

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CORRELAÇÃO GENÉTICA ENTRE O FATOR V
DE LEIDEN E O INFARTO DO MIOCÁRDIO.**

Elisângela Rosa da Silva

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

**Uberlândia – MG
Março/ 1999**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CORRELAÇÃO GENÉTICA ENTRE O FATOR V DE
LEIDEN E O INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Elisângela Rosa da Silva

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

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

**Uberlândia – MG
Março/ 1999**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

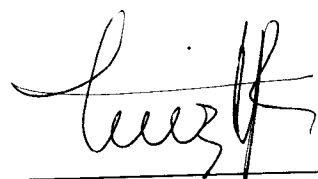
CORRELAÇÃO GENÉTICA ENTRE O FATOR V DE LEIDEN
E O INFARTO DO MIOCÁRDIO

Elisângela Rosa da Silva

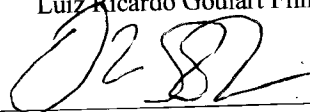
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 10/03/1999

Nota 100

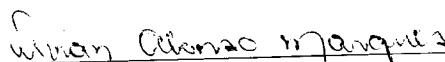
Assinatura
Assinatura do(a) aluno(a)
Nome do(a) aluno(a) _____
Assinatura do(a) orientador(a) _____
Nome do(a) orientador(a) _____



Luiz Ricardo Goulart Filho



Juarez Inácio



Vivian Alonso Marques

Uberlândia- MG
Março/1999

À Deus,

“Obrigada Senhor, pelo dom precioso da vida. Esta vida que generosamente nos destes e pela qual nos sentimos responsáveis. Obrigada por nossos pais, irmãs, amigos, professores, por todos quanto fizeram parte dessa nossa história e nos ajudaram a crescer e a sermos mais gente. Obrigada por esta etapa vencida, por nosso passado e por nosso futuro. Receba em tuas mãos, nossa alegria e eterna gratidão. Que tua constante presença ilumine sempre nosso futuro...”

Aos meus pais,

“Dou-lhes o sorriso que trago em minha face. O sorriso do trabalho, da luta, do carinho, da crença e da esperança que um dia espero ver nas faces dos meus filhos. Dou-lhes também uma parte do meu futuro, futuro do qual vocês abriram mãos dos seus para nos reservar um melhor. Dou-lhes ainda todo trabalho que eu possa desprender, para fazer brilhar esta herança, torná-los notórios e dignos de respeito. Pai, mãe, apenas dou-lhes; pois tudo o que tenho feito foi receber...”

Às minhas irmãs,

‘Na construção de uma grande peça teatral, a presença de todos, é imprescindível. Não existirá um cenário, se não houver quem o construa. Não existirá luz, se não houver quem o ilumine. Não existirá som, se não houver quem o projete. Por trás dos bastidores, estão os grandes responsáveis pela realização e andamento da peça. Da nossa grande peça...A vida.’

Ao meu orientador,

‘Sábios são aqueles que estudam como se fossem viver eternamente e vivem como se fossem morrer amanhã; que educam sempre através do exemplo; que pensam que tudo o que realizaram é sempre pouco em comparação com o resta fazer. Escravo é aquele que se entrega à sôfrega e insaciável fome de poder, vencendo sua dignidade e anestesiando sua consciência. Livre é o homem que enriqueceu com a cabeça erguida e que, podendo pisar e esmagar, recolheu e ajudou. Homem é aquele que, demolindo os medos e os preconceitos, ampliou-se, auto afirmou-se e cresceu.’

Aos amigos e funcionários do laboratório de Genética Molecular e do Departamento de Genética e Bioquímica

‘Pode-se comprar o tempo de um homem, pode-se também comprar-lhe certas atividades. Mas não se pode comprar entusiasmo, iniciativa, lealdade, nem devoção de espírito, de coração, de alma. Estas coisas necessita-se conquistar! Muito obrigada a vocês que enriqueceram a nossa luta, animaram nosso trabalho, que sorriram, que ouviram nossas queixas. Muito obrigada a vocês, não importa quantos nomes vocês tenham....’

Resumo:

Uma única mutação de ponto no gene fator V (Arg 506 Gln) que leva à resistência à proteína C ativada (APC) é um fator de risco comum para o tromboembolismo venoso. O fenótipo da resistência à APC está associado à heterozigose ou homozigose para o fator V de Leiden, o qual caracteriza-se pela substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1691, codon 506, do exon 10. A herança à trombofilia causada pela presença do fator V mutante é a mais conhecida e prevalente, sendo um defeito genético bem definido associado com a ocorrência de trombose venosa. Porém, ainda não está claro se o fator V de Leiden predispõe ao infarto do miocárdio. Para determinar a correlação genética entre o fator V de Leiden e o infarto do miocárdio, amostras de DNA de 57 pessoas foram analisadas; sendo 36 infartadas e 21 saudáveis. Não foi encontrada diferença significativa entre a distribuição de alelo mutante quando os grupos foram comparados. A análise estatística feita pelo software STATISTICA não estabeleceu correlação estatisticamente significativa entre os fatores analisados. Assim, no presente estudo, a presença do fator V de Leiden não predispõe ao infarto do miocárdio.

PALAVRAS CHAVE: Trombose- fator V de Leiden- infarto do miocárdio.

Índice

1-Introdução	1
2-Revisão Bibliográfica	3
2.1-O sistema proteína C, um anticoagulante natural	4
2.2-Fatores VIIIa e Va substratos para a APC	5
2.3-A trombomodulina e a ativação da proteína C	6
2.4-Resistência à APC causada por uma mutação do gene fator V	6
3-Material e Métodos	9
3.1-Material Biológico	9
3.2-Extração de DNA	9
3.3-PCR para genotipagem do fator V	10
3.4-Análise estatística	12
4-Resultados	14
5-Discussão e Conclusões	18
6-Refências Bibliográficas	20

1- Introdução

O tromboembolismo venoso, com uma incidência anual de 1/1000, é um sério problema médico causando sofrimento e mortes ocasionais (Goldhaber *et al.*, 1994; Allaart *et al.*, 1994). A trombose tende a ocorrer em conjunção com cirurgias, fraturas, estados inflamatórios, imobilização, gravidez, e uso de contraceptivos orais; demonstrando que fatores circunstanciais de risco têm importância na patogênese. Adicionalmente, a trombose é muitas vezes familiar, sugerindo o envolvimento de fatores de risco genéticos (Miletich *et al.*, 1993; Allaart *et al.*, 1994).

Os defeitos genéticos anteriormente conhecidos pela sua associação com a trombofilia eram deficiências de proteína C, proteína S, antitrombina II e disfibrinogenemia. Entretanto, juntos, eles ocorrem em somente 5% a 10% dos casos. (Hijboer *et al.*, 1990; Taberner *et al.*, 1991; Allaart *et al.*, 1994). Recentemente, a herança da resistência à ação anticoagulante da proteína C ativada (APC) foi encontrada como um fator envolvido na trombofilia (Dahlbäck *et al.*, 1993).

