

Artigo / Article

## Polimorfismo genético do fibrinogênio na doença arterial periférica

### *Genetic polymorphisms of fibrinogen in peripheral artery disease*

Antônio C. Brandão<sup>1</sup>Daniel M. Trindade<sup>2</sup>Julia Hotta<sup>3</sup>Marcela A. Pinhel<sup>3</sup>Alexandre M. Anacleto<sup>4</sup>José Maria P. Godoy<sup>5</sup>Moacir F. Godoy<sup>5</sup>José E. Santos<sup>6</sup>Dorotéia R. S. Souza<sup>7</sup>

O objetivo do presente estudo foi analisar frequências alélicas e genotípicas para o gene codificador da cadeia b do fibrinogênio em pacientes com doença arterial periférica (DAP). Foram estudados 44 pacientes caucasóides do sexo masculino com sintomas clínicos e comprovação angiográfica de DAP, com idade entre 38 e 79 anos ( $62 \pm 8,6$  anos). Entre eles, 22 apresentaram obstrução aterosclerótica nas artérias ilíacas, femorais e/ou carótidas e 22 tinham aneurisma de aorta torácica, abdominal ou tóraco-abdominal. O grupo controle foi constituído por 56 indivíduos, sem história clínica de DAP ou alterações ao exame clínico, com idades variando de 43 a 80 anos ( $59 \pm 9,2$  anos). Foram excluídos os indivíduos com doença renal, doença hepática ou diabetes mellitus. A análise do polimorfismo genético da cadeia do fibrinogênio foi realizada por PCR (polimerase chain reaction) e RFLP (restriction fragment length polymorphism) com a endonuclease Bcl I, identificando-se três genótipos: B1/B1, B1/B2 e B2/B2. A análise estatística incluiu teste exato de Fisher; cálculo do odds ratio, teste de Kruskal Wallis e análise de variância (ANOVA). Admitiu-se erro  $\alpha$  igual a 5%, com nível de significância para  $P \leq 0,05$ . O alelo B1 foi o mais prevalente em pacientes e controles (0,819 e 0,857, respectivamente;  $P=0,5605$ ), com prevalência do genótipo B1/B1 nos pacientes (65,9%) e controles (71,4%;  $P=0,6639$ ), seguido de B1/B2 (31,8; 28,6%, respectivamente;  $P=0,8268$ ). Em conclusão, DAP, independente do tipo de lesão obstrutiva ou aneurismática, apresenta-se indiferente ao polimorfismo Bcl I do fibrinogênio, portanto, sem influência dos alelos B1 e B2 para fibrinogênio e seus respectivos genótipos na doença. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(3):202-205.

**Palavras-chave:** Polimorfismo genético; fibrinogênio; doença arterial periférica.

### Introdução

O fibrinogênio, uma glicoproteína plasmática com ação no final da cascata de coagulação sangüínea, é também reconhecido como fator de risco para a doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial periférica (DAP).<sup>1-6</sup> Após a clivagem pela trombina, essa proteína forma monômeros de fibrina, os quais se polimerizam no processo de coagulação. Nesse

contexto, o fibrinogênio, bem como a fibrina e seus produtos de degradação, pode se acumular na placa aterosclerótica e estimular a proliferação de células musculares lisas. Além disso, a organização de trombos também está envolvida na progressão da aterosclerose.<sup>7,8</sup>

Vários fatores parecem influenciar a concentração plasmática de fibrinogênio, como tabagismo, idade, obesidade, nível de colesterol, diabetes mellitus, consumo de álcool, ingestão de fibras, uso de contraceptivos orais e

<sup>1</sup> Prof. Dr. Adjunto do Depto. de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - Famerp.

<sup>2</sup> Prof. Dr. do Departamento de Genética Molecular da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

<sup>3</sup> Bióloga Estagiária do Depto. de Biologia Molecular da Famerp.

<sup>4</sup> Médico do Instituto de Moléstias Cardiovascular de São José do Rio Preto-SP.

<sup>5</sup> Prof. Dr. Adjunto do Depto de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular da Famerp.

<sup>6</sup> Prof. Dr. do Depto de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

<sup>7</sup> Profª. Dra. Adjunto do Depto. de Biologia Molecular da Famerp.

