

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DESENVOLVIMENTO DE UM PADRÃO DE GENOTIPAGEM POR LIS-SSCP
(CONFORMAÇÃO POLIMÓRFICA DE FITA SIMPLES EM BAIXA FORÇA IÔNICA)
PARA O POLIMORFISMO ¹⁴⁵Thr/Met DO GENE DA GLICOPROTEÍNA Ib α E ANÁLISE
DE SUA INFLUÊNCIA NA DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.

PAULA CRISTINA BATISTA DE FARIA

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DESENVOLVIMENTO DE UM PADRÃO DE GENOTIPAGEM POR LIS-SSCP
(CONFORMAÇÃO POLIMÓRFICA DE FITA SIMPLES EM BAIXA FORÇA IÔNICA)
PARA O POLIMORFISMO ¹⁴⁵Thr/Met DO GENE DA GLICOPROTEÍNA Ib α E ANÁLISE
DE SUA INFLUÊNCIA NA DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.

PAULA CRISTINA BATISTA DE FARIA

Prof. Dr. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Fevereiro - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DESENVOLVIMENTO DE UM PADRÃO DE GENOTIPAGEM POR LIS-SSCP
(CONFORMAÇÃO POLIMÓRFICA DE FITA SIMPLES EM BAIXA FORÇA IÔNICA)
PARA O POLIMORFISMO ¹⁴⁵Thr/Met DO GENE DA GLICOPROTEÍNA Ib α E ANÁLISE
DE SUA INFLUÊNCIA NA DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.

PAULA CRISTINA BATISTA DE FARIA

Aprovado pela Banca Examinadora em ____/____/____ Nota ____

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

MsC. Elisângela Rosa Silva Cordeiro

Renata Ríspoli Gatti

Uberlândia, ____ de _____ de 2003.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por tudo!

À minha família, **meu alicerce**: minha mãe Neusa, meus irmãos Jú, Márcio, Dedé e Delei e meu afilhadinho Rafael. Pelo apoio, pela torcida, pelo amor e carinho sempre constantes. Obrigada de verdade!!! Sem vocês NADA seria possível!

Ao meu pai, que mesmo sendo um pouco ausente, torce por mim e pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Cris pelo amor, pela cumplicidade, e principalmente pela paciência de me ouvir e me acalmar nos momentos de "stress" total... Você é muito especial!

Aos meus colegas de sala que "bem ou mal" dividiram comigo esses quatro anos de curso. Alguns levo no coração, outros... deixo por aqui mesmo! Mas a vida é assim, o importante é saber tirar alguma lição de tudo e de todos que atravessam nosso caminho!

Às minhas amigas de todas as horas: Hidi, Stael, Isabela, Marcela e Mariana. Sei que posso SEMPRE contar com vocês... contem sempre comigo também! VALEU!

À Karina Marangoni, que apesar dos conflitos, foi a minha maior companheira de sala e de laboratório. Valeu Ká pela amizade... meio conturbada, mas tudo bem! Temos ainda muito tempo pela frente...

À TODOS os meus AMIGOS do laboratório, que fazem dele um ótimo ambiente de trabalho. Obrigada pela boa vontade e pela disponibilidade em ajudar. Fazer este trabalho jamais teria sido possível sem a colaboração de vocês!!!

Em especial ao Prof. Luiz Ricardo que desde o início confiou na minha capacidade, e me deu a oportunidade de trabalhar e crescer. Obrigada POR TUDO, mas principalmente pela confiança! Ah, e pela paciência...

LISTA DE ABREVIACÕES

GP Ib α	Glicoproteína Ib alfa
vWF	Fator von Willebrand
LIS-SSCP	Conformação Polimórfica de Fita Simples em Baixa Força Iônica
DAC	Doença Arterial Coronária
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra Acético Sal Dissódico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
TBE	Tris Borato EDTA
UV	Ultra Violeta
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
ml	Mililitro
μ l	Microlitro
ng	Nanograma
mg	Miligrama
pb	Pares de base
pmol	Picomol
U	Unidade
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
X	Vezes
rpm	Rotação por minuto
cm	Centímetro
min	Minuto
s	Segundo

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Doença Arterial Coronária e Infarto do Miocárdio	01
1.2. Glicoproteína Iba	02
1.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	04
1.4. Conformação Polimórfica de Fita Simples em Baixa Força Iônica (LIS-SSCP)	05
2. OBJETIVOS	07
3. MATERIAL E MÉTODOS	07
3.1. Material Biológico	07
3.2. Extração de DNA	08
3.3. Amplificação do fragmento (PCR)	09
3.4. Genotipagem dos pacientes(LIS-SSCP)	10
3.5. Análise Estatística	11
4. RESULTADOS	11
5. DISCUSSÕES	16
6. CONCLUSÕES	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

DESENVOLVIMENTO DE UM PADRÃO DE GENOTIPAGEM POR LIS-SSCP (CONFORMAÇÃO POLIMÓRFICA DE FITA SIMPLES EM BAIXA FORÇA IÔNICA) PARA O POLIMORFISMO ¹⁴⁵Thr/Met DO GENE DA GLICOPROTEÍNA Ib α E ANÁLISE DE SUA INFLUÊNCIA NA DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.

