

Rita Karina Santana

Associação da mutação G1691A (fator V de Leiden) no gene do fator V da coagulação, da mutação G20210A no gene da protrombina e das mutações C677T e G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase com a doença arterial coronariana.

Araraquara - SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rita Karina Santana

Associação da mutação G1691A (fator V de Leiden) no gene do fator V da coagulação, da mutação G20210A no gene da protrombina e das mutações C677T e G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase com a doença arterial coronariana.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do Grau de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

Araraquara - SP

2008

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

(Membro Titular)

Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy

(Membro Titular)

Prof. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos

(Membro Titular)

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

(Membro Titular)

Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite

(Membro Suplente)

Prof. Dra. Ana Maria de Souza

(Membro Suplente)

Prof. Dr. Evandro José Cesarino

(Membro Suplente)

Araraquara – SP

2008

Não se pode ensinar
tudo a alguém, pode-se apenas
ajudá-lo a encontrar por si
mesmo.

Galileu Galilei

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Domingos e a minha mãe Sonia, por dedicarem seu presente na realização do meu sonho, fazendo deste parte dos seus.

Ao meu marido Rodrigo, por todo amor, companheirismo e incentivo dedicados a mim em todos momentos.

Aos meus irmãos Eduardo e Alexandre, por respeitarem os meus objetivos, apoiando-me em cada passo conquistado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu o dom da vida e que a todo momento, me dá a certeza de Sua presença em minha vida.

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho e apoio.

Ao meu orientador professor Doutor Haroldo Wilson Moreira, pela amizade, confiança e preciosos ensinamentos que ajudaram na realização desta tese e no meu crescimento profissional.

À Comissão Examinadora pelas sugestões fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Doutor Luiz Carlos de Mattos pela disponibilidade e valiosas contribuições para a realização deste estudo.

Ao professor Doutor Moacir Fernandes de Godoy e a toda sua equipe pelo fornecimento das amostras analisadas neste trabalho.

Aos professores, alunos e funcionários dos Laboratórios de Micologia, Imunologia e Citologia pelo auxílio e por permitirem a utilização de vários equipamentos.

À seção de Pós-Graduação e a Biblioteca pelo auxílio prestado na realização deste estudo.

À Cristina pela confecção do abstract.

Aos alunos da Pós-Graduação em especial a Pâmela, Ana Paula, Roberta, Beth, Tarcia, Isabel e Débora pela amizade e incentivo.

Ao Max e a Rose por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e divertido.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese meu sincero muito obrigada.

RESUMO

A doença arterial coronariana representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade das populações, principalmente naquelas que habitam regiões desenvolvidas. Os considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença são bastante conhecidos e analisados, sendo verificada uma importância cada vez maior com relação aos riscos genéticos e a verificação da associação de sistemas polimórficos humanos com a propensão a desenvolver uma determinada doença. A partir desses estudos foi possível imaginar a ocorrência dos denominados marcadores genéticos, onde os autores realizam uma tentativa com vistas às possibilidades de correlacionar esses marcadores com a doença analisada. Foi propósito do presente trabalho estabelecer e verificar a validade para o nosso laboratório de uma metodologia molecular capaz de caracterizar a mutação G1691A no gene do fator V da coagulação, a mutação G20210A no gene da protrombina e as mutações C677T e G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase. Com essa possibilidade, verificar e correlacionar as freqüências dessas mutações em portadores de doença arterial coronariana, de não portadores de doença arterial coronariana e em doadores de sangue em uma parcela da população paulista. Para tanto foram estabelecidos três grupos de estudo constituídos por moradores da região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sendo dois deles classificados por cinecoronariografia como portadores de doença arterial coronariana e como não portadores de doença arterial coronariana, enquanto um terceiro grupo foi constituído por doadores de sangue da mesma região. A idade dos pacientes variava dos 36 aos 84 anos de idade, enquanto a do terceiro grupo variava dos 18 aos 55 anos de idade.

O DNA genômico foi extraído com Kit da Amersham Pharmacia Biotech, sendo a caracterização dos alelos envolvidos nas mutações G1691A (fator V de Leiden), G20210A da protrombina, C677T e G1793A da MTHFR determinadas por amplificação gênica, seguidas da atuação de enzima de restrição em conformidade com protocolo estabelecido. Os resultados permitiram concluir que as frequências gênicas observadas para as mutações G1691A do fator V, G20210 da protrombina e C677T da MTHFR não têm influência no estabelecimento da DAC e que uma associação entre essas mutações e a DAC não pode ser estabelecida. Por sua vez as frequências gênicas para a mutação G1793A da MTHFR permitem caracterizar uma associação modesta entre os portadores dessa mutação, quer sejam portadores ou não portadores de DAC, com o aparecimento da DAC. Fica clara a quase inexistência de correlações entre os sistemas polimórficos analisados no presente trabalho e o estabelecimento da doença arterial coronariana para uma amostra da população paulista.

ABSTRACT

The coronary artery disease is a major cause of morbidity and mortality of people, especially those who inhabit the developed regions. The considered risk factors for the development of this disease are quite known and analyzed, being observed an increasingly regard to the risks of genetic and a verification of human polymorphic systems' association to the propensity to develop a particular disease. From these studies it was possible to imagine the occurrence of so-called genetic markers, where the authors hold an attempt to view the possibilities of these markers be correlated to the disease examined.

The purpose of this work was to establish and verify the validity of a molecular methodology capable of characterizing the mutation in G1691A in the gene of the clotting factor V, the mutation in the gene G20210A prothrombin and of the mutations in the gene C677T and G1793A of methylene-tetrahydrofolate reductase. With this option, check and correlate the frequency of these mutations in individuals with coronary artery disease, in non individuals with coronary artery disease and in blood donors in a share of the Paulista population. Hence, three groups of study were established, consisting in residents of the region of Sao Jose do Rio Preto, São Paulo, two of them classified by coronary angiography as bearers of coronary artery disease and non bearers individuals with coronary artery disease, while a third group was set by donors of blood in the same region. The patients' ages ranged from 36 to 84 years old, while the third group ranged from 18 to 55 years old. The genomic DNA was extracted with Amersham Pharmacia Biotech's Kit, and the characterization of alleles involved in the change G1691A (factor V Leiden), the prothrombin G20210A, and G1793A of MTHFR C677T determined by gene amplification, followed by the performance of restriction enzyme, in accordance with established protocol.

