

Artigo / Article

Frequência do polimorfismo da glicoproteína IIIa de plaquetas (PI^{A2}) em mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2

Platelet glycoprotein IIIa polymorphism (PI^{A2}) frequency in Type 2 diabetic women

Anna L. Soares¹
Marinez O. Sousa²
Fernanda R. Freitas³
Michelle A. R. Borges⁴
Pedro W. Rosário⁴
Geralda F. G. Lages⁵
Jarbas E. Cardoso⁵
Karina B.G. Borges²
Ana Paula S. M. Fernandes²
Maria das Graças Carvalho²

O polimorfismo da glicoproteína IIIa de plaquetas está associado a um aumento no risco de doenças arteriais coronarianas. Mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 apresentam um aumento de cinco vezes no risco para doenças arteriais coronarianas quando comparadas com mulheres não-diabéticas. O objetivo do presente estudo foi verificar a frequência do polimorfismo da glicoproteína IIIa (PI^{A2}) em mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 e comparar com a frequência descrita na literatura. A análise do polimorfismo PI^{A2} foi realizada para 62 mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 através da reação em cadeia da polimerase seguida de análise do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP). As frequências observadas foram 81% para PI^{A1A1}, 18% para PI^{A1A2} e 1% para PI^{A2A2}. Não houve diferença significativa entre as frequências observadas e as frequências descritas na literatura. Nossos resultados sugerem que a frequência do polimorfismo PI^{A2} em mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 é a mesma observada na população em geral. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(1):15-18.

Palavras-chaves: Plaquetas; glicoproteína IIIa; polimorfismo; *diabetes* tipo 2; mulheres.

Introdução

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos que não possuem núcleo, apresentam diâmetro de 2 µm e vida média de seis a dez dias.¹ Apesar da aparência morfológica simples na microscopia ótica, as plaquetas possuem uma estrutura funcional complexa que permite um rápido reconhecimento da lesão vascular e início da formação do tampão plaquetário.^{1,2}

A glicoproteína IIb/IIIa é o receptor de superfície plaquetário mais abundante e apresenta um papel fundamental na formação de trombos, pois promove a ligação das plaquetas por intermédio do fibrinogênio e do fator de von Willebrand.³

Estudos recentes têm mostrado que o polimorfismo na glicoproteína IIIa (PI^{A2}), em homozigose, está associado a um risco três vezes maior de doença cardiovascular isquêmica e de quatro vezes maior de infarto do miocárdio. A influência funcional do polimorfismo sobre a reatividade da plaqueta permanece sem explicação.^{4,5} A associação entre o alelo PI^{A2} e eventos cardiovasculares ainda não é considerada um achado consistente,⁶ entretanto, já foi descrito que o alelo PI^{A2} está associado a um aumento da agregação plaquetária³ e que o polimorfismo promove uma interação mais intensa com o fibrinogênio.⁷

Homens e mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 apresentam um risco aumentado para doença arterial coronariana

¹Farmacêutica-bioquímica.

²Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG – Belo Horizonte-MG.

³Bolsista de iniciação científica.

⁴Médica(o) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte-MG.

⁵Farmacêutica(o)-bioquímica(o) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte-MG.

Correspondência: Anna Leticia Soares
SGAS 905 – Residencial Central Park, Bloco B, apt 215 – Asa Sul
70390-050 – Brasília-DF – Brasil
Tel.: (+55 61) 3322-3014 e (+55 61) 8408-9773
Email: alsoares@ufmg.br

(DAC) devido às complicações macrovasculares inerentes à doença.^{8,9} Para os homens há duplicação do risco total para DAC quando comparados com homens sem diabetes, e para as mulheres há um aumento de cinco vezes quando comparadas com mulheres não-diabéticas. O aumento do risco cardiovascular para mulheres diabéticas já foi confirmado por estudos epidemiológicos.^{10,11}