**Correspondência para:** Antonio Carlos Brandão

Rua: Garabed Karabashian, 411

1570-600 – São José do Rio Preto-SP

menopausa. Além disso, estimativas de herdabilidade dos níveis plasmáticos de fibrinogênio variam de 27% a 51%.<sup>1</sup>

O fibrinogênio é composto por três cadeias polipeptídicas conhecidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , com simetria bilateral, organizadas e conectadas por pontes bissulfeto, cujos genes estão localizados no cromossomo 4 humano na região 4q28, constituindo um conjunto de aproximadamente 50 kb. Entretanto, o processo que coordena a expressão dos três genes ainda é obscuro. Nesse caso, parece que a cadeia  $\beta$  atua como fator limitante na síntese dos outros dois componentes do fibrinogênio.<sup>9,10</sup>

O polimorfismo  $\beta$  *Bcl I*, localizado na região 3' do gene  $\beta$  é associado a aterosclerose periférica.<sup>4</sup> Essa variante funcional pode resultar da substituição de guanina por adenina na posição  $\beta$  448, com troca de arginina por lisina, posicionada a 13 resíduos de aminoácidos antes do grupo carboxil terminal da cadeia  $\beta$  do fibrinogênio. Isso gera a expressão de dois alelos identificados como B1 e B2, cujas combinações permitem três genótipos B1/B1, B1/B2 e B2/B2, em cerca de 67, 30 e 3% da população, respectivamente.<sup>4</sup>

Este estudo teve como objetivo analisar frequências alélicas e genótípicas para o gene codificador da cadeia  $\beta$  do fibrinogênio em pacientes com doença arterial periférica.

### Casuística e Método

Foram estudados cem indivíduos caucasóides do sexo masculino, entre eles 44 pacientes com sintomas clínicos e comprovação angiográfica de DAP, com idade entre 38 e 79 anos (média e desvio padrão =  $62 \pm 8,6$  anos). Desses, 22 apresentaram obstrução aterosclerótica nas artérias ilíacas, femorais e/ou carótidas e 22 tinham aneurisma de aorta torácica, abdominal ou tóraco-abdominal. O grupo controle constituiu-se de 56 indivíduos, sem história clínica ou alterações ao exame clínico, cuja idade variou de 43 a 80 anos (média e desvio padrão =  $59 \pm 9,2$  anos). Foram excluídos os indivíduos com doença renal, doença hepática ou diabetes mellitus. Todos os indivíduos concordaram em participar do estudo pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### Análise molecular

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico (5 mL) coletados com EDTA. A extração foi realizada em três etapas, compreendendo: 1) lise das células sanguíneas e desnaturação com solução de brometo dodeciltrimetilamonio (DTAB); 2) desproteinização com clorofórmio; 3) precipitação do DNA e ressuspensão via brometo cetilmetrimetilamonio (CTAB).<sup>11</sup>

O segmento polimórfico do gene para a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio foi amplificado por PCR (*polymerase chain reaction*). Em cada reação utilizou-se 0,5  $\mu$ L de cada

desoxinucleotídeo (0,8 mM); 2,5  $\mu$ L de tampão PCR 10X; 2,5  $\mu$ L de dimetilsulfóxido 10%; 2,5  $\mu$ L de cada *primer* (2,5mM); 0,2  $\mu$ L de Taq polimerase (5 U/ $\mu$ L); 11  $\mu$ L de água Milli Q; 2  $\mu$ L de DNA genômico diluído (0,2mg). Foram utilizados os *primers* P1: 5'-ACCTGGTTTCTCTGCCACAAG -3' e P2: 5'-AATAGTTCTCATACCAAGTGT-3'. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos seguido de 35 ciclos a 95°C por um minuto para desnaturação do DNA, 55°C por um minuto para anelamento dos *primers*, 72°C por dois minutos para extensão da amplificação e ciclo final a 72°C por sete minutos. As amostras foram expostas a enzima de restrição *Bcl I* e mantidas em banho-maria a 37°C, *overnight*, para reconhecimento das substituições das bases nitrogenadas guanina por adenina no códon B448.<sup>12</sup> A enzima *Bcl I* não atinge o produto da amplificação referente ao alelo B1, nesse caso os segmentos apresentam 2.500pb, enquanto em B2 ocorre restrição enzimática gerando fragmentos de 1.100 e 1.400pb. Desse modo, três genótipos podem ser identificados: B1/B1, B1/B2 e B2/B2.