RESUMO

O conhecimento de genes que atuam direta ou indiretamente no sistema cardiovascular tem contribuído para um melhor entendimento desta patologia, bem como para uma maior eficácia no seu diagnóstico e tratamento. A Glicoproteína (GP) Ib α está presente na membrana das plaquetas e é responsável pela adesão e agregação destas após trauma endotelial. O presente trabalho objetivou desenvolver um padrão de genotipagem para o polimorfismo ¹⁴⁵Thr/Met por meio da técnica de LIS-SSCP e analisar a sua influência no desenvolvimento da DAC e IAM (infarto agudo do miocárdio). Foram analisados 150 indivíduos. As extrações de DNA foram feitas a partir de sangue total e posteriormente a região da variante ¹⁴⁵Thr/Met, contendo 588 pb, foi amplificada por meio da PCR. A melhor resolução para as bandas foi obtida em eletroforese de gel de poli-acrilamida (49:1-acrilamida:bis) 10%, submetido à 200 volts por 18 horas à temperatura ambiente. Todos os indivíduos foram eficientemente genotipados pela técnica LIS-SSCP. Dois indivíduos apresentaram um perfil eletroforético diferente dos demais, podendo ser um novo polimorfismo ainda não descrito, que deverá ser confirmado por sequenciamento. As frequências genotípicas não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, evidenciando a não associação entre os genótipos e o desenvolvimento da DAC ou IAM. A principal limitação deste estudo que, provavelmente, afetou a significância dos dados foi a insuficiência na amostragem.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Arterial Coronária e Infarto do Miocárdio

A etiologia das Doenças Cardíacas envolve fatores genéticos e ambientais. Classicamente, foram estabelecidos através de estudos epidemiológicos vários fatores que aumentam o risco do indivíduo desenvolver aterosclerose coronária e Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) como a dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo e diabetes mellitus. Os fatores envolvidos nas patogêneses da aterosclerose, trombose e vasoconstrição também contribuem no desenvolvimento de Doenças Cardíacas Coronarianas (WANG *et al.*, 1994).

A importância dos fatores genéticos na patogênese da Doença Arterial Coronária (DAC) é sugerida pela freqüente associação familiar na doença prematura (SLACK & EVANS, 1966; MARENBERG *et al.*, 1994).

É sabido que os fatores de risco clássicos para a aterosclerose podem explicar apenas 50% da sua etiologia, sendo que a modificação destes inibem a sua progressão em apenas 40% dos pacientes; assim, a procura de novos fatores de risco é necessária (GRABCZEWSKA & NARTOWICZ, 1999).

A análise genética das Doenças Arteriais Coronárias deve levar em consideração: 1- a natureza multigênica da DAC pela qual polimorfismos simples estão ligados para desempenhar um importante papel no risco global da doença; 2- os múltiplos mecanismos patogênicos da DAC e IAM (obstrução ateromatosa, ruptura da placa, trombose, vasoespasmos) que são, provavelmente, influenciados por vários genes e diversos fatores ambientais. Assim, a investigação simultânea de um conjunto de polimorfismos e suas interações com os fatores ambientais poderiam proporcionar um maior entendimento desta

patologia de causas múltiplas, pois o conhecimento dos genes que atuam direta ou indiretamente no sistema cardiovascular é de suma importância para um diagnóstico preciso e uma terapêutica eficaz (MANZOLI *et al.*, 2000).

1.2. Glicoproteína Iba

Investigações angiográficas têm demonstrado o papel da formação do trombo na patogênese das síndromes coronárias agudas. Na trombose coronária, acredita-se que o funcionamento plaquetário é um fator chave e as plaquetas podem estar também envolvidas com o desenvolvimento de aterosclerose. A adesão e agregação das plaquetas a vasos sanguíneos lesionados inicia o processo de formação do trombo e, liberando fatores de crescimento, leva à proliferação de células vasculares (MURATA *et al.*, 1997).

A angina instável e o IAM são freqüentemente associados ao desenvolvimento de novas plaquetas ricas em trombina, sugerindo que a adesão e agregação destas, bem como a deposição de fibrina, são fatores patogénéticos na doença arterial isquêmica. Outros estudos e observações clínicas também revelam que a atividade aumentada da trombina e agregação plaquetária, podem estar envolvidas na ocorrência da reoclusão trombótica. Assim, o entendimento dos mecanismos que regulam a atividade plaquetária talvez leve a melhores métodos de prevenção e tratamento para as doenças cardíacas (GOTO *et al.*, 1999).

Segundo DOPHEIDE *et al.* (2002), a formação de uma adesão estável entre células sanguíneas, tais como plaquetas e leucócitos, e um vaso sanguíneo lesionado requer mecanismos capazes de superar as forças mecânicas geradas pela corrente sanguínea; e a adesão destas células é dependente de uma ligação inicial do complexo plaquetário receptor GPIb-IX-V a uma proteína plasmática chamada Fator von Willebrand (vWF).

O complexo GPIb-IX-V contém quatro polipeptídeos: GP Ib α , GP Ib β , GP IX e GP V, os quais são codificados por genes diferentes e estão presentes na membrana plasmática numa proporção estequiométrica de 2:2:2:1 (KHARGHAN *et al.*, 1999). A glicoproteína (GP) Ib α é o maior dos polipeptídeos e é o componente central deste complexo receptor. Ela ancora o complexo ao citoesqueleto plaquetário e contém dentro de sua porção N – terminal o sítio de ligação ao vWF. O vWF é uma proteína multimérica que age como uma ponte ligante entre as plaquetas e a célula matriz (no vaso lesionado) através da ligação com a GP Ib α pelo seu domínio A1. Embora a estrutura do domínio vWF-A1 seja conhecida, sua interação precisa com a GP Ib α e o mecanismo pelo qual ela se desencadeia ainda são pouco compreendidos (HUIZINGA *et al.*, 2002).

A GP Ib α , então, desempenha um papel fundamental na adesão e agregação das plaquetas, formação do trombo e hiperplasia da íntima após trauma endotelial, estando, portanto, relacionada à progressão da DAC. Sendo assim, variações neste gene têm sido muito estudadas em pacientes com síndromes coronárias agudas (MIKKELSSON *et al.*, 2001; SONODA *et al.*, 2000; MEISEL *et al.*, 2001).

A associação entre o genótipo da GP Ib α e o risco de ocorrência da DAC foi descrita pela primeira vez por MURATA *et al.* (1997), onde dois polimorfismos na seqüência que codifica esta glicoproteína plaquetária foram encontrados.