The results showed that the gene frequencies observed for the change of factor V G1691A, G20210 of prothrombin and the MTHFR C677T have no influence on the establishment of DAC and that an association between these mutations and DAC can not be established. Therefore the genetic frequencies for G1793A mutation of MTHFR make it possible to define a modest association between the mutation carriers, whether individuals or not holders of DAC, with the emergence of DAC. It is clear the almost no correlation between the systems polymorphic analyzed in this work and the establishment of coronary artery disease for a sample population of Sao Paulo.

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract	11
Lista de figuras	14
Lista de tabelas	16
Introdução	19
Objetivos	27
Casuística	28
Metodologia	30
Resultados	40
Discussão	59
Conclusões	73
Referências bibliográficas	74
Apêndices	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do metabolismo do folato em relação à metilação e síntese do DNA 25
- Figura 2.** Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Mnl I para a mutação G1691A do gene do fator V da coagulação 34
- Figura 3.** Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Hind III para a mutação G20210A do gene da protrombina 35
- Figura 4.** Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Hinf I para a mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase 37
- Figura 5.** Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a BsrB I para a mutação G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase 38
- Figura 6.** Produto da restrição enzimática da Mnl I para a mutação G1691A no gene do fator V da coagulação 41

- Figura 7.** Produto da restrição enzimática da Hind III para a mutação G20210A no gene da protrombina 46
- Figura 8.** Produto da restrição enzimática do Hinf I para a mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase 48
- Figura 9.** Produto da restrição enzimática da BsrB I para a mutação G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos genótipos da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto - SP 44
- Tabela 2.** Frequências dos alelos G e A com relação à mutação G1691A no gene do fator V da coagulação nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue 44
- Tabela 3.** Distribuição dos genótipos da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo masculino da região de São José do Rio Preto - SP 45
- Tabela 4.** Distribuição dos genótipos da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo feminino da região de São José do Rio Preto - SP 45
- Tabela 5.** Distribuição dos genótipos da mutação C677T do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto – SP 51

Tabela 6. Frequências dos alelos C e T com relação à mutação C677T no gene da MTHFR nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue	51
Tabela 7. Distribuição dos genótipos da mutação C677T do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo masculino da região de São José do Rio Preto - SP	52
Tabela 8. Distribuição dos genótipos da mutação C677T do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo feminino da região de São José do Rio Preto - SP	52
Tabela 9. Distribuição dos genótipos da mutação G1793A do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto - SP	56
Tabela 10. Frequências dos alelos G e A com relação à mutação G1793A no gene da MTHFR nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue	56
Tabela 11. Distribuição dos genótipos da mutação G1793A do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo masculino da região de São José do Rio Preto - SP	57

- Tabela 12.** Distribuição dos genótipos da mutação G1793A do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo feminino da região de São José do Rio Preto - SP 57
- Tabela 13.** Prevalência da soma dos heterozigotos e homozigotos mutantes observadas nos indivíduos analisados 58

INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, acometendo principalmente os indivíduos na faixa etária mais produtiva. Assim sendo, representa um importante problema de saúde pública que se torna mais expressivo se considerarmos os custos elevados necessários para a manutenção do atendimento emergencial, tratamentos terapêuticos e cirúrgicos dos portadores (Lotufo & Lolio, 1994; Cecil, 2001).

A DAC é uma doença caracterizada principalmente por um acúmulo de depósito de gordura nas células que revestem a parede de uma artéria coronária, com a possibilidade de obstruir o fluxo sanguíneo. Esses depósitos são formados de forma gradual nos grandes ramos das artérias coronárias principais, que circundam o coração e que são os responsáveis pelo provimento de sangue e conseqüentemente pela oxigenação do músculo cardíaco. Esse processo gradual de depósito de gordura é denominado aterosclerose e o estabelecimento do acúmulo de gordura, ateromas ou placas. À medida que a obstrução de uma artéria coronariana evolui e se agrava, pode ocorrer uma irrigação inadequada de sangue ao coração, denominada de isquemia e com a possibilidade de lesão cardíaca. A DAC representa a causa mais comum de isquemia do miocárdio, sendo as principais complicações representadas pela angina *pectoris* e pelo infarto do miocárdio (Cecil, 2001; Gaziano, 2003).

A angina é representada por uma dor torácica transitória ou por uma sensação de pressão que ocorre quando o coração não recebe oxigênio de forma suficiente; sendo que, por sua vez, o infarto do miocárdio é considerado uma emergência médica em que parte do fluxo de sangue para o coração é

reduzido ou interrompido de forma súbita e intensa produzindo morte do músculo cardíaco por falta de oxigênio (Gaziano, 2003).

A DAC é uma moléstia multifatorial causada tanto por defeitos genéticos quanto por defeitos adquiridos, quer sejam intrínsecos ou ambientais envolvidos na patogênese da aterosclerose e suas complicações trombóticas (Marian, 1997; Fletcher & Kessling, 1998).

Estudos epidemiológicos permitiram identificar fatores de risco associados a DAC e a partir desses conhecimentos foi possível utilizá-los, tendo como propósito à prevenção dessa doença. Dessa forma, a caracterização dos fatores de risco convencionais para a DAC está bem estabelecida e compreendem: sexo, idade, antecedentes familiares com história positiva para cardiopatia, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, hiperglicemia, sobrepeso ou obesidade, tabagismo e até mesmo nível sócio econômico (Fletcher & Kessling, 1998; Zak et al., 2003; Walton et al., 2004).

Calcula-se que em 2020 as doenças cardiovasculares serão responsáveis por aproximadamente 25 milhões de morte anualmente e a DAC irá ultrapassar as doenças infecciosas como causa mundial número um de morte e incapacidade (Gaziano, 2003). A DAC apresenta índice de mortalidade mais elevado no sexo masculino com relação ao feminino, mais particularmente na faixa etária de 35 aos 55 anos, sendo que após os 55 anos esse índice é mantido entre os homens, enquanto nas mulheres continua aumentando. Apesar de afetar ambas as raças, essa doença é mais observada entre caucasóides, enquanto que entre os afro-descendentes é mais elevado até os 60 anos para os homens e para as mulheres até os 75 anos. O mais importante desses fatores parece ser o estilo de vida, sendo que uma dieta rica

em gorduras pode permitir o estabelecimento e agravar consideravelmente o aparecimento da DAC (Cheitun & Zipes, 2003; Douglas, 2003).

