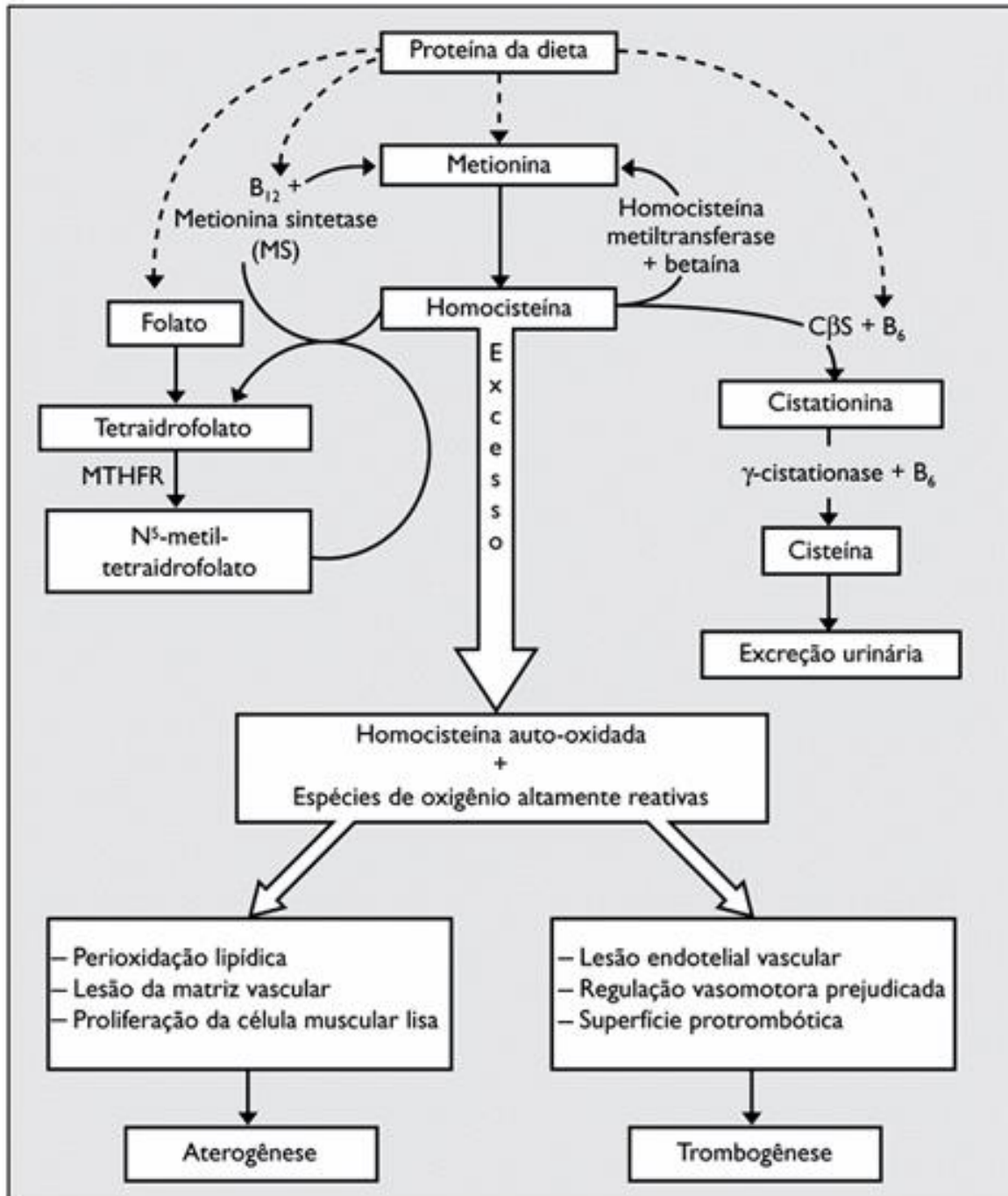
19

20 Alguns ensaios clínicos apontam que concentrações plasmáticas elevadas
 21 de homocisteína (Hcy) de jejum é um fator de risco independente para a
 22 aterosclerose, favorecendo a aterogênese e a trombogênese (figura 2) (DEMIRCI *et*
 23 *al.*, 2019; PIAZZOLLA *et al.*, 2019). A Hcy é um aminoácido essencial obtido
 24 exclusivamente pela dieta e é um produto intermediário da conversão da metionina
 25 (Met) em cisteína (Cys). No plasma, a Hcy apresenta as seguintes conformações:
 26 ligada à albumina por pontes dissulfeto (S-homocisteinilação), correspondendo a
 27 cerca de 70% dos valores plasmáticos; ligada a compostos tióis de baixo peso

1 molecular, formando homodímeros com outro resíduo de Hcy (homocistina) ou
 2 heterodímero com um outro composto tiol; na sua forma livre, reduzida (Hcy
 3 reduzida) (GANGULY; ALAM, 2015).

4

5 **Figura 2** – Metabolismo da homocisteína e os mecanismos relacionados ao
 6 desenvolvimento da aterogênese e da trombogênese.



7

8 Cistationina beta-sintase (CBS); Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR); Vitamina B6
 9 (Vit B6); Vitamina B12 (Vit B12)

10 **Fonte:** Neves; Macedo; Lopes (2004)

1

2 A Hcy pode ser metabolizada por duas vias, a via de transulfuração ou a de
3 remetilação. Praticamente todas as células do organismo realizam a remetilação,
4 enquanto a transulfuração é feita apenas por células hepáticas, renais, pancreáticas
5 e do intestino delgado (ESSE *et al.*, 2019). Na vigência de dietas ricas em proteína
6 animal, contendo Met, cerca de 70% da Hcy é catabolizada pela enzima cistationina
7 beta-sintase (CBS), via transulfuração. Já nos pacientes que recebem quantidade
8 limitada de proteína ou estão sob jejum, a via da remetilação é mais ativa e apenas
9 10% da Hcy é metabolizada pela CBS. Justifica-se, assim, o fato de quantidades
10 excessivas de Met não levarem a um aumento da Hcy nos pacientes com alteração
11 da via de remetilação ou com deficiência nos níveis de folato e/ou cobalamina
12 (NEVES; MACEDO; LOPES, 2004). A transulfuração é um processo irreversível
13 onde a Hcy é catalisada pela CBS, tendo como cofator o fosfato de piridoxal (forma
14 ativa da vitamina B6), formando a cistationina (ESSE *et al.*, 2019).

15 O processo de remetilação pode ocorrer por duas vias distintas, cada uma
16 com sua respectiva enzima. Na via da betaína-homocisteína metiltransferase
17 (BHMT), catalisada por essa enzima e que ocorre apenas nos rins e no fígado, a
18 betaína consiste no grupo doador de metilo para formar Met e dimetilglicina (DMG).
19 Já na via da metionina sintetase (MS), há dependência do substrato 5-
20 metiltetrahydrofolato (5-metilTHF), proveniente da metabolização do 5,10-
21 metiltetrahydrofolato (5,10-metilenoTHF) pela enzima metileno-tetrahydrofolato
22 redutase (MTHFR). Na presença de 5-metilTHF e da vitamina B12 (cofator da MS), a
23 MS catalisa a transferência do grupo metilo do 5-metilTHF para a Hcy, dando origem
24 a Met e ao tetrahydrofolato (THF), fazendo parte do processo conhecido como ciclo
25 dos folatos (ESSE *et al.*, 2019). A Figura 3 ilustra as vias de remetilação e de
26 transulfuração da Hcy com a participação da MTHFR.

27

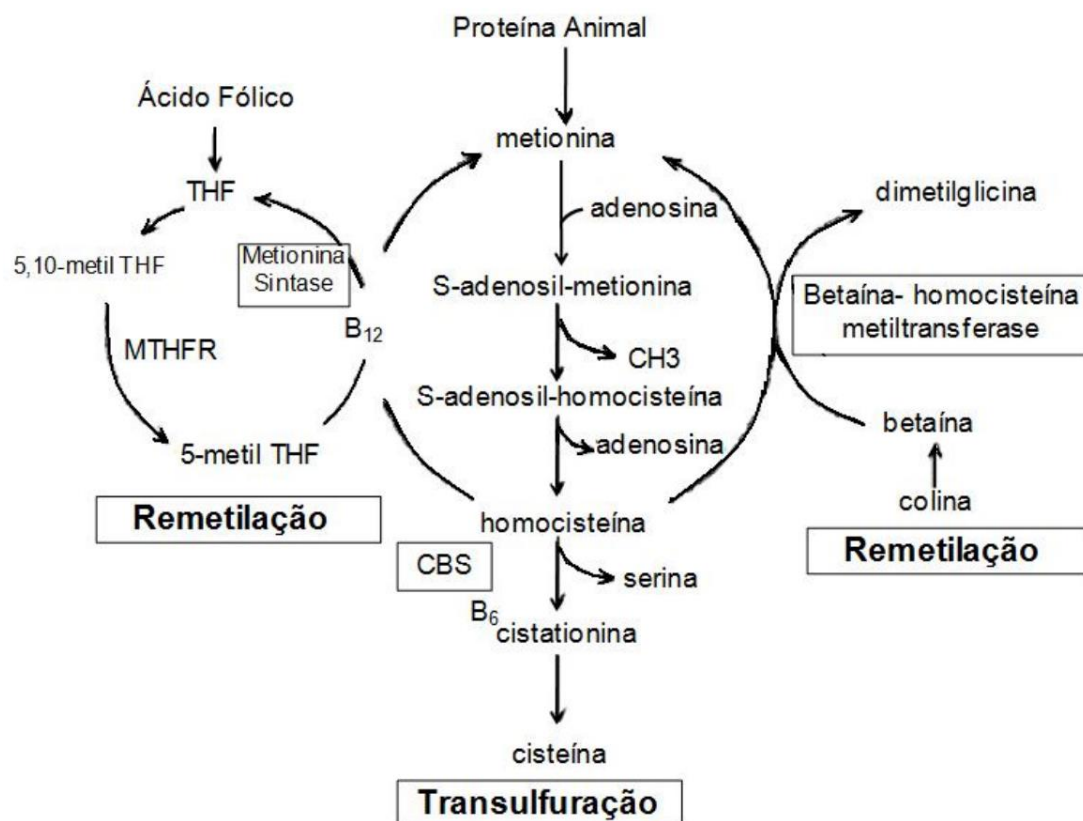
28

29

30

31

1 **Figura 3** – Vias de remetilação e de transulfuração no metabolismo da homocisteína



2

3 Metabolismo da homocisteína. A homocisteína (Hcy) é originada a partir da metionina
 4 adquirida pela dieta contendo proteína animal. Depois de formada, a Hcy pode ser
 5 metabolizada por duas vias. Na via da remetilação, a Hcy é catalisada pela metionina
 6 sintase (MS) ou através da betaína-homocisteína metiltransferase. Na via da transulfuração
 7 a Hcy é catalisada pela cistationina beta-sintase (CBS), levando à formação de cisteína, de
 8 maneira irreversível e, utiliza a vitamina B6 (B6) como co-fator. Na via dependente da MS o
 9 ácido fólico é utilizado para a formação do substrato 5-metiltetrahydrofolato (5-metilTHF), e a
 10 vitamina B12 (Vit B12) é o co-fator da reação. Alterações no funcionamento da enzima
 11 metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) reduzem a produção do substrato 5-metilTHF,
 12 fazendo com que a Hcy não seja metabolizada de maneira adequada.

13 **Fonte:** Adaptado de Haynes (2002)

14

15 Diante do exposto anteriormente, observa-se que os níveis de Hcy podem
 16 ser alterados por diversos mecanismos, sejam eles ambientais e/ou
 17 comportamentais ou genéticos. A definição precisa de hiperhomocisteinemia (HHcy)
 18 pode variar de acordo com alguns autores, mas a maioria deles adotam os seguintes
 19 critérios: valores entre 5 e 15 micromol/L são normais, entre 16 e 30 micromol/L
 20 correspondem a uma HHcy discreta, entre 31 e 100 micromol/L indicam uma HHcy
 21 moderada e valores superiores a 100 micromol/L são indicativos de HHcy grave. Os
 22 valores são referentes ao valor da Hcy total, com o exame realizado em jejum e
 23 usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (GANGULY;
 24 ALAM, 2015; JAISSON *et al.*, 2020). As formas mais frequentes de HHcy

1 compreendem as relacionadas a fatores genéticos e ambientais, determinando uma
2 doença de leve à moderada intensidade. No entanto, de forma mais rara, algumas
3 variações genéticas podem resultar em uma forma grave da doença (GANGULY;
4 ALAM, 2015).

5 As variações genéticas provocam alteração no funcionamento de algumas
6 das enzimas que participam no metabolismo da Hcy. As enzimas afetadas, de
7 acordo com cada variação, são a MTHFR, a MS e a CBS. Dessas, a que apresenta
8 a maior frequência em diferentes populações mundiais, é a substituição pontual de
9 uma Citosina (C) por uma Timina (T) no nucleotídeo 677 na região codificadora do
10 gene *MTHFR* e, normalmente, resulta em HHcy de graus discreto e moderado.
11 Enquanto isso, a variação homozigótica da CBS é a alteração mais frequente
12 associada à forma grave da doença, incluindo os casos de homocistinúria
13 (GANGULY; ALAM, 2015).

14 A HHcy também pode estar associada à deficiência de vitamina B12 (Vit
15 B12), vitamina B6 (Vit B6) e de folato e, a reposição desses reduz os seus níveis
16 (ZHANG *et al.*, 2012). No entanto, diversos ensaios clínicos demonstraram que a
17 redução dos níveis séricos de Hcy pela suplementação vitamínica não é eficaz na
18 redução do risco cardiovascular (CONTE *et al.*, 2019; MARTÍ-CARVAJAL *et al.*,
19 2017; VITATOPS *et al.*, 2010).

20 Os mecanismos pelos quais a redução dos níveis de Hcy, após a
21 suplementação dietética, não reduzem o risco de um evento cardiovascular ainda
22 não foram esclarecidos. Uma possível explicação para esse fato é que o
23 metabolismo da Hcy é regulado por diversos fatores, dentre eles, o adequado
24 funcionamento da enzima MTHFR (GANGULY; ALAM, 2015; PIAZZOLLA *et al.*,
25 2019). Dessa forma, variações genéticas, como, por exemplo, a variante 677C>T do
26 gene que codifica essa enzima, podem estar relacionadas ao aumento nos níveis de
27 Hcy e, também, ao desenvolvimento da aterosclerose e da DAOP (LIEW; GUPTA,
28 2015; MADLOOL; AL-BARQAAWI; BAQIR, 2019).

29 A fisiopatogenia da lesão vascular determinada pela HHcy envolve a lesão
30 celular do endotélio, o crescimento da musculatura lisa vascular, a maior
31 adesividade plaquetária, a auto-oxidação, a geração de espécies reativas de
32 oxigênio (EROs), a modificação pós-translacional de proteínas, o aumento da
33 oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol e de sua deposição na
34 parede vascular e a ativação direta da cascata de coagulação (ESSE *et al.*, 2019;

1 NEVES; MACEDO; LOPES, 2004). Segundo Neves e colaboradores (2004), a HHcy
2 em jejum ou após sobrecarga de Met aumenta o risco cardiovascular de modo
3 semelhante à hiperlipidemia e ao tabagismo.

4 Boushey e colaboradores (1995) realizaram uma meta-análise incluindo 27
5 publicações, somando mais de quatro mil pacientes, e concluíram que quando os
6 valores de Hcy são maiores do que 10 mmol/L, a cada 5 mmol/L acrescidos aos
7 valores da Hcy circulante associa-se 80,0% de risco para doença cardiovascular em
8 mulheres e 60,0% em homens; e 50,0% para doença cerebrovascular, além de
9 aumentar consideravelmente o risco para o desenvolvimento da DAOP.