A resistência à proteína C ativada é uma anormalidade hemostática que freqüentemente causa trombose e trata-se de uma herança, aparentemente, autossômica dominante (Dahlbäck *et al.*, 1993; 1995 a).

A proteína C é ativada pelo complexo trombina-trombomodulina, na sua forma ativada (APC), e cliva os fatores de coagulação Va e VIIIa, limitando a formação de coágulos sanguíneos (Esmon 1993, Shen *et al.*, 1994).

Uma mutação no gene fator V, localizado no cromossomo 1q 21-25 e contendo 25 exons com mais de 80 Kb, está sendo identificada como base molecular para muitos casos de

resistência à proteína C ativada (Bertina *et al.*, 1994). O fator V alternativo, conhecido como fator V de Leiden, tem uma mutação de guanina para adenina (G→A) no nucleotídeo 1691 que converte arginina (Arg) 506 para glutamina (Gln). A proteína C ativada cliva o fator V normal no sítio R 506 enquanto o fator V de Leiden, Q506R, é resistente à clivagem (Garcia-Gala. *et al.*, 1997).

A associação entre a mutação do fator V Q506R e o risco de tromboembolismo venoso está sendo claramente estabelecida (Dahlbäck, 1995 b). Co-segregação de trombose com a mutação tem sido demonstrada em estudos de grandes famílias, nas quais heterozigotos e homozigotos para a mutação têm um aumento do risco de sofrer trombose de 5 a 10 vezes e de 50 a 80 vezes, respectivamente (Zöller *et al.*, 1994; Beufé *et al.*, 1995; Rosendall *et al.*, 1995).

Provavelmente, a formação e o crescimento de trombos é causado pela ativação local do sistema da coagulação, combinado com um distúrbio no balanço entre coagulação e reações fibrinolíticas, favorecendo a formação de coágulos. Acredita-se que os defeitos genéticos do sistema de coagulação possam desencadear outras doenças complexas, como o infarto do miocárdio, derrames, eclampsia, pré-eclampsia e diabetes (Rosendaal *et al.*, 1997).

A resistência à proteína C ativada, com deficiência para clivar e inibir o fator Va, pode levar a uma incontrollável coagulação e formação de trombos, provavelmente, segundo Holm *et al.* (1994) a presença do fator V de Leiden contribuiu para casos de infarto do miocárdio em seus pacientes.

Defeitos genéticos do sistema de coagulação, como deficiências de proteína S e proteína C, resistência à proteína C ativada e outros, são associados com a doença de tromboembolismo venoso, porém poucas pesquisas têm associado estes defeitos ao risco de infarto do miocárdio. Na tentativa de demonstrar se o fator V de Leiden é um fator de risco para o infarto do miocárdio, esse trabalho teve por objetivo geral, por meio de técnicas de genética molecular, a análise do genótipo do gene fator V de pacientes infartados e de não infartados. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram realizados: (a)-amplificação de um fragmento de 223 bp, pertencente ao códon 506, pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase); (b)-genotipagem dos indivíduos por meio de (b-1)-restrição enzimática com *Mnl* I e (b-2)-LIS-SSCP (Conformação Polimórfica de Fita Simples em Baixa Concentração Iônica); (c)-cálculo da frequência gênica do alelo mutante pela equação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e (d)-cálculo da correlação genética entre o fator V de Leiden e o infarto do miocárdio pelo software STATISTICA.

2-Revisão Bibliográfica

A herança de defeitos na coagulação sanguínea é conhecida há séculos pelo fato de provocar desordens vitais no sangue. Mas em contrapartida, a existência de desordens relacionadas à herança da trombose estão sendo observadas somente há poucas décadas (De Stefano *et al.*, 1996).

A trombose venosa é a obstrução da circulação pelos coágulos que são formados localmente nas veias ou pelos trombos que são liberados de outras partes. Os sítios usuais de formação de trombos são as veias superficiais e profundas das pernas, mas isto também pode ocorrer nas veias do cérebro, retina, fígado e mesentério.

O envolvimento de fatores genéticos foi reconhecido em pesquisas feitas com grupos familiares nos quais haviam ocorrido eventos de trombose venosa (trombofilia familiar); 20 a 30 por cento dos pacientes com trombose, que foram pesquisados, tinham no mínimo um parente com trombose. Por outro lado, estudos clínicos revelaram que condições adquiridas como trauma, cirurgias, imobilização, gravidez, o puerpério e o uso de contraceptivos orais são importantes fatores de risco para a trombose venosa (Bertina & Rosendaal, 1998).

A primeira herança de deficiência à antitrombina (AT) foi descrita por Egeberg (1965) e por muitos anos a deficiência dessa proteína anticoagulante de ocorrência natural foi a única causa identificada de herança à trombofilia. A trombofilia herdada foi definida como uma tendência geneticamente determinada ao tromboembolismo venoso que caracteristicamente ocorre na idade jovem (entre 40 e 45 anos) sem causas aparentes e tendência a ocorrer periodicamente.

Na década de 80 houve uma explosão de novos conhecimentos, com identificação da primeira deficiência de proteína C (Griffin *et al.*, 1981) e a deficiência de proteína S (Comp *et al.*, 1984, Schwarz *et al.*, 1984) como causas adicionais da trombofilia herdada. Contudo, esses três defeitos juntos somente ocorrem em menos de 15% dos casos selecionados de trombose venosa juvenil e ou recorrente e em menos de 10% dos casos não selecionados (Allaart *et al.*, 1994).

Recentemente, a herança de resistência à ação anticoagulante da proteína C ativada (APC) foi identificada como um fator envolvido na trombofilia. Observou-se, em amostras de plasma, que certos indivíduos com trombofilia herdada eram resistentes à ação anticoagulante da proteína C ativada, uma protease gerada pelo sistema anticoagulante trombomodulina-proteína C que inativa os fatores da coagulação V e VIII ativos (Va e VIIIa) (Dahlbäck *et al.*, 1993). Em muitos casos, a resistência à APC é causada por uma única mutação de ponto no gene do fator V, a qual leva à troca da Arg 506 pela Gln: A Arg 506 está localizada em um dos sítios de clivagem da APC no fator Va, e o fator Va mutado é menos sensível do que o fator Va normal à inativação mediada pela APC. Tal fato, causa um estado de hipercoagulação pela redução do grau de inativação do fator Va (Bertina *et al.*, 1994; Greengard *et al.*, 1994). Esta é a causa mais freqüente de trombofilia herdada, ocorrendo em 20% a 50% dos casos (Griffin *et al.*, 1993; Svensson & Dahlbäck, 1994).