Além dos riscos convencionais, hoje em dia tem se dado uma importância cada vez maior aos considerados riscos genéticos, sendo que a partir desses estudos foi possível imaginar a ocorrência dos denominados marcadores genéticos, sendo que os autores realizam uma tentativa com vistas às possibilidades de correlacionar esses marcadores com a doença analisada (Pyeritz, 2003).

Esses estudos foram iniciados com o advento da biologia molecular que permitiu analisar seqüências de bases do DNA e suas mutações com a possibilidade de estabelecer correlações entre mutações genéticas hereditárias e uma determinada freqüência aumentada ou não de uma doença. Com relação a DAC alguns locais gênicos já foram analisados, destacando-se entre eles as mutações nos genes do fator V da coagulação, da protrombina e da metilenotetrahidrofolato redutase (Kim & Becker, 2003).

Mesmo assim, a influência desses fatores genéticos na DAC não está clara (Gupta et al., 2003, Pyeritz, 2003) e espera-se que o conhecimento do papel de marcadores genéticos auxilie na explicação das bases moleculares da doença e no melhor planejamento de métodos terapêuticos e preventivos, principalmente em pacientes que sobreviveram ao infarto do miocárdio e não apresentavam nenhum fator de risco convencional (Zak et al., 2003).

Mutação G1691A no gene do fator V da coagulação (fator V de Leiden)

Em 1994, três laboratórios independentes descobriram uma mutação no exon 10 do gene que codifica o fator V da coagulação e que passou a ser denominada fator V de Leiden. Essa resulta na transição de uma guanina para uma adenina no nucleotídeo 1691 nesse gene, realizando a substituição do

aminoácido arginina pela glutamina na posição 506 (Greengard et al., 1994), resultando em falha da proteína C ativada. Essa serina protease tem influência no processo de coagulação através da inativação proteolítica do fator V ativado e do fator VIII ativado, componentes do processo da cascata de coagulação. O fator V ativado é derivado do fator V mediado pela protrombina (fator II ativado). Na presença da mutação, o produto, agora denominado fator V de Leiden, é clivado e inativado de forma insatisfatória, o que faz com que a necessária ativação da protrombina não seja reconhecida, resultando em acúmulo de fator Va com conseqüente processo de coagulação ampliado. Portanto, essa mutação representa uma maior predisposição genética para o risco de trombose venosa em humanos (Hezard et al., 1997; Zivelin et al., 1997). Este defeito está relacionado com mais de 90% dos casos de resistência hereditária a proteína C ativada (Zivelin et al., 1997) pois é inativado dez vezes menos que o fator V (Heeb et al., 1995; Kalafatis et al., 1995; Nicolaes et al., 1995; Rosing et al., 1995).

Os portadores homocigotos para essa mutação (genótipo AA) apresentam risco 50 a 100 vezes maior de desenvolver trombose quando comparados aos não portadores de fator V de Leiden. Por sua vez, os heterocigotos para essa mutação (genótipo GA) apresentam esse risco na ordem de 5 a 10 vezes maior (Rees et al., 1995).

O fator V de Leiden é detectado em cerca de 3 a 5% da população caucasóide da Europa e Estados Unidos e em menos de 1% no sudeste da Ásia, Oriente Médio e África (Rees et al., 1995). A população brasileira apresenta prevalência em caucasóides e, raramente, está presente em afrodescendentes e nativos (Arruda et al., 1996).

Mutação G20210A no gene da protrombina

Um outro fator de risco genético considerado para DAC é a mutação G20210A observada no gene da protrombina. Em 1996, Poort e colaboradores identificaram uma substituição de guanina para adenina na posição 20210 da região 3' não traduzida do gene da protrombina. A presença dessa mutação não altera a estrutura da proteína, mas induz elevação dos níveis plasmáticos de protrombina, com resultado potencial de hipercoagulabilidade e um risco a trombose, aumentada de 2 a 3 vezes (Sykes et al., 2000). O mecanismo pelo qual a mutação promove o aumento dos níveis de protrombina ainda não está completamente definido. Como a mutação G20210A está localizada na extremidade 3' do gene, pode ser que ocorra uma eficiência maior na transcrição ou uma maior estabilidade do RNAm transcrito (Poort et al., 1996).

A protrombina (fator II) é o precursor da enzima trombina ativa (fator IIa), que possui um papel fundamental na regulação do processo de coagulação (dentre eles o processamento do fator V em fator V ativado) (Bertina et al., 1992; Dang et al., 1995; Jackson, 1994). A prevalência para a heterozigose desse polimorfismo tem sido relatada como de 1 a 2%, sendo que esta mutação prevalece entre 1 a 4% na população européia e é considerada rara entre asiáticos e africanos (Rosendaal et al., 1998).

Mutações C677T e G1793A no gene da metilotetrahidrofolato redutase

Além dos fatores genéticos citados, a hiperhomocisteinemia também tem sido responsabilizada como outro fator de risco para doenças cardiovasculares, pois alguns estudos sustentam que mesmo uma pequena elevação nos níveis de homocisteína resulta em aumento na ocorrência dessas doenças (Cecil, 2001).

O excesso de homocisteína pode ser responsável pela formação de homocisteína tiolactona, um intermediário muito reativo e que modifica grupos amino livres da LDL (Low Density Lipoprotein), fazendo com que eles se agreguem e sejam fagocitados por macrófagos. Por outro lado, a homocisteína pode produzir lipoperoxidação e agregação plaquetária resultando em fibrose e calcificação de placas ateroscleróticas (Devlin, 1998).

A elevação da homocisteína no sangue é causada por diversos fatores, tais como a ingestão elevada de metionina, redução do metabolismo, alterações genéticas ou deficiências de enzimas (cistationina β sintetase ou metileno tetrahydrofolato redutase) ou de vitaminas B12, B6 e do ácido fólico, substâncias importantes no metabolismo da homocisteína (Lima et al., 2007).

A homocisteína é metabolizada por duas vias, a remetilação e a transsulfuração, sendo a primeira dependente da enzima metionina sintetase que utiliza como cofator a vitamina B12. O 5-metiltetrahydrofolato é o doador de metil para essa reação e a metiltetrahydrofolato redutase (MTHFR) é um catalizador no processo de remetilação de folato. A 5,10-metilenotetrahydrofolato é reduzida a 5-metilenotetrahydrofolato auxiliada pela 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase, sendo o produto dessa redução a forma predominante do folato e a doadora de carbono para a remetilação da homocisteína para metionina (**Figura 1**). Um excesso de metionina faz com que a homocisteína entre na via da transsulfuração, na qual a mesma reage com a serina em uma reação catalizada pela cistationina sintetase e vitamina B6, gerando cistationina que, hidrolisada, passa para cisteína (Devlin, 1998).