10

11 1.1.3.1 Variante Genética 677C>T do *MTHFR*, Hiperhomocisteinemia e Doença 12 Arterial Obstrutiva Periférica

13

14 A concentração plasmática de Hcy é influenciada por uma complexa
15 interação de fatores ambientais e genéticos. O gene *MTHFR* humano está localizado
16 no final do braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) e foi originalmente descrito como
17 contendo 12 éxons. Os transcritos do gene *MTHFR* humano estão, respectivamente,
18 a 2,2 kilobases (kb), 7,5 kb e 9,5 kb. Este gene codifica proteínas diméricas com
19 subunidades de 70 a 77 kilodalton (kDa) (GOYETTE *et al.*, 1998; GOYETTE;
20 ROZEN, 2000; LIEW; GUPTA, 2015). Duas variantes do gene *MTHFR*, 677C>T
21 (rs1801133) e 1298 A>C (rs1801131), já foram bem descritas e associadas ao
22 desenvolvimento de inúmeras doenças, como doença coronariana, doença
23 cerebrovascular e trombose venosa profunda (ROBIEN; ULRICH, 2003;
24 ROSENBERG *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2008). Foram descritas outras nove
25 mutações raras em pacientes com deficiência grave de *MTHFR* (GOYETTE *et al.*,
26 1995).

27 A substituição pontual da C por uma T no nucleotídeo 677 na região
28 codificadora do gene *MTHFR* leva à substituição de uma alanina (Ala) por uma
29 valina (Val) no aminoácido número 222 da proteína MTHFR. Essa substituição
30 culmina no bloqueio da ligação do dinucleotídeo flavina/adenina (DFA), na perda de
31 folato e na redução da atividade da MTHFR em temperaturas mais elevadas,
32 tornando-a termolábil (MADLOOL; AL-BARQAABI; BAQIR, 2019). Quando a
33 variação genética ocorre em homozigose, em temperaturas de $\geq 37^{\circ}\text{C}$, a enzima
34 apresenta redução de suas atividades em aproximadamente 50,0-60,0% e, redução

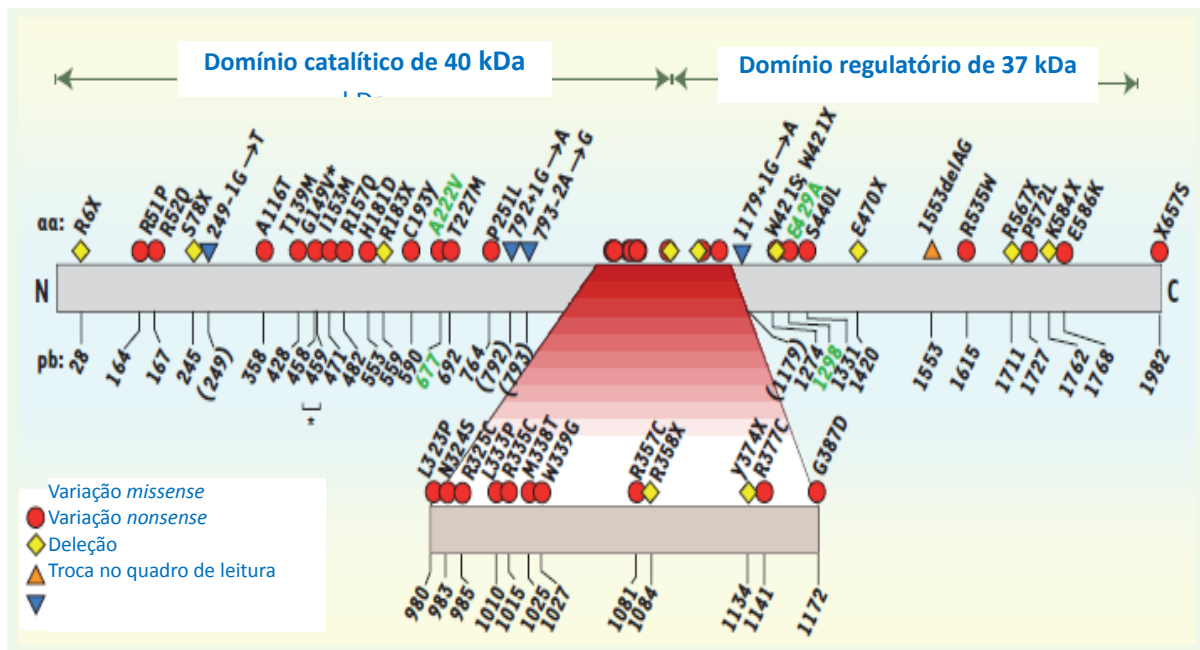
1 superior a 65,0% quando a temperatura é de 46°C (LIEW; GUPTA, 2015). Em
2 algumas civilizações, a frequência da variante em heterozigose chega a acometer
3 40,0-50,0% dos indivíduos, enquanto a variante em homozigose atinge entre 10,0-
4 15,0% (CROWTHER; KELTON, 2003).

5 Além disso, os indivíduos homozigotos para o alelo variante mostram níveis
6 plasmáticos significativamente aumentados de Hcy, particularmente quando os seus
7 níveis plasmáticos de folato estão abaixo da faixa de normalidade (FROSST *et al.*,
8 1995; JACQUES *et al.*, 1996). Esta substituição foi proposta como fator de risco
9 genético para doenças vasculares. Em um estudo de pacientes Holandeses com
10 DAOP, a frequência do genótipo TT homozigoto (o que corresponde a ValVal na
11 enzima codificada), foi em torno de 15,0% nos casos e de 5,0% nos controles
12 (KLUIJTMANS *et al.*, 1996).

13 As Figuras 4 e 5 sumarizam as principais variantes localizadas no gene
14 *MHTFR* e as alterações na estrutura e função da proteína MTHFR.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

- 1 **Figura 4** – Representação esquemática de 41 variantes no gene *MTHFR* de acordo
- 2 com sua localização na sequência de pares de bases (pb) no DNA humano



3

- 4 Representação esquemática de 41 variantes no gene *MTHFR* de acordo com sua
- 5 localização na sequência de pares de bases (pb) no DNA e as correspondentes alterações
- 6 na sequência de aminoácidos (aa) na proteína, partindo da região amino terminal (N) para a
- 7 região carboxiterminal (C). As variantes mais estudadas estão assinaladas em verde. A
- 8 variante localizada na posição 677 (677C>T) resulta na troca de aminoácidos Alanina por
- 9 Valina na posição 222 (A222V) no domínio catalítico da proteína metilenotetrahydrofolato
- 10 redutase (MTHFR), enquanto a variante localizada na posição 1298 (1298A>C) resulta na
- 11 troca de aminoácidos Glutamato para Alanina na posição 429 (E429A) no domínio
- 12 regulatório da proteína MTHFR.

13 **Fonte:** Adaptado de Leclerc; Rozen (2007)

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

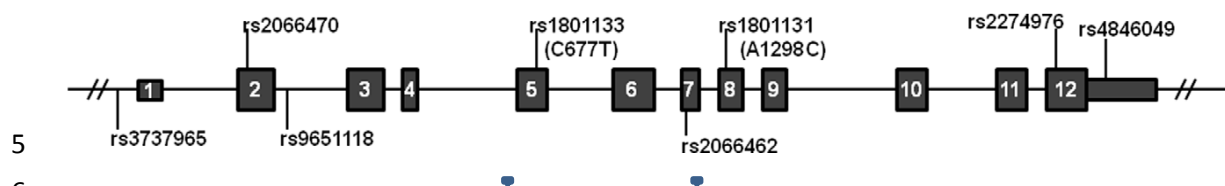
25

1 **Figura 5** – Variações de um único nucleotídeo no gene *MTHFR* e a atividade
2 enzimática da MTHFR associada às duas variantes mais comuns no gene *MTHFR*

3 **A:**

4 **5'**

3'



8 **B:**

677C>T (rs1801133)	1298A>C (rs1801131)
Atividade da enzima MTHFR no genótipo em heterozigose (CT): 67,0%	Atividade da enzima MTHFR no genótipo em heterozigose (AC): 83,0%
Atividade da enzima MTHFR no genótipo em homozigose (TT): 25,0%	Atividade da enzima MTHFR no genótipo em homozigose (CC): 61,0%

9

10 **A:** Gene *MTHFR* localizado no cromossomo 1 (1p36.3). Os 12 éxons estão numerados nas
11 caixas e as linhas intercaladas estão os íntrons na direção 5' para 3' e as principais variantes
12 estão identificadas: rs3737965 (C>T na região promotora); rs2066470 (C>T no éxon 2);
13 rs9651118 (C>T no intron 2); rs1801133 (C>T no éxon 5); rs2066462; rs1801131 (A>C no
14 éxon 8); rs2274976 (G>A no éxon 12); rs4846049 (G>T na região 3' não transcrita/3'UTR).

15 **B:** Diminuição da atividade (% do normal) da enzima metilenotetrahidrofolato redutase
16 (MTHFR) de acordo com o genótipo de cada variante.

17 **Fonte:** Adaptado de Wan e colaboradores (2018) e Spellicy e colaboradores (2012)

18

19 A HHcy e a variante 677C>T do gene *MTHFR* emergiram como fatores de
20 risco independentes para aterosclerose subclínica, implicando influências genéticas
21 como contribuintes potenciais para o aumento da carga de doença aterosclerótica
22 que caracteriza a DAOP. A associação entre as variantes do *MTHFR* e DAOP foi
23 descrita na literatura com resultados controversos: o estudo *Linz Peripheral Arterial*
24 *Disease* (LIPAD) não correlaciona *MTHFR* e DAOP, enquanto uma meta-análise de
25 nove estudos apropriados mostrou que ser homozigoto para o alelo T estava
26 associado a um risco aumentado de DAOP (MUELLER *et al.*, 2005;
27 KHANDANPOUR *et al.*, 2009).

28 A variante genética 677C>T do *MTHFR* foi associada a níveis aumentados
29 de Hcy e a várias condições médicas, como principalmente doença cardiovascular,
30 trombose, complicações na gravidez, defeitos do tubo neural, risco de câncer e
31 doença psiquiátrica (HICKEY *et al.*, 2013; LEVIN; VARGA, 2016).

1 Embora o envolvimento da variante 677C>T do *MTHFR* esteja bem
2 estabelecido no aumento do risco para o acidente vascular encefálico isquêmico
3 (AVEi) (KUMAR *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015) e para o desenvolvimento da
4 doença coronariana (MADLOOL; AL-BARQAAWI; BAQIR, 2019), há poucos e
5 contraditórios estudos sobre a sua relação com a DAOP (DUBSKY *et al.*, 2015;
6 KHANDANPOUR *et al.*, 2009; MULLER *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2011).

7 Em um dos primeiros estudos relacionados à variante 677C>T do *MTHFR*,
8 Fowkes e colaboradores (2000) avaliaram a associação entre essa variante genética
9 e a DAOP em um grupo de 80 indivíduos Escoceses e concluíram que a presença
10 do alelo T é um fator protetor para DAOP [*odds ratio* (OR): 0,54 com intervalo de
11 confiança (IC) de 95%: 0,32-0,9, p=0,02]. Ainda no mesmo ano, outro grupo de
12 pesquisadores avaliou 85 homens com DAOP classes III e IV de Fontaine e 51
13 pacientes normolipidêmicos e demonstrou que pacientes com os genótipos TT e CT
14 apresentavam maiores níveis de Hcy quando comparados àqueles com genótipo CC
15 (RASSOUL *et al.*, 2000).

16 Crowther e Kelton (2003) revisaram estudos publicados na língua inglesa e
17 encontraram variantes heterozigóticas e homozigóticas relativas à 677C>T no gene
18 *MTHFR* em, respectivamente, 40,0-50,0% e 10,0-15,0% da população geral. Os
19 autores demonstraram associação do alelo T em homozigose com a HHcy somente
20 quando havia, simultaneamente, níveis reduzidos de folato, Vit B12 ou Vit B6. Esses
21 resultados podem ser justificados pelo fato do folato apresentar a função de
22 substrato e as Vit B12 e Vit B6 serem co-fatores no metabolismo da Hcy, sendo
23 fundamentais para o funcionamento normal das duas vias metabólicas (ESSE *et al.*,
24 2019).

25 Posteriormente, Muller e colaboradores (2005) publicaram um estudo caso-
26 controle na população Austríaca em que avaliaram 487 pacientes brancos com
27 DAOP sintomática. A prevalência da variante 677C>T do *MTHFR*, na forma
28 homozigótica (TT) e heterozigótica (CT), foi, respectivamente, 8,8% e 44,1%, não
29 havendo diferença estatisticamente significativa em relação à população controle.

30 Khandanpour e colaboradores (2009) realizaram um estudo caso-controle
31 com uma população Britânica portadora de DAOP e verificaram uma forte
32 associação entre a HHcy, DAOP e a variante 677C>T do *MTHFR*. Os autores
33 demonstraram que a presença do alelo T em homozigose aumentou a chance de
34 DAOP em 1,99 vezes. Neste mesmo artigo foi realizada uma meta-análise com nove

1 estudos (incluindo os dados do próprio autor), que comprovou o envolvimento do
2 genótipo TT no aumento dos níveis plasmáticos de Hcy em pacientes com DAOP.

3 Em 2011, um estudo avaliou a variante 677C>T do *MTHFR* em 39 pacientes
4 com DAOP e em 32 indivíduos com ausência desta doença, ambos grupos
5 provenientes da população Brasileira. Os autores concluíram que não há associação
6 entre a presença desta variante, a suscetibilidade à DAOP e ao aumento nos níveis
7 de Hcy (SANTOS *et al.*, 2011).

8 Já em 2015, Dubsy e colaboradores realizaram um estudo caso-controle
9 com 113 pacientes com DM e com diagnóstico de DAOP grau IV de Fontaine
10 submetidos à angioplastia transluminal percutânea (ATP) e o grupo controle foi
11 composto por 65 indivíduos saudáveis. Os autores avaliaram se as taxas de sucesso
12 ou falha da ATP apresentavam associação com a variante 677C>T, heterozigótica ou
13 homozigótica, do gene *MTHFR*, não sendo identificada correlação significativa.

14

15 1.1.4 Tratamento da Doença Arterial Obstrutiva Periférica

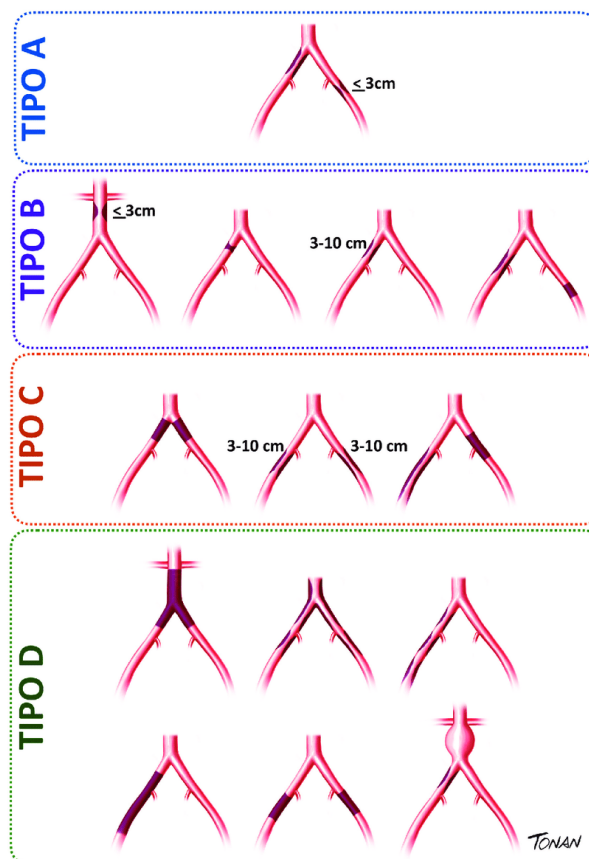
16

17 A conduta terapêutica inicial nos pacientes com DAOP, independente da
18 classificação clínica, visa a modificação dos fatores de risco, por meio do tratamento
19 medicamentoso associado à conscientização do paciente para cessação do
20 tabagismo e dieta adequada. Introduce-se antiagregantes plaquetários como ácido
21 acetilsalicílico (AAS) e clopidogrel e estatinas, no caso de pacientes sintomáticos e
22 diabéticos, o cilostazol e metformina, respectivamente. O paciente deve ser
23 acompanhado para verificação de sinais de progressão da doença para isquemia
24 crítica do membro (estágios III e IV) (HIRAMOTO *et al.*, 2018; PRESTI *et al.*, 2015;
25 SUZUKI *et al.*, 2016).