2.1-O sistema proteína C, um anticoagulante natural

Em resposta à injúria vascular, o fator VII liga-se ao fator exposto do tecido, iniciando uma cascata de reações que resulta na formação de trombina (Furie, 1988; Nemerson, 1988; Davie *et al.*, 1991) (Quadro-1). A trombina ativa plaquetas, converte fibrinogênio à fibrina, e ativa os fatores VIII e V (para VIIIa e Va). Os fatores VIIIa e Va ligam-se às plaquetas ativadas e servem como receptores/cofatores para as enzimas proteolíticas fatores IXa e Xa respectivamente. (Kane *et al.*, 1988; Jenny *et al.*, 1994). O fator IXa ativa o fator X, o fator Xa retorna ativando protrombina a trombina. Os fatores VIIIa e Va aumentam a eficiência catalítica das respectivas enzimas em mais de 1000 vezes. No sítio de injúria vascular, a amplificação da cascata de reações da coagulação resulta na geração explosiva de trombina e coagulação. Em contraste, nos vasos intactos a trombina realiza uma função completamente diferente como um iniciador do sistema anticoagulante da proteína C (Walker *et al.*, 1992; Esmon, 1993 a).

A trombina liga-se com alta afinidade a um receptor conhecido como trombomodulina (TM), o qual está presente na superfície das células endoteliais. Quando ocorre essa ligação, a trombina perde suas propriedades procoagulantes e torna-se um potente ativador de proteína C. APC cliva e inativa os corpos fosfolipídicos dos fatores Va e VIIIa, resultando na inibição da coagulação. Duas proteínas plasmáticas, proteína S e fator V, potencializam a atividade anticoagulante da APC. No plasma humano, APC é lentamente neutralizada pela atividade, de no mínimo, três diferentes inibidores de proteinase. A longa meia-vida da APC e sua especificidade para as formas ativadas dos fatores V e VIII são pré-requisitos para a sua própria função como anticoagulante circulante in vivo (Esmom, 1993b; Shen *et al.*, 1994).

Sob condições fisiológicas normais o balanço dos mecanismos coagulante e anticoagulante favorece a anticoagulação. Entretanto, nos sítios de injúria vascular, o sistema anticoagulante age moderadamente e as forças procoagulantes prevalecem, permitindo a ocorrência de coagulação sangüínea extravascular enquanto a fluidez intravascular é mantida (Dahlbäck, 1995 a).

2.2-Fatores VIIIa e Va, substratos para a APC

Os fatores VIII e V são glicoproteínas homólogas de alto peso molecular ($M_r \cong 300.000$) a concentração no plasma do fator VIIIa (0,1 a 0,2 mg/L) é 50 a 100 vezes menor do que a do fator V ($\cong 10\text{mg/L}$) (Fay, 1993; Jenny *et al.*, 1994; Kane *et al.*, 1988). Ambas proteínas, são sintetizadas como proteínas precursoras de cadeia única. No seus estados precursores, os fatores V e VIII expressam pouca ou nenhuma atividade procoagulante. Precocemente, durante a ativação da coagulação do sangue, eles estão completamente ativados, limitando a proteólise pela trombina ou pelo fator Xa. A APC, especificamente, degrada os corpos de membrana dos fatores Va e VIIIa, entretanto os fatores V e VIII inativos são substratos pobres para APC. Vários corpos peptídicos dos fatores Va e VIIIa são clivados pela APC. No fator Va, a APC medeia a clivagem correspondente à Arg 506 correlacionada à queda da atividade do fator Va. Porém, esta clivagem é insuficiente para a completa inativação do fator Va, e recentes descobertas sugerem que a clivagem na Arg 306 também seja requerida (Kalifatis *et al.*, 1993). No fator VIII a clivagem da Arg 562 no domínio A₂ resulta em um cofator de inativação (Fay, 1993; Svensson & Dahlbäck, 1994).

2.3-A trombomodulina e a ativação da proteína C

A trombomodulina (TM) é uma proteína multimodular de membrana que liga-se à trombina com alta afinidade (Walker *et al.*, 1992; Esmon, 1993 a). A trombina ligada à TM torna-se no mínimo 20.000 vezes mais eficiente na ativação da proteína C do que na sua forma não complexada. Com poucas exceções, células endoteliais de artérias, veias, capilares e vasos linfáticos expressam TM. Devido à área de superfície, o volume de sangue é maior nos capilares do que nos grandes vasos, a concentração da TM na microcirculação é mais de 1.000 vezes maior do que nos principais vasos. Nos grandes vasos a trombina está no seu estado livre, não complexada, mas quando o sangue penetra na microcirculação ela é exposta à TM, e assim elas se complexam, ativando, portanto, a proteína C. Devido ao acúmulo de trombina na microcirculação, a TM medeia a modulação da trombina de um procoagulante para uma enzima anticoagulante de importância crucial (Esmon, 1989).

2.4-Resistência à APC causada por uma mutação do gene fator V

Uma mutação no gene fator V, recentemente identificada em conjunto com a resistência à APC é mais um defeito que aumenta consideravelmente o risco de trombose (Dahlbäck, 1995 a). Essa mutação no gene fator V, localizado no cromossomo 1q 21-25 e contendo 25 exons com mais de 80 Kb, está sendo identificada como base molecular para muitos casos de resistência à proteína C ativada. Indivíduos resistentes à APC são originalmente portadores de mutações afetando o sítio de clivagem do fator Va (Arg 506-Gly 507) ou APC ligada à região do fator V (Arg 1865-Ile 1874) (Bertina *et al.*, 1994).

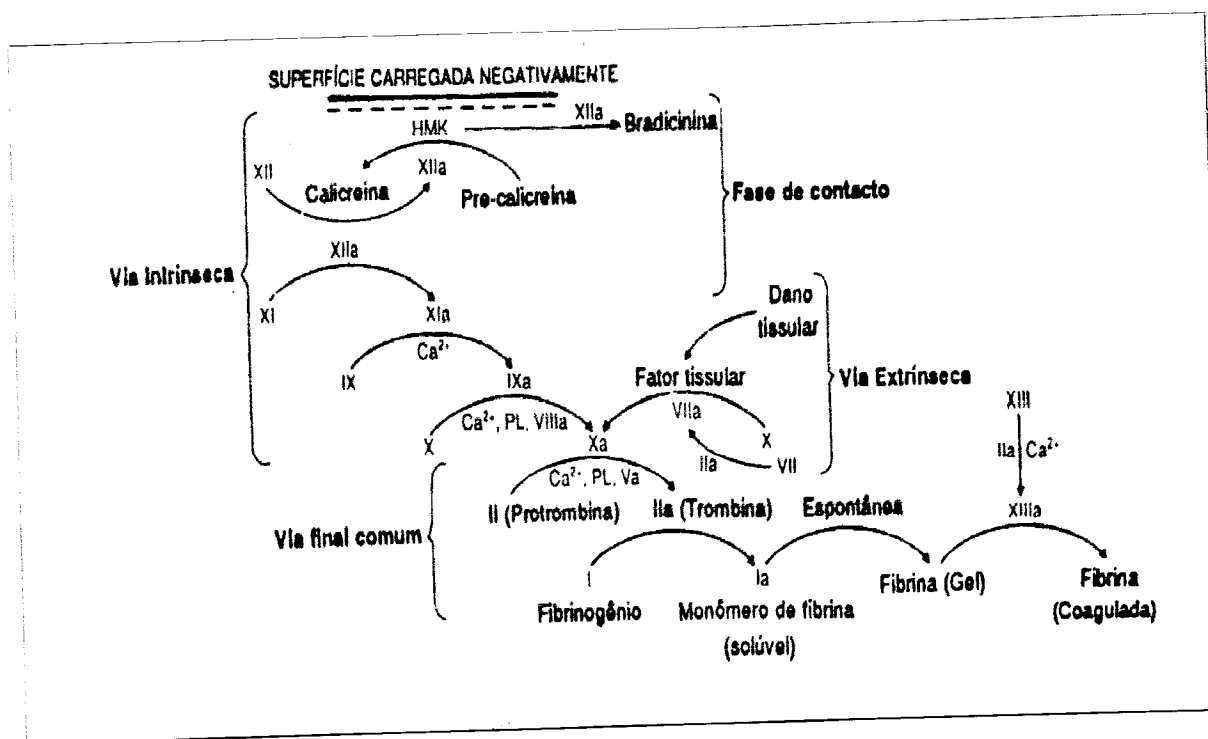
O fator V alternativo, também conhecido como fator V de Leiden, tem uma mutação de guanina para adenina (G→A) no nucleotídeo 1691 do exon 10, a qual converte Arg 506 para Gln. A APC cliva o fator V normal no sítio R 506 enquanto o fator V de Leiden, (Q 506) é resistente à clivagem pela APC (Garcia-Gala *et al.*, 1997). Essa mutação de ponto, causando resistência à APC pela inativação do fator Va, é encontrada em 80% a 100% dos pacientes investigados (Bertina *et al.*, 1994; Alhene-Gelas *et al.*, 1994; Voorberg *et al.*, 1994; Zoller *et al.*, 1994).

