

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Casuística

3.1.1 - Seleção dos participantes do estudo

Após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG (parecer ETIC 070/04), os pacientes participantes do estudo foram encaminhados pelos médicos Daniel Dias Ribeiro e Patrícia Santos Resende Cardoso, hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para a coleta de amostra biológica. Foi preenchida uma ficha clínica (apêndice 1) para cada paciente, após os mesmos terem sido esclarecidos acerca dos objetivos do estudo e após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 2).

3.1.2 - Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo somente pacientes com diagnóstico de trombose arterial periférica ou cerebral, confirmado por *duplex scan*, cintilografia ou ressonância magnética nuclear (RMN). Os pacientes foram incluídos seqüencialmente no estudo, independente de sexo, idade, local de ocorrência do evento trombótico e recorrência.

3.1.3 - Critérios de exclusão

Pacientes com história de trombose venosa ou embolismo pulmonar, como primeiro evento trombótico não foram incluídos, bem como aqueles com doença arterial coronariana, definido por história de evento prévio ou pela presença de estenose em análise de angiografia coronariana. A presença de estenose foi confirmada, conforme mencionado acima, por angiografia coronariana de acordo com a definição de estenose padrão, ou seja, até 30%, ateromatose leve, 30 a 69%, ateromatose moderada e acima de 70% ateromatose grave. Ainda, foram excluídos pacientes com idade abaixo de 8 e acima de 60 anos, hemoglobinúria paroxística noturna, câncer, doenças hepáticas, infecciosas, auto-imunes e mieloproliferativas, pacientes com imobilização prolongada e submetidos a cirurgia recente.

3.2 - Planejamento experimental

As fichas clínicas de cada paciente foram avaliadas para a caracterização dos seguintes parâmetros: idade, sexo, local de ocorrência do evento trombótico, história familiar de trombose, presença de fatores adquiridos associados à trombose arterial como tabagismo, obesidade, dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensão. Para tal levantamento foram considerados os parâmetros a seguir:

O índice de massa corporal foi calculado pelo peso em quilogramas dividido pela altura ao quadrado. A pressão sistólica e diastólica foi medida no braço direito com o paciente sentado. Pacientes com relato de hipertensão, sob terapia anti-hipertensiva e/ou pressão observada de 160/90 mmHg em repouso, foram definidos como hipertensos. Os pacientes foram classificados como diabéticos, se a glicose plasmática foi superior a 126 mg/dL em jejum, ou se estavam sob terapia hipoglicemiante ou em uso de insulina. O paciente foi considerado tabagista se fumava diariamente 1 cigarro. Todos os participantes apresentavam níveis de triglicérides abaixo de 400 mg/dL. Nenhum dos pacientes estavam em uso de estatinas, mas alguns, 23 (11 homens e 12 mulheres) usavam aspirina regularmente, enquanto 6 (3 homens e 3 mulheres) estavam sob uso de Marevan.

3.3 - Amostras biológicas

Foram coletadas, de cada paciente, após jejum de 12 a 14 horas, amostras de 15 mL de sangue venoso em tubos do sistema Vacutainer (Becton Dickinson), sendo 5 mL em citrato de sódio, 5 mL em EDTA e 5 mL em tubo sem anticoagulante. A amostra obtida em citrato foi centrifugada a 1100 g durante 15 minutos, para obtenção das amostras de plasma pobre em plaquetas, que foi dividido em alíquotas (8 alíquotas de 300µL) e armazenado em freezer à - 70º C, até o momento do uso. A amostra obtida em EDTA foi utilizada para a extração de DNA. A amostra obtida em tubo sem anticoagulante foi centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, que foi utilizado nas determinações do perfil lipídico e apolipoproteico.

3.4 - Métodos

3.4.1 - Extração de DNA

O DNA dos leucócitos foi extraído utilizando-se o conjunto de reagentes “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. A um volume de 900µL de solução de lise de hemácias em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL foram adicionados 300µL de sangue total colhido em EDTA e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a lise das hemácias a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 60 segundos à temperatura ambiente em microcentrífuga FANEN. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi solubilizado com 300µL de solução de lise nuclear e homogeneizado cuidadosamente. Nesta etapa foram adicionados 100µL de solução de precipitação de proteínas, sendo a solução misturada no vórtex por 20 a 30 segundos e centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido

para outro tubo tipo *ependorf* contendo 300µL de isopropanol e homogeneizado para que ocorresse a precipitação do DNA. Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Logo após, foram adicionados 300µL de etanol a 70%, invertendo-se o tubo várias vezes. Novamente a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante desprezado. Finalmente, foram adicionados 50µL de solução de hidratação (Tris 10mM/EDTA 0,1 mM). Após este procedimento, as amostras foram armazenadas no freezer a - 20° C para posterior pesquisa das mutações.