26 Entretanto, 20,0 a 40,0% dos pacientes não respondem ao tratamento
27 convencional e evoluem para as fases mais críticas da doença, necessitando, assim,
28 de revascularização do membro, seja por via cirúrgica ou endovascular (SIGVANT;
29 LUNDIN; WAHLBERG, 2016). Os procedimentos para revascularização levam em
30 consideração os *guidelines* da *Inter-Society Consensus for the Management of*
31 *Peripheral Arterial Disease* (TASC II), que categorizam anatomicamente o segmento
32 acometido, como aortoiliaco (Figura 6) e infrainguinal (femoropoplíteo e
33 popliteotibial) (Figura 7), assim como as características anatomorradiológicas das
34 lesões presente em cada segmento (lesões do tipo A, B, C, D), que por sua vez são

1 identificadas pelo exame de angiografia. A classificação das lesões irá direcionar o
 2 tratamento intervencionista, no qual os mais empregados correspondem a
 3 revascularização por *by-pass* (enxerto ou ponte) e angioplastia por via endovascular
 4 (NORGREN *et al.*, 2007; PRESTI *et al.*, 2015).

5
 6 **Figura 6** – Classificação da doença arterial obstrutiva periférica no segmento
 7 aortoilíaco conforme *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral*
 8 *Arterial Disease* (TASC II)



9

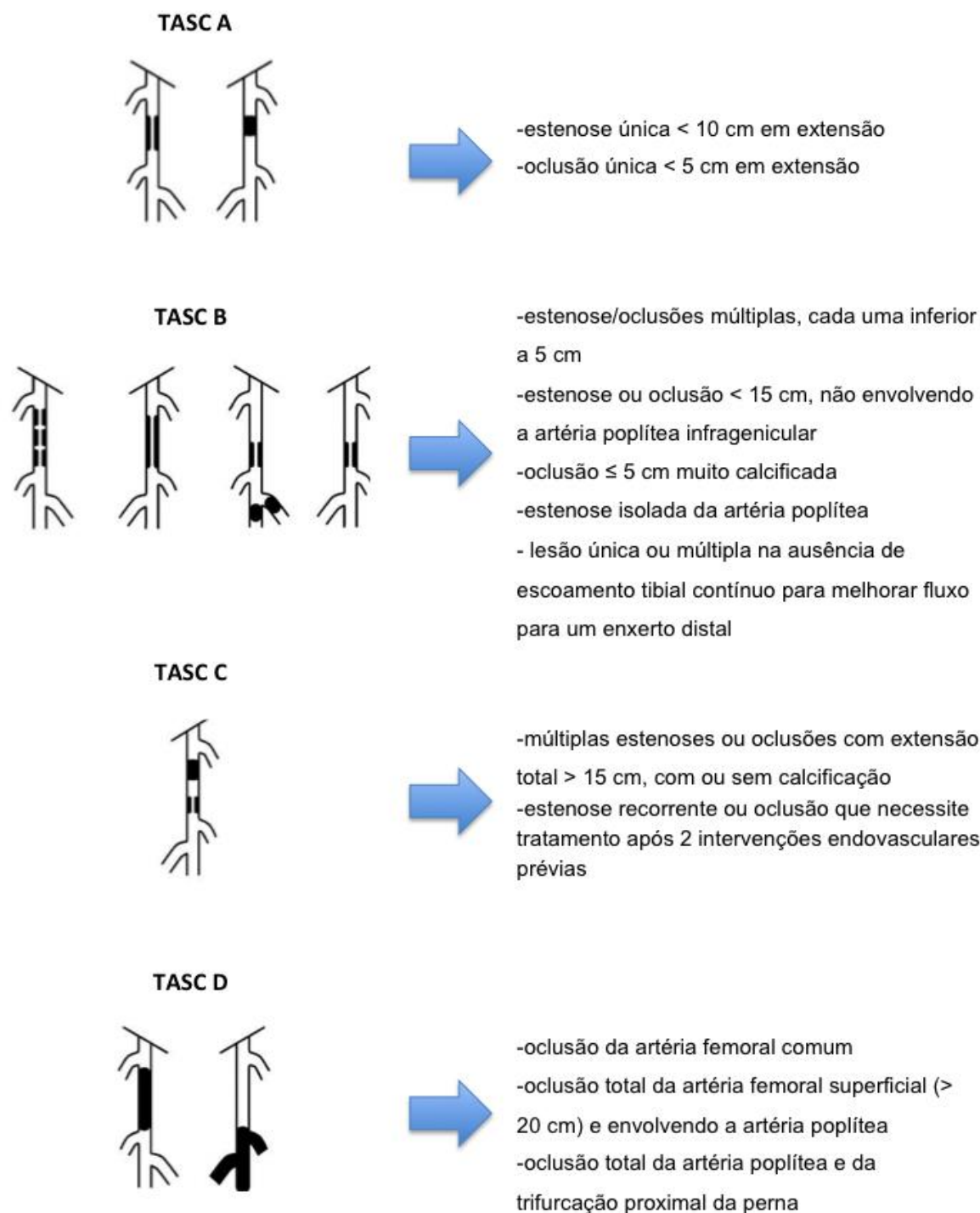
10 TASC A: estenose unilateral ou bilateral da artéria ilíaca comum (AIC); estenose unilateral
 11 ou bilateral ≤ 3 cm da artéria ilíaca externa (AIE). TASC B: estenose ≤ 3 cm da aorta
 12 infrarrenal; oclusão unilateral da AIC; estenose da AIE, única ou múltipla, entre 3-10 cm que
 13 não se estende para a artéria femoral comum (AFC); oclusão unilateral da AIE, não
 14 envolvendo o óstio da artéria ilíaca interna (AII) ou AFC. TASC C: oclusão bilateral da AIC;
 15 estenose bilateral da AIE entre 3-10 cm, sem extensão para AFC; estenose unilateral da AIE
 16 envolvendo a AFC; oclusão unilateral da AIE que envolve a origem da AII ou AFC; oclusão
 17 intensamente calcificada da AIE unilateral com ou sem envolvimento das origens da AII e/ou
 18 AFC. TASC D: oclusão da aorta infrarrenal; estenoses difusas, múltiplas, em AIC, AIE e AFC;
 19 oclusão unilateral da AIC e da AIE; oclusão bilateral da AIE; doença difusa envolvendo a
 20 aorta e ambas AIC; estenose arterial ilíaca em paciente com AAA não passível de
 21 tratamento endovascular ou outra lesão que necessite de cirurgia aberta.

22 **Fonte:** Adaptado de Alcantara e colaboradores (2016)

23

24

- 1 **Figura 7** – Classificação da doença arterial obstrutiva periférica no segmento
 2 infrainguinal conforme *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral*
 3 *Arterial Disease (TASC II)*



- 4
 5 **Fonte:** Adaptado de Norgren e colaboradores (2007)

- 6
 7 Contudo, estima-se que 60,0% dos pacientes não têm sucesso na
 8 revascularização devido à reestenose no local da angioplastia ou nova estenose na

- 1 topografia do enxerto cirúrgico frequentemente associada à proliferação miointimal,
- 2 evoluindo para a amputação do membro dentro de 12 meses após o procedimento
- 3 e/ou a cirurgia (GOLLEDGE *et al.*, 2018; HIRAMOTO *et al.*, 2018; SCHILLINGER;
- 4 MINAR, 2005).

1 2 JUSTIFICATIVA

2

3 A DAOP apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Sua
4 prevalência, que já era alta, cresce ainda mais no século XXI. Isso se deve,
5 principalmente, às mudanças nos hábitos de vida da população, que favorecem o
6 surgimento dos principais fatores de risco relacionados à doença.

7 Embora alguns estudos tenham avaliado o envolvimento da variante 677C>T
8 do gene *MTHFR* com HHcy e o desenvolvimento de DAOP, os dados ainda são
9 escassos e contraditórios na literatura mundial (GAROFOLO *et al.*, 2007; SABINO *et*
10 *al.*, 2009).

11 Além disso, não há estudos que avaliaram o envolvimento da variante
12 genética 667C>T com a gravidade da DAOP na população brasileira. Visto que nos
13 estudos realizados com outras populações os resultados foram controversos, faz-se
14 necessário melhor entendimento das características genéticas e do comportamento
15 da DAOP. Desta forma, os dados obtidos neste estudo poderão contribuir para o
16 conhecimento das variáveis na fisiopatologia da DAOP, assim como avaliar a
17 frequência desta variante genética em uma população brasileira.

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 Avaliar o envolvimento da variante 677C>T (rs1801133) do gene *MTHFR* na
6 suscetibilidade e gravidade da DAOP, bem como sua associação com os níveis
7 séricos de Hcy em uma população brasileira.

8

9 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

10

- 11 • Comparar a frequência da variante 677C>T (rs1801133) do gene *MTHFR*
12 em pacientes com DAOP e indivíduos controle;
- 13 • Verificar a associação entre a variante 677C>T (rs1801133) do gene
14 *MTHFR* e os níveis plasmáticos de Hcy em ambos os grupos;
- 15 • Verificar a associação dos genótipos da variante 677C>T (rs1801133) do
16 *MTHFR* com a gravidade clínica da DAOP, verificada pela classificação de
17 Fontaine, assim como com a gravidade anatomorradiológica da doença
18 de acordo com a classificação TASC.

1 **4 METODOLOGIA**

2

3 **4.1 ASPECTOS ÉTICOS**

4

5 Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
6 Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob o parecer de
7 aprovação número 2.400.074 (ANEXO A). Todos os participantes envolvidos no
8 estudo assinaram o Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento (APÊNDICE A).

9

10 **4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM**

11

12 Este é um estudo caso-controle, em que foram selecionados 270
13 participantes, de ambos os sexos e com idade entre 37 e 76 anos, sendo 113
14 indivíduos do grupo controle atendidos no Hemocentro Regional de Londrina e 157
15 pacientes diagnosticados com DAOP atendidos no Setor de Hemodinâmica do
16 Hospital Universitário de Londrina (HU). Posteriormente, os pacientes com DAOP
17 foram subdivididos de acordo com a classificação clínica de Fontaine em um dos
18 cinco grupos: Assintomático I, Claudicação leve IIa, Claudicação severa IIb, Dor em
19 Repouso III e Lesão trófica IV. Nenhum dos indivíduos (controles e DAOP)
20 apresentou doença renal crônica, insuficiência hepática, doenças inflamatórias e/ou
21 infecciosas agudas ou neoplasias, e nem faziam uso de suplementos vitamínicos (Vit
22 B12) e/ou ácido fólico.

23

24 **4.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS**

25

26 Previamente à coleta do sangue, foram realizadas as medidas
27 antropométricas (peso, altura e circunferência abdominal) e calculado o índice de
28 massa corporal (IMC) como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A
29 aferição da pressão arterial sistêmica também foi realizada, seguida do
30 preenchimento de um questionário com dados referentes à idade, etnia
31 (autodeclaração), comorbidades, tabagismo e uso de medicamentos. Os dados
32 relacionados à classificação clínica e anatômica da doença, além do histórico
33 cirúrgico do paciente, foram fornecidos por um médico cirurgião vascular ou
34 acessados no prontuário médico.

1 A coleta de 10 mL de sangue venoso foi realizada após 8 horas de jejum. O
2 plasma, soro e *buffy coat* foram armazenados em freezer a -80°C até a realização
3 das análises.

4 Os níveis séricos de Hcy, vitamina B12 e folato foram determinados por
5 quimioluminescência em micropartículas, utilizando o equipamento Architect
6 (Architect i2000SR, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

7

8 4.4 ANÁLISE DA VARIANTE 677C>T DO GENE *MTHFR*

9

10 O DNA genômico foi extraído com o kit de extração de DNA Biopur
11 (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná) de acordo com instruções do fabricante,
12 com algumas modificações, como o volume de *buffy coat* utilizado (200 µL) e a
13 temperatura do tampão de eluição (70°C). O DNA extraído foi quantificado utilizando
14 o equipamento NanoDrop 2000c™ *spectrophotometer* (ThermoScientific, Waltman,
15 MA, USA) com leitura em 260 nm e avaliada a pureza pela razão de leitura em
16 260/280 nm.

17 A variante 677C>T do gene *MTHFR* (rs1801133) foi avaliada por reação em
18 cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com o uso de sondas TaqMan®. Foi
19 utilizado um ensaio validado (C_32060205_10, Life Technologies Corporation,
20 Carlsbad, CA, USA) com *primers* específicos e sondas fluorescentes para
21 determinação dos possíveis genótipos ([**VIC/FAM**] GGC AAA CAA TAA ATG TAATAG
22 TAG G[C/T]A AAT TTG TGC TAT GTT AGA GGT CTT). Os níveis de fluorescência
23 dos produtos de qPCR foram avaliados pelo equipamento QuantumStudio VI
24 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

25

26 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

27

28 A análise da tabela de contingência (χ^2 ou teste exato de Fischer) foi
29 empregada para verificar as associações entre as variáveis categóricas e os grupos
30 avaliados. As variáveis categóricas foram expressas em números absolutos e em
31 porcentagem (%). As diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos foram
32 avaliadas com o teste de Mann-Whitney e expressas como mediana e intervalo
33 interquartil 25%-75% (IIQ). As frequências genotípica e alélica foram comparadas
34 pelo teste qui-quadrado. *Odds ratio* (OR) foi calculado com intervalo de confiança de

- 1 95% (IC 95%). A análise de regressão logística binária foi realizada. Para todos os
- 2 testes estatísticos, $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas
- 3 foram realizadas no IBM SPSS Windows versão 24 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA).

1 5 RESULTADOS

2

3 Os resultados desta dissertação foram apresentados e discutidos em um
4 artigo científico original intitulado “***MTHFR 677C>T (rs1801133) genetic variant is***
5 ***associated with homocysteinemia but not with clinical severity in Brazilian***
6 ***patients with peripheral arterial occlusive disease*”.**

7

8

9 Guilherme da Silva Silvestre¹, Iriana Moratto Carrara², Tamires Flauzino², Marcell Alysson
10 Batisti Lozovoy^{2,3}, Rubens Cecchini⁴, Edna Maria Vissoci Reiche², Andréa Name Colado
11 Simão^{2,3}

12

13

14 ¹ Hemodynamics Sector of the University Hospital of Londrina, Londrina, PR, Brazil

15 ² Laboratory of Research in Applied Immunology, University Hospital of Londrina, Londrina,
16 PR, Brazil

17 ³ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State
18 University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

19 ⁴ Department of Pathology Sciences, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

20

21

22

23 *Corresponding author: Andréa Name Colado Simão. Postal address: Department of
24 Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, University Hospital,
25 State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440.
26 Tel/Fax: +55-43-3371-2619.