A mutação da Arg 506 para Gln no gene fator V, é a melhor conhecida e prevalente, sendo um defeito genético bem definido associado com a trombofilia venosa. Sua alta prevalência na população em geral sugere que uma pressão genética positiva esteja envolvida (Majerus, 1994). Durante a evolução, um estado de hipercoagulação desprezível

pode ter conferido vantagens em situações de injúrias traumáticas e gravidez, mas a natureza dessas vantagens é somente especulativa. Neste contexto, poder-se-ia imaginar que muitos fatores de risco circunstanciais para a trombose são artefatos da vida moderna (Dahlbäck, 1995 a).

O fator V de Leiden, impõe um aumento no risco de ocorrência de tromboses, ao longo do período de vida, de cerca de 5 a 10 vezes nos portadores desta mutação. Em indivíduos afetados, a trombose pode não ocorrer ou se manifestar somente em idade avançada. Entretanto, se a resistência à APC está associada a outros defeitos genéticos ou a fatores de risco circunstanciais, o risco de trombose torna-se alto. Devido a prevalência da resistência à APC no norte europeu ser de 3% a 7%, espera-se que uma em cada 1.000 pessoas seja homozigota para o fator V de Leiden (Dahlbäck, 1995 a).

Acredita-se que a prevalência do fator V de Leiden esteja associada às populações do Velho Mundo. Riss *et al.* (1995) demonstrou a ocorrência mundial desta mutação, comprovando a sua maior incidência na população européia (Tabela-1).



Quadro-1- Vias Intrínsecas e Extrínsecas da coagulação sanguínea levando à coagulação de fibrina insolúvel. –HMK-cininogênio de alto peso molecular; PL- fosfolípido. Dados de Murray *et al.*, 1994.

TABELA(1)-Frequência do Fator V de Leiden em várias populações.

	Combinant/country	Nº	Heteroz	Homoz	Allele frequency (% 95%CT)
Europa	Uk, White	237	21	0	4.4 (2.6, 6.3)
	Iceland	96	3	1	2.6 (0.4, 4.9)
	Greece, Greek Cypriots	197	24	1	7.0 (4.4, 9.6)
	Italy	49	0	0	0
	Germany, Bavariana	49	2	0	2.0(-0.8, 4.8)
	Total	618	50	2	4.4(3.3, 5.5)
Africa/Middle East	Kenya, Luo	60	0	0	0
	Senegal, Mandenka	96	0	0	0
	Zambia	95	0	0	0
	Saudi Arabia	55	0	0	0
	Total	306	0	0	0
Asia	Indonésia, Sumatra	105	0	0	0
	Taiwan Aboriginais	83	0	0	0
	Mongolians	36	0	0	0
	Hong Kong Chinese	48	0	0	0
	total	272	0	0	0
Australia	Australian Aboiginais	73	0	0	0
	Papua N. Guinea, highlands	48	0	0	0
	Papua n. guinea, coast	47	0	0	0
	total	108	0	0	0
Asia Minor	Pakistan	36	0	0	0
	Gujerati	32	1	0	1.6(-1.4, 4.6)
	Punjab	36	0	0	0
	Sikh	29	1	0	1.7(-1.6, 5.0)
	Sri Lanka	47	0	0	0
	total	180	2	0	0.6(-0.2, 1.4)
America	Vancouver Island Indians	36	0	0	0
	Peruvian indians	19	0	0	0
	Jamaica	91	0	0	0
	Total	146	0	0	0

Dados de Ress *et al.*, 1995.

3-Material e Métodos:

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia e Biogenetics Tecnologia Molecular Ltda.

3.1-Material Biológico:

O material para estudo, sangue periférico humano, foi obtido por meio da colaboração da equipe de cardiologistas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, mediante autorização do paciente para coleta do mesmo.

Foram coletadas 36 amostras de sangue de pacientes infartados, cujo diagnóstico clínico foi confirmado por angiografia e cineangiocoronariografia, e 21 amostras de sangue de pessoas saudáveis não infartadas.

Do sangue coletado, extraiu-se as amostras de DNA utilizadas no estudo.

3.2-Extração de DNA:

As extrações de DNA foram feitas no laboratório Biogenetics Tecnologia Molecular Ltda, segundo o método de Isolamento de DNA descrito:

- 1 - Transferir 500 µL da camada de leucócitos para eppendorf de 1,5 ml.
- 2 - Acrescentar 1,0 ml de Tampão de Lise Hemácia (TLH) [NH_4Cl 155mM, KHCO_3 10mM e EDTA 1mM] em cada amostra. Misturar por inversão durante 30 segundos.

- 3 - Centrifugar a 2.500 rpm durante 5 minutos para peletizar os núcleos. Descartar o sobrenadante, desprender o pelete do fundo do tubo com leves batidas, e repetir o passo até que o pelete adquira uma coloração creme claro.
- 4 - Adicionar 150 μ L do Tampão de Lise do Núcleo (TLN) [Tris - HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 2mM, NaCl 400mM] e ressuspender o pelete. Gotejar 5 μ L de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% gelado e acrescentar 2,5 μ L de proteinase K (20 mg/ml).
- 5 - Incubar as amostras por 6 horas à temperatura de 55° a 60° C.
- 6 - Adicionar 100 μ L de NaCl saturado. Agitar vigorosamente por 10 segundos. Deixar em gelo por 10 minutos.
- 7 - Centrifugar a 2.500 rpm por 15 minutos. Recolher o sobrenadante e adicionar 800 μ L de etanol absoluto não congelado. Misturar por inversão até que ocorra precipitação.
- 8 - Girar o tubo em seu eixo no sentido horizontal, para prender o DNA à parede do tubo, e descartar o sobrenadante. Adicionar 10 ml de Etanol 70% para realizar a lavagem. Girar o tubo como descrito acima e descartar o álcool.
- 9 - Ressuspender os peletes em TE [TRIS -HCl 10mM, EDTA 1 mM (pH. 7,4)] de acordo com o tamanho dos mesmos.