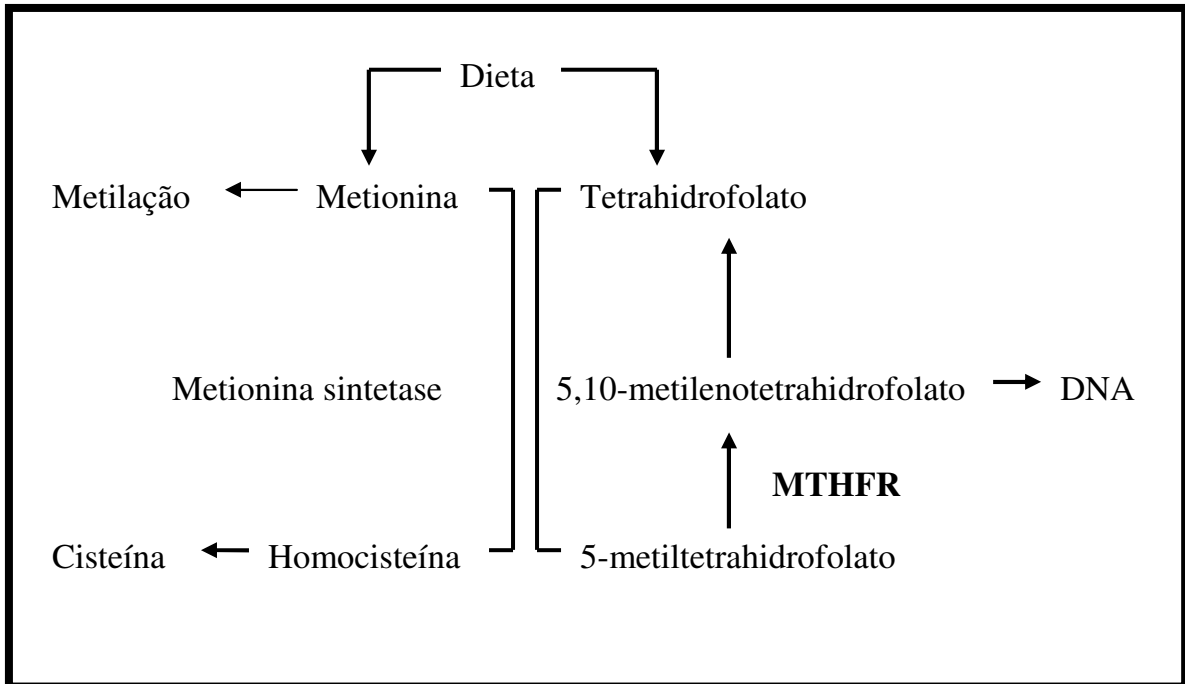


Figura 1. Esquema do metabolismo do folato em relação à metilação e síntese do DNA (Mao et al., 2008).

Mutações no gene da MTHFR podem reduzir a atividade dessa enzima, o que propicia uma metilação inadequada da homocisteína e como consequência uma hiperhomocisteinemia, sendo que esse aumento tem sido associado a complicações vasculares (Brugada & Marian, 1997).

Algumas mutações tem sido reconhecidas no gene da MTHFR, sendo que as mais estudadas são a C677T e a G1793A. Apesar de todas serem reconhecidamente responsáveis por alterarem de formas diversas a concentração de homocisteína plasmática, a mais analisada e mais amplamente correlacionada a DAC é a mutação C677T.

Kang e colaboradores (1988) descreveram uma variante termolábil da MTHFR que promovia um decréscimo da atividade dessa enzima e um pequeno aumento na concentração plasmática da homocisteína. Em 1995, Frosst e colaboradores, descreveram uma mutação que conferia uma termolabilidade a essa enzima diminuindo a sua atividade específica, com consequente aumento da homocisteína, sendo a mesma representada por uma

substituição de citosina para timina no nucleotídeo 677 no gene da MTHFR, promovendo a substituição da alanina para valina na posição 226 do gene. Nesse último estudo foi verificada uma incidência de 35% de heterozigotos CT e 12% de homozigotos TT.

Essa mutação é reconhecida como responsável pela redução da atividade enzimática o que resulta em um aumento aproximado de 3,5 mmol de homocisteína em relação ao genótipo não mutante, conferindo uma hiperhomocisteinemia moderada (Brattström & Wilcken, 2000).

Já na mutação G1793A, descrita por Rady e colaboradores (2002), ocorre uma substituição de guanina por adenina na posição 1793, resultando em alteração da arginina por glutamina. Nesse estudo também foi verificada a presença de heterozigotos em 2,6% de judeus Ashkenazi, 6,2% de afro-americanos, 12,6% de caucasóides e 11,6% de hispânicos. A ausência de maiores estudos relacionados a essa mutação e suas implicações na concentração de homocisteína plasmática faz com que seja controversa a influência ou não desse polimorfismo como possível fator de risco para doenças vasculares.

OBJETIVOS

No presente trabalho pretendeu-se:

Estabelecer e verificar a validade de uma metodologia molecular capaz de caracterizar a mutação G1691A no gene do fator V da coagulação, a mutação G20210A no gene da protrombina e as mutações C677T e G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase.

Verificar as frequências dessas mutações em portadores de doença arterial coronariana, não portadores de doença arterial coronariana e doadores de sangue.

Correlacionar as frequências desses marcadores genéticos nessas populações com o propósito de verificar as distribuições desses polimorfismos e a associação dos mesmos com a suscetibilidade ou resistência em desenvolver doença arterial coronariana em uma parcela da população paulista.

CASUÍSTICA

No presente trabalho foram estabelecidos três grupos de estudo, constituídos por moradores da região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sendo que dois deles foram formados por pacientes que eram indicados a realizarem cateterismo e que ao passarem por cinecoronariografia foram classificados como portadores de doença arterial coronariana e como não portadores de doença arterial coronariana, enquanto um terceiro grupo foi constituído por doadores de sangue.

Os dois primeiros grupos foram estabelecidos por equipe de clínicos cardiologistas intervencionistas responsáveis pelo serviço de hemodinâmica do Hospital de Base da FUNFARME de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, por cinecoronariografia, considerado este um teste padrão ouro que permite verificar a presença ou a ausência da obstrução arterial coronariana. A idade desses pacientes variava dos 36 aos 84 anos de idade.