O produto de reação foi aplicado em gel de agarose a 1% preparado com tampão TEB diluído dez vezes e brometo de etídeo (0,2 mg/L), submetido a eletroforese em corrente contínua de 200 V por 20 minutos, utilizando-se como padrão *ladder* 500pb (Gibco).

#### Análise estatística

Frequências alélicas e genótípicas foram comparadas entre pacientes e controles utilizando-se o teste exato de Fisher. Procedimento semelhante foi realizado para os pacientes subdivididos de acordo com o tipo de lesão arterial, considerando-se aqueles com DAP obstrutiva (DAPO) ou DAP aneurismática (DAPA). A influência dos alelos e genótipos na presença ou ausência da doença foi verificada pelo cálculo dos produtos cruzados (*odds ratio*) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Admitiu-se erro  $\alpha$  de até 5%, sendo considerados significantes valores de  $P \leq 0,05$ .

### Resultados

A distribuição das frequências alélicas e genótípicas para a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio, referente a 44 pacientes e 56 controles para a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio, é apresentada na tabela 1. O alelo B1 foi o mais representado nos pacientes e controles (0,819; 0,857, respectivamente;  $P=0,5605$ ). O genótipo B1/B1 foi detectado em 65,9% dos pacientes e 71,4% ( $P=0,6639$ ) dos controles, seguido de B1/B2 (31,8; 28,6%, respectivamente;  $P=0,8268$ ). O genótipo B2/B2 foi observado apenas em um paciente (2,3%) e sem representatividade nos controles.

A tabela 2 mostra a distribuição dos alelos e genótipos para o fibrinogênio em pacientes com DAPO ou

DAPA. Nota-se semelhança entre os grupos, sendo o alelo B1 mais freqüente em pacientes com obstrução ou aneurisma (0,886; 0,773, respectivamente; P=0,2565). O genótipo B1/B1 destacou-se com prevalência de 77,2% na DAPO e 54,5% em pacientes com DAPA (P=0,2027). O genótipo B2/B2 foi detectado em apenas um paciente com DAPA (4,5%), sem ocorrência em DAPO. Não houve diferença

**Tabela 1**

Distribuição das freqüências alélicas e genótípicas para a cadeia β do fibrinogênio na análise do polimorfismo genético por restrição enzimática com Bcl I em pacientes com doença arterial periférica e controles

Alelo	Paciente		Paciente		p
	Nº	Freqüência	Nº	Freqüência	
B1	72	0,819	96	0,857	0,5605
B2	16	0,181	16	0,143	0,5605
Total	88	1,000	112	1,000	Ñ
Genótipo	Nº	%	Nº	%	P
B1/B1	29	65,9	40	71,4	0,6639
B1/B2	14	31,8	16	28,6	0,8268
B2/B2	1	2,3	0	0	0,4400
Total	44	100,0	56	100,0	Ñ

( — ) = não se aplica

**Tabela 2**

Distribuição das freqüências alélicas e genótípicas para a cadeia β do fibrinogênio na análise do polimorfismo genético por restrição enzimática com Bcl I em pacientes com doença arterial periférica (DAP) obstrutiva ou com aneurisma de aorta

Alelo	DAP Obstrutiva		DAP Aneurismática		P
	Nº	Freqüência	Nº	Freqüência	
B1	39	0,886	33	0,773	0,2565
B2	5	0,114	10	0,227	0,2565
Total	44	1,000	44	1,000	
Genótipo	Nº	%	Nº	%	p
B1/B1	17	77,2	12	54,5	0,2027
B1/B2	5	22,8	9	41,0	0,3319
B2/B2	0	0	1	4,5	1
Total	22	100,0	22	100,0	

**Tabela 3**

Valor do odds ratio para os genótipos e alelos de cadeia β do fibrinogênio, em análise de sua relação com a doença arterial periférica

Polimorfismo Genético	Odds Ratio - IC 95%
Fibrinogênio Alelo	
B1	0,7500 (0,35 - 1,60)
B2	1,33 (0,62 - 2,84)
Genótipo	
B1/B1	0,77 (0,33 - 1,81)
B1/B2	1,16 (0,49 - 2,75)
B2/B2	3,89 (0,15 - 98,008)

IC = Intervalo de confiança

estatisticamente significativa entre os grupos, confirmando-se pelo cálculo do *odds ratio* para os genótipos e alelos da cadeia β do fibrinogênio (Tabela 3).