3.3-PCR para genotipagem do fator V:

Um fragmento do gene fator V com 223bp, contido no exon 10, códon 506, foi amplificado por meio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os primers:

1- ACC CAC AGA AAA TGA TGC CCA G e

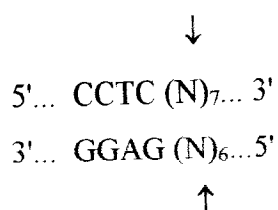
2- TGC CCC ATT ATT TAG CCA GGA G (Garcia-Gala *et al.*, 1997).

Cada reação de PCR continha, aproximadamente, 100 ng de DNA genômico, 7,5 pmoles de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, 1,5mM $MgCl_2$, tampão da Taq-DNA polimerase (1X) e uma unidade de Taq-DNA polimerase (Promega) em um volume final de reação de 30 μ L. A PCR foi feita em um termociclador MJ. Research, Inc. utilizando-se o seguinte programa: 95°C durante 5 min, desnaturação inicial, seguidos por 30 ciclos a: 95°C por 30s, desnaturação, 56°C por 60s, anelamento, e 75°C por 30s, extensão. Ao final destes 30 ciclos, acrescentou-se uma temperatura de extensão de 75°C por 5 minutos.

O fragmento, de 223bp, amplificado foi visualizado e fotografado, em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, por meio do aparelho de VDS da PharmaciaBiotech.

Dez microlitros de cada produto da PCR foram digeridos com a enzima de restrição Mnl I (New England Biolabs). Em cada reação de digestão foram necessárias 3 unidades da referida enzima, tampão2 (I X) e BSA 1%. As reações foram incubadas por 4h a 37°C.

A enzima MnlII reconhece o seguinte sítio:



Dois sítios de restrição da enzima MnlII estão presentes no alelo normal amplificado, criando fragmentos de 37, 82 e 104 pares de bases. No fator V de Leiden, a mutação leva à perda de um sítio de restrição produzindo dois fragmentos de 82 e 141 pares de bases. Um indivíduo homozigoto para os dois alelos normais (A_2A_2) terá os fragmentos de 37, 82 e 104 pb; um heterozigoto (A_1A_2) apresentará fragmentos de 37, 82, 104 e 141 pb; enquanto um homozigoto para o alelo mutante (A_1A_1) conterá fragmentos de 82 e 141 bp (Fig 1) (Jeff *et al.*, 1997). O produto da restrição foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio.

Um método alternativo para identificar indivíduos mutantes, o LiS-SSCP (Conformação Polimórfica de Fita Simples em Baixa Concentração Iônica), foi também utilizado para genotipagem do gene fator V. A vantagem dessa técnica reside na rapidez e diminuição de custos, pois evita o emprego de enzima de restrição. O LIS - SSCP foi desenvolvido por Maruya *et al.* (1993) e baseia-se no fato de que a mobilidade eletroforética dos ácidos nucleicos de fita simples depende de sua sequência e não somente do seu tamanho. Assim, este método detecta polimorfismo no DNA, incluindo mutações de ponto em uma variedade de posições em fragmentos de DNA.

O LiS - SSCP foi feito a partir de 2µL de produto amplificado, adicionados a 18 µL de solução de LiS (10% sacarose, 0,01% bromofenol azul e 0,01% de xileno cianol FF). Esta mistura foi incubada por 5 min a 97°C e, posteriormente, 10µL da mesma foram aplicados em gel de poliacrilamina 12% (acrilamida/ bisacrilamida = 49:1). A eletroforese teve duração de, aproximadamente, 6 horas sendo aplicada nesta uma corrente constante de 15mA e temperatura de 4°C. Em seguida, o gel foi corado com nitrato de prata, possibilitando a visualização dos resultados.

3.4-Análise estatística

As frequências genóticas e alélicas foram calculadas pela equação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste do Qui-quadrado foi aplicado para verificar se frequências genóticas estavam de acordo com os resultados esperados.

A análise da correlação genética entre o fator V de Leiden e o fenótipo infarto foi feita pelo software STATISTICA. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

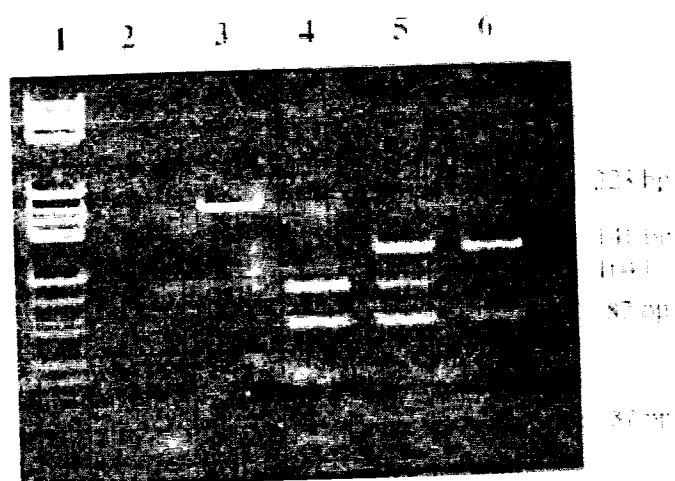


Figura-1: Análise da restrição do fator V de Leiden (Jeff *et al*, 1997).
(1)-Marcador de peso molecular
(2)-H₂O branco
(3)-Fragmento de 223 pb, exon 10
(4)-Indivíduo normal (A₂A₂)
(5)-Indivíduo heterozigoto (A₁A₂)
(6)-Indivíduo homozigoto mutante (A₁A₁).

4-Resultados:

Amostras de DNA de 57 indivíduos foram analisadas quanto à mutação presente no códon 506, fator V de Leiden.

Desses indivíduos, 36 tinham diagnóstico clínico comprovado para o infarto do miocárdio e 21 eram saudáveis. Após a PCR, que amplificou um fragmento de 223 bp do gene do fator V (Fig.2), e digestão com a enzima de restrição MnlI, dois alelos foram detectados, A₂ e A₁. O alelo A₂, normal (Arg. 506) que possui dois sítios de restrição, resultou em fragmentos de 37, 82 e 104 bp. O mutante, alelo A₁ (Gln 506), perdeu um sítio de clivagem e apresentou dois fragmentos de 82 e 141 bp cada (Fig 3).

Entre os 36 pacientes infartados, 34 (94,5%) foram homozigotos para o alelo normal (A₂A₂) e 2(5,5%) heterozigotos (A₂A₁); nenhum homozigoto (A₁A₁) para o alelo mutante foi genotipado. Dos 21 indivíduos saudáveis, 20 (95,2%) foram homozigotos (A₂A₂) e 1 (4,8%) heterozigoto (A₂A₁); o genótipo A₁A₁ não foi detectado entre esses indivíduos.