A presença da DAC foi considerada naqueles indivíduos que apresentaram coronariopatia obstrutiva por comprometimento importante (mais de 70% de obstrução), moderado (obstrução de 50 a 60%) ou discreto (obstrução de 30 a 40%). Os não portadores foram aqueles que no resultado da cinecoronariografia, na sua maioria, não apresentaram qualquer alteração nesse exame, enquanto os restantes, nesse grupo, apresentavam um dos seguintes problemas: função sistólica comprometida, estenose mitral, estenose aórtica ou insuficiência aórtica.

Os indivíduos pertencentes ao terceiro grupo e constituído por doadores de sangue passaram, pelos procedimentos clínicos e laboratoriais característicos do Serviço de Hemoterapia do Hemocentro da Faculdade

Regional de Medicina de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo. A idade destes pacientes variava dos 18 aos 55 anos de idade.

Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, estando protocolado sob o número 0447/2007.

Para a análise da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação foram analisados 101 indivíduos que passaram por cinecoronariografia e 102 doadores de sangue. Dos indivíduos submetidos à cinecoronariografia 76 apresentaram DAC e 25 ausências de DAC. Dos indivíduos com DAC, 49 eram homens e 27 mulheres, enquanto que nos indivíduos sem DAC, 13 eram homens e 12 mulheres. Já nos doadores de sangue, 62 eram homens e 40 mulheres.

Na verificação da mutação G20210A no gene da protrombina foram analisados 105 indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia e 103 doadores de sangue. Dos indivíduos que realizaram a cinecoronariografia, 78 apresentaram DAC e 27 ausências de DAC. Dos indivíduos com DAC, 53 eram homens e 25 mulheres, enquanto que nos indivíduos sem DAC, 13 eram homens e 14 mulheres. Entre os doadores de sangue, 63 eram homens e 40 mulheres.

Para a mutação C677T do gene MTHFR foram analisados 112 indivíduos que passaram por cinecoronariografia e 101 doadores de sangue. Dos indivíduos submetidos à cinecoronariografia, 84 apresentaram DAC e 28 ausências de DAC. Dos indivíduos com DAC, 55 eram homens e 29 mulheres, enquanto que nos indivíduos sem DAC, 13 eram homens e 15 mulheres. Nos doadores de sangue, 65 eram homens e 36 mulheres.

A mutação G1793A do gene MTHFR foi verificada em 101 indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia e 100 doadores de sangue. Dos indivíduos que realizaram a cinecoronariografia, 77 apresentaram

DAC e 24 ausências de DAC. Dos indivíduos com DAC, 51 eram homens e 26 mulheres, enquanto que nos indivíduos sem DAC, 10 eram homens e 14 mulheres. Entre doadores de sangue, 60 eram homens e 40 mulheres.

METODOLOGIA

1. Extração de DNA a partir de sangue periférico

A extração de DNA genômico foi realizada com Kit para extração de DNA da Amersham Pharmacia Biotech (GFXTM Genomic blood DNA purification kit), segundo as orientações do fornecedor descritas a seguir:

Lise de eritrócitos

- Adicionar solução de lise de eritrócitos 3X ao volume da amostra em um micro tubo de 1,5 mL,
- Adicionar 300 µl da amostra de sangue a solução de lise de eritrócitos e misturar por inversão (8 a 10 vezes),
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugar 12000 rpm por 20 segundos para formar o sedimento de glóbulos brancos (*pellet*),
- Remover o sobrenadante (decantação ou aspiração, sem remover o *pellet*).

Extração

- Ressuspender o *pellet* no sobrenadante residual por agitação vigorosa em *vortex*,
- Antes de sedimentar, adicionar 500 µl da solução de extração no *pellet* ressuspendido e misturar no *vortex*,
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente;

- Enquanto incuba, preparar a coluna GFX colocando-a no tubo coletor de 2 ml para a purificação (colocar tampão de eluição para pré-aquecer a 70°C).

Ligação do DNA a matrix da coluna

- Transferir a mistura da extração para a coluna GFX e centrifugar 8000 rpm por 1 minuto,
- Descartar o sobrenadante do tubo coletor e recolocar a coluna GFX dentro dele.

Lavagem

- Adicionar 500 µl de solução de extração na coluna. Centrifugar 8000 rpm por 1 minuto,
- Descartar novamente o sobrenadante do tubo coletor e recolocar a coluna GFX,
- Adicionar 500 µl de solução de lavagem na coluna GFX. Centrifugar 12000 rpm por 3 minutos,
- Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um micro tubo de 1,5 mL (onde ficará o DNA eluído).

Eluição

- Aplicar 100 a 200 µl do tampão de eluição pré-aquecido ou água na coluna GFX, (volumes menores que 50 µl centrifugar 12000 rpm para recuperar o DNA da coluna)
- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto,
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto para recuperar o DNA.

2. Quantificação do material genético

O material genético foi diluído na proporção 1:100 em água Milli-Q (em 495 μL de água Milli-Q foi adicionado 5 μL de DNA), sendo em seguida determinada a densidade ótica em 260 e em 280 nm, usando água Milli-Q para zerar o espectrofotômetro.

A concentração de DNA foi calculada pela fórmula:

$$\text{Concentração da amostra em } \mu\text{g/mL} = \text{DO } 260 \text{ nm} \times 50 \times 100$$

O grau de pureza da amostra foi verificado através da relação DO 260 / DO 280, o que permite verificar a presença de outras proteínas. As amostras de DNA a serem amplificadas pela PCR devem apresentar relação entre 1,7 e 2,0.

3. Verificação da pureza do DNA em gel de agarose

A pureza e a não degradação do DNA foi verificada em eletroforese horizontal realizada em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1X, aplicando-se 10 μL da mistura (8 μL da amostra de DNA e 2 μL de azul de bromofenol) em cada poço do gel. A migração foi realizada aplicando 110 V por aproximadamente 40 minutos.

Após a migração o gel foi corado com solução de brometo de etídio por aproximadamente 20 minutos, sendo as frações visualizadas em transiluminador.

4. Procedimento de amplificação do material genético e tratamento do produto da amplificação para a caracterização das mutações analisadas

4.1. Mutação G1691A no gene do fator V da coagulação

A caracterização da presença da mutação G1691A (fator V de Leiden) foi determinada através da amplificação gênica de um fragmento localizado no exon 10 do gene do fator V utilizando os pares de primers: 5'-TgCCCAgTgCTTAACAAGACCA-3' e 5'-TgTTATCACACTggTgCTAA-3' (Hashimoto et al., 1999).