O primeiro polimorfismo, uma transição C//T no nucleotídeo 1018 de acordo com WENGER *et al.* (1988), resulta em um dimorfismo de aminoácidos (Thr//Met) no resíduo 145 da cadeia α da GP Ib, o qual é localizado dentro do domínio de ligação ao vWF-A1. O segundo polimorfismo é um número variável (de 1 a 4) de seqüências repetidas de 13 aminoácidos (SONODA *et al.*, 2000).

No entanto, as conseqüências funcionais destes polimorfismos no complexo receptor são desconhecidas.

1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (INNIS & GELFAND, 1990; MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1985) e desde então revolucionou toda a genética. A PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) na presença da enzima DNA polimerase. Esta metodologia se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que “flanqueiam” a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Cada ciclo da PCR envolve 3 passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA molde é inicialmente desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e da seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridação DNA – DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que “flanqueiam” a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada porção terminal 3’ dos *primers*. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência seja produzida no processo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Vários

ciclos repetidos permitem a amplificação do fragmento, cujo tamanho é limitado pelos *primers* (porção 5') (WHITE *et al.*, 1989).

O passo decisivo para a expansão da técnica de PCR ocorreu quando SAIKI *et al.* (1988) isolaram uma DNA polimerase (Taq polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes térmicas e polimerisa a 72°C, conseguindo manter a atividade por alguns minutos a 95°C (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As condições iniciais para amplificação, tais como: concentrações de MgCl₂, Taq DNA polimerase e de *primers*, bem como a temperatura de hibridação, devem ser definidas para cada par de *primers* a ser utilizado (PASSAGLIA & ZAHA, 1996).

1.4. Conformação Polimórfica de Fita Simples em Baixa Força Iônica (LIS-SSCP)

A técnica da Conformação Polimórfica de Fita Simples (SSCP) permite a detecção e análise de mutações de ponto em pequenos fragmentos de DNA, baseado na mobilidade diferencial de moléculas de DNA de fita simples (ssDNA). Desde quando foi desenvolvida e utilizada pela primeira vez por ORITA *et al.* (1989), esta técnica tem demonstrado sua eficácia em várias aplicações (GLAVAC & DEAN, 1993).

A detecção de variantes na seqüência do DNA é importante para a identificação de doenças causadas por mutações nas seqüências gênicas, bem como para a detecção de polimorfismos no DNA. Visto que grande parte das variações genéticas é devida a diferenças na seqüência de bases, se faz necessário o uso de técnicas capazes de detectar substituições simples de bases quando se procura mutações ou seqüências polimórficas (SHEFFILD *et al.*, 1993).

A técnica é baseada no princípio de que as moléculas de DNA de fita simples assumem conformações específicas sob condições não desnaturantes. Assim, moléculas que diferem em apenas uma substituição simples de bases, formam estruturas secundárias distintas, migrando diferencialmente durante corrida eletroforética em gel de poliacrilamida não-desnaturante (ORITA *et al.*, 1989).

O SSCP apresenta uma sensibilidade muito alta na detecção de mutações de ponto e sequências polimórficas no DNA (HAYASHI, 1992; MICHAUD *et al.*, 1992); porém limitações também têm sido impostas à técnica. SHEFFIELD *et al.* (1993) demonstraram que a sensibilidade do SSCP varia significativamente com o tamanho do fragmento de DNA a ser analisado, sendo o tamanho ótimo para a eficiência da técnica em torno de 150 pb. Além do tamanho do fragmento, outros fatores parecem afetar a sensibilidade do SSCP, incluindo a posição da substituição de bases dentro do fragmento, a natureza da substituição e a composição da sequência do fragmento de DNA.

MARUYA *et al.* (1996) desenvolveram um método mais simples e eficaz para a geração do DNA de fita simples em relação ao procedimento original desenvolvido por ORITA *et al.* (1989), onde era utilizada a formamida como reagente desnaturante. Neste novo método, o DNA de fita simples é obtido através de desnaturação pelo calor sob condições de baixa força iônica (LIS), e não requer reagentes desnaturantes nem resfriamento da solução após a desnaturação.

O LIS-SSCP além de permitir uma maior nitidez na visualização das bandas, também dá uma maior estabilidade ao DNA de fita simples, ainda mesmo sob temperatura ambiente. Isto porque a diluição do DNA (produto de PCR) na solução contendo baixa concentração iônica (tampão de LIS) diminui bastante as chances de hibridação entre as fitas sense e antisense após a desnaturação (MARUYA *et al.*, 1996).

O método é de fácil execução, tem custo mínimo se comparado com enzimas de restrição, requer um mínimo de equipamentos e tem um grande histórico na descoberta de mutações conhecidas e desconhecidas em produtos de PCR de DNA e RNA (HENESSY *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um padrão de genotipagem para o polimorfismo 145Thr//Met do gene da Glicoproteína I β por meio da técnica de LIS-SSCP e investigar a associação entre esta variante genética e o desenvolvimento da Doença Arterial Coronária, mais especificamente o Infarto Agudo do Miocárdio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

O material de estudo foi coletado no Hospital de Clínicas da UFU no setor de hemodinâmica e no Instituto do Coração do Triângulo, obtidas em processo normal de diagnóstico e tratamento, realizada com autorização prévia dos pacientes através do termo de consentimento informado (ANEXO 1). Foram coletadas 150 amostras de sangue periférico

em tubos por sistema da *Vacutainer*, contendo EDTA (Ácido etilenoaminotetra acético sal dissódico) para evitar a coagulação.

Os pacientes com histórico de DAC (comprovada angiograficamente), foram separados em dois grupos, com 50 indivíduos cada um: com IAM e sem IAM. O grupo controle (população) foi constituído de outros 50 indivíduos sem evidências clínicas ou laboratoriais de qualquer doença cardiovascular.