27

1 Abstract

2

3 **Introduction:** Hyperhomocysteinemia (HHcy) is an important risk factors for peripheral
4 arterial occlusive disease (PAOD) and has been associated with the *MTHFR* 677C>T
5 (rs1801133) genetic variant. **Objective:** To evaluate the association between the *MTHFR*
6 677C>T variant with the susceptibility and severity of PAOD, as well as with serum levels of
7 homocysteine (Hcy) in the Brazilian population. **Subjects and Methods:** This case-control
8 study enrolled 157 patients with PAOD attended at University Hospital of Londrina, Brazil,
9 and unrelated 113 healthy individuals from Londrina, Brazil. The clinical severity of the
10 PAOD patients was assessed by Fontaine classification and anatomoradiological categories by
11 TASC. The *MTHFR* 677C>T genotyping was determined using real-time polymerase chain
12 reaction. **Results:** The patients showed higher levels Hcy than controls, and them did not
13 differ according to Fontaine (p=0.257) and TASC categories (p=0.678). The groups did not
14 differ about allelic and genotypes frequencies. However, patients carrying the TT genotype
15 (recessive model) or CT+ TT (dominant model) presented higher levels of Hcy than those
16 carrying other genotypes, independently of extraneous variables. **Conclusions:** The T allele
17 of *MTHFR* 677C>T variant was associated with HHcy in PAOD patients, but not in controls.
18 In addition, this variant was not associated with the clinical stage and the anatomoradiological
19 categories of PAOD. Our data suggested a possible interaction between *MTHFR* 677C>T
20 variant and a presence of other genetic, epigenetic and environment factors associated with
21 PAOD on modulation of metabolism of Hcy.

22

23

24 **Key Words:** Peripheral arterial occlusive disease. Methylenetetrahydrofolate reductase.
25 677C>T genetic variant. Homocysteine. Fontaine classification.

1 Introduction

2

3 Peripheral arterial occlusive disease (PAOD) is a global public health concern as
4 result of a severe arterial stenosis and insufficient blood supply to the distal limb causing
5 intermittent claudication and resting pain, decreases the quality of life of the patients in terms
6 of mobility and level of independence and can lead to disability and even death (BREEK *et*
7 *al.*, 2001). It is characterized by atherosclerotic lesions involving non-cardiac and non-
8 cerebral arteries and disturbances in the axial vessels and at the microcirculatory level, which
9 may lead to critical ischemia of lower limbs. It is significantly PAOD is closely associated
10 with an increased risk for incident cardiovascular disease (CVD), cerebrovascular diseases,
11 and mortality (ANKLE BRACHIAL INDEX *et al.*, 2008; CRIQUI *et al.*, 1992; RESNICK *et*
12 *al.*, 2004; MERINO *et al.*, 2008; MOSTAZA *et al.*, 2008; FOWKES *et al.*, 2014).

13 The underlying pathological mechanism of PAOD, and the potential pathways and
14 core genes, had gained considerable attention in recent years with the aim of identifying
15 potential therapeutic targets (GUAN *et al.*, 2020). Over the last decade, much progress has
16 been made in the capability of efficiently identifying genetic variants through whole genome
17 sequencing efforts, genome-wide association studies (GWAS), and epigenetic profiling
18 (MANOLIO *et al.*, 2009; GOLLEDGE *et al.*, 2016; KRISHNA *et al.*, 2015). A better
19 understanding of the genetics of PAOD may allow earlier identification of those at risk for
20 PAOD and may open the door for precision medicine-based approaches to treatment.

21 Although familial aggregation and heritability estimates suggest a significant genetic
22 contribution, little is known about the genetic susceptibility to PAOD in non-European
23 populations (MURABITO *et al.*, 2006; CARMELLI *et al.*, 2000; WASSEL *et al.*, 2011;
24 KHALEGHI *et al.*, 2014). A GWAS of the ankle-brachial index (ABI) and PAOD (defined as
25 an ABI < 0.90) showed that the variants associated with the ABI differ by Hispanic/Latino
26 ethnic groups (SOFER *et al.*, 2019).

27 Hyperhomocysteinemia (HHcy) is involved in endothelial dysfunction, an important
28 step in atherosclerosis development (SPARK *et al.*, 2003), and a relation between HHcy and
29 PAOD has been showed (BOUSHEY *et al.*, 1995). The plasma concentration of Hcy is
30 influenced by a complex interaction of environmental and genetic factors (ESSE *et al.*, 2019).
31 The 677C>T (rs1801133) variant of the *MTHFR*, which codes the methylenetetrahydrofolate
32 reductase (MTHFR), a critical enzyme in the remethylation of Hcy to methionine, is the most
33 common genetic cause of HHcy (KISELJAKOVIC *et al.*, 2008; ROZEN, 1997) and consists

1 in a C (cytosine) to T (thymine) transition at the nucleotide 677 in the exon 4 (LIEW;
2 GUPTA, 2015).

3 HHcy and *MTHFR* 677 C>T genetic variant emerged as independent risk factor for
4 subclinical atherosclerosis, implying genetic influences as potential contributors to the
5 increased burden of atherosclerotic disease characterizing the PAOD. The association between
6 PAOD and *MTHFR* variants has been studied in literature with controversial results; the Linz
7 Peripheral Arterial Disease (LIPAD) study does not correlate *MTHFR* 677C>T and PAOD
8 (MUELLER *et al.*, 2005), while a meta-analysis of nine appropriate studies showed that the
9 homozygosity for the T allele was associated with an increased risk of PAOD
10 (KHANDANPOUR *et al.*, 2009).

11 Although some studies have assessed the involvement of the *MTHFR* 677C>T
12 variant with HHcy and the development of PAOD, data are still scarce and contradictory in
13 the global literature (SABINO *et al.*, 2009). Moreover, there are no studies that have
14 evaluated the involvement of the *MTHFR* 667C>T genetic variant with the severity of the
15 PAOD in the Brazilian population. Since, in studies carried out with other populations, the
16 results were quite diverse, it is necessary a better understanding of the genetic characteristics
17 and behavior of DAOP in our population. In this context, the aim of the present study was to
18 evaluate the association between the *MTHFR* 677C>T variant with the susceptibility and
19 severity of PAOD, as well as with serum levels of Hcy in the Brazilian population.

20

21 **Subjects and Methods**

22

23 This is a case-control study, in which 270 unrelated participants were consecutively
24 enrolled, of both sexes and aged between 37 and 76 years old. Of them, 113 were healthy
25 individuals (controls without PAOD) attended at the Londrina Regional Blood Center and 157
26 were patients diagnosed with PAOD who were attended at the Hemodynamics Sector of the
27 University Hospital of Londrina, State of Paraná, South Brazil. Exclusion criteria (controls
28 and PAOD patients) were the presence of cancer, chronic inflammatory, infectious, and
29 autoimmune diseases, and the use of supplements such as folic acid and vitamin B12. The
30 ABI < 0.9 determined by continuous wave doppler were the criteria used for the diagnosis of
31 PAOD. Continuous wave doppler was performed with DF-7001 VN Portable Vascular
32 Doppler (Medpej, Ribeirão Preto, São Paulo). ABI measurement technique was performed
33 according to ACC/AHA guidelines for the management of patients with PAOD (ARNETT *et*
34 *al.*, 2019). The ABI values were calculated by dividing the higher of the two ankle systolic

1 pressures in one leg with the greater brachial artery value of systolic pressure. ABI values
2 were calculated up to two decimal places (CONTE *et al.*, 2019).

3 Subsequently, the patients with PAOD were categorized according to their severity
4 using the Fontaine's clinical classification into five groups: I- Asymptomatic, IIa- Mild
5 claudication, IIb- Severe claudication, III- Pain at Rest, and IV- Trophic Injury (CONTE *et*
6 *al.*, 2019). The PAOD group was also evaluated regarding the severity and the different
7 anatomical distributions using the anatomoradiological categories according to the *Inter-*
8 *Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease* (TASC II), including
9 the aortoiliac segment and infra-inguinal (in this study called as femoropopliteal and it
10 included the popliteotibial territory) segment (NORGREN *et al.*, 2007). TASC category was
11 defined by a vascular surgeon after analyzing an arteriography (Siemens, Berlin and Munich,
12 Germany) that was performed in hemodynamic sector of the University Hospital.

13 The study was approved by the Institutional Research Ethics Committees of State
14 University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 2.400.074) and all of the individuals invited
15 were informed in detail about the research and gave written Informed Consent. All procedures
16 were conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

17

18 *Demographic, clinical and laboratory data*

19 Prior to blood collection, anthropometric measurements (weight, height, and waist
20 circumference) were obtained, and the body mass index (BMI) was calculated. The
21 measurement of systemic blood pressure was also performed, followed by filling out a
22 questionnaire with data on age, ethnicity, comorbidities, smoking and use of medications. The
23 data related to the clinical and anatomical classification of the disease, in addition to the
24 patient's surgical history, were provided by a vascular surgeon or accessed in the medical
25 records. The systemic arterial hypertension (SAH), dyslipidemia, and type 2 diabetes mellitus
26 (T2DM) diagnosis agreed with the guidelines of European Society of Hypertension/European
27 Society of Cardiology (WILLIAMS *et al.*, 2018), with the Third Report of the National
28 Cholesterol Education program (NCEP, 2001) and with the American Diabetes Association
29 (ADA, 2021), respectively.

30 Venous blood collection (10 ml) was performed after 8 hours of fasting with no
31 anticoagulant and with EDTA anticoagulant using Vacutainer System tubes (Becton-
32 Dickinson, New Jersey, U.S). The plasma, serum and buffy coat were stored in a -80°C until
33 the analyzes were performed. The serum levels of Hcy, vitamin B12 and folate were

1 determined by chemiluminescence in microparticles, using the Architect equipment (Architect
2 i2000SR, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

3

4 *MTHFR C677T genotyping*

5 The genomic DNA was extracted with the Biopur DNA extraction kit (Biometrix
6 Diagnóstica, Curitiba, Paraná) according to the manufacturer's instructions, with some
7 modifications, such as the volume of buffy coat (200 μ L) and the temperature of the elution
8 buffer (70° C). DNA samples were quantified using a NanoDrop 2000c™ spectrophotometer
9 (ThermoScientific, Waltman, MA, USA) at 260 nm and purity was assessed by measuring the
10 260/280 nm ratio.

11 The *MTHFR* 677C>T (rs1801133) variant was determined using real time
12 polymerase chain reaction (qPCR) through the TaqMan® (Thermo Fisher Scientific,
13 Waltham, Massachusetts, EUA) method. It was used a validated assay (C_32060205_10,
14 Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) with specific *primers* and
15 fluorescent probes for the genotype determination [VIC/FAM] GGC AAA CAA TAA ATG
16 TAATAG TAG G[C/T]A AAT TTG TGC TAT GTT AGA GGT CTT). The level of
17 fluorescence of the qPCR products were evaluated using the Quantum Studio VI (Applied
18 Biosystems, Foster City, CA, USA).

19

20 *Statistical analysis*

21 Analysis of contingency tables (χ^2 or Fisher's exact test) were employed to check the
22 associations between categorical variables and diagnostic groups. Categorical variables were
23 expressed as absolute number (n) and percentage (%). We assessed the differences in
24 continuous variables between groups using the Mann-Whitney test and were expressed as
25 median and interquartile range 25%-75% (IQR). Genotype and allele frequencies were
26 compared by chi-squared test. Odds ratios (OR) were calculated with 95% confidence interval
27 (95% CI). Binary logistic regression analysis was performed to assess the effect of the genetic
28 variants in the study groups and OR and 95% CI were determined. For all statistical tests
29 $p < 0.05$ was considered for significance level. The number of samples allowed to reach 80%
30 of power. Statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 24 (SPSS,
31 Inc., Chicago, IL, USA).

32

33 **Results**

34

1 The PAOD patients were older ($p < 0.001$) and had higher levels of Hcy ($p < 0.020$)
2 when compared to the control group. However, they did not differ about sex ($p = 0.116$),
3 ethnicity ($p = 0.119$), BMI ($p = 0.355$), folate ($p = 0.242$), and vitamin B12 ($p = 0.885$) (**Table 1**).

4 **Table 2** summarizes the demographic, clinical, anatomical, and laboratory
5 characteristics of the PAOD group. Regarding clinical characteristics, there were no patients
6 in Fontaine's classification I included in the study. There were 35 (22.4%) and 33 (21.2%)
7 patients with Fontaine's classes IIa and IIb patients, respectively. The group of patients with
8 pain at rest, corresponding to Fontaine's class III, presented 11 (7.1%) individuals and patients
9 with trophic injury, the most severe stage of the disease, allocated to Fontaine's class IV,
10 presented 77 (49.4%) patients. Fontaine's classes IIa and IIb were grouped, since the
11 prognosis and treatment of choice are similar, adding up to a total of 68 (43.6%) patients.
12 Similarly, classes III and IV were also joined, resulting in a total of 88 (56.4%) individuals.
13 Regarding the different anatomical distributions of PAOD, 40 (25.8%) patients had disease in
14 the aortoiliac segment; of them, 7 (4.5%) were TASC A, 5 (3.2%) were TASC B, 12 (7.7%)
15 were TASC C and 16 were (10.3%) TASC D. Other 115 (74.2%) patients were free of disease
16 in that territory.

17 In relation to the infra-inguinal segment, in the study it was called femoropopliteal,
18 134 (86.5%) of the patients had disease in this territory, while 21 (13.5%) had no significant
19 disease in this topography. As in the aortoiliac segment, the patients with femoropopliteal
20 territory, the classes A and B showed less frequency, with 9 (5.8%) TASC A and 17 (11.0%)
21 TASC B, while the majority had more advanced disease, with 36 (23.2%) TASC C and 71
22 (45.8%) TASC D. In addition, we obtained 19 (12.3%) patients with concomitant disease in
23 the aortoiliac and femoropopliteal territories.

24 When we grouped the cases in which the treatment of choice is similar, without
25 distinction of the arterial territory, we obtained 23 (14.8%) of the patients in the classes of
26 TASC A + B and 132 (85.2%) in the classes C + D; 31 (19.9%) patients underwent
27 endovascular revascularization, 66 (42.3%) had conventional surgery and 59 (37.8%) adopted
28 conservative therapy. Regarding the demographic and laboratory characteristics of the patients
29 with PAOD, 37 (24.2%) were smokers, 68 (44.4%) were ex-smokers, 98 (71.5%) were
30 diagnosed with T2DM, 73 (47.4%) were diagnosed with dyslipidemia, 114 (74%) were
31 diagnosed with SAH and 58 (39.2%) showed HHcy (**Table 2**).

32 However, Hcy levels did not differ according to the clinical stage of the PAOD
33 evaluated by Fontaine classification ($p = 0.257$) (**Figure 1A**) and the anatomoradiological

1 categories evaluated by TASC II classification ($p=0.678$) (**Figure 1B**). All data were adjusted
2 by age, ethnicity, BMI, folate, and vitamin B12.

3 **Table 3** shows the frequency of the alleles and genotypes of the *MTHFR* 677C>T
4 variant in the controls and PAOD patients. The groups did not differ regarding about the allele
5 and genotypes distributions ($p>0.05$), after adjusted by sex, ethnicity, age, and BMI.

6 **Table 4** shows the data related to the dominant and recessive models of statistical
7 analysis of the *MTHFR* 677C>T obtained in the PAOD group. The groups differed on
8 ethnicity in both models. In addition, Hcy serum levels were higher in patients carrying the
9 CT+TT genotypes than those carrying the CC genotype ($p=0.008$, dominant model) while
10 patients carrying the TT genotype who had higher levels of Hcy when compared with those
11 carrying the CC+CT genotypes ($p=0.019$, recessive model), independently of sex, ethnicity,
12 age, BMI, folic acid, vitamin B12, and dyslipidemia. There were not any association about
13 genotypes (dominant and recessive models) and Hcy serum levels in control group (data not
14 shown). Regarding the Fontaine and TASC classification, the groups did not differ, according
15 to the genotypes.

16

17 **Discussion**

18

19 The main results of this case-control study are that the T allele of the *MTHFR*
20 677C>T variant was associated with increased Hcy serum levels only PAOD patients but not
21 in health controls, independently of extraneous variables. However, there are no associations
22 between the genotypes and Fontaine or TASC classification. To our knowledge, the present
23 study is the first that evaluated the association between the *MTHFR* 677C>T variant, Hcy
24 levels and the severity of PAOD in Brazilian patients.