Nesse procedimento foi utilizado os seguintes parâmetros de reação: uma desnaturação inicial de 1 minuto a 94° C, seguidas por 35 ciclos de 40 segundos de desnaturação a 94° C, 40 segundos de anelamento a 55° C e 40 segundos de extensão a 72° C, com uma extensão final de 72° C por 5 minutos, o que resulta como produto da amplificação um fragmento de 267 pb.

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição Mnl I por 4 horas a 37°C, de acordo com instruções do fornecedor, seguido por eletroforese em gel de agarose a 4%, sendo os produtos evidenciados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador ultravioleta.

O alelo normal foi caracterizado pela presença de bandas de 163, 67 e 37 pb; o alelo homozigoto mutante pela presença de bandas de 200 e 67 pb e o heterozigoto pela associação dessas bandas (Hashimoto et al., 1999) (**Figura 2**).

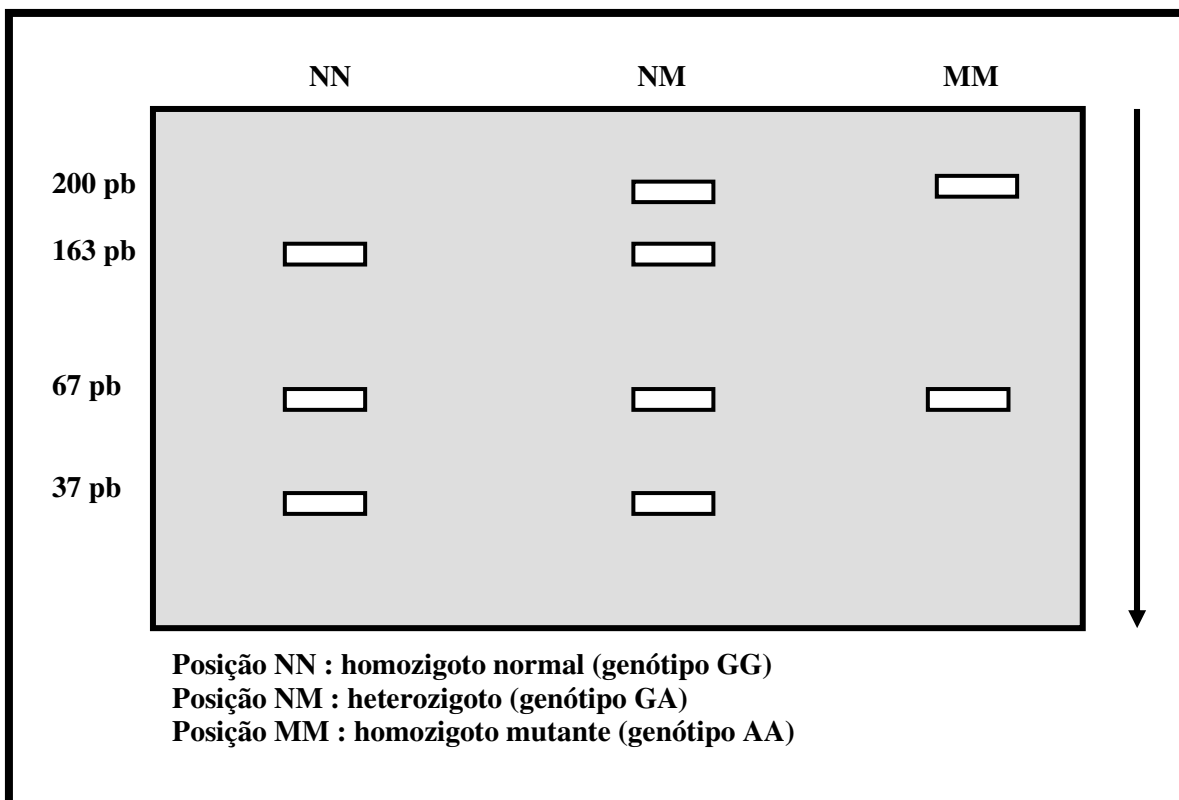


Figura 2. Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Mnl I para a mutação G1691A do gene do fator V da coagulação.

4.2. Mutação G20210A do gene da protrombina

A caracterização da mutação G20210A no gene da protrombina foi determinada por amplificação gênica de um fragmento localizado na região não traduzida 3' UT desse gene utilizando os pares de primers: 5'-TCTAgAAACAgTTgCCTggC-3' e 5'-ATAgCACTgggAgCATTgAAgC-3' (Poort et al., 1996).

Nesse procedimento foi utilizado os seguintes parâmetros de reação: uma desnaturação inicial de 10 minutos a 94° C, seguidas por 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94° C, 1 minuto de anelamento a 57° C e 1 minuto de extensão a 72 ° C, com uma extensão final de 72° C por 5 minutos, resultando em um fragmento de 345 pb.

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição Hind III por 4 horas a 37°C, de acordo com instruções do fornecedor, seguido por eletroforese em gel de agarose a 4%, sendo os produtos obtidos corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador ultravioleta.

O alelo normal foi caracterizado por banda de 345 pb; o alelo homozigoto mutante pela presença de bandas de 322 e 23 pb, sendo o alelo heterozigoto representado pela associação dessas bandas (Poort et al., 1996) (**Figura 3**).