As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas por meio da equação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e aplicou-se o teste do Qui-quadrado(χ^2),verificando-se que as frequências genotípicas se ajustaram às previstas pela equação (Tabela-2).

Tabela-(2)-Frequências alélicas,genotípicas e resultado de teste Qui-quadrado.

Fenótipos	N	Alelo A ₁	Alelo A ₂	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₂ A ₂	χ^2
infartados	36	0.03	0.97	-	0.055	0.945	0.108
saudáveis	21	0.024	0.976	-	0.048	0.952	0.053

A genotipagem por meio do LIS - SSCP confirmou os resultados obtidos por restrição enzimática, quando comparou-se os indivíduos normais e aqueles que apresentaram o alelo mutante, com exceção do indivíduo normal (4), o qual apresentou um padrão de bandas diferente do esperado em relação aos outros indivíduos pertencentes ao grupo normal. Possivelmente, esse indivíduo possui uma mutação fora do sítio de clivagem da enzima *Mnl* I, que não era esperada e foi detectada pela técnica. O LIS-SSCP demonstrou ser uma alternativa viável neste tipo de diagnóstico, substituindo a técnica de restrição enzimática e detectando novas mutações. A diferenciação entre os alelos normais e mutantes deu-se pelo padrão de bandas apresentado na eletroforese (Fig.4).

A análise dos dados, fator V de Leiden e infarto, pelo programa Statistics resultou em baixo grau de correlação, 0.09 (N=57, $p < 0.050$) não estabelecendo uma correlação genética significativa entre esses dois fatores.

Portanto, neste estudo, o fator V de Leiden não foi um fator de risco para a ocorrência do infarto do miocárdio nos pacientes analisados.

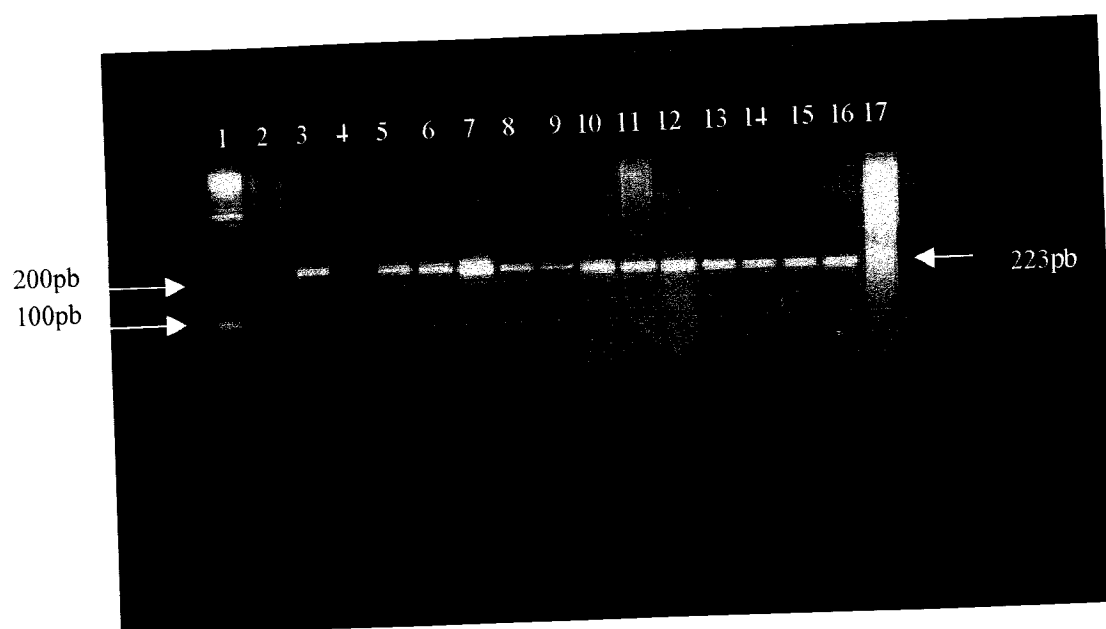


Figura 2: Amplificação do fragmento de 223 pb, pertencente ao códon 506. Linha 1= marcador molecular de 100 pb. Linhas 3,5-16= fragmentos de 223 pb.

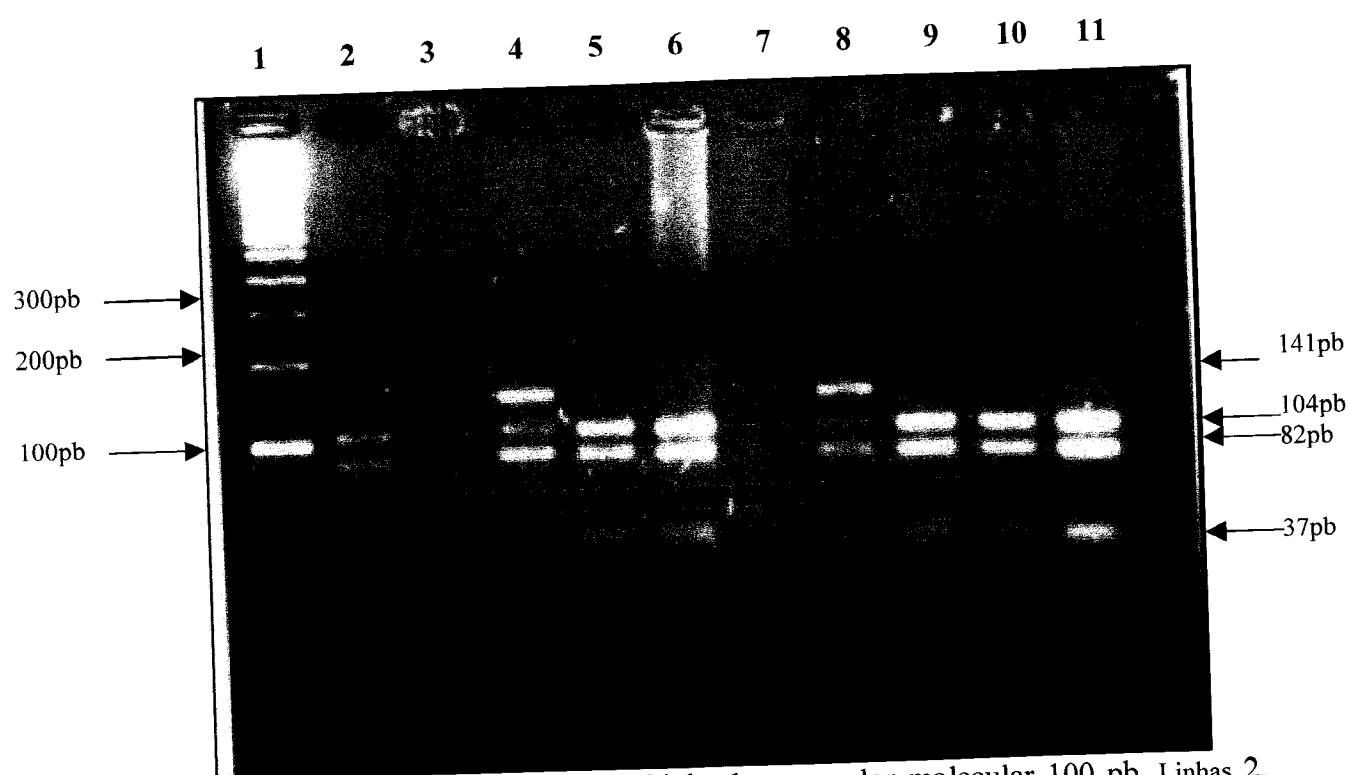


Figura 3: Restrição enzimática. Linha 1= marcador molecular 100 pb. Linhas 2, 3,5, 6, 9, 10, 11= indivíduos $A_2 A_2$. Linhas 4 e 8= indivíduos $A_2 A_1$.

