

PREVALÊNCIA DE FATORES DE RISCO HEREDITÁRIOS PARA O TROMBOEMBOLISMO VENOSO EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DE IDOSOS DO NORDESTE BRASILEIRO, PARNAÍBA (PI)

Pablo Nunes Costa (bolsista do PIBIC/CNPQ), Ari Perreira de Araújo Neto (PIBIC/ CNPQ) Hygor Ferreira Fernandes (bolsista do PIBIC/CNPQ,)Hianny Ferreira Fernandes(bolsista do PIBIC/CNPQ), Giovanny Rebouças Pinto (Orientador, Curso de Biomedicina - UFPI)

INTRODUÇÃO

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma patologia que tem sua gênese a partir da formação de trombos que forma principalmente em veias profundas (TVP) dos membros inferiores, e que quando se desprendem causam o TEV. E quando ele vai para a árvore pulmonar e causa obstrução de alguma parte do pulmão causa a chamada Embolia pulmonar (EP) (Maffei et al, 2001).

A incidência do TEV é altamente dependente da idade, pois sua presença, extremamente incomum na infância (1/100.000/ano), aumenta quase 1% a cada ano de vida. O TEV atinge menos de 10 indivíduos por 100.000/ano até os 50 anos, no entanto, essa incidência aumenta rápida e exponencialmente nos anos seguintes (Cushman et al., 2004). Estudos realizados na França, Estados Unidos e Noruega demonstraram que quase 70% de todos os pacientes diagnosticados com TEV estão acima dos 60 anos e 25% acima dos 80 anos (Oger, 2000; Tsai et al., 2002), Além disso, indivíduos que apresentam uma predisposição genética consequentemente terão uma maior propensão de desenvolver tromboembolismo venoso (TEV), visto que esses portadores de mutação representam quase 60% de todos os casos de TEV, e dentre os fatores genéticos os fatores V e II da coagulação merecem destaque, pois são o primeiro e o segundo principais causas dessa doença respectivamente (Rosendaal et al, 2007).

A mutação Fator Vascensão dos fatores genéticos como os expoentes do TEV surgiu no fim da última década do século passado, com a descoberta inicialmente da Resistência a Proteína C Ativada pelo fator V da coagulação, a qual ocorre em mais de 90% por uma mutação de ponto no códon 506 (Arg506Gln) do fator V. Essa mutação promove a perda em um dos sítios de clivagem do FV pela proteína C que é um dos principais anticoagulantes naturais atuando no complexo protrombinase inativando-o, e consequentemente ele permanece no plasma propiciando maior formação de fibrina e aumenta o risco do TEV. Outra causa comum é a mutação 20210 da gene do Fator II, responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, atua assim como o FV, sendo um zimógeno (pró-enzima) na cascata da coagulação. Essa mutação potencializa a capacidade do RNAmensageiro de permanecer no sangue e consequentemente formando mais fibrina. O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência da mutação G20210A no gene do fator II da coagulação que confere risco para o TEV em idosos do município de Parnaíba (PI) e, comparar as frequências genotípicas e alélicas obtidas com as observadas em outras regiões do Brasil e do mundo.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado no período de agosto de 2010 a julho de 2011, com 100 idosos de ambos os sexos, com idade entre 65 e 92 anos. Foi coletado sangue periférico dos indivíduos com

tubos a vácuo de 4 ml contendo EDTA, do qual foi extraído DNA através kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as especificações do fabricante, em seguida feita PCR para amplificar as regiões de interesse foi preparado um mix de 25 µL de como na tabela 1.

Tabela 1 – volume e concentração dos reagentes utilizados na PCR.

| Reagentes | Volume (µL) | Concentração |
|---------------------------|--------------|--------------|
| dNTPs | 5,0 | 200 µM |
| Tampão | 2,5 | 1 X |
| MgCl₂ | 0,75 | 1,5 mM |
| Primer forward | 1,0 | 0,4 µM |
| Primer reverse | 1,0 | 0,4 µM |
| Taq DNA polimerase | 0,3 | 1,5 U |
| DNA amostral | 1,0 | |
| Água estéril | 13,45 | |
| Total | 25 µL | |

Posteriormente a amplificação foi realizada a digestão do produto pela técnica de RFLP, sendo cada polimorfismo com sua enzima e protocolo específicos, como se segue nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Volumes dos reagentes utilizados na RFLP do SNP G1691A do gene *FV*.