25 In this study, we demonstrated that patients with PAOD showed increased Hcy serum
26 levels, when compared with controls, but the Hcy levels did not differ according to disease
27 severity. Our data agree with a previous study that found increased Hcy in PAOD patients
28 compared with controls (TAYLOR *et al.*, 1999), and increased Hcy levels have been
29 considered an important risk factor for cardiovascular diseases (UELAND *et al.*, 1993;
30 FROSST *et al.*, 1995). Hcy may affect both atherogenesis and the resistance of the
31 endothelium to thrombosis through different mechanisms including the direct toxic effect to
32 endothelial cells, interference with the antithrombotic and vasodilator functions of nitric oxide
33 (STAMLER; SILVKA, 1996), enhancement of leukocyte adhesion and extravasation, with the
34 potency to contribute to vascular injury (DUDMAN *et al.*, 1997).

1 The 677C>T (rs1801133) variant of *MTHFR* consists in a cytosine (C) to thymine
2 (T) transition at the nucleotide 677 in the exon 4. This nonsynonymous variant results in the
3 alanine-to valine (Ala to Val) amino acid change leading to a thermolabile enzyme with
4 reduced activity (FROSST *et al.*, 1995). The reduced MTHFR enzyme activity and the
5 increased thermolability, lead to a decrease in 5-methyltetrahydrofolate and an increase in the
6 accumulation of the substrate 5,10- methylenetetrahydrofolate and, consequently HHcy
7 (ESSE *et al.*, 2019).

8 Our data showed that the allelic and genotypes frequency of the *MTHFR* 677C>T
9 variant did not differ between the PAOD patients and control group in different genetic
10 models evaluated, suggesting that this genetic factor, by itself, may not contribute to the
11 development of PAOD in our population. These results agree with previous studies reported in
12 Brazilian population (SABINO *et al.*, 2009).

13 However, the observed frequency of the *MTHFR* 677C>T genotypes in the present
14 study agrees with previous studies that showed the presence of the TT genotype among 5.0–
15 15.0% of the general population and its role and impact on the Hcy levels may vary among
16 different populations (ARRUDA *et al.*, 1998; RASSOUL *et al.*, 2000; CAPPUCCIO *et al.*,
17 2002; LIMA *et al.*, 2006). In addition, we demonstrated that patients with PAOD carrying the
18 TT genotype (in recessive model) showed higher levels of Hcy than those carrying the CT +
19 TT genotypes. Moreover, the patients with PAOD carrying the TT + CT genotypes (in
20 dominant model) showed higher levels of Hcy than those carrying the CC genotype,
21 suggesting that this variant may be related to HHcy in PAOD Brazilian patients. It is
22 important to highlight that these associations were independently of age, sex, ethnicity, and
23 BMI, folate, and vitamin B12.

24 Divergent results have been reported regarding the association between Hcy levels
25 and *MTHFR* 677C>T genotypes. Khandanpour *et al.* (2009) showed that PAOD was
26 associated with elevated levels of Hcy and the TT genotype. However, other studies reported
27 that the T allele could be a protector factor for PAOD (FOWKES *et al.*, 2000), and that high
28 levels of Hcy were associated with the T allele only in those individuals with decreased levels
29 of folate, vitamin B12 or Vitamin B6 (CROWTHER; KELTON, 2003). These results can be
30 justified by the fact that folate and vitamins B12 and B6 are, respectively, substrate and co-
31 factors in the Hcy metabolic pathway (ESSE *et al.*, 2019). Moreover, no significant
32 association between the *MTHFR* 677C>T genotypes and Hcy levels was also reported
33 (STRICKER *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2005).

1 It is important to emphasize that our data showed that the presence of the T allele
2 was associated with an increase in Hcy levels exclusively in the PAOD patients (but not in
3 controls) with the CT + TT genotypes, regardless of the other risk factors. That association
4 could be explained, in part, through the presence of other genetic and/or epigenetic factors
5 associated with the disease that may modulate the metabolism of Hcy in these patients Several
6 risk factors for PAOD could regulate gene expression through the epigenetic mechanisms.
7 Studies reported the epigenetic effects of T2DM, SAH, Hcy levels, aging, smoking, and
8 sedentary lifestyle in the DNA methylation and chromatin remodeling, histone acetylation,
9 microRNA expression and regulation (BELKIN; DAMRAUER, 2017; LEEPER *et al.*, 2012).

10 Gene-by-environmental interactions are hypothesized to play an important role in the
11 expression of a disease. Therefore, the effects of environmental factors in association with the
12 risk factors for PAOD that were not evaluated in the present study may regulate the
13 expression of genes involved in the Hcy metabolism and could explain why the high levels of
14 Hcy were observed only in PAOD patients, independently of the risk factors controlled in this
15 study.

16 PAOD has complex phenotypes that depend on multiple other genetic and
17 environmental factors, as well as epigenetic mechanisms (BELKIN; DAMRAUER, 2017) that
18 could also explain the high levels of Hcy among the patients with PAOD carrying the T allele
19 of *MTHFR* 677C>T variant. The reduced enzyme activity associated with the *MTHFR*
20 677C>T variant has been linked to decreased DNA methylation (CASTRO *et al.*, 2004) and
21 HHcy (SAM *et al.*, 2003). In turn, decreased DNA methylation may involve aberrant
22 expression of structural and matrix proteins or reduced DNA integrity resulting in premature
23 aging of the vascular tissue (WILMANN *et al.*, 2011).

24 This study has some potential limitations. First, it is a case-control design, which
25 does not allow inferences on causal relationship between the *MTHFR* 677C>T variant and the
26 PAOD, as well as the Hcy levels and the severity of the disease. Second, we evaluated one
27 *MTHFR* variant, but this gene presents more than one single nucleotide variant, and it might
28 be interesting to evaluate whether genetic haplotypes play a role in subjects with PAOD.
29 However, this study has some strengths, such as controlling confounding effects by the
30 statistical analysis.

31 In conclusion, the T allele of *MTHFR* 677C>T variant was associated with HHcy in
32 PAOD patients, but not in controls. In addition, this variant was not associated with the
33 clinical stage and the anatomoradiological categories of PAOD. Our data suggested a possible

1 interaction between *MTHFR* 677C>T variant and a presence of other genetic, epigenetic and
2 environment factors associated with PAOD on modulation of metabolism of Hcy.

3

4 **References**

5

6 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). 2. Classification and diagnosis of
7 diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 44, p. S15-S33, 2021.

8

9 ANKLE BRACHIAL INDEX COLLABORATION, FOWKES, F. G.; MURRAY, G. D.;
10 BUTCHER, I.; HEALD, C. L.; LEE, R. J.; CHAMBLESS, L. E.; FOLSOM, A. R.; HIRSCH,
11 A. T.; DRAMAIX, M.; DEBACKER, G.; WAUTRECHT, J. C.; KORNTITZER, M.;
12 NEWMAN, A. B.; CUSHMAN, M.; SUTTON-TYRRELL, K.; FOWKES, F. G.; LEE, A. J.;
13 PRICE, J. F.; D'AGOSTINO, R. B.; MURABITO, J. M.; NORMAN, P. E.; JAMROZIK, K.;
14 CURB, J. D.; MASAKI, K. H.; RODRÍGUEZ, B. L.; DEKKER, J. M.; BOUTER, L. M.;
15 HEINE, R. J.; NIJPELS, G.; STEHOUWER, C. D.; FERRUCCI, L.; MCDERMOTT, M. M.;
16 STOFFERS, H. E.; HOOI, J. D.; KNOTTNERUS, J. A.; OGREN, M.; HEDBLAD, B.;
17 WITTEMAN, J. C.; BRETELER, M. M.; HUNINK, M. G.; HOFMAN, A.; CRIQUI, M. H.;
18 LANGER, R. D.; FRONEK, A.; HIATT, W. R.; HAMMAN, R.; RESNICK, H. E.;
19 GURALNIK, J.; MCDERMOTT, M. M. Ankle brachial index combined with Framingham
20 Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. **JAMA**, v. 300, n.
21 2, p. 197-208, 2008.

22

23 ARNETT, D. K.; BLUMENTHAL, R. S.; ALBERT, M. A.; BUROKER, A. B.;
24 GOLDBERGER, Z. D.; HAHN, E. J.; HIMMELFARB, C. D.; KHERA, A.; LLOYD-JONES,
25 D.; MCEVOY, J. W.; MICHOS, E. D.; MIEDEMA, M. D.; MUÑOZ, D.; SMITH, S. C. JR.;
26 VIRANI, S. S.; WILLIAMS, K. A. SR.; YEBOAH, J.; ZIAEIAN, B. 2019 ACC/AHA
27 Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American
28 College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice
29 Guidelines. **Circulation**, v. 140, n. 11, p. 596-646, 2019. *Erratum in: Circulation*. 2019 Sep
30 10;140(11):e649-e650. *Erratum in: Circulation*. 2020 Jan 28;141(4):e60. *Erratum in:*
31 *Circulation*. 2020 Apr 21;141(16):e774. PMID: 30879355; PMCID: PMC7734661.

32

33 ARRUDA, V. R.; SIQUEIRA, L. H.; GONÇALVES, M. S.; VON ZUBEN, P. M.; SOARES,
34 M. C.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; COSTA, F. F. Prevalence of the
35 mutation C677 T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic
36 groups in Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, v. 78, p. 332-335, 1998.

37

38 BELKIN, N.; DAMRAUER, S. M. Peripheral Arterial Disease Genetics: Progress to Date and
39 Challenges Ahead. **Current Cardiology Reports**, v. 19, p. 131, 2017.

40

41 BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A.; OMENN, G. S.; MOTULSKY, A. G. A quantitative
42 assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of
43 increasing folic acid intakes. **JAMA**, v. 274, n. 13, p. 1049-1057, 1995.

44

45 BREEK, J. C.; HAMMING, J. F.; DE VRIES, J.; AQUARIUS, A. E.; VAN BERGE, D. P.
46 Quality of life in patients with intermittent claudication using the world health organization
47 questionnaire. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 21, p. 118-
48 22, 2001.

49

- 1 CAPPUCCIO, F. P.; BELL, R.; PERRY, I. J.; GILG, J.; UELAND, P. M.; REFSUM, H.;
2 SAGNELLA, G. A.; JEFFERY, S.; COOK, D. G. Homocysteine levels in men and women of
3 different ethnic and cultural background living in England. **Atherosclerosis**, v. 164, n. 1, p.
4 95-102, 2002.
- 5
6 CARMELLI, D.; FABBITZ, R. R.; SWAN, G. E.; REED, T.; MILLER, B.; WOLF, P. A.
7 Contribution of genetic and environmental influences to ankle-brachial blood pressure index
8 in the NHLBI Twin Study. National Heart, Lung, and Blood Institute. **American Journal of**
9 **Epidemiology**, v. 151, n. 5, p. 452-458, 2000.
- 10
11 CASTRO, R.; RIVERA, I.; RAVASCO, P.; CAMILO, M. E.; JAKOBS, C.; BLOM, H. J.; DE
12 ALMEIDA, I. T. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C → T and 1298A
13 → C mutations are associated with DNA hypomethylation. **Journal of Medical Genetics**, v.
14 41, n. 6, p. 454-458, 2004.
- 15
16 CONTE, M. S.; BRADBURY, A. W.; KOLH, P.; WHITE, J. V.; DICK, F.; FITRIDGE, R.;
17 MILLS, J. L.; RICCO, J.; SURESH, K. R.; MURAD, M. H.; GVG WRITING GROUP.
18 Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. **Journal**
19 **of Vascular Surgery**, v. 69, n. 6S, 2019.
- 20
21 CRIQUI, M. H.; LANGER, R. D.; FRONEK, A.; FEIGELSON, H. S.; KLAUBER, M. R.;
22 MCCANN, T. J.; BROWNER, D. Mortality over a period of 10 years in patients with
23 peripheral arterial disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, p. 381-386,
24 1992.
- 25
26 CROWTHER, M. A.; KELTON, J. G. Congenital thrombophilic states associated with venous
27 thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. **Annals of Internal**
28 **Medicine**, v. 138, n. 2, p. 128-134, 2003.
- 29
30 DUDMAN, N. P. B.; HALE, S. E. T.; FU, W.; PERRY, M. A. Homocysteine may contribute
31 to occlusive vascular disease by enhancing leukocyte-endothelial adhesion. **Atherosclerosis**,
32 v. 134, p. 255, 1997.
- 33
34 FOWKES, F. G.; LEE, A. J.; HAU, C. M.; COOKE, A.; CONNOR, J. M.; LOWE, G. D.
35 Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and nitric oxide synthase (ecNOS) genes and
36 risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh Artery Study.
37 **Atherosclerosis**, v. 150, p. 179-185, 2000.
- 38
39 FOWKES, F. G.; MURRAY, G. D.; BUTCHER, I.; FOLSOM, A. R.; HIRSCH, A. T.;
40 COUPER, D. J.; DEBACKER, G.; KORNITZER, M.; NEWMAN, A. B.; SUTTON-
41 TYRRELL, K. C.; CUSHMAN, M.; LEE, A. J.; PRICE, J. F.; D'AGOSTINO, R. B. SR.;
42 MURABITO, J. M.; NORMAN, P.; MASAKI, K. H.; BOUTER, L. M.; HEINE, R. J.;
43 STEHOUWER, C. D.; MCDERMOTT, M. M.; STOFFERS, H. E.; KNOTTNERUS, J. A.;
44 OGREN, M.; HEDBLAD, B.; KOENIG, W.; MEISINGER, C.; CAULEY, J. A.; FRANCO,
45 O.; HUNINK, M. G.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C.; CRIQUI, M. H.; LANGER, R. D.;
46 HIATT, W. R.; HAMMAN, R. F.; ANKLE BRACHIAL INDEX COLLABORATION.
47 Development and validation of an ankle brachial index risk model for the prediction of
48 cardiovascular events. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 21, n. 3, p. 310-320,
49 2014.
- 50

- 1 FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C. A.; MATTHEWS, R.
2 G.; BOERS, G. J. H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L. A. J.; VAN DEN HEUVEL, L.
3 P.; ROZEN, R. A candidate gene risk factor for vascular disease: a common mutation in
4 methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, p. 111-113, 1995.
5
- 6 GAROFOLO, L.; BARROS, N. JR.; MIRANDA, F. JR.; D'ALMEIDA, V.; CARDIEN, L. C.;
7 FERREIRA, S. R. Association of increased levels of homocysteine and peripheral arterial
8 disease in a Japanese-Brazilian population. **European Journal of Vascular and**
9 **Endovascular Surgery**, v. 34, n. 1, p. 23-28, 2007.
10
- 11 GOLLEDGE, J.; BIROS, E.; BINGLEY, J.; IYER, V.; KRISHNA, S. M. Epigenetics and
12 peripheral artery disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 18, n. 4, p. 15, 2016.
13
- 14 GUAN, X.; YANG, X.; WANG, C.; BI, R. In silico analysis of the molecular regulatory
15 networks in peripheral arterial occlusive disease. **Medicine** (Baltimore), v. 99, 2020.
16
- 17 KHALEGHI, M.; ISSEH, I. N.; BAILEY, K. R.; KULLO, I. J. Family history as a risk factor
18 for peripheral arterial disease. **American Journal of Cardiology**, v. 114, p. 928-932, 2014.
19
- 20 KHANDANPOUR, N.; WILLIS, G.; MEYER, F. J.; ARMON, M. P.; LOKE, Y. K.;
21 WRIGHT, A. J. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)
22 C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. **Journal of Vascular Surgery**, v.
23 49, p. 711-718, 2009.
24
- 25 KISELJAKOVIC, E.; JADRIC, R.; HASIC, S.; SKENDERI, F.; RESIC, H.;
26 WINTERHALTER-JADRIC, M. Polymorphism in methylenetetra-hydrofolate reductase gene:
27 important role in diseases. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 165-
28 169, 2008.
29
- 30 KRISHNA, S. M.; TROLLOPE, A. F.; GOLLEDGE, J. The relevance of epigenetics to
31 occlusive cerebral and peripheral arterial disease. **Clinical Science**, v. 128, n. 9, p. 537-558,
32 2015.
33
- 34 LEEPER, N. J.; KULLO, I. J.; COOKE, J. P. Genetics of peripheral artery disease.
35 **Circulation**, v. 125, n. 25, p. 3220-3228, 2012.
36
- 37 LIMA, L. M.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, A. P.; SABINO, A. P.; LOURES-VALE,
38 A. A.; FONSECA NETO, C. P.; GARCIA, J. C. F.; SAAD, J. A.; SOUSA, M. O.
39 Homocysteine and metilenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in subjects submitted to
40 coronary angiography. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 2, p. 167-172, 2006.
41
- 42 MANOLIO, T. A.; COLLINS, F. S.; COX, N. J.; GOLDSTEIN, D. B.; HINDORFF, L. A.;
43 HUNTER, D. J.; MCCARTHY, M. I.; RAMOS, E. M.; CARDON, L. R.; CHAKRAVARTI,
44 A.; CHO, J. H.; GUTTMACHER, A. E.; KONG, A.; KRUGLYAK, L.; MARDIS, E.;
45 ROTIMI, C. N.; SLATKIN, M.; VALLE, D.; WHITTEMORE, A. S.; BOEHNKE, M.;
46 CLARK, A. G.; EICHLER, E. E.; GIBSON, G.; HAINES, J. L.; MACKAY, T. F. C.;
47 MCCARROLL, S. A.; VISSCHER, P. M. Finding the missing heritability of complex
48 diseases. **Nature**, v. 461, p. 747-753, 2009.
49