3.2. Extração de DNA

Das amostras coletadas procedeu-se a extração de DNA genômico, de acordo com os procedimentos para micro extração de SAMBROOK *et al.* (1989). Todas as precauções foram tomadas para evitar tanto a contaminação das amostras com DNase (enzima que degrada o DNA), quanto contaminação cruzada de amostras durante a manipulação do sangue. Após a coleta do sangue, alíquotas de 500 µl da camada de leucócitos foram colocadas em microtubos de 1,5 ml juntamente com 1 ml de Tampão de Lise Celular (TLH: NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 1 mM) e foram agitadas no aparelho “Vortex” por 10 s para a ressuspensão das células. Centrifugou-se a 5.000 rpm por 5 min para precipitar os núcleos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se novamente 1 ml de Tampão de Lise Celular e repetiu-se a centrifugação até os precipitados ficarem com uma coloração branco-creme. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 400 µl de Máster Mix (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 0,5%) a cada tubo pipetando-se “up and down” até o precipitado se desfazer. Adicionou-se 20 µl de Proteinase K (10 mg/ml) a cada tubo e as amostras foram incubadas a 65°C em banho-maria durante 2 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi recolhido em um microtubo limpo

adicionando-se 200 µl de Cloreto de Sódio (NaCl) Saturado 10 M. As amostras foram novamente submetidas à agitação por 5 s e colocadas em gelo por 10 min. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 min para precipitar as proteínas e outros contaminantes e novamente o sobrenadante foi recolhido em um microtubo limpo adicionando-se Etanol Absoluto. Misturou-se por inversão até que os flocos de DNA se tornassem visíveis. Centrifugou-se por 10 min a 13.000 rpm para precipitar o DNA. Após a centrifugação, descartou-se o Etanol residual para que o DNA precipitado fosse secado. O DNA foi, então, ressuspendido em 200 µl de água destilada.

Após a extração, a integridade de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em Tampão Tris-Borato EDTA (TBE 0,5X). O gel foi visualizado em transiluminador UV e fotografado por meio do aparelho Video Documentation System (VDS) Image Master (Pharmacia Biotech), após ser corado com Brometo de Etídeo (10 mg/ml).

3.3. Amplificação do fragmento (PCR)

O fragmento com 588 pb do gene da GPIb α foi amplificado por meio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando o seguinte par de *primers*, anteriormente descrito por MURATA *et al.* (1997): 5'- GGA CGT CTC CTT CAA CCG GC - 3' e 5'- GCT TTG CTG GGG AAC TTG AC - 3'.

A amplificação consistiu das seguintes condições: 1U Taq DNA polimerase, Tampão da enzima (1X), 200 µM dNTPs, 7 pmoles de cada *primer*, 1,5 mM MgCl₂, 30 ng de DNA, completando-se o volume final da reação para 30 µl com água destilada.

O fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5%, em Tampão Tris-Borato EDTA (TBE 0,5X). Aplicou-se 2 µl de Tampão de Carreamento (LOAD) e 8 µl de amostra, utilizando-se um marcador de 100 pb. O gel foi corado com Brometo de Etídeo, visualizado em transiluminador UV e fotografado em VDS Image Master (Pharmacia Biotech).

3.4. Genotipagem dos Pacientes (LIS – SSCP)

Para a obtenção do padrão de genotipagem pela técnica LIS – SSCP utilizou-se um gel de poliacrilamida (49:1 - Acrilamida : Bis) 10%, não desnaturante, nas dimensões de 15:15:0,5 cm.

Foram adicionados 20 µl de Tampão de LIS (Sacarose 10%, Azul de Bromofenol 0,01%, Xilenocianol 0,01%) a 2 – 3 µl de produto amplificado de acordo com a qualidade da amplificação. As soluções foram incubadas por 10min a 95°C para desnaturação, e foram aplicados no gel 10 µl destas. O gel foi submetido a 200 volts por 18 horas à temperatura ambiente, para corrida eletroforética em cuba vertical, utilizando-se como tampão TBE (1X).

Logo após o término da eletroforese, o gel foi corado de acordo com BLUM et al. (1987), com modificações de BASSAM et al. (1991). Primeiramente, foi deixado por 30 min em ácido acético 10%, lavado 2 vezes com água destilada por 2 minutos e corado com solução contendo 400 mg de Nitrato de Prata dissolvido em 200 ml de água destilada e 300 µl de Formaldeído. O gel foi deixado nesta solução por 30 min no escuro.

Após esta etapa, o gel foi lavado com água destilada 2 vezes por 30 s, adicionando-se uma solução reveladora gelada contendo: 6 g de Carbonato de Sódio, 300 µl de Formaldeído,

40 μ l de Tioossulfato de Sódio (10 mg/ml) em 200 ml de água destilada. A solução reveladora permaneceu em contato com o gel até ser obtido um padrão adequado de bandas.

A reação foi parada com Ácido Acético 10% por 5 min e em seguida o gel foi lavado com água destilada. Depois de corado, o gel foi colocado em papel celofane para secagem.

3.5. Análise Estatística

A fim de avaliar a influência do polimorfismo do gene da GP Ib α na DAC e IAM, foi realizada uma análise estatística descritiva através de tabelas de contingência, onde foram calculados o “ODDS ratio” (risco relativo) e os intervalos de confiança (IC). Foi feita também uma comparação média entre os grupos em relação a outros fatores de risco para DAC por meio do *teste t de Student*.

4. RESULTADOS

Na FIGURA 1, observa-se o resultado obtido pela amplificação por meio da técnica de PCR, onde é evidenciada a presença do fragmento esperado de 588 pb referente ao gene da GP Ib α .

Todos os indivíduos foram eficientemente genotipados pela técnica LIS-SSCP. Os padrões obtidos foram os seguintes: 2 bandas com migrações diferenciais para os homozigotos normal (T/T) e mutante (M/M) e 3 bandas para o heterozigoto (T/M), sendo que

dentro dos heterozigotos, dois indivíduos apresentaram um perfil eletroforético diferente (FIGURA 2).