Entre os indivíduos não diabéticos, as mulheres apresentam um risco cardiovascular menor que o dos homens. De fato, o diabetes "anula" o efeito protetivo da mulher em relação à doença cardiovascular. Nas mulheres, o controle glicêmico é afetado pela alta incidência de distúrbios alimentares, uso de contraceptivo hormonal, menstruação, gravidez e climatério. Outros fatores também contribuem para aceleração do risco de DAC em mulheres com diabetes, tais como hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade central, depressão e baixo nível socioeconômico.¹¹

Mulheres com níveis normais de estrógeno, geralmente apresentam baixo risco cardiovascular. Na menopausa, com a redução do estrógeno, observa-se aumento do LDLc, redução do HDLc, aumento na deposição de gordura abdominal e hipertensão. Todo esse fenômeno é acompanhado pelo aumento da idade.¹²

Frente a esse cenário, o presente estudo teve como objetivo verificar a frequência do polimorfismo PI^{A2} em mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 e comparar a frequência observada com a descrita na literatura.

Casuística e Método

Este estudo transversal recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP e do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. Todas as participantes receberam esclarecimento sobre os objetivos, responderam a ficha clínica e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

Foram selecionadas 62 mulheres com faixa etária entre 40 e 75 anos e com diagnóstico clínico de *diabetes mellitus* tipo 2, segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (1999). Foram excluídas as mulheres que estavam em tratamento de reposição hormonal, tabagistas, pacientes com história clínica de tumor maligno, doença infecciosa aguda, trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, infarto agudo do miocárdio e desequilíbrio metabólico.

As amostras de sangue venoso foram obtidas utilizando-se tubos com EDTA do sistema Vacuette® (Geiner Bio-One). As amostras de DNA foram obtidas a partir de 300 µL de sangue total, submetidos ao processo de precipitação com acetato de amônia (segundo o protocolo e os reagentes do Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega®).

Para a pesquisa do polimorfismo no gene da glicoproteína IIIa de plaqueta foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de digestão com enzima de restrição para análise do polimorfismo de tamanho de

fragmento de restrição (RFLP), utilizando-se os oligonucleotídeos e a metodologia descrita por Pamukcu,⁵ conforme exposto abaixo.

Após a extração de DNA total, uma região de 282 pares de bases do gene codificador da GPIIIa foi amplificada, utilizando-se os oligonucleotídeos 5' GCT CCA ATG TAC GGG GTAAAC 3' e 5' GGG GAC TGACTT GAG TGA CCT 3'. As condições da reação de PCR consistiram de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, precedidos de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos e finalizados com um passo de 72°C por 8 minutos. O produto de PCR de 282pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Msp* I (Promega®). A presença do polimorfismo cria uma sequência que a enzima *Msp* I reconhece e leva à quebra do fragmento em duas partes, uma de 125pb e outra de 157pb. Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam três fragmentos (282, 157 e 125pb) e homozigotos possuem os dois fragmentos (157 e 125pb).

O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de poli-acrilamida a 6%, seguido de coloração pela prata. O padrão de peso molecular "1Kb Plus" (Gibco®) foi utilizado como referência nas eletroforeses. Os fragmentos com menos de 100pb não são visualizados no gel corado.

Para as variáveis contínuas foram calculados os valores de média e desvio-padrão. As variáveis discretas estão apresentadas como frequências absolutas e relativas. As frequências encontradas foram comparadas com as frequências descritas no estudo de Framingham³ utilizando-se o teste de χ^2 no programa Prism 3.0.

Resultados

As características clínicas e metabólicas das pacientes avaliadas no presente estudo estão apresentadas na Tabela 1. As participantes apresentavam um bom controle do perfil lipídico, função renal preservada e não eram obesas, dados que confirmam a homogeneidade do grupo. A Figura 1 ilustra os resultados obtidos para identificação do polimorfismo no gene da glicoproteína IIIa (PI^A), através da técnica de PCR-RFLP, em participantes deste estudo. Os resultados das frequências absolutas e relativas do polimorfismo para a GPIIIa obtidos neste estudo estão relacionados na Tabela 2.

As frequências descritas no estudo de Framingham para o polimorfismo PI^{A2} são: 71,5% para ^{A1A1}; 26,0% para ^{A1A2} e 2,5% para ^{A2A2}.³ Não foi encontrada diferença significativa entre as frequências deste estudo com as referenciadas.