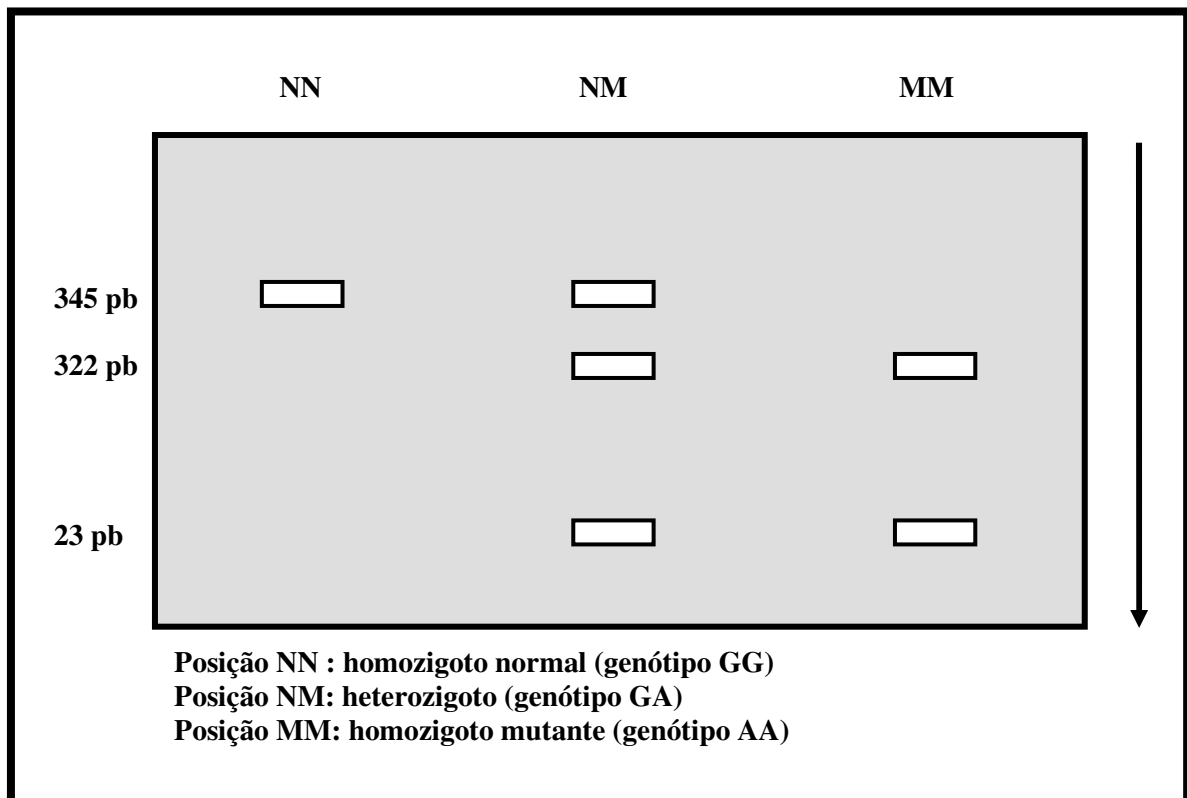


Figura 3. Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Hind III para a mutação G20210A do gene da protrombina.

4.3. Mutações C677T e G1793A do gene da MTHFR

4.3.1. Caracterização da mutação C677T

A presença da mutação C677T foi determinada por amplificação gênica de um fragmento localizado na região do exon 4 do gene da enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) utilizando os pares de primers: 5'-TgAAggAgAAggTgTCTgCgggA-3' e 5'-AggACggTgCggTgA gAgTg-3' (Frosst et al., 1995; Skibola et al., 1999).

Nesse procedimento foi utilizado os seguintes parâmetros de reação: uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95° C, seguidas por 34 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94° C, 1 minuto de anelamento a 56° C e 30 segundos de extensão a 72 ° C, com uma extensão final de 72° C por 3 minutos, resultando em um fragmento de 198 pb.

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição Hinf I por 4 horas a 37°C, de acordo com instruções do fornecedor, seguido por eletroforese em gel de agarose a 4%, evidenciados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador ultravioleta.

O alelo normal foi caracterizado pela presença de banda de 198 pb; o alelo homozigoto mutante por bandas de 175 e 23 pb e o heterozigoto pela associação dessas (Frosst et al., 1995; Skibola et al., 1999) (**Figura 4**).

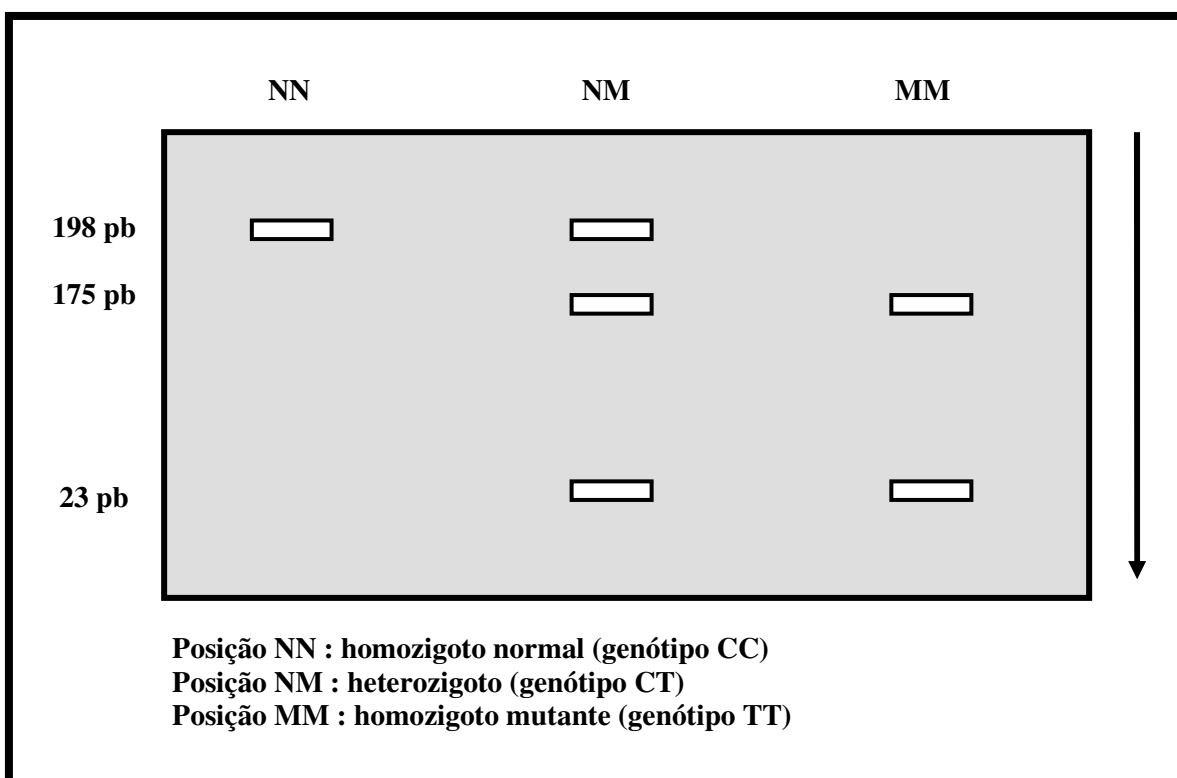


Figura 4. Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Hinf I para a mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase.