As frequências genóticas e gênicas de cada grupo estão descritas nas TABELAS 1a e 1b respectivamente. Foi encontrado somente um indivíduo (2,0%) no grupo de pacientes não infartados, homozigoto para o alelo M. A frequência de heterozigotos (T/M) foi maior no grupo de pacientes com DAC e IAM (38,0%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (32,0%; OR = 1.3).

TABELA 1a: Frequências genóticas para os grupos de estudo.

Genótipos da GP Ib alfa	Grupo Controle (n=50)	Pacientes com DAC, sem IAM (n=50)	ODDS Ratio TTxTM	IC 95%	Pacientes com DAC, com IAM (n=50)	ODDS Ratio TTxTM	IC 95%
TT	34 (68,0%)	33 (66,0%)	1,03	0,4437- 2,3922	31 (62,0%)	1,3	0,5713- 2,9694
TM	16* (32,0%)	16 (32,0%)			19 (38,0%)		
MM	0	1 (2,0%)			0		

* 2 indivíduos apresentam padrão heterozigoto variante

TABELA 1b: Frequências gênicas ou alélicas para os grupos de estudo.

Alelos	Grupo Controle (n=50)	Pacientes com DAC, sem IAM (n=50)	Pacientes com DAC, com IAM (n=50)
T	0,84	0,82	0,81
M	0,16	0,18	0,19

As tabelas 2a e 2b apresentam dados clínicos tais como idade, sexo, taxas de colesterol total, HDL, LDL e Triglicérides; dos grupos de pacientes não infartados e infartados respectivamente, em relação ao grupo controle.

Para o grupo com DAC sem IAM, a idade variou da 40 a 84 anos e não houve diferença média entre os grupos. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para sexo, HDL e Triglicérides. Em contrapartida, as taxas de Colesterol total ($P = 0,0000114$) e de LDL ($P = 0,000000183$) apresentaram diferenças bastante significativas em relação ao grupo controle.

TABELA 2a: Fatores de risco para Doença Arterial Coronária no grupo de pacientes não infartados em relação ao grupo controle.

Variáveis	Média (DP) ou nº		Valor de P*
	Grupo Controle (n = 50)	Pacientes com DAC, sem IAM (n = 50)	
Idade (anos)	56,38 (10,23)	61,86 (10,92)	ns
Sexo F/M	27/23	27/23	ns
Coesterol Total (mg/dl)	188,86 (24,92)	216,26 (33,67)	<0,01
HDL (mg/dl)	48,6 (9,86)	46,1 (8,82)	ns
LDL (mg/dl)	105,68 (22,8)	133,88 (27,22)	<0,01
Triglicérides (mg/dl)	152,18 (54,73)	178,46 (134,05)	ns

* Análise da significância pelo teste *t*

Já para o grupo de pacientes com IAM, houve diferenças significativas quanto aos valores de HDL ($P = 0,0057$) e LDL ($P = 0,0039$). Idade, sexo, Colesterol total e Triglicérides não diferiram significativamente do grupo controle.

TABELA 2b: Fatores de risco para Doença Arterial Coronária no grupo de pacientes infartados em relação ao grupo controle.

Variáveis	Média (DP) ou nº (%)		Valor de P*
	Grupo Controle (n = 50)	Pacientes com DAC, com IAM(n = 50)	
Idade (anos)	56,38 (10,23)	60,86 (11,33)	ns
Sexo F/M	27/23	18/32	ns
Coesterol Total (mg/dl)	188,86 (24,92)	204,18 (33,49)	ns
HDL (mg/dl)	48,6 (9,86)	43,14 (9,45)	< 0,01
LDL (mg/dl)	105,68 (22,8)	121,48 (30,23)	< 0,01
Triglicérides (mg/dl)	152,18 (54,73)	169,6 (59,84)	ns

* Análise da significância pelo teste *t*

Para uma melhor compreensão da contribuição dos fatores de risco cardiovascular convencionais que mostraram diferença significativa entre os grupos em associação com o gene da GP $Ib\alpha$ no desenvolvimento da DAC e IAM, eles foram também analisados em relação a cada um dos genótipos em questão. Foram considerados os seguintes valores: níveis de Colesterol total maior que 239 mg/dl, HDL menor que 40 mg/dl e LDL maior que 159 mg/dl.

Foram analisados somente os genótipos T/T e T/M pelo fato de haver somente um indivíduo homocigoto mutante M/M dentre os 150 que fazem parte da pesquisa.

Os níveis aumentados de Colesterol total e LDL foram mais frequentes nos indivíduos com genótipo T/T nos grupos controle e de pacientes com IAM, já no grupo de pacientes não infartados predominaram no genótipo T/M.

Em relação aos baixos níveis de HDL, nos dois grupos de pacientes o genótipo T/T apresentou maior frequência, ao contrário do grupo controle que teve esta característica predominante nos pacientes com genótipo T/M. Todos esses dados encontram-se resumidos nos gráficos 3a, 3b e 3c.

GRÁFICO 3a: Frequências genóticas em relação aos níveis aumentados de Colesterol total (acima de 239 mg/dl)

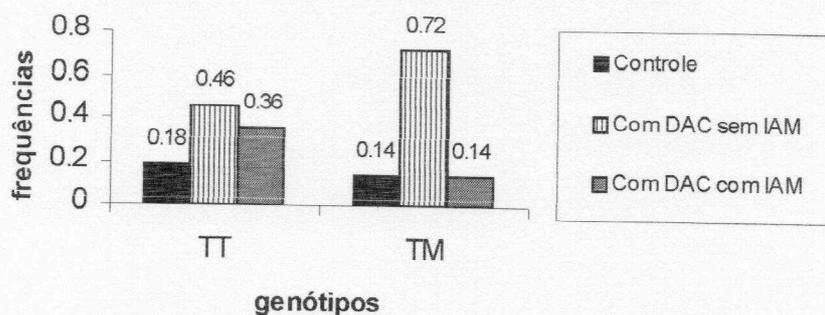


GRÁFICO 3b: Frequências genóticas em relação aos baixos níveis de HDL (até 40 mg/dl)