Discussão

Indivíduos diabéticos apresentam o mesmo risco cardíaco de indivíduos não diabéticos que já sofreram um evento cardiovascular.¹³ Mulheres diabéticas apresentam um risco cardíaco semelhante ao de homens diabéticos, perdendo

Tabela 1. Características clínicas e metabólicas das pacientes estudadas

Mulheres com DM2	
n	62
Idade (anos)	57,6 + 8,5
IMC (kg/m ²)	28,3 + 5,1
CRE (mg/dL)	0,89 + 0,22
GLI (mg/dL)	139,6 + 53,4
HbA1c (%)	7,7 + 1,8
CT (mg/dL)	170,9 + 27,4
HDLc (mg/dL)	46,1 + 10,6
LDLc (mg/dL)	101,6 + 24,5
TG (mg/dL)	115,7 + 50,0

Caracterização quanto ao n (tamanho), idade e IMC (índice de massa corporal). Os dados bioquímicos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão dos valores de CRE (creatinina), GLI (glicemia de jejum), HbA1c (hemoglobina glicada), CT (colesterol total), HDLc (colesterol presente na lipoproteína de alta densidade), LDLc (colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade) e TG (triglicérides)

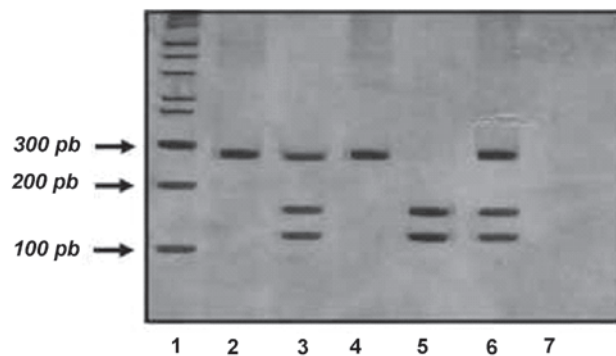


Figura 1. Gel de poliácridamida corado pela prata, obtido após PCR seguida de digestão com a endonuclease de restrição *Msp* I e eletroforese. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 7, branco da reação; na canaleta 5, bandas de 157 e 125pb (controle homozigoto para o polimorfismo); na canaleta 6, bandas de 282, 157 e 125pb (controle heterozigoto para o polimorfismo); nas canaletas 2 e 4, banda de 282pb (indivíduos não portadores do polimorfismo); e na canaleta 3, bandas de 282, 157 e 125pb (indivíduo portador do polimorfismo em heterozigose).

Tabela 2. Frequência do polimorfismo PI^A no gene da glicoproteína IIIa (GPIIIa) nas pacientes diabéticas

Polimorfismo PI ^A no gene da GPIIIa	
n	62
PI ^{A1,A1} (n,%)	50 (81)
PI ^{A1,A2} (n,%)	11 (18)
PI ^{A2,A2} (n,%)	1 (1)
Portadoras do alelo PI ^{A2} (n,%)	12 (19)

Tamanho do grupo (n), PI^{A1,A1} (ausência do polimorfismo), PI^{A1,A2} (heterozigose), PI^{A2,A2} (homozigose)

o efeito protetivo relacionado ao sexo feminino.¹¹ Dessa forma, é de grande interesse conhecer marcadores moleculares de pacientes diabéticos para melhor avaliar os fatores que contribuem para as complicações macrovasculares decorrentes da evolução natural da doença e também para estabelecer tratamentos diferenciados.