3.4.2 - Investigação das mutações/polimorfismos nos genes do fator V (fator V Leiden-G1691A), da protrombina (G20210A) e da MTHFR (C677T), apolipoproteína E (ApoE), inibidor do ativador de plasminogênio tecidual (PAI-1) e sistema ABO.

3.4.2.1 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A investigação das mutações nos genes do fator V (G1691A), da protrombina (G20210A), MTHFR (C677T) e ApoE, foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de digestão com endonucleases de restrição para análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Os protocolos utilizados para as reações de PCR-RFLP para o FVL, a mutação nos genes da protrombina e da MTHFR foram otimizados previamente no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG (GODOI, 2002). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen®, cujas seqüências (quadro 2) foram descritas por HUBER et al. (2000), para detecção das mutações G1691A (FV) e G20210A (protrombina), FROOST et al. (1995), para detecção da mutação C677T (MTHFR) e TSUKAMOTO et al. (1992) e SOUZA et al. (2005) para detecção do polimorfismo no gene da ApoE. Os protocolos para a detecção dos polimorfismos na região promotora do gene do PAI-1 foram otimizados em nosso laboratório, utilizando-se a técnica da PCR alelo específica para o polimorfismo 4G/5G e PCR-RFLP para G844A, sendo utilizados oligonucleotídeos descritos por MANSFIELD, et al. (1995) e MORANGE, et al. (2000). A investigação dos polimorfismos do sistema ABO foi feita por meio da amplificação dos exons 6 e 7 do gene ABO, separadamente pelo método da PCR-RFLP. Os fragmentos de DNA amplificados foram digeridos com as enzimas *KpnI* ou *MspI* em uma reação única. Este método permitiu a diferenciação dos alelos A¹, A², B, O¹ e O² (OLSSON et al., 1995).

O gene ABO codifica as glicosiltransferases responsáveis pela conversão da substância H em antígenos A e B. Os exons 6 e 7 codificam 77% da proteína

(glicosiltransferase) e 91% do domínio catalítico das mesmas, enquanto os exons 1,2,3,4 e 5 codificam a parte amino terminal, uma região transmembrana e 9% do domínio catalítico das glicosiltransferases. Dessa forma, os polimorfismos do gene ABO podem ser estudados, quase que exclusivamente nos exons 6 e 7 (YAMAMOTO et al., 1995; SELTSAM et al., 2003; ROUBINET et al., 2004). Foram utilizados os oligonucleotídeos sintetizados pela Invitrogen®, cujas seqüências (quadro 2) foram descritas por OLSSON et al. (1995).

Nas reações de PCR, foram utilizados desoxirribonucleotídeos fornecidos pela GIBCO BRL®, tampão (15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de Triton-100) e Taq polimerase fornecida pela Phoneutria®.

Quadro 2 - Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa das mutações/polimorfismos

Mutação	Oligonucleotídeos senso	Oligonucleotídeos anti-senso
PT	5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3'	5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C-3'
MTHFR	5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'	5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'
FVL	5'-TCAGGCAGGAACAACACCAT-3'	5'-GGTTACTTCAAGGACAAAATACCTGTAAAGCT-3'.
ApoE	5'- GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC-3'	5'- CTCAGCGC CATCCGCGAGCGCC-3
PAI-1 G844A	5'- CAGGCTCCCACTGATTCTAC-3'	5'- AGGGCTCTCTTGTGTCAAC-3
PAI-1 4G/5G	5'- AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT-3	5'- TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3'
PAI-1 4G	5'- GTCTGGACACGTGGGGA-3'	
PAI-1 5G	5' - GTCTGGACACGTGGGGG-3'	
ABO – exons 6	5'CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCCTGCCA3'	5'CGGAATTCACCTGCCACTGCCTGGGTCTC3'
ABO – exon 7	5' CGGGATCCCCGTCCGCCTGCCTTGACAG 3'	5' GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC 3'

PT- Protrombina; MTHFR- Metilenotetrahidrofolato redutase; FVL- Fator V Leiden; ApoE- Apolipoproteína E; PAI- inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1, ABO – sistema sanguíneo ABO

As concentrações dos reagentes empregados na reação de PCR encontram-se descritas nos quadros 3 e 4.