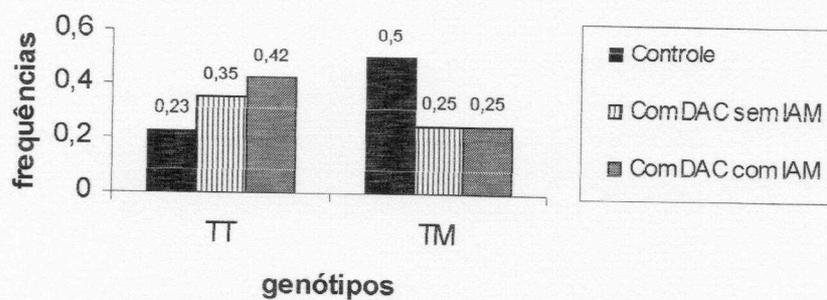
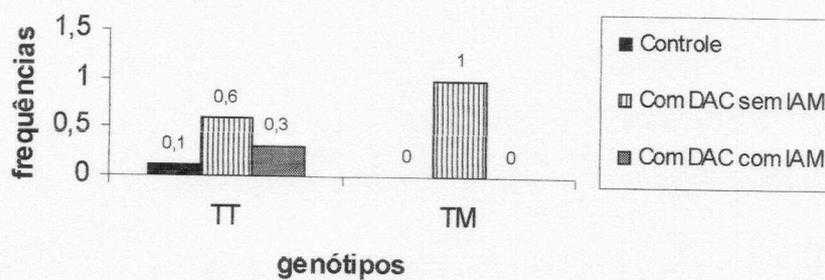


GRÁFICO 3c: Frequências genóticas em relação aos níveis aumentados de LDL (acima de 159 mg/dl)



5. DISCUSSÕES

A técnica LIS-SSCP mostrou-se bastante eficiente na caracterização dos indivíduos quanto à presença do polimorfismo ¹⁴⁵Thr/Met do gene da GP I β .

O gel de poliacrilamida não desnaturante 10%, foi escolhido por apresentar uma melhor definição no padrão de bandas e por ser adequado para se recuperar, reamplificar e sequenciar bandas de interesse.

Como o padrão de genotipagem para esta variante ainda não foi descrito por LIS-SSCP e não foi possível obter um padrão por restrição enzimática, o trabalho requer o sequenciamento dos amplicons para fins de confirmação do polimorfismo.

A determinação dos genótipos a partir dos padrões obtidos por LIS-SSCP foi possível pelo fato de as frequências, tanto genótípicas quanto alélicas, obtidas neste trabalho foram semelhante à de outro trabalho recentemente publicado (MIKKELSON *et al.*, 2001).

O padrão de bandas variante encontrado em dois indivíduos heterozigotos do grupo controle, pode significar um novo polimorfismo no gene da GP I β ainda não descrito, que deverá também ser confirmado por sequenciamento.

Desde o relato inicial feito por MURATA *et al.* (1997), vários autores descreveram seus resultados com o estudo deste polimorfismo do gene da GP I β , como fator de risco para o desenvolvimento da DAC ligado ao alelo Met (MIKKELSON *et al.*, 2001; SONODA *et al.*, 2000). Outros autores chegaram à conclusão que a presença deste alelo não está relacionada ao desenvolvimento desta patologia (CARLSSON *et al.*, 1997; MEIKLEJOHN *et al.*, 2001)

No presente estudo, a frequência dos genótipos T/T, T/M e M/M teve distribuição semelhante nos 3 grupos estudados. O que significa a não associação entre a variante ¹⁴⁵Thr/Met do gene da GP I β e o desenvolvimento tanto da DAC quanto do IAM. Resultado

confirmado pela análise do “ODDS ratio” e dos Intervalos de Confiança que não mostraram significado estatístico entre os grupos de pacientes em relação ao grupo controle pois, os IC (95%) incluem o valor um.

A relativa ausência de indivíduos homozigotos para o alelo Met pode ser explicada devido a insuficiência na amostragem. Contudo, trata-se de um alelo raro, sendo assim até mesmo em trabalhos com um número bastante superior de pacientes analisados, como o realizado por SONODA *et al.* (2000), sua frequência é muito baixa.

Quanto aos fatores de risco cardiovascular classicamente comprovados na literatura como o sexo, idade, níveis de Colesterol total e LDL elevados, baixos níveis de HDL e aumento dos níveis de Triglicérides; apenas o Colesterol total e LDL no grupo de pacientes com DAC e sem IAM e o HDL e LDL no grupo de pacientes infartados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Este fato pode explicar, parcialmente, o acometimento desses pacientes pela DAC e até mesmo pelo IAM, por estarem expostos a fatores de risco diferentes do grupo controle (constituído de indivíduos que não apresentam quaisquer doenças cardiovasculares).

A análise desses três fatores de risco convencionais que aqui apresentaram maior influência no desenvolvimento das patologias em questão, de acordo com os genótipos da GP $Ib\alpha$, não mostrou diferenças substanciais entre os subgrupos evidenciando que, isoladamente, nenhum deles poderia influenciar no desenvolvimento da DAC em associação com o gene da GP $Ib\alpha$.

Indubitavelmente, a principal limitação deste estudo que, provavelmente, afetou a significância de alguns fatores de risco, bem como da influência do polimorfismo em si, foi a insuficiência na amostragem.

6. CONCLUSÕES

Foi possível a genotipagem de 100% dos pacientes por meio da técnica LIS-SSCP, que poderá perfeitamente então, substituir o uso das enzimas de restrição, como uma alternativa mais simples, rápida e de custo mínimo.

As frequências genotípicas encontradas foram semelhantes às de outros estudos, porém, os dados poderão ser mais significativos com o aumento da amostragem.

Estudos futuros serão necessários para fins de confirmação deste polimorfismo, bem como para a identificação de um provável polimorfismo ainda não descrito, caracterizado neste trabalho por apresentar um padrão de bandas diferente dos demais, por meio do sequenciamento dos amplicons.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Germany, v. 8, p. 93-99, 1987.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 196, p. 80-83, 1991.