A glicoproteína GPIIb/IIIa da superfície de plaquetas é um receptor de membrana para o fibrinogênio e fator de von Willebrand e tem um papel importante na agregação plaquetária. A presença do alelo A2 na GPIIIa está associada com um aumento do risco para doença cardiovascular.⁵

A frequência observada do polimorfismo PI^{A2}, no presente estudo, para as pacientes diabéticas não difere da frequência descrita para pacientes diabéticos de um modo geral e para a população não-diabética.^{3,14} Dessa forma, o presente estudo vem corroborar com outros que não observam associação entre a presença do alelo A2 e *diabetes mellitus* tipo 2, apesar da limitação do tamanho do grupo estudado. Por outro lado, cabe ressaltar que o presente estudo avaliou um grupo mais restrito quanto ao gênero, homogêneo e com um risco aumentado para doenças coronarianas (mulheres com diabetes tipo 2, não tabagistas, sem terapia de reposição hormonal e sem evento isquêmico prévio).

Outros estudos já relataram que não há associação entre o polimorfismo da GPIIIa e a progressão das lesões macrovasculares no *diabetes mellitus* tipo 2.^{15,16} Porém, estudos complementares são necessários para confirmar ou refutar essa evidência.

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a frequência do polimorfismo PI^{A2} em mulheres com *diabetes mellitus* tipo 2 é a mesma observada na população em geral.

Abstract

The platelet glycoprotein IIIa polymorphism is associated to an increased risk of coronary heart disease. Type 2 diabetic women present a fivefold higher risk of coronary heart disease compared to non-diabetic women. The aim of this study was to verify the frequency of the glycoprotein IIIa polymorphism (PI^{A2}) in type 2 diabetic women and compare this result with the frequency reported for the general population. The PI^A polymorphisms of 62 type 2 diabetic women were determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The resulting frequencies were 81% for PI^{A1,A1}, 18% for PI^{A1,A2} and 1% for PI^{A2,A2}. There was no significant difference between observed frequencies and the frequencies described in the literature. Our results suggest that the frequency of the glycoprotein IIIa polymorphism, PI^{A2}, in type 2 diabetic women is similar to that observed in general population Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(1):15-18.

Key words: Platelets; glycoprotein IIIa; polymorphism; Type 2 diabetes; women.

Referências Bibliográficas

1. Kottke-Marchant K, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(2):133-46.
2. Steen VM, Holmsen H. Current aspects on human platelet activation and responses. *Eur J Haematol.* 1987;38(5):383-99.
3. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa P1A2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):1142-7.
4. Grove EL, Ørntoft TF, Lassen JF, Jensen HK, Kristensen SD. The platelet polymorphism P1A2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J Intern Med.* 2004;255(6):637-44.
5. Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y. The role of platelet glycoprotein IIIa polymorphism in the high prevalence of in vitro aspirin resistance in patients with intracoronary stent restenosis. *Am Heart J.* 2005;149(4):675-80.
6. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Platelet glycoprotein IIIa P1(a) polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation.* 2001;104(2):140-4.
7. Tschoepe D, Menart B, Ferber P, Altmann C, Haude M, Haastert B, et al. Genetic variation of the platelet- surface integrin GPIIb-IIIa (P1A1/A2-SNP) shows a high association with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2003;46(7):984-9.
8. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.
9. Nazimek-Siewniak B, Moczulski D, Grzeszczak W. Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes: results of longitudinal study design. *J Diabetes Complications.* 2002;16(4):271-6.
10. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension.* 2001;37(4):1053-9.
11. Koerbel G, Korytkowski M. Coronary heart disease in women with diabetes. *Diabetes Spectrum* 2003;16(3):148-53.
12. Resnick HE, Howard BV. Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 2002;53:245-67.
13. Mykkänen L. Prevention of coronary heart disease in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl.* 2000;(113):40-5.
14. Kozieradzka A, Kaminski K, Pepinski W, Janica J, Korecki J, Szepletowska B, et al. The association between type 2 diabetes mellitus and A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa gene. *Acta Diabetol.* 2007;44(1):30-3.
15. Carter AM, Mansfield MW, Grant PJ. Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1998;15(4):315-9.
16. Scaglione L, Gambino R, Lillaz E, Bo S, Cassader M, Pagano G, et al. Platelet glycoprotein IIIa P1A1/A2 polymorphism and its relationship with diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Nephrol.* 2000;53(4):253-6.

Suporte Financeiro: CNPq, Fapemig

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 29/07/2008

Aceito: 25/08/2008