| | Reagentes | Volume (µL) |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------|
| RFLP FV | NEBuffer 4 | 1,5 |
| | BSA | 0,5 |
| | MnII | 0,2 |
| | PCR | 5,0 |
| | Água estéril | 7,8 |
| | Temperatura e tempo de incubação | 37°C <i>overnight</i> |

Tabela 2 - Volumes dos reagentes utilizados na RFLP do SNP G20210A do gene *FII*.

| | Reagentes | Volume (µL) |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------|
| RFLP FII | NEBuffer 4 | 1,5 |
| | HindIII | 0,2 |
| | PCR | 5,0 |
| | Água estéril | 7,8 |
| | Temperatura e tempo de incubação | 37°C <i>overnight</i> |

O produto digerido foi separado por eletroforese e analisado em gel de Poliacrilamida a 10%, corado com prata, após corrida em corrente elétrica de 150V.

A corrida do gel de poliacrilamida ocorreu em cuba vertical utilizando um tampão TBE 1x (Tris, EDTA e ácido bórico).

RESULTADOS

Dos 100 indivíduos analisados, 36 eram homens e 64 mulheres, com idades variando entre

65 e 93 anos (média de 73 anos). Quanto à análise do locus em questão, foram analisados 400 alelos, correspondendo à análise das 200 amostras. Dos indivíduos analisados, 99 (98,%) apresentaram genótipo selvagem (G/G), 1 (2,0%) o genótipo heterozigoto (G/A) e nenhum (0,0%) homozigotos mutantes (A/A). A comparação entre as frequências genotípicas revelou que a distribuição se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que não houve diferença significativa ($p=0,995$) entre as frequências genotípicas esperadas e as observadas. Tabela 4– Resumo das frequências genotípicas observadas e esperadas, frequência alélica e o valor de P encontrado dos *locus FV G1691A* e *FII G20210A*.

| Genótipo | N | Normal | Heterozigoto | Homozigoto | f(G) | f(A) | P |
|------------|-----|--------|--------------|------------|-------|-------|---|
| <i>FV</i> | 100 | 99 | 1 | 0 | 0,995 | 0,005 | 1 |
| <i>FII</i> | 100 | 100 | 0 | 0 | 1,0 | 0 | 1 |

DISCUSSÃO

As mutações estudadas são relativamente comuns, principalmente em populações caucasóides. Logo a análise da distribuição das frequências neste estudo revelou que a população estudada apresentou uma pessoa com o alelo polimórfico (sendo o seu genótipo G/A para o fator V), resultado bem próximo do encontrado em algumas populações como a tailandesa (Angchaisuksiri *et al*, 2000), Amerídeos brasileiros (Franco, 1999). Em outros estudos principalmente onde a população é predominantemente caucasóide houve um maior número de casos como a frequência do alelo A como os Gregos (Angelopoulou, 2000), e aos quais muitos pesquisadores apontam como sendo a região de origem da mutação (Sottilotta, 2009).

CONCLUSÃO

A investigação molecular dos SNPs *FII G20210A* e *FV G1691A*, associadas ao TEV em uma amostra da população de Parnaíba (PI), mostrou que a prevalência dessas mutações nessa população é muito baixa, com isso pode-se concluir que quanto ao risco genético de desenvolver tromboembolismo venoso a população de Parnaíba esta livre.

Palavras-chave: Fator V de Leiden, Tromboembolismo venoso, Fatores de risco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATICHARTAKARN, V., SRITARA, P. Prevalence of the G1691A mutation in the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A prothrombin gene mutation in the Thai population. *American Journal of Hematology*, 65 (2): 104-7, Apr 2000.
- DUQUE, F.L.V., MELLO, N.A. Thrombogenesis–Thrombophilia. *J Vasc Br*, Vol. 2, Nº2, 2003.
- FRANCO, RF. Trombofilias hereditárias. *Medicina*, Ribeirão Preto, 34: 248-257. 2001.
- MAFFEI FHA, et al. Tromboses Venosas. In: *Hematologia: Fundamentos e Prática*. ZAGO M.A.; FALCÃO R.P.; PASQUINI R. (eds.). São Paulo, Editora Atheneu. p. 855-878. 2001.
- YOSHIOKA, F.K.N., ARAÚJO A.G, TAVELLA M.H, HAMOY I.G, GUERREIRO J.F. Prevalence of hereditary risk factors for thrombophilia in Belém, Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol*. 29(1):38-40,

2006.

ROSENDAAL, F.R., VLIEG, A.H., DOGGEN, J. M., J of Thromb. and Haemostasis, 2007.