CARLSSON, L. E.; GREINACHER, A.; SPITZER, C.; WALTHER, R.; KESSLER, C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GP IIb/ IIIa), von Willebrand factor (GP Ib/IX), and collagen (GP Ia/IIa) are not correlated with a increased risk of stroke. **Stroke**, Germany, v. 7, p.1392-1395, 1997.

DOPHEIDE, S. M.; MAXWEL, M. J.; JACKSON, S. P. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. **Blood**, Australia, v. 99, p. 159-167, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**.3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, 220 p.

GLAVAC, D.; DEAN, M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. **Human Mutation**, USA, v. 2, p. 404-414, 1993.

- GOTO, S.; SAKAI, H.; GOTO, M.; ONO, M.; IKEDA, Y.; HANDA, S.; RUGGERI, Z. M. Enhanced shear-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction. **Circulation**, Japan, v. 99, p. 608-613, 1999.
- GRABCZEWSKA, Z.; NARTOWICZ, E. Infections with *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* or cytomegalovirus and atherosclerosis. **Przegl. Lek.**, Warsaw, v. 56, p. 584-587, 1999.
- HAIASHI, K. A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. **PCR Methods Appl.**, v. 1, p. 34-38, 1992.
- HENESSY, L. K.; TEAR, J.; KO, C. PCR conditions and DNA denaturants effects on reproducibility as SSCP patterns for BRCA 1 mutations. **Innovations Forum**, Issue 3, 1999.
- HUIZINGA, E. G.; TSUJI, S.; ROMIJN, R. A. P.; SCHIPHORST, M. E.; GROOT, P. G.; SIXMA, J. J.; GROS, P. Structures of glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand factor A1 domain. **Science**, Netherlands, v. 297, p. 1176-1179, 2002.
- INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSHY, J. J.; WHITE, T. J. (1990). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, Inc., 1990. p 3-12.
- KHARGHAN, V. A.; LI, C. Q.; KHOSHNEVIS, M.; LÓPES, J. A. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ib α gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GPIb-IX-V complex. **Blood**, Houston, v. 94, p. 186-191, 1999.

- MANZOLI, A.; ANDREOTTI, F.; LEONE, A. M.; SPERTI, G.; ZECCHI, P.; DI SCIASCIO, G. Vascular and hemostatic gene polymorphisms associated with non-fatal myocardial infarction: a critical review. **Ital. Heart. J.**, Rome, v. 1, p. 184-193, 2000.
- MARENBERG, M. E.; RISCH, N.; BERKMAN, L. F. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1041-1046, 1994.
- MARUYA, E.; SAJI, H.; YOKOYAMA, S. PCR-LIS-SSCP (Low ionic strength single-stranded conformation polymorphism) - a simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1-DQB1 and DPB1. **Genome research**, Japan, v. 6, p. 51-57, 1996.
- MEIKLEJOHN, D. J.; VICKERS, M. A.; MORRISSON, E. R.; DIJKUISEN, R.; MOORE, I.; URBANIAK, S. J.; GREAVES, M. In vivo platelet activation in atherotrombotic stroke is not determined by polymorphisms of human platelet glycoprotein IIIa or Ib. **Br. J. Haematol**, Foresterhill, v. 3, p. 621-631, 2001.
- MEISEL, C.; KHARGHAN, V. A.; CASCORBI, I.; LAULE, M.; STANGL, V.; FELIX, S. B.; BAUMANN, G.; LÓPEZ, J. A.; ROOTS, I.; STANGL, K. Role of Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ib α as a risk factor of coronary artery disease and catheter interventions. **J. Am. Coll. Cardiol.**, Texas, v. 38, p. 1023-1027, 2001.
- MICHAUD, J.; BRODV, L.C.; STEEL, G.; FONTAINE, G.; MARTIN, I. S.; VALLE, D.; MITCHELL, G. Stranded-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine δ -aminotransferase gene. **Genomics**, v. 13, p. 389-394, 1992.
- MIKKELSSON, J.; PEROLA, M.; PENTTILA, A.; KARHUNEN, P. J. Platelet glycoprotein Ib alpha HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction in sudden cardiac death. **Circulation**, Finland, v. 104, p. 876-880, 2001.

- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. **Methods Enzimology**, San Diego, v. 55, p. 335-350, 1987.
- MURATA, M.; MATSUBARA, Y.; KAWANO, K.; ZAMA, T.; AOKI, N.; YOSHINO, H.; WATANABE, G.; ISHIKAWA, K.; YKEDA, Y. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress dependent platelet activation. **Circulation**, Tokyo, v. 96, p. 3281-3286, 1997.
- ORITA, M.; IWAHAANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel eletrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 86, p. 2766-2770, 1989.
- PASSAGLIA, L. M. P. & ZAHA, A. Técnicas de DNA Recombinante. In: SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; SCHRANK, I.; RODRIGUES, J. J. S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; RAUPP, R. M.; SILVA, S. C.; GAIESKY, V. L. V.; ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto alegre: Mercado Aberto, 1996. p. 307-331.
- SAIKI, R.K. & GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 230, p. 487-491, 1988.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzimatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, Washington, v. 230, p.1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratorial manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. vol. 1.

SHEFFIELD, V. C.; BECK, J. S.; LIDRAL, A.; NICHOLS, B.; COUSINEAU, A.; STONE, E. M. Detection of polymorphisms within gene sequences by CG-clamped denaturing gradient gel electrophoresis. **Am. J. Hum. Genet.**, Iowa, v. 50, p. 567-575, 1993.

SLACK, J.; EVANS, K. A. The increased risk of death from ischemic heart disease in first-degree relatives of 121 men and 96 women with ischemic heart disease. **J. Med. Genet.**, v. 3, p. 239-259, 1966.