**Discussão**

O polimorfismo *Bcl I* para a cadeia α do fibrinogênio, é representado neste estudo principalmente pelo alelo B1 em controles e pacientes, independente de DAP obstrutiva ou aneurismática, enquanto o alelo B2 mostra prevalência igualmente reduzida entre os grupos (0,143; 0,181, respectivamente). Freqüências reduzidas do alelo B2 também foram detectadas por Fowkes et al<sup>1</sup> em pacientes com DAP (0,197), embora significativamente aumentada em relação aos controles (0,097). Nesse caso, registraram freqüência de 29,6% de pacientes homocigotos ou heterocigotos para o alelo B2, contra 15,8% dos controles. No presente estudo, os genótipos com pelo menos um alelo B2 também foram preferencialmente observados nos pacientes (34,1%) em relação aos controles (28,6%), embora sem diferença significativa entre os grupos. Nesse caso, o tamanho reduzido da casuística pode se tornar um fator limitante na análise dos dados.

Éster de colesterol, colesterol e fibrinogênio são os principais componentes da placa aterosclerótica, sendo que a concentração do fibrinogênio na lesão parece ser proporcional ao conteúdo de lipídios.<sup>7,13</sup> Nesse contexto, estudos revelam associação entre níveis de fibrinogênio e alelo B2 nas doenças cardiovasculares.<sup>5</sup> Estudos *in vitro* demonstraram absorção do fibrinogênio por pérolas de oleato de colesterol e lecitina, sendo tal absorção proporcionalmente maior de acordo com o aumento da concentração de éster de colesterol na superfície das pérolas.<sup>14</sup> Entretanto, a influência do alelo B2 pode não apenas mediar a concentração do fibrinogênio, mas associar-se a um desequilíbrio de ligação com genes vizinhos ou variações em sua estrutura.<sup>1</sup>

O estudo de Edinburgh, envolvendo quarenta casos de aneurisma de aorta abdominal, mostrou que tanto o fibrinogênio como os dímeros da fibrina apresentam-se associados com aumento significativo para o risco da doença, provavelmente por deposição da fibrina no saco aneurismático.<sup>6</sup> Singh et al,<sup>15</sup> em estudo retrospectivo realizado na Noruega abrangendo 6.386 indivíduos, confirmaram a relação entre aumento nos níveis plasmáticos de fibrinogênio e aneurisma de aorta abdominal. Nesse contexto, considerando a associação entre os níveis de fibrinogênio e o alelo B2,<sup>5</sup> no presente estudo a presença do alelo B2, principalmente nos pacientes com DAPA (0,227) comparado àqueles com DAPO (0,114), pode ser um fator de risco para a doença, o que deve ser investigado em casuísticas amplas, incluindo também dosagens bioquímicas.

Vários polimorfismos do gene β para o fibrinogênio,

além do *Bcl I*, têm sido investigados e caracterizados em relação ao nível plasmático de fibrinogênio, incluindo o *Hae III* localizado na região promotora em posição 455. Entretanto, há ainda aspectos polêmicos quanto à sua associação com DAP e doença arterial coronariana (DAC). Lee et al<sup>6</sup> encontraram frequência significativamente aumentada do polimorfismo 455G/A em pacientes com DAP em relação aos controles, mas não para DAC. É possível que o loco polimórfico  $\beta$  *Hind III* (posição 148), associado intimamente com  $\beta$  *Hae III*, afete a interação deste sítio regulador e fatores de transcrição induzidos ou modulados pelo cigarro, que é fator de risco importante para DAC e DAP e determinante do fibrinogênio plasmático.<sup>4</sup>

Nesse contexto, este estudo, embora com resultados não mostrados, registrou tabagismo em 45% dos pacientes com DAPO e 36% daqueles com DAPA, além de hipertensão arterial (40% e 55%, respectivamente). Nesse caso, embora não detectada no presente trabalho associação entre polimorfismo *Bcl I* e DAP, é possível que esses fatores associados à presença do alelo B2 identifiquem um subgrupo de pacientes que deve ser caracterizado em uma casuística ampla. Em conclusão, embora neste estudo DAP aterosclerótica obstrutiva ou aneurismática apresenta-se indiferente ao polimorfismo  $\beta$  *Bcl I*, a presença do alelo B2 associado a outros fatores de risco para doença aterosclerótica deve ser avaliado.