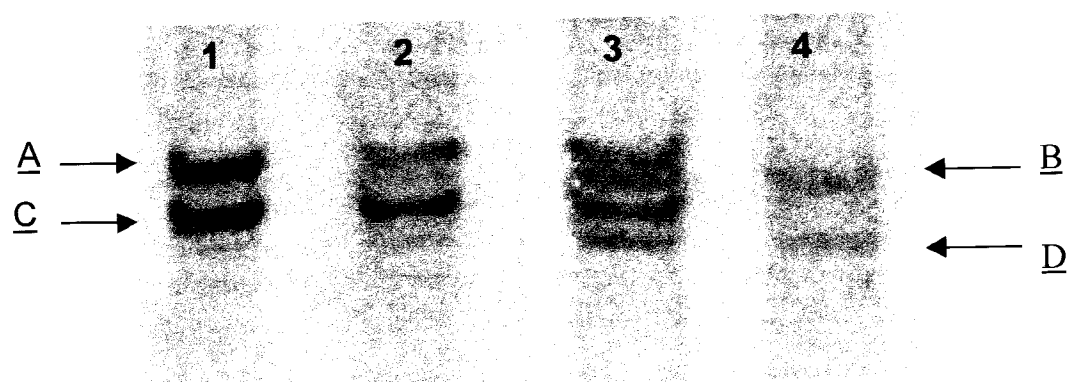


Figura-4-Análise do gel de LIS-SSCP.

- (1 e 2)-Indivíduos normais ($A_2 A_2$)- bandas: A,C.
- (3)-Indivíduo heterozigoto ($A_1 A_2$)- bandas:A, B, C, D.
- (4)- Indivíduo mutante (?) - bandas: B, D.

5-Discussão e Conclusões:

Este estudo se propôs a avaliar, por meio de diagnóstico molecular, a ocorrência do fator V de Leiden em pacientes infartados. No presente, não foi estabelecida uma correlação genética significativa entre a presença da mutação no gene fator V e o fenótipo infartado. Esse resultado se opôs aos estudos de Holm et al. (1994) e de Baranovskaya et al. (1998). O primeiro estabeleceu uma correlação significativa entre os fatores envolvidos ao analisar um "pedigree" de uma paciente infartada e observar a co-segregação do fator V de Leiden nesta família e os casos de infarto, o segundo encontrou uma correlação positiva, entre esses dois fatores, ao analisar amostras de DNA de 287 indivíduos, tendo a idade como um fator de risco para a ocorrência de infarto do miocárdio em portadores do fator V de Leiden.

Um possível fato que, talvez tenha contribuído para essa discordância é a baixa frequência da mutação do gene fator V de Leiden em populações sem uma considerável mistura caucasiana. No estudo foi analisada uma população cuja frequência do alelo, possivelmente, é baixa devido à miscigenação envolvida. Arruda et al. (1995) relatou que a frequência alélica da mutação em brasileiros de uma região de indivíduos, predominantemente, de origem caucasiana foi de 2%, enquanto, entre brasileiros negros a frequência encontrada foi de 0,35% e entre 83 indígenas da Amazônia nenhuma mutação foi detectada.

Assim, embora possa ocorrer uma correlação entre a presença do fator V de Leiden e o infarto do miocárdio, esta não foi verificada em virtude da amostragem, visto que, foram analisados pacientes ao acaso sem levar-se em conta suas histórias familiares; e quando têm um alelo mutante com baixa frequência e deseja-se relacioná-lo a outros fatores é necessário

que se estabeleça estudos de pedigrees para melhor conhecer sua segregação na população em geral.

Outro fato, é o tamanho da amostragem. A análise de 57 indivíduos, 36 infartados e 21 saudáveis; possivelmente, devido à baixa frequência do alelo fator V de Leiden em algumas populações, especialmente na americana, não ofereceu uma amostragem significativa para que pudéssemos estabelecer estatisticamente uma correlação genética, de comprovada veracidade, entre o fator V de Leiden e o infarto do miocárdio.

Ress et al. (1995) demonstrou em seu trabalho a frequência do fator V de Leiden na população mundial (tabela 1). No presente estudo as frequências gênicas do alelo na população foram coincidentes com os resultados apresentados por esse autor, confirmando que a ocorrência desta mutação na população em estudo, brasileira, varia de acordo com a mistura étnica que se estabelece em cada região, em virtude da colonização européia e da mão-de-obra africana que juntamente com a população nativa contribuíram para a formação dessa variabilidade genética e oscilação gênica nas diversas regiões.

Portanto, faz-se necessário que estudos adicionais sejam realizados, em particular, levando-se em consideração a etnia da população em estudo e a história familiar dos indivíduos envolvidos. Desta forma, levar-se-à em consideração a evolução dessa mutação ao longo do tempo e sua distribuição geográfica em relação ao meio ambiente e aos fatores ditos artefatos da vida moderna.

6-Referências Bibliográficas

Alhene - Gelas M., Gandrill S., Aubry ML., Emmerich J., Fiessinger J.N., Aiach M.:
Unexplained Thrombosis and Factor V Leiden Mutation. Lancet 1994;344:555.

Allaart cF., Briët E.: Familial venous Thrombophilia, in Bloom AL, Zorbes CD, Tomas D.P,
Tuddenham EGD (eds): **Haemostasis and Thrombosis**, Edinburg, UK, Churchill
Livingstone, 1994, p. 1349.

Arruda V.R, Annichino - Bizzachi JM, Acosta FF, Reitsma P.H. **Factor V Leiden (FVQ 506)
is Commom in a Brazilian Population.** Am.J Haematol. 1995;49:242-243

Baranovskaya S. ,Kudinov S. ,Fomicheva E. ,*et al.*:**Age as a risk factor for myocardial
infarction in Leiden mutation carriers.** Mol. Genet. Metab.1998;64(2):155-7.

Bertina R.M., Koeleman BPC, Koster T., Rosendaal FR., Dirven RJ, de Ronde H., Vander
Velden PA, Reistsma PH: **Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated With
Resistance to Activated Protein C.** Nature 1994: 369:64-67.