SONODA, A.; MURATA, M.; ITU, D.; TANAHASHI, N.; OHTA, A.; TADA, Y.; TAKESHITA, E.; YOSHIDA, T.; SAITO, I.; YAMAMOTO, M.; IKEDA, Y.; FUKUUCHI, Y.; WATANABE, K. Association between platelet glycoprotein Ib α genotype and ischemic cerebrovascular disease. **Stroke**, Tokyo, v. 31, p. 493-497, 2000.

WANG, X. L.; TAM, C.; McCREIDE, R. M.; WILCKEN, D. Determinants of severity of coronary artery disease in Australian men and women. **Circulation**, v. 89, p. 1974-1981, 1994.

WENGER, R. H.; KIEFFER, A. N.; WICKI, N.; CLEMETSON, K. J. Structure of the human platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 156, p. 389-395, 1988.

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Technical Focus**, v. 5, p. 185-188, 1989.

ANEXO 1

Termo de Consentimento

O Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) está realizando um estudo de genética relacionado à hipertensão como fator de risco para a ocorrência de Infarto do Miocárdio (IM). Este estudo está sendo dirigido pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, juntamente com a acadêmica Paula Cristina Batista de Faria do Curso de Ciências Biológicas.

O projeto consiste no estudo da presença de uma variação específica no gene na Glicoproteína Iba que é responsável pela adesão e agregação das plaquetas após lesão coronária, o que pode influenciar no processo que leva ao IM.

Para detectar a possível variação no gene, é necessário análise do DNA a partir de sangue periférico de indivíduos que possuam histórico de doença arterial coronária com e sem IM.

Para a realização deste exame, é necessário coletar 15 ml de sangue periférico de cada paciente utilizando-se o sistema de coleta *Vacutainer*, contendo EDTA para evitar a coagulação.

O sangue coletado será enviado ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de DNA.

O paciente poderá pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados, e aqueles que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja prejuízo próprio.

Pelos termos apresentados por este documento,

Eu _____

Concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Paciente _____

Testemunhas

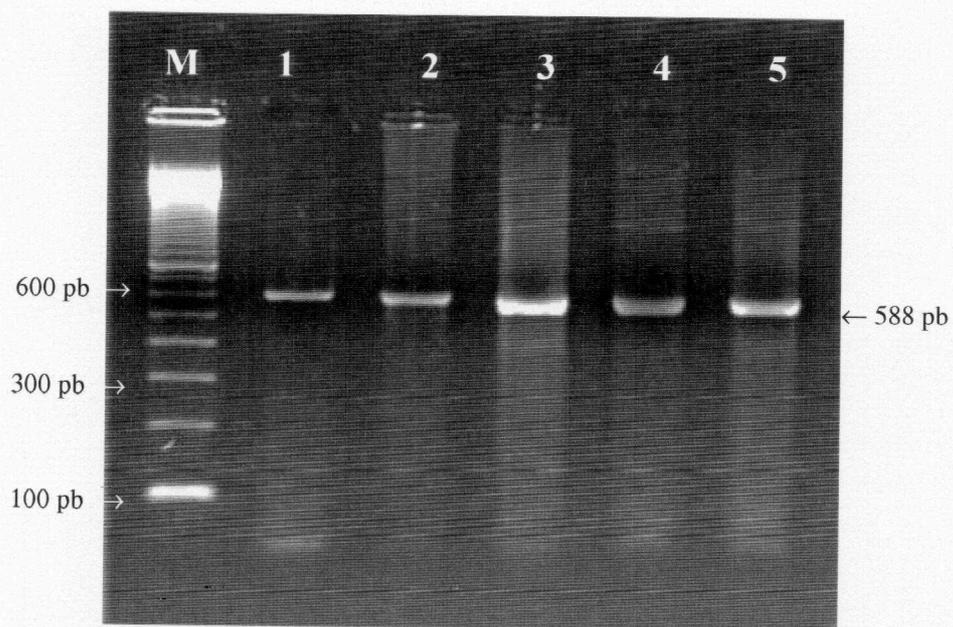


FIGURA 1: Gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação do fragmento de 588 pb referente ao gene da Glicoproteína I β . M - marcador de 100 pb; 1 a 5 - pacientes.

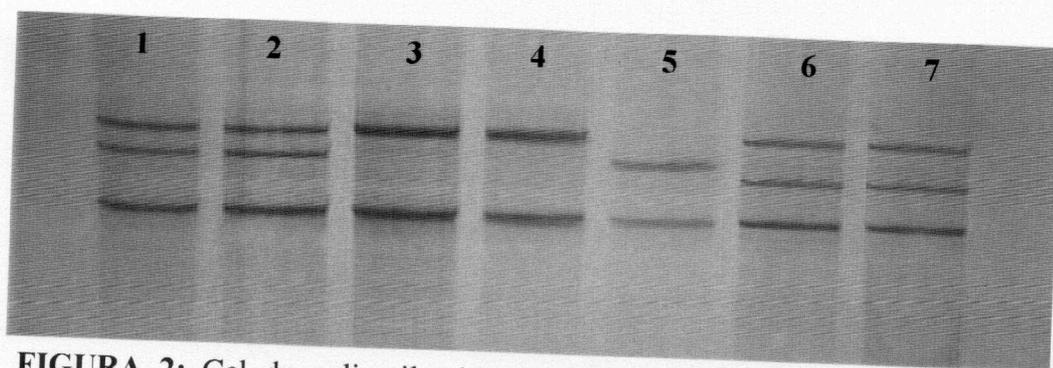


FIGURA 2: Gel de poliacrilamida (49:1) 10% evidenciando o padrão de genotipagem obtido pela técnica LIS-SSCP para o polimorfismo ¹⁴⁵Thr//Met do gene da Glicoproteína I α . 1 e 2 – indivíduos heterozigotos (TM); 3 e 4 – indivíduos homozigotos normais (TT); 5 – indivíduo homozigoto mutante (MM); 6 e 7 – indivíduos heterozigotos com padrão variante.