Quadro 3 - Concentrações dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (GODOI, 2002)

Fragmento do gene a ser amplificado - MTHFR, PT, FVL, APOE e PAI-1		
Reagente	Estoque	Concentrações de uso
MgCl ₂	15mM	1,5mM
dNTPs	2 mM	0,2 mM
Oligonucleotídeo senso	10 µM	1,0 µM
Oligonucleotídeo anti-senso	10 µM	1,0 µM
Taq polimerase	5u/ µL (unidades)	1u/ µL
DNA ¹	100ng/µL(media)	20µg
Água q.s.p		20 µL

PT - protrombina; MTHFR - metilenotetrahidrofolato redutase; FVL- fator V Leiden; q.s.p- quantidade suficiente para; 1 - Não foi realizada quantificação espectrofotométrica para todos os DNAs, portanto as quantidades mencionadas correspondem a estimativas.

Quadro 4 - Concentrações dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase para o sistema ABO (PAIVA, 2008)

Reagente	Fragmento do gene a ser amplificado	
	Exon 6	Exon 7
MgCl ₂ ¹	1,5 mM	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Oligonucleotídeos senso	1,5 µM	0,3 µM
Oligonucleotídeos anti-senso	1,5 µM	0,3 µM
Taq polimerase	0,5 u/ µL	0,75 u/ µL
DNA ²	100,0 ng/µL	100 ng/µL
Água q.s.p	16,0 µL	15 µL

q.s.p- quantidade suficiente para, 1- Foi utilizado tampão 10 vezes concentrado fornecido pela Phoneutria, 2 - Não foi realizada quantificação espectrofotométrica para todas as amostras de DNAs, portanto as quantidades mencionadas correspondem a estimativas.

As condições de amplificação dos genes pesquisados, bem como o perfil esperado após digestão enzimática ou PCR-alelo específica são apresentadas nos quadros 5, 6, 7, 8 e 9.

Quadro 5 – Condições de temperatura das reações de PCR

Fragmentos dos genes a serem amplificados				
Etapas	ApoE	PT	MTHFR	FVL
Desnaturação inicial	95°C - 10 min	95°C - 10 min	94°C - 3 min	95°C - 10 min
Desnaturação	94°C - 1 min	94°C - 1 min	94°C - 1 min	94°C - 1 min
Anelamento	68°C - 1 min	57°C - 1 min	64°C - 30 seg	55°C - 1 min
Extensão	72°C - 1 min	72°C - 1 min	72°C - 1 min	72°C - 1 min
Nº de ciclos	40 ciclos	40 ciclos	35 ciclos	40 ciclos
Extensão final	72°C - 5 min	72°C - 5 min	72°C - 5 min	72°C - 5 min

ApoE - apolipoproteína E; PT- protrombina; MTHFR- metilenotetrahidrofolato redutase; FVL- fator V Leiden

Quadro 6 – Condições das reações de PCR para os polimorfismos de PAI-1

Fragmento do gene a ser amplificado				
Etapas	PAI-1 (G844A)		PAI-1 (4G/5G)	
Desnaturação inicial	95° - 5 min	95° - 5 min	95° - 5 min	95° - 5 min
Desnaturação	95° - 30 seg	95° - 30 seg	95° - 1 min	95° - 1 min
Anelamento	62° - 1 min	53° - 1 min	59° - 1 min	52° - 1 min
Extensão	72° - 1 min	72° - 1 min	72° - 1 min	72° - 1 min
Nº de ciclos	15 ciclos	15 ciclos	15 ciclos	20 ciclos
Extensão final	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min

Quadro 7 - Condições de temperatura das reações de PCR para o sistema ABO

Fragmentos do gene a ser amplificado		
Etapas	Exons 6	Exon 7
Desnaturação inicial	94°C – 2 min	94°C – 2 min
Desnaturação	94°C – 10 seg	94°C – 10 seg
Anelamento	62°C – 30 seg	62°C – 30 seg
Extensão	72°C – 30 seg	72°C – 30 seg
Nº de ciclos	40 ciclos	40 ciclos