- Bertina R.M., Rosendaal, F.R.; **Venous Thrombosis - Interaction of Genes and Environment.** IV. N.Eng. J. Med. 1998;338:1840.
- Beufé S., Borg J - Y, Vasse M, Charbonnier F., MoreauV, et al: **Cosegregation of Thrombosis With the Factor V Q506 in Anextended Family With Resistance to Activated Protein C.** Br J Haematol 1995;89:659-662.
- Comp P., Esmon C.: **Recurrent Venous Thromboembolism in Pacients With a Partial Deficiency of Protein S.** N. Engl. J Med 1984;311:1525.
- Dahlbäck B., Carlsson M., Svensson PJ.: **Familial Thrombophilia Due to a Previously Unrecognized Mechanism Characterized by Poor Anticoagulant Response to Activated Protein C.** Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:1004-1008.
- Dahlbäck B.: **Inherited Thrombophilia: Resistance to Activated Protein C as a Pathogenic Factor of Venous Thromboembolism.** Blood 1995a;85:607-614
- Dahlbäck B.: **Resistance to Activated Protein C, the Arg to Gln Mutation in the Factor V Gene and Venous Thrombosis.** Tromb Haemost 1995 b; 73:739-742.
- Davie EW., Fryikawa K., Kisiek W.: **The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation.** Biochemistry 1991;30:10363.
- De Stefano V, Zinazzi G, Mannucci PM.: **Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes and Management.** Blood 1996;87:3531-3544.
- Egeberg O. **Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia.** Tromb. Diath Haemorrh 1965;13:516.
- Esmon CT.: **The Roles of Protein C and Trombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation** J. Biol Chem 1989;264:4743.
- Esmon CT.: **Molecular Events That Control the Protein C Anticoagulant Pathway.** Tromb. Haemost 1993 a;70:29.

Esmon CT.: **Cell Mediated Events That Control Blood Coagulation and Vascular Injury.**
Annu Ver Cell Biol 1993 b:9:1.

Fay P.J, **Factor VIII Struture and Function.** Tromb Haemost 1993:70:63.

Furie B., Furie BC.: **The Molecular Basis of Blood Coagulation.** Cell 1988:53:505.

Garcia-Gala J. M., Alvarez V., Pinto C. R., *et al.*: **Factor V de Leiden (R 506 Q) and Risk of Venous Thromboembolism: a case-controlle study based on the Spanish population.**
Clin.Genet. 1997:52:206-210.

Goldhaber SZ.: **Epidemiology of Pulmonary Embolism and Deep Vein Thrombosis, in**
Bloom AL, Zorbes CD, Thomas DP. Tuddenhamm EGD (eds): Haemostasis and
Thrombosis. Edinburg, UK, Churchill Livinstone, 1994, p.1327.

Greengard J.S; Sin X., Xu X.; Fernandez J.A; Griffin J.H.; Evatt B.; **Activated Protein C Resistance Caused by Arg 506 Gln Mutation in Fator Va** Lancet 1994:343:1362

GriffinJ., Evatt B., Zimmermam T., Kleiss Wideman C: **Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease.** J Clin Invest 1981:68:1370.

Griffin J.H, Evatt B., Wideman C., Fernandez J.A: **Anticoagulant Protein C Pathway Defective in Majority of Thrombophilic Patients.** Blood 1993:82:1989.

Hijboer H., Brandjes D, Büller H.R., Sturk A., tem Cate JW: **Deficiencies of Coagulation-Inhibiting and Fibrinolytic Protein in Outpatientes with Deep-Vein Thrombosis.** N. Engl J. Med 1990: 323:323:1512.

Holm J., Zöller B., Svensson P.J., et al.: **Myocardial Infarction Associated with Homozygous Resistance to Activated Protein C.** Lancet 1994:344:952-953.

Jeff, P.G; Akemi, J.Y.; Wayne, W.G.: **Prevalence of the Factor V - Leiden Mutation in Four Distinct American Ethnic Populations.** Am. J. Med Genet. 1997:73:334-336.

Jenny R. J., Iracy P. B., Mann K.G.: **The Physiology and Biochemistry of Factor V**, in Bloom A. L., Zoobes C. D., Thomas D. P., Tuddenham EGD (eds): **Haemostasis and Thrombosis**. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone 1994, p.465.

Kalifatis M; Mann K.G: **Role of the Membrane in the Inactivation of Factor Va by Activated Protein C** - J Biol Chem 1993;268:2724-6.

Kane W.H., Davie EW.: **Blood Coagulation Factors V and VIII: Structural and Functional Similarities and Their Relationship to Hemorrhagic and Thrombotic Disorders**. Blood 1988;71:539.

Majerus, P.W.: **Bad Blood by Mutation**. Nature 1994;369:14

Maruya, E. Saji, H., and Yokoyama, S.: **PCR - LSS (Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism) A Simple Method for High Resolution Allele Typing of HLA, - DRB₁ -DQB₁, and DPB₁** - Genome Research 1996 (6) 51:57.

Miletich, J.P, Prescott SM; White R.; Majerus P.W., Bovill EG: **Inherited Predisposition to Thrombosis**. Cell 1993;72:477.

Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: **Proteínas Plasmáticas, Imunoglobulinas & Fatores da Coagulação** in: Harper: Bioquímica. 7ª ed., Editora Ateneu São Paulo-S.P., 1994.

Nemerson Y.: **Tissue Factor and Hemostasis** Blood, 1988;71:1.

Ress, D.C; Cox, M; Clegg, J.B.: **World Distribution of Factor V Leiden**. Lancet 1995;346: 1133-34.

Rosendaal FR., Koster T, Vandenbroucke JP., Reitsma PH.: **High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance)**. Blood, 1995;85:1504-1508.

- Rosendaal F.R., **Risk Factors for Venous Thrombosis: Prevalence, Risk and Interaction.** Semin Hematol 1997; 34:171-87.
- Schwarz HP., Fisher M.m Hopmeier P. et al.: **Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease.** Blood, 1984;64:1297.
- Shen L., Dahlbäck B.: **Factor V and Protein S as Synergistic Cofactors to Activated Protein C in Degradation of Factor VIIIa.** J. Biol Chem, 1994;269:18735.
- Svensson PJ., Dahlbäck B.: **Resistance to Activated Protein C as a Basis for Venous Thrombosis.** N. Engl. J. Med, 1994;330:517.
- Taberner M.D., Tomas J.F., Alberca I., Orfao, et al.: **Incidence and Clinical Characteristics of Hereditary Disorders Associated with Venous Thrombosis.** Am J. Hamatol, 1991;36:249.
- Voorberg J.F, Roelse J., Koopman R., et al.: **Association of Idiopathic Venous Thromboembolism with Single-Point Mutation at Arg 506 of Factor V.** Lancet. 1994;343:1535
- Walker F.J; Zay P.J.: **Regulation of Blood Coagulation by the Protein C System.** FASEB J. 6:2561, 1992.
- Zöller B., Svensson P. J., He X., Dahlbäck B.: **Identification of the Same Gene Mutation in 47 out of 50 Thrombosis Prone Families with Inherited Resistance to Activated protein C.** J. Clin. Invest. 1994;94:2521-2524.