#### Abstract

*The objective of this study was to analyze the frequencies of the alleles and genotypes of the gene encoder of the fibrinogen b-chain in patients suffering from peripheral artery disease. A total of 62 male Caucassoid patients with ages varying from 38 to 79 years old were studied. All the patients had clinical symptoms of peripheral artery disease, which was later confirmed by angiography. Forty of the patients had atherosclerotic obstructions of the iliac, femoral or carotid arteries and 22 suffered from aneurysms of the thoracic, abdominal or thoracoabdominal aortas. All the patients were submitted to surgery. A control group was formed of 62 individuals, with ages ranging from 43 to 80 years old, without clinical histories or alterations in their clinical examinations of peripheral artery disease. Individuals with renal disease, liver disease or diabetes mellitus were excluded. Analysis of the fibrinogen b-chain was performed using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism with *Bcl I* endonuclease. Three genotypes, B1/B1, B1/B2 and B2/B2 were identified. Statistical analysis was made using the Fisher Exact test, odds ratio, Kruskal-Wallis test and variance analysis (ANOVA). A p-value = 0.05 was considered significant. The B1 allele was the most prevalent in both patients and the control group (0.819 and 0.857, respectively), with prevalence of the B1/B1 genotype in patients and controls (65.9% vs. 71.4% respectively), followed by B1/B2 (31.8% vs. 28.6% respectively). No significant difference was observed in relation to the *Bcl I* polymorphisms of the fibrinogen b-chain and obstructive and aneurysmal peripheral artery disease. In conclusion, the B1 and B2 polymorphisms of the fibrinogen b-*

*chain and their respective genotypes do not have any influence in peripheral artery disease. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(3):202-205.*

**Key words:** *Fibrinogen genetic polymorphisms; peripheral artery disease.*

#### Referências Bibliográficas

1. Fowkes FGR, Connor JM, Smith FB et al. Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. *Lancet* 1992;339:693-696.
2. Heinrich J, Balleisen L, Schulte H et al. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk: results from the Procarn study in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:54-59.
3. Smith FB, Lee AJ, Hau CM, et al. Plasma fibrinogen, haemostatic factors and prediction of peripheral arterial disease in the Edinburgh artery study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:43-50.
4. Behague I, Poirier O, Nicaud V et al.  $\beta$  fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1996;93:440-449.
5. Zito F, Nuovo AD, Concetta A et al. *Bcl I* Polymorphism in the fibrinogen  $\beta$  chain gene is associated with the risk of familial myocardial infarction by increasing plasma fibrinogen levels. *Arter Thromb Vasc Biol* 1997;17:3.489-3.494.
6. Lee AJ, Fowkes FG, Lowe GD et al. Fibrinogen, factor VII and PAI-I genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study. *Thromb Haemost* 1999;81:553-60.
7. Smith EB, Keen GA, Grant A. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis* 1990;10:263-275.
8. Fuster V, Stein B, Ambrose JA et al. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: evolving concepts. *Circulation* 1990;82 (suppl II): II-47-II-59.
9. Blombäck B, Blombäck M. The molecular structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 1972;202:77-97.
10. Henschen A, Lottspeich F, Kehl M et al. Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 1983;408:28-43.
11. Gustincich S, Manfioletti G, Del San G, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 1991;11:298-301.
12. Thomaz A, Lamlum H, Humphries SE et al. Linkage disequilibrium across the fibrinogen locus as shown by five polymorphisms, G/A<sup>455</sup> (*Hae III*), C/T<sup>148</sup> (*Hind III/Alu I*), T/G<sup>+1689</sup> (*Ava II*), *Bcl I* (b-fibrinogen) and *Taq I* (a-fibrinogen), and their detection by PCR. *Hum Mut* 1994;3:79-81.
13. Lassila R, Peltonen S, Lepäntalo M et al. Severity of peripheral atherosclerosis is associated with fibrinogen and degradation of cross-linked fibrin. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1.738-1.742.
14. Retzinger GS. Adsorption and Coagulability of Fibrinogen on atheromatous lipid surfaces. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:786-792.
15. Singh FB, Bona KH, Jacobsen BK et al. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysm population based study: the Tromso study. *Am J Epidemiol* 2001;154:236-44.

*Avaliação:* Editor e dois revisores externos.

*Conflito de interesse:* não declarado

*Recebido:* 28/04/2004

*Aceito após modificações:* 28/07/2004