- 1 MERINO, J.; PLANAS, A.; DE MONER, A.; GASOL, A.; CONTRERAS, C.; MARRUGAT,
2 J.; VIDAL-BARRAQUER, F.; CLARÀ, A. The association of peripheral arterial occlusive
3 disease with major coronary events in a Mediterranean population with low coronary heart
4 disease incidence. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 36, n. 1, p.
5 71-76, 2008.
- 6
- 7 MOSTAZA, J. M.; MANZANO, L.; SUAREZ, C.; CAIROLS, M.; FERREIRA, E. M.;
8 ROVIRA, E.; SÁNCHEZ, A.; SUÁREZ-TEMBRA, M. A.; ESTIRADO, E.; ESTRELLA, J.
9 D.; VEGA, F.; SÁNCHEZ-ZAMORANO, M. A.; MERITO II STUDY. Prevalence of
10 asymptomatic peripheral artery disease detected by the ankle-brachial index in patients with
11 cardiovascular disease. MERITO II study. **Medicina Clinica**, v. 131, n. 15, p. 561-565, 2008.
- 12
- 13 MUELLER, T.; MARSCHOM, R.; DIEPLINGER, B.; HAIDINGER, D.; GEGENHUBER,
14 A.; POELZ, W.; WEBERSINKE, G.; HALTMAYER, M. Factor V Leiden, Prothrombin
15 G20210A, and MTHFR C667T mutation are not associated with chronic limb ischemia: The
16 Linz Peripheral arterial disease (LIPAD) study. **Journal of Vascular Surgery**, v. 41, n. 5, p.
17 808-815, 2005.
- 18
- 19 MURABITO, J. M.; GUO, C. Y.; FOX, C. S.; D'AGOSTINO, R. B. Heritability of the ankle-
20 brachial index: the Framingham Off spring study. **American Journal of Epidemiology**, v.
21 164, p. 963-968, 2006.
- 22
- 23 Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program
24 (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in
25 Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, n. 19, p. 2486-2497, 2001
- 26
- 27 NORGREN, L.; HIATT, W. R.; DORMANDY, J. A.; NEHLER, M. R.; HARRIS, K. A.;
28 FOWKES, F. G. R. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial
29 Disease (TASC II). **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 33, n. 1,
30 p. S1-S75, 2007.
- 31
- 32 RASSOUL, F.; RICHTER, V.; JANKE, C.; PURSCHWITZ, K.; KLÖTZER, B.; GEISEL, J.;
33 HERRMANN, W. Plasma homocysteine and lipoprotein profile in patients with peripheral
34 arterial occlusive disease. **Angiology**, v. 51, n. 3, p. 189-196, 2000.
- 35
- 36 RESNICK, H. E.; LINDSAY, R. S.; MCDERMOTT, M. M.; DEVEREUX, R. B.; JONES, K.
37 L.; FABSITZ, R. R.; HOWARD, B. V. Relationship of high and low ankle brachial index to
38 all-cause and cardiovascular disease mortality: the Strong Heart Study. **Circulation**, v. 109, n.
39 6, p. 733-739, 2004.
- 40
- 41 ROZEN, R. Genetic Predisposition to Hyperhomocysteinemia: Deficiency of
42 Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR). **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 1,
43 p. 523-526, 1997.
- 44
- 45 SABINO, A.; FERNANDES, A. P.; LIMA, L. M.; RIBEIRO, D. D.; SOUSA, M. O.;
46 SANTOS, M. E. C.; MOTA, A. P.; DUSSE, L. M.; CARVALHO, M. G. Polymorphism in the
47 methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) gene and homocysteine levels: a comparison in
48 Brazilian patients with coronary arterial disease, ischemic stroke and peripheral arterial
49 obstructive disease. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 27, n. 1, p. 82-87, 2009.
- 50

- 1 SAM, R. C.; BURNS, P. J.; HOBBS, S. D.; MARSHALL, T.; WILMINK, A. B. M.;
2 SILVERMAN, S. H.; BRADBURY, A. W. The prevalence of hyperhomocysteinemia.
3 methylene tetrahydrofolate reductase C677T mutation. and vitamin B12 and folate deficiency
4 in patients with chronic venous insufficiency. **Journal of Vascular Surgery**, v. 38, n. 5, p.
5 904-908, 2003.
6
- 7 SOFER, T.; EMERY, L.; JAIN, D.; ELLIS, A. M.; LAURIE, C. C.; ALLISON, M. A.; LEE,
8 J.; KURNIANSYAH, N.; KERR, K. F.; GONZÁLEZ, H. M.; TARRAF, W.; CRIQUI, M. H.;
9 LANGE, L. A.; PALMAS, W. R.; FRANCESCHINI, N.; WASSEL, C. L. Variants Associated
10 with the Ankle Brachial Index Differ by Hispanic/Latino Ethnic Group: a genome-wide
11 association study in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. **Scientific**
12 **Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
13
- 14 SPARK, J. I.; LAWS, P.; FRITIDGE, R. The incidence of hyperhomocysteinemia in vascular
15 patients. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 26, n. 5, p. 558-561,
16 2003.
17
- 18 STAMLER, J. S.; SILVKA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in
19 vasculature-related disease. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 1-30, 1996.
20
- 21 STRICKER, H.; SOLDATI, G.; BALMELLI, T.; MOMBELLI, G. Homocysteine, vitamins
22 and gene mutations in peripheral arterial disease. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 12,
23 n. 6, p. 469-75, 2001.
24
- 25 TAYLOR, L. M. JR.; MONETA, G. L.; SEXTON, G. J.; SCHUFF, R. A.; PORTER, J. M.
26 Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression
27 of symptomatic peripheral arterial disease. **Journal of Vascular Surgery**, v. 29, n. 1, p. 8-19,
28 1999.
29
- 30 UELAND, P. M.; REFSUM, H.; STABLER, S. P.; MALINOW, M. R.; ANDERSSON, A.;
31 ALLEN, R. H. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.
32 **Clinical Chemistry**, v. 39, p. 1764-1779, 1993.
33
- 34 WASSEL, C. L.; LOOMBA, R.; IX, J. H.; ALLISON, M. A.; DENENBERG, J. O.; CRIQUI,
35 M. H. Family history of peripheral artery disease is associated with prevalence and severity of
36 peripheral artery disease: the San Diego population study. **Journal of the American College**
37 **of Cardiology**, v. 58, n. 13, p. 1386-1392, 2011.
38
- 39 WILLIAMS, B.; MANCIA, G.; SPIERING, W.; ROSEI, E. A.; AZIZI, M.; BURNIER, M.;
40 CLEMENT, D. L.; COCA, A.; SIMONE, G. D.; DOMINICZAK, A.; KAHAN, T.;
41 MAHFOUD, F.; REDON, J.; RUILOPE, L.; ZANCHETTI, A.; KERINS, M.; KJELDSSEN, S.
42 E.; KREUTZ, R.; LAURENT, S.; LIP, G. Y. H.; MCMANUS, R.; NARKIEWICZ, K.;
43 RUSCHITZKA, F.; SCHMIEDER, R. E.; SHLYAKHTO, E.; TSIOUFIS, C.; ABOYANS, V.;
44 DESORMAIS, I.; ESC SCIENTIFIC DOCUMENT GROUP. ESC/ESH Guidelines for the
45 management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial
46 hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of
47 Hypertension (ESH), **European Heart Journal**, v. 39, n. 33, p. 3021-3104, 2018.
48

- 1 WILMANNNS, C.; CASEY, A.; SCHINZEL, H.; WALTER, P. K. Superficial thrombophlebitis
- 2 in varicose vein disease: the particular role of methylenetetrahydrofolate reductase.
- 3 **Phlebology**, v. 26, p. 135-139, 2011.

1 **Table 1** – Sociodemographic and clinical data of peripheral arterial occlusive disease (PAOD)
 2 patients and controls

	Control (n=113)	PAOD (n=157)	p value*
Age (year)	43 (37 – 48)	69 (62 – 76)	<0.001
Sex (Female/Male)	54 (47.8)/59 (52.2)	60 (38.2)/97 (61.8)	0.116
Ethnicity (C/NC)	88 (77.9)/25 (22.1)	109 (69.4)/48 (30.6)	0.123
BMI (kg/m ²)	25.81 (22.95 – 28.80)	25.31 (21.64 – 29.73)	0.355
Hcy (μmol/L)	9.91 (8.47 – 11.30)	13.66 (10.61 – 16.74)	<0.020
Folate (ng/mL)	5.4 (3.9 – 7.5)	7.3 (5.1 – 10.6)	0.242
Vitamin B12 (μg)	320 (230-450)	316 (236 – 440)	0.885

3 All results of Mann Whitney test. X^2 : results of analyses of contingency tables. Continuous
 4 variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and categorical
 5 variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). C: Caucasian; NC: not
 6 Caucasian; BMI: Body mass index. Hcy: Homocysteine. *Adjusted by age, sex, ethnicity, and
 7 body mass index.

1 **Table 2** – Clinical parameters of patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD)

Characteristics	Patients (n=157)
Fontaine classification*	
I	0 (0.0)
IIa	35 (22.4)
IIb	33 (21.2)
III	11 (7.1)
IV	77 (49.4)
Intermittent claudication (IIa + IIb)	68 (43.6)
Critical limb ischemia (III + IV)	88 (56.4)
Aorto-Iliac (No/Yes)**	115 (74.2)/40 (25.8)
TASC A	7 (4.5)
TASC B	5 (3.2)
TASC C	12 (7.7)
TASC D	16 (10.3)
Femoropopliteal (No/Yes)*	21 (13.5)/134 (86.5)
TASC A	9 (5.8)
TASC B	17 (11.0)
TASC C	36 (23.2)
TASC D	71 (45.8)
Aorto-Iliac/Femoropopliteal (No/Yes)**	136 (87.7)/19 (12.3)
All patients without distinction of the arterial territory: TASC A+B/C+D **	23 (14.8)/132 (85.2)
Treatment *	
Endovascular	31 (19.9)
Surgical	66 (42.3)
Conservative	59 (37.8)
Smoking	37 (24.2)
Ex-smoker	68 (44.4)
Type 2 diabetes mellitus	98 (71.5)
Dyslipidemia	73 (47.4)
Systemic Arterial Hypertension	114 (74.0)
Hyperhomocysteinemia ($\geq 15 \mu\text{mol/L}$)	58 (39.2)

2 The categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%).

3 *In one patient, this variable was not recorded.

4 ** In two patients, this variable was not recorded.

5 I: asymptomatic; IIa: mild claudication; IIb: severe claudication; III: pain at rest,; IV: trophic
6 injury; TASC: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease.

A)
Fonta
ine
Classi
ficati
on

B)
TASC
Classi
ficati
on

1 **Figure 1.** Homocysteine serum levels in patients with peripheral arterial occlusive disease
2 (PAOD) according to Fontaine and TASC classification A) Fontaine classification. B) TASC II
3 classification. Data evaluated by Mann-Whitney test and expressed as median and interquartile
4 range (25%-75%). Adjusted by age, sex, ethnicity, body mass index, folate, vitamin B12, and
5 dyslipidemia.
6 I: asymptomatic; IIa: mild claudication; Iib: severe claudication; III: pain at rest,; IV: trophic
7 injury; TASC: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease.

1 **Table 3** – Distribution of genotypes and allele frequencies of *MTHFR* 677C>T variant between
 2 patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and controls

Genetic model		Controls (n=113)^a	PAOD (n=157)^b	OR (95% CI)	p-value*
Allelic	C	156 (69.0)	209 (66.6)	Reference	-
	T	70 (31.0)	105 (33.4)	1.120 (0.778 – 1.628)	0.576
Codominant	CC	54 (47.8)	76 (48.4)	Reference	-
	CT	48 (42.5)	57 (36.3)	1.230 (0.423 – 3.579)	0.704
	TT	11 (9.7)	24 (15.3)	3.415 (0.655 – 17.79)	0.145
Dominant	CC	54 (47.8)	76 (48.4)	Reference	-
	CT+TT	59 (52.2)	81 (51.6)	1.484 (0.536 – 4.105)	0.447
Recessive	CC+CT	102 (90.3)	133 (84.7)	Reference	-
	TT	11 (9.7)	24 (15.3)	3.029 (0.660 – 13.91)	0.154
Overdominant	CC+TT	65 (57.5)	100 (63.7)	Reference	-
	CT	48 (42.5)	57 (36.3)	0.921 (0.346– 2.454)	0.870

3 χ^2 : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as absolute number (n) and
 4 percentage (%). Bold values represent statistically significant values. *Adjusted by age, sex,
 5 ethnicity, and BMI.

1 **Table 4** – Results of the dominant and recessive model analysis of the association between the *MTHFR* 677C>T variant in patients with peripheral
 2 arterial occlusive disease (PAOD) and exploratory variables

Patients with PAOD						
	CC (n=76)	CT+TT (n=81)	p value*	CC+CT (n=133)	TT (n=24)	p value*
Age (year)	71 (61 – 78)	68 (62 – 74)	0.321	69 (61 – 76)	71 (63 – 76)	0.963
Sex (Female/Male)	26 (34.2)/50 (65.8)	34 (42.0)/47 (58.0)	0.317	50 (37.6)/83 (62.4)	10 (41.7)/14 (58.3)	0.705
Ethnicity (C/NC)	44 (57.9)/ 32 (42.1)	65 (80.2)/16 (19.8)	0.002	88 (66.2)/45 (33.8)	21 (87.5)/3 (12.5)	0.037
BMI (kg/m ²)	24.57 (21.26 – 27.92)	26.17 (22.43 – 30.61)	0.157	25.35 (21.67 – 29.73)	24.98 (20.31 – 29.37)	0.489
Hcy (μmol/L)	12.94 (10.02 – 15.98)	14.60 (10.86 – 17.83)	0.008	13.22 (10.20 – 15.97)	16.40 (13.65 – 23.77)	0.019
Folate (ng/mL)	7.1 (5.2 – 10.6)	7.5 (4.8 – 10.8)	0.945	7.5 (5.3 – 11.1)	6.3 (3.7 – 9.6)	0.126
Vitamin B12 (μg)	341 (241 – 459)	299 (217 – 418)	0.202	318 (244 – 445)	276 (185 – 395)	0.596
Fontaine IIa+IIb/II+IV	32 (42.1)/44 (57.9)	36 (45.0)/44 (55.0)	0.716	56 (42.4)/76 (57.6)	12 (50.0)/12 (50.0)	0.548
TASC A+B/C+D [#]	10 (13.3)/65 (86.7)	13 (16.2)/67 (83.8)	0.610	20 (15.2)/112 (84.8)	3 (13.0)/20 (87.0)	0.544

3 Mann Whitney test. Data were expressed by median and interquartile range (25%-75%). X^2 : results of analyses of contingency tables. Data were
 4 expressed as absolute number (n) and percentage (%). *Adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, folate, vitamin B12, and dyslipidemia.
 5 BMI: Body mass index, Hcy: Homocysteine, TASC: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease. [#]In two
 6 patients, this variable was not recorded.

1 6 CONCLUSÕES

2

3 • Os grupos de pacientes com DAOP e indivíduos controles não diferiram
4 quanto a frequência alélica e genotípica da variante 677C>T (rs1801133)
5 do gene *MTHFR*;

6 • Não houve associação entre a variante 677C>T (rs1801133) do gene
7 *MTHFR* e os níveis de Hcy em indivíduos controles, nos diferentes
8 modelos genéticos avaliados;

9 • Pacientes com DAOP com o genótipo TT (modelo recessivo) ou os
10 genótipos CT+TT (modelo dominante) apresentaram maiores níveis de
11 Hcy, independentemente de fatores confundidores, tais como, sexo, etnia,
12 idade, IMC e níveis séricos de folato e vitamina B12;

13 • Não houve associação entre a variante genética estudada e a gravidade
14 clínica e o acometimento anatomorradiológico dos pacientes com DAOP.

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2

3 Pretende-se, com esse estudo, melhorar o entendimento da fisiopatologia da
4 DAOP e apontar possíveis novos alvos terapêuticos para o tratamento dos pacientes
5 acometidos por esta doença, que apresenta elevada morbidade e mortalidade. Na
6 prática clínica diária, nota-se que, mesmo com o controle adequado dos fatores de
7 risco, um número significativo de pacientes apresenta a progressão da doença, com
8 um mau prognóstico pela elevada morbidade, resultando na amputação dos MMII,
9 assim como elevada mortalidade. A heterogeneidade do quadro clínico e a
10 progressão da doença podem ser explicadas pelo caráter multifatorial da DAOP e o
11 estudo pleiotrópico e interdependente dos efeitos de diferentes genes candidatos a
12 biomarcadores genéticos associados a esta doença é um desafio a ser enfrentado.

13 Uma vez que a DAOP resulta de alterações em múltiplas vias aterogênicas,
14 grandes efeitos de um único gene são improváveis; por outro lado, múltiplos *loci*
15 provavelmente estão envolvidos e os genes candidatos podem se expressar apenas
16 por meio da interação com outros genes ou com estilos de vida associados aos
17 fatores de risco da doença.

18 Além disto, o gene *MTHFR* investigado neste estudo apresenta mais de uma
19 variante genética e pode ser interessante avaliar o possível papel de outras
20 variantes e haplótipos na fisiopatologia da DAOP. Portanto, o melhor conhecimento
21 do papel dos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais poderá contribuir para um
22 manejo mais adequado da doença e sua evolução. Os esforços para avaliar o
23 metiloma de indivíduos com DAOP podem demonstrar como as exposições
24 ambientais ou outros fatores de risco regulam genes importantes para a progressão
25 da doença.

REFERÊNCIAS

- 1
2
3 ALCÂNTARA, M. L.; SANTOS, S. N.; FREIRE, C. M. V.; CANTISANO, A. L.;
4 TEODORO, J. A. R.; PORTO, C. L. L.; AMARAL, S. I.; VELOSO, O.; ALBRICKER, A.
5 C. L.; PETISCO, A. C. G. P.; BARROS, F. S.; BARROS, M. V. L.; SANTOS, J. C. M.;
6 MORHY, S. S. Recomendações para Avaliação Ultrassonográfica da Aorta
7 Abdominal e Ramos: Grupo de Trabalho do Departamento de Imagem
8 Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – DIC – SBC. **Arquivos**
9 **Brasileiros de Cardiologia**: Imagem cardiovascular. v. 29, 2016.
- 10
11 ABOYANS, V.; RICCO, J. B.; BARTELINK, M. E. L.; BJÖRCK, M; BRODMANN, M;
12 COHNERT, T.; COLLET, J. P.; CZERNY, M.; DE CARLO, M.; DEBUS, S.;
13 ESPINOLA-KLEIN, C.; KAHAN, T.; KOWNATOR, S.; MAZZOLAI, L.; NAYLOR, A. R.;
14 ROFFI, M.; RÖTHER, J.; SPRYNGER, M.; TENDERA, M.; TEPE, G.; VENERMO,
15 M.; VLACHOPOULOS, C.; DESORMAIS, I. Editor's Choice - 2017 ESC Guidelines
16 on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with
17 the European Society for Vascular Surgery (ESVS). **European Journal of Vascular**
18 **and Endovascular Surgery**, v. 55, n. 3, p. 305-368, 2018. DOI:
19 10.1016/j.ejvs.2017.07.018
- 20
21 ABOYANS V, LACROIX P, CRIQUI MH. Large and small vessels atherosclerosis:
22 similarities and differences. **Progress in Cardiovascular Diseases**. v. 50, n. 2, p.
23 112–125, 2007.
- 24
25 BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A. A.; OMENN, G. S.; MOTULSKY, A. G. A
26 Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular
27 Disease: Probable Benefits of Increasing Folic Acid Intakes. **JAMA**, v. 274, n. 13, p.
28 1049-1057, 1995.
- 29
30 CAMPIA, U.; GERHARD-HERMAN, M.; PIAZZA, G.; GOLDHABER, S. Z. Peripheral
31 Artery Disease: Past, Present, and Future. **The American Journal of Medicine**, v.
32 132, p. 1133-1141, 2019. DOI: 10.1016/j.amjmed.2019.04.043
- 33
34 CHACRA, A. P. M; SANTOS-FILHO, R. D. Patogenia e Fisiopatologia da
35 Aterosclerose. In: MAFFEI et al. **Doenças Vasculares Periféricas**. 5ª ed. Rio de
36 Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. p. 2016-2045.
- 37
38 CHEN Q, SMITH CY, BAILEY KR, WENBERG PW, KULLO IJ. Disease location is
39 associated with survival in patients with peripheral arterial disease. **Journal of**
40 **American Heart Association**, v. 2, n.5, 2013.
- 41
42 CONTE, M. S.; BRADBURY, A. W.; KOLH, P.; WHITE, J. V.; DICK, F.; FITRIDGE, R.;
43 MILLS, J. L.; RICCO, J.; SURESH, K. R.; MURAD, M. H.; GVG WRITING GROUP.
44 Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia.
45 **Journal of Vascular Surgery**, v. 69, n. 6S, p. 3S-125S, 2019. DOI:
46 10.1016/j.jvs.2019.02.016
- 47
48 CROWTHER, M. A.; KELTON, J. G. Congenital thrombophilic states associated with
49 venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system.
50 **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 2, p. 128-134, 2003.

- 1
2 DEMIRCI, E.; ÇELİK, O.; KALÇIK, M.; BEKAR, L.; YETİM, M.; DOĞAN, T. Evaluation
3 of homocystein and asymmetric dimethyl arginine levels in patients with coronary
4 slow flow phenomenon. **Interventional Medicine & Applied Science**, v. 11, n. 2, p.
5 89-94, 2019.
- 6
7 DIEHM N, SHANG A, SILVESTRO A, DO DD, DICK F, SCHMIDLI J, MAHLER F,
8 BAUMGARTNER I. Association of cardiovascular risk factors with pattern of lower
9 limb atherosclerosis in 2659 patients undergoing angioplasty. **European Journal of**
10 **Vascular and Endovascular Surgery**. v. 31, n.1, p. 59–63, 2006.
- 11
12 DOSLUOĞLU, H. H. Doença Arterial Periférica: Considerações Gerais. In:
13 CRONENWETT, J. L.; JOHNSTON, W. **Rutherford: Cirurgia Vascular**. 8ª ed. Rio
14 de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 1660-1674.
- 15
16 DUBSKY, M.; JIRKOVSKA, A.; PAGACOVA, L.; BEM, R.; NEMCOVA, A.;
17 FEJFAROVA, V.; WOSKOVA, V.; JUDE, E. B. Impact of inherited prothrombotic
18 disorders on the long-term clinical outcome of percutaneous transluminal angioplasty
19 in patients with diabetes. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015. DOI:
20 10.1155/2015/369758
- 21
22 ESSE, R.; BARROSO, M.; TAVARES DE ALMEIDA, I.; CASTRO, R. The Contribution
23 of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art.
24 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019. DOI:
25 10.3390/ijms20040867
- 26
27 FOWKES, F. G.; LEE, A. J.; HAU, C. M.; COOKE, A.; CONNOR, J. M.; LOWE, G. D.
28 Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and nitric oxide synthase (ecNOS)
29 genes and risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh
30 Artery Study. **Atherosclerosis**, v. 150, n. 1, p. 179-185, 2000.
- 31
32 FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C. A.;
33 MATTHEWS, R. G.; BOERS, G. J. H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L. A. J.; VAN
34 DEN HEUVE, L. P.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a
35 common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, p.
36 111-113, 1995.
- 37
38 GANGULY, P.; ALAM, S. F. Role of homocysteine in the development of
39 cardiovascular disease. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 6, p. 1-10, 2015. DOI:
40 10.1186/1475-2891-14-6
- 41
42 GAROFOLO, L.; BARROS, N. JR.; MIRANDA, F. JR.; D'ALMEIDA, V.; CARDIEN, L.
43 C.; FERREIRA, S. R. Association of increased levels of homocysteine and peripheral
44 arterial disease in a Japanese-Brazilian population. **European Journal of Vascular**
45 **and Endovascular Surgery**, v. 34, p. 23-28, 2007.
- 46
47 GOLLEDGE, J.; MOXON, J. V.; ROWBOTHAM, S.; PINCHBECK, J.; YIP, L.; VELU,
48 R.; QUIGLEY, F.; JENKINS, J.; MORRIS, D. R. Risk of major amputation in patients
49 with intermittent claudication undergoing early revascularization. **The British Journal**
50 **of Surgery**, v. 105, n. 6, p. 699-708, 2018. DOI: 10.1002/bjs.10765

- 1
2 GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R. Seven novel
3 mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype
4 correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **The**
5 **American Journal of Human Genetics**, v, 56, p. 1052-1059, 1995.
- 6
7 GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; FROSST, P.; TRAN, P.; CHEN, Z.; CHAN, M.;
8 ROZEN, R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate
9 reductase (MTHFR). **Mammalian Genome**, v. 9, 652-656, 1998.
- 10
11 GOYETTE, P.; ROZEN, R. The thermolabile variant 677C>T can further reduce
12 activity when expressed in CIS with severe mutations for human
13 methylenetetrahydrofolate reductase. **Human Mutation**, v. 16, 132-138, 2000.
- 14
15 HAYNES, W. G. Hyperhomocysteinemia, Vascular Function and Atherosclerosis:
16 Effects of Vitamins. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 16, p. 391-399, 2002.
- 17
18 HICKEY, S. E.; CURRY, C. J.; TORIELLO, H. V. ACMG Practice Guideline: Lack of
19 evidence for *MTHFR* polymorphism testing. **Genetics in Medicine**, v. 15, p. 153-156,
20 2013.
- 21
22 HIRAMOTO, J. S.; TERA, M.; BORST, G. J. DE; CONTE, M. S. Interventions for
23 lower extremity peripheral artery disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 6, p.
24 332–350, 2018. DOI: 10.1038/s41569-018-0005-0
- 25
26 JACQUES, P. F.; BOSTOM, A. G.; WILLIAMS, R. R.; ELLISON, R. C.; ECKFELDT, J.
27 H.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J.; ROZEN, R. Relation between folate status, a
28 common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine
29 concentrations. **Circulation**, v. 93, p. 7-9, 1996. DOI: 10.1161/01.CIR.93.1.7
- 30
31 JAISSON, S.; DESMONSA, A.; BRACONNIER, A.; WYNCKEL, A.; RIEUC, P.;
32 GILLERYA, P.; GARNOTEL, R. An unusually high plasma concentration of
33 homocysteine resulting from a combination of so-called “secondary” etiologies.
34 **Clinical Biochemistry**, v. 80, p. 52-55, 2020.
- 35
36 KATSIKI, N.; PEREZ-MARTINEZ, P.; MIKHAILIDIS, D. P. Homocysteine and Non-
37 Cardiac Vascular Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 22, p. 3224-
38 3232, 2017. DOI: 10.2174/1381612823666170317124913
- 39
40 KHANDANPOUR, N.; WILLIS, G.; MEYER, F. J.; ARMON, M. P.; LOKE, Y. K.;
41 WRIGHT, A. J. A.; FINGLAS, P. M.; JENNINGS, B. A. Peripheral arterial disease and
42 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations: A case-control
43 study and meta-analysis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 49, n. 3, p. 711-718,
44 2009. DOI: 10.1016/j.jvs.2008.10.004
- 45
46 KLUIJTMANS, L. A. J.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; BOERS, G. H. J.; FROSST, P.;
47 STEVENS, E. M. B.; VAN OOST, B. A.; DEN HEIJER, M.; TRIJBELS, F. J.; ROZEN,
48 R.; BLOM, H. J. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a
49 common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk

- 1 factor for cardiovascular disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 58,
2 n. 1, p. 35-41, 1996.
- 3
- 4 KUMAR, A.; KUMAR, P.; PRASAD, M.; SAGAR, R.; YADAV, A. K.; PANDIT, A. K.;
5 JALI, V. P.; PATHAK, A. Association of C677T polymorphism in the
6 methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR gene) with ischemic stroke: a
7 meta-analysis. **Neurological Research**, v. 37, n. 7, p. 568-577, 2015.
- 8
- 9 LECLERC D, ROZEN R. Génétique moléculaire de MTHFR: les polymorphismes ne
10 sont pas tous bénins [Molecular genetics of MTHFR: polymorphisms are not all
11 benign]. **Médecine Sciences**, v. 23, n. 3, p. 297-302, 2007.
- 12
- 13 LEVIN, B. L.; VARGA, E. MTHFR: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using
14 Evidence-Based Literature. **Journal of Genetic Counseling**, v. 25, p. 901-911,
15 2016.
- 16
- 17 LIEW, S. C.; GUPTA, E. D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T
18 polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European**
19 **Journal of Medicinal Genetics**, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2015.
- 20
- 21 MADLOOL, R. F.; AL-BARQAAWI, M. A.; BAQIR, H. A. Association of MTHFR C677T
22 Gene Polymorphism with Ischemia in Iraqi Population Undergoing Coronary
23 Angiography. **Karbala Journal of Medicine**, v. 12, n. 2, 2019.
- 24
- 25 MAKDISSE, M.; PEREIRA, A. C.; BRASIL, D. P.; BORGES, J. L.; MACHADO-
26 COELHO, G. L. L.; KRIEGER, J. E.; NASCIMENTO-NETO, R. M.; CHAGAS, A. C. P.
27 (representando os investigadores do Projeto Corações do Brasil e do Comitê de
28 Doença Arterial Periférica da Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC/Funcor).
29 Prevalência e fatores de risco associados à doença arterial periférica no projeto
30 corações do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 6, p. 402-414,
31 2008.
- 32
- 33 MARTÍ-CARVAJAL, A. J.; SOLÀ, I.; LATHYRIS, D.; DAYER, M. Homocysteine-
34 lowering interventions for preventing cardiovascular events. **The Cochrane**
35 **Database of Systematic Reviews**, v. 8, 2017. DOI:
36 10.1002/14651858.CD006612.pub5.
- 37
- 38 MULLER, T.; MARSCHON, R.; DIEPLINGER, B.; HAIDINGER, D.; GEGENHUBER,
39 A.; POELZ, W.; WEBERSINKE, G.; HALTMAYER, M. Factor V Leiden, prothrombin
40 G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations are not
41 associated with chronic limb ischemia: The Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD)
42 Study. **Journal of Vascular Surgery**, v. 41, n. 5, p. 808-815, 2005.
- 43
- 44 NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **Jornal Brasileiro de**
45 **Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 311-320, 2004.
- 46
- 47 NORGREN, L.; HIATT, W. R.; DORMANDY, J. A.; NEHLER, M. R.; HARRIS, K. A.;
48 FOWKES, F. G. R. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral
49 Arterial Disease (TASC II). **European Journal of Vascular and Endovascular**
50 **Surgery**, v. 33, n. 1, p. S1–S75, 2007. DOI: 10.1016/j.ejvs.2006.09.024

- 1
2 PASTORI, D.; FARCOMENI, A.; MILANESE, A.; DEL SOLE, F.; MENICHELLI, D.;
3 HIATT, W. R.; VIOLI, F. Statins and Major Adverse Limb Events in Patients with
4 Peripheral Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Thrombosis**
5 **and Haemostasis**, v. 120, n. 5, 2020. DOI: 10.1055/s-0040-1709711.
6
- 7 PIAZZOLLA, G.; CANDIGLIOTA, M.; FANELLI, M.; CASTROVILLI, A.; BERARDI, E.;
8 ANTONICA, G.; BATTAGLIA, S.; SOLFRIZZI, V.; SABBÀ, C.; TORTORELLA, C.
9 Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor of atherosclerosis in patients
10 with metabolic syndrome. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 87,
11 2019. DOI: 10.1186/s13098-019-0484-0
12
- 13 PRESTI, C.; MIRANDA-JR, F.; CASELLA, I. B.; DE-LUCCIA, N.; COVRE, M. R.
14 Doença arterial periférica obstrutiva de membros inferiores: diagnóstico e
15 tratamento. **Projeto Diretrizes SBACV – Sociedade Brasileira de Angiologia e**
16 **Cirurgia Vascul**, 2015. p. 3-20.
17
- 18 RASSOUL, F.; RICHTER, V.; JANKE, C.; PURSCHWITZ, K.; KLÖTZER, B.; GEISEL,
19 J.; HERRMANN, W. Plasma homocysteine and lipoprotein profile in patients with
20 peripheral arterial occlusive disease. **Angiology**, v. 51, n. 3, p. 189-196, 2000.
21
- 22 ROBIEN, K.; ULRICH, C. M. 5.10-Methylenetetrahydrofolate reductase
23 polymorphisms and leukemia risk: A HuGE minireview. **American Journal of**
24 **Epidemiology**, v. 157, n.7, p. 571-582, 2003.
25
- 26 ROSENBERG, N.; MURATA, M.; IKEDA, Y.; OPARE-SEM, O.; ZIVELIN, A.;
27 GEFFEN, E.; SELIGSOHN, U. The frequent 5.10-methylenetetrahydrofolate
28 reductase C677T polymorphism is associated with a common haplo-type in whites,
29 Japanese, and Africans. **The American Journal of Human Genetics**, v. 70, p. 758-
30 762, 2002.
31
- 32 SABINO, A.; FERNANDES, A. P.; LIMA, L. M.; RIBEIRO, D. D.; SOUSA, M. O.;
33 CASTRO-SANTOS, M. E. R.; MOTA, A. P. L.; DUSSE, L. M. S. A.; GRAÇAS-
34 CARVALHO, M. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (C677T)
35 gene and homocysteine levels: A comparison in Brazilian patients with coronary
36 arterial disease, ischemic stroke and peripheral arterial obstructive disease. **Journal**
37 **of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 27, n. 1, p. 82-87, 2009. DOI:
38 10.1007/s11239-007-0172-z
39
- 40 SANTOS, M. E.; SILVA, F. C. L.; GOMES, K. B.; FERNANDES, A. P.; FREITAS, F.
41 R.; FARIA, M. C.; MOTA, A. P.; CARVALHO, M. G. Mutations in
42 methylenetetrahydrofolate reductase and in cystathionine beta synthase: is there a
43 link to homocysteine levels in peripheral arterial disease? **Molecular Biology**
44 **Reports**, v. 38, n. 5, p. 3361-3336, 2011.
45
- 46 SCHILLINGER, M.; MINAR, E. Restenosis after percutaneous angioplasty: the role of
47 vascular inflammation. **Vascular Health and Risk Management**, v. 1, n. 1, p. 73-78,
48 2005.
49

- 1 SIGVANT, B.; LUNDIN, F.; WAHLBERG, E. The risk of disease progression in
2 peripheral arterial disease is higher than expected: A meta-analysis of mortality and
3 disease progression in peripheral arterial disease. **European Journal of Vascular**
4 **and Endovascular Surgery**: the Official Journal of the European Society for
5 Vascular Surgery, v. 51, n. 3, p. 395-403, 2016. DOI: 10.1016/j.ejvs.2015.10.022
6
- 7 SONG, P.; RUDAN, D.; ZHU, Y.; FOWKES, F. J. I.; RAHIMI, K.; FOWKES, F. G. R.;
8 RUDAN, I. Global, regional, and national prevalence and risk factors for peripheral
9 artery disease in 2015: an updated systematic review and analysis. **The Lancet –**
10 **Global Health**, v. 7, n. 8, p. e1020-e1030, 2019. DOI: 10.1016/S2214-
11 109X(19)30255-4
12
- 13 SPELLICY, C. J.; NORTHRUP, H.; FLETCHER, J. M.; CIRINO, P. T.; DENNIS, M.;
14 MORRISON, A. C.; MARTINEZ, C. A.; AU, K. S. Folate metabolism gene 5,10-
15 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ADHD in
16 myelomeningocele patients. **PLoS One**, v. 7, n. 12, 2012. DOI:
17 10.1371/journal.pone.0051330.
18
- 19 SUZUKI, J.; SHIMAMURA, M.; SUDA, H.; WAKAYAMA, K.; KUMAGAI, H.; IKEDA, Y.;
20 AKAZAWA, H.; ISOBE, M.; KOMURO, I.; MORISHITA, R. Current therapies and
21 investigational drugs for peripheral arterial disease. **Hypertension Research**: Official
22 Journal of the Japanese Society of Hypertension, v. 39, n. 4, p. 183-191, 2016. DOI:
23 10.1038/hr.2015.134
24
- 25 VITATOPS Trial Study Group. B vitamins in patients with recent transient ischaemic
26 attack or stroke in the VITamins TO Prevent Stroke (VITATOPS) trial: a randomised,
27 double-blind, parallel, placebo- controlled trial. **The Lancet – Neurology**, v. 9, n. 9, p.
28 855-865, 2010.
29
- 30 WAN, L.; LI, Y.; ZHANG, Z.; SUN, Z.; HE, Y.; LI, R. Methylenetetrahydrofolate
31 reductase and psychiatric diseases. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, 2018. DOI:
32 10.1038/s41398-018-0276-6.
33
- 34 YANG, Q-H.; BOTTO, L. D.; GALLAGHER, M.; FRIEDMAN, J. M.; SANDERS, C. L.;
35 KOONTZ, D.; NIKOLOVA, S.; ERICKSON, J. D.; STEINBERG, K. Prevalence and
36 effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total
37 homocysteine concentrations in the United States: Findings from the third National
38 Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. **The American Journal of**
39 **Clinical Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 232-246, 2008.
40
- 41 ZHANG, D.; FANG, P.; JIANG, X.; NELSON, J.; MOORE, J. K.; KRUGER, W. D.;
42 BERRETTA, R. M.; HOUSER, S. R.; YANG, X.; WANG, H. Severe
43 hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory
44 monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLr/CBS-deficient mice. **Circulation**
45 **Research**, v. 111, n. 1, p. 37-49, 2012.
46

1

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa:

“AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE C677T (rs1801133) DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA PERIFÉRICA: ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E A GRAVIDADE CLÍNICA E ANATÔMICA DA DOENÇA”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE C677T (rs1801133) DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA PERIFÉRICA: ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E A GRAVIDADE CLÍNICA E ANATÔMICA DA DOENÇA”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina (HU) da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar os fatores de risco cardiovasculares em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP). A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: avaliação clínica pelo médico cirurgião vascular e coleta de sangue. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. **Serão realizados testes laboratoriais para o perfil metabólico, resposta imunológica, estresse oxidativo e outras análises que se façam necessárias.**

Os benefícios esperados são: 1) o conhecimento da prevalência do perfil bioquímico dos pacientes portadores de DAOP, de uma amostra da população brasileira, permite a estratificação de risco cardiovascular, o que implica em manejo mais adequado de acordo com as características da nossa população; 2) o

1 entendimento da fisiopatologia que envolve as alterações do estresse oxidativo e
2 inflamação na DAOP possibilita melhor monitoramento da doença e
3 desenvolvimento de novas intervenções medicamentosas.

4 Informamos que o (a) senhor (a) não pagará nem será remunerado por sua
5 participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da
6 pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua
7 participação na pesquisa.

8 Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode
9 contatar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da
10 Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, 60 ou no telefone
11 3371-2490 . Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo
12 uma delas devidamente preenchida e assinada entregue a você.

13

14

15 Londrina, _____ de _____ de 2017.

16

17

18 _____(nome por extenso do sujeito de
19 pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa,
20 concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

21 Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

22

23 Eu, _____(nome do membro da equipe que
24 apresentou o TCLE), obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre
25 e Esclarecido do sujeito da pesquisa para a sua participação na mesma.

26

27 _____

28 (assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

29

30

31 Pesquisadores responsáveis

32 _____

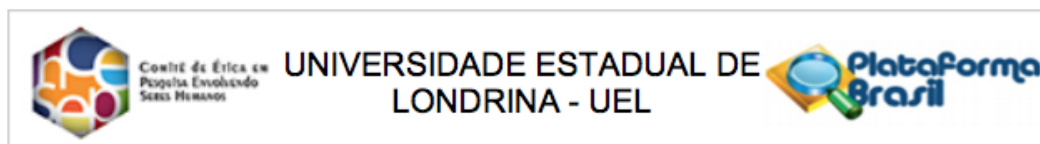
33 Prof. Dra Andréa Name Colado Simão

1

ANEXOS

1
2
3
4

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE LONDRINA (UEL)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO NA DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA PERIFÉRICA (DAOP) EM HUMANOS

Pesquisador: Rubens Cecchini

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 78870317.8.0000.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.400.074

Apresentação do Projeto:

O arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_885289.pdf" em seu item "Resumo" diz: A Doença Arterial Oclusiva Periférica (DAOP) é uma doença crônica que leva a uma redução na capacidade física e funcional do paciente, cuja causa é parcialmente representada pela redução do aporte de sangue em membros inferiores e disfunção mitocondrial. Portanto, o objetivo deste estudo é investigar a partir do modelo isquemia e reperfusão induzido pela DAOP os níveis de estresse oxidativo, perfil de citocinas inflamatórias sistêmicas e biomarcadores de lesão celular sistêmica. Neste estudo 100 pacientes serão divididos em 3 grupos: controle (n=50) sem DAOP, grupo IIa (n=25) claudicação intermitente limitante e grupo IIb (n=25) claudicação intermitente incapacitante de acordo com a classificação de Fontaine - Rutherford (1997). Serão realizadas análises de perfil inflamatório, metabólico e de estresse oxidativo. A partir desses resultados pretende-se contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia e destacar biomarcadores de lesão sistêmica dessa doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil metabólico, inflamatório e estresse oxidativo em pacientes com DAOP em diferentes estágios de claudicação intermitente e compará-los com indivíduos saudáveis (grupo

Endereço: LABESC - Sala 14

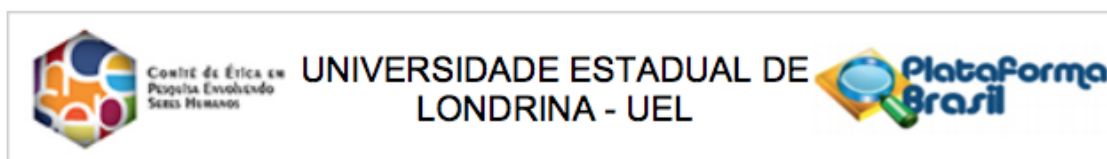
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

5



Continuação do Parecer: 2.400.074

controle).

Objetivo Secundário:

- Determinar o perfil oxidativo através da determinação de marcadores pró-oxidantes e antioxidantes;
- Analisar o perfil Inflamatório sistêmico a partir da dosagem de citocinas pró-inflamatórias;
- Avaliar o perfil metabólico sistêmico;
- Relacionar os diferentes estágios da doença com o comprometimento renal.
- Pesquisar quais marcadores é mais específicos em cada estágio da doença;
- Fornecer ferramentas para o desenvolvimento de novas terapias ou terapias adjuvantes para o tratamento da DAOP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Benefícios:

Espera-se encontrar uma melhor compreensão da fisiopatologia da DAOP e determine-se os biomarcadores de lesão sistêmica dessa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este CEP entende, ressalta a importância da pesquisa e considera não haver pendências ético-documentais à realização da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Apresenta folha de rosto devidamente preenchida e assinada;
2. Apresenta TCLE constando das informações necessárias ao esclarecimento dos participantes;
3. Apresenta autorização do HU para realização da pesquisa;
4. Apresenta termo de confidencialidade e sigilo para acesso a dados secundários;
5. Apresenta termo para armazenamento de material biológico;
6. Apresenta cronograma de execução compatível com a proposta;
7. Apresenta orçamento financeiro com previsão de financiamento próprio.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

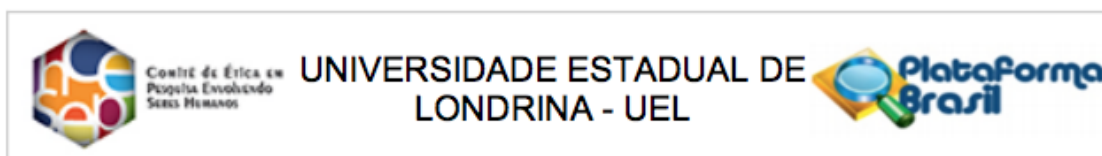
UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.400.074

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências ético-documentais, este CEP considera a pesquisa apta à realização.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_885289.pdf	17/11/2017 21:54:41		Aceito
Folha de Rosto	Foha_rosto.pdf	17/11/2017 21:54:09	Rubens Cecchini	Aceito
Outros	banco_material_biologico_humano.jpg	11/10/2017 15:18:09	Rubens Cecchini	Aceito
Outros	termo_confidencialidade.jpg	11/10/2017 15:16:18	Rubens Cecchini	Aceito
Outros	Aprovacao_hu.jpg	11/10/2017 15:14:31	Rubens Cecchini	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	1507744769fd0537266aedda5d3d4e3c21f2a0a051.jpg	11/10/2017 15:01:07	Rubens Cecchini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_correto.doc	11/10/2017 14:56:15	Rubens Cecchini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_correto.docx	11/10/2017 14:56:05	Rubens Cecchini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

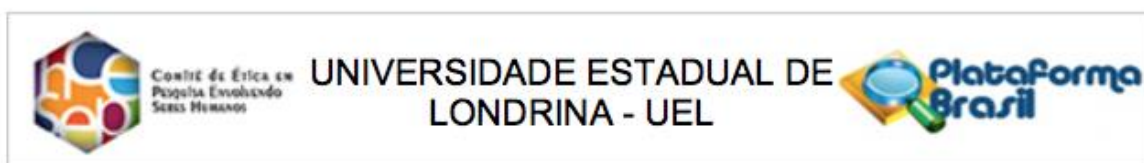
UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

Município: LONDRINA

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.400.074

LONDRINA, 27 de Novembro de 2017

Assinado por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br