4.3.2. Caracterização da mutação G1793A

A presença da mutação G1793A foi determinada por amplificação gênica de um fragmento localizado na região do exon 11 do gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) utilizando os pares de primers: 5'-CTCTgTgTgTgTgTgCATgTgTgCg-3' e 5'-gggACAaggAgTg gCTCCAACgCAgg-3' (Rady et al., 2002).

Nesse procedimento foi utilizado os seguintes parâmetros de reação: uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94° C, seguidas por 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94° C, 1 minuto de anelamento a 66° C e 1 minuto

de extensão a 72 ° C, com uma extensão final de 72° C por 10 minutos. Esse processo gerou um fragmento de 310 pb.

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição BsrBI por 5 horas a 37°C, de acordo com instruções do fornecedor, seguido por eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo os produtos obtidos evidenciados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador ultravioleta.

O alelo normal foi caracterizado pela presença de bandas de 233 e 77 pb; enquanto o alelo homozigoto mutante pela banda de 310 pb (Rady et al., 2002) (**Figura 5**).

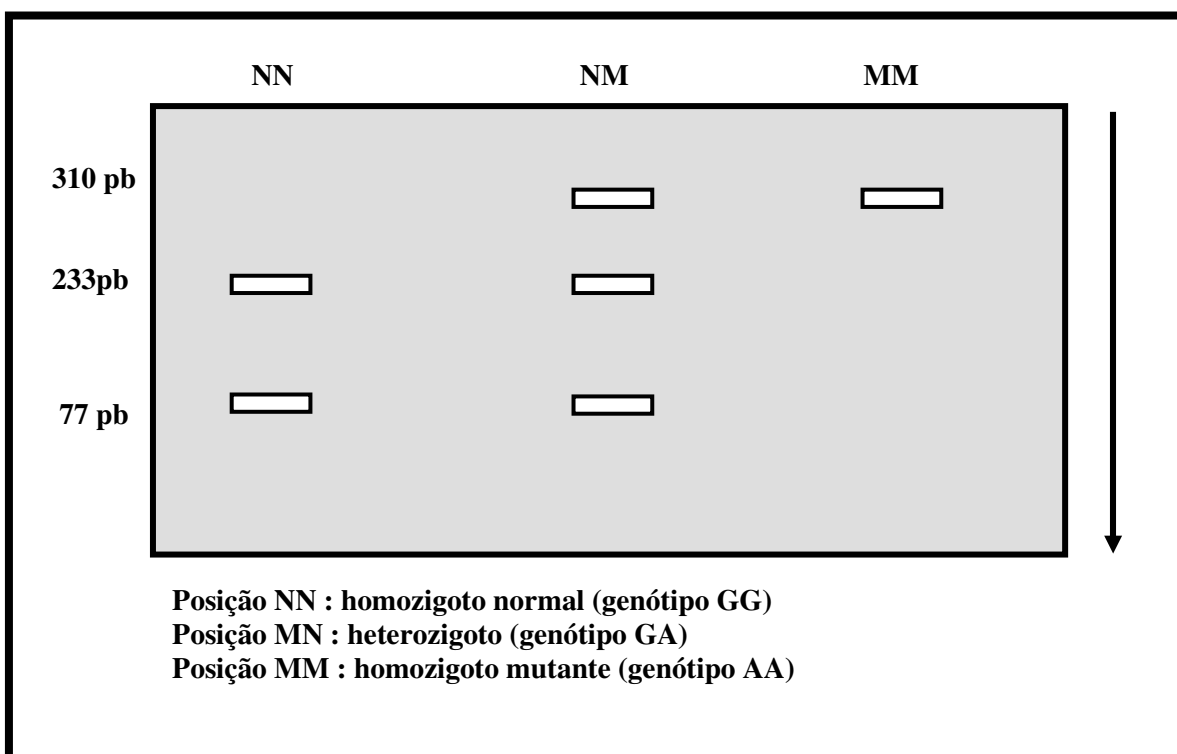


Figura 5. Esquema representativo do produto da amplificação gênica após restrição enzimática com a Bsrb I para a mutação G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância da presença das mutações analisadas nos grupos de portadores e não portadores da doença arterial coronariana comparados com os doadores de sangue, foi realizada pelo teste do qui-quadrado e, quando recomendado, aplicado o teste exato de Fisher. Um valor de $P \leq 0,05$ era considerado estatisticamente significativo.

Os resultados foram também analisados por *odds ratio* (OR) (razão das possibilidades) (razão das chances), considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%, o que permitia uma aproximação estimada do risco relativo (RR) entre a ocorrência da mutação e os grupos. Quando o extremo inferior do intervalo de confiança excedia o valor de 1 representava significância estatística a um nível de 5%.

Essas análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa EpiInfo da Organização Mundial de Saúde.

As frequências gênicas foram calculadas pela somatória dos alelos observados na população nos casos de sistemas com dois alelos.

RESULTADOS

A metodologia molecular aplicada na caracterização das mutações de nosso interesse mostrou ser de fácil realização, reprodutível, confiável, válida para o presente estudo e possível de ser executada em qualquer outro laboratório que desejasse realizar esse tipo de análise.

O material genético extraído com a ajuda de um kit comercial evidenciou excelente recuperação do produto final, principalmente quando levávamos em consideração o espaço de tempo entre a coleta do sangue total e do processo de extração de até dois dias. Espaços de tempo maiores que esse não interferiam na qualidade do DNA, mas na quantidade desse material. Outra vantagem verificada na utilização desse kit comercial foi o tempo total para a extração do DNA, que era em torno de 5 horas, enquanto os métodos tradicionais levam até dois dias para completar todo o processo.

Mutação G1691A no gene do Fator V da coagulação

A caracterização da mutação G1691A permitia através dos padrões de migração das bandas, visualizar diferentes genótipos, sendo que bandas de 163, 67 e 37 pb caracterizavam o indivíduo homozigoto normal (genótipo GG), bandas de 200, 163, 67 e 37 pb evidenciavam o genótipo heterozigoto (genótipo GA) e bandas de 200 e 67 pb caracterizavam o genótipo homozigoto mutante (AA).

Na **Figura 6** apresentamos um exemplo do material amplificado seguidos da restrição enzimática com Mnl I e que permite a caracterização dos diferentes genótipos para a presença ou não da mutação. Nesse exemplo, aplicamos também o produto da PCR sem atuação da enzima de restrição e

que fornecia uma banda de 267 pb com o propósito de representar uma banda de migração marcadora de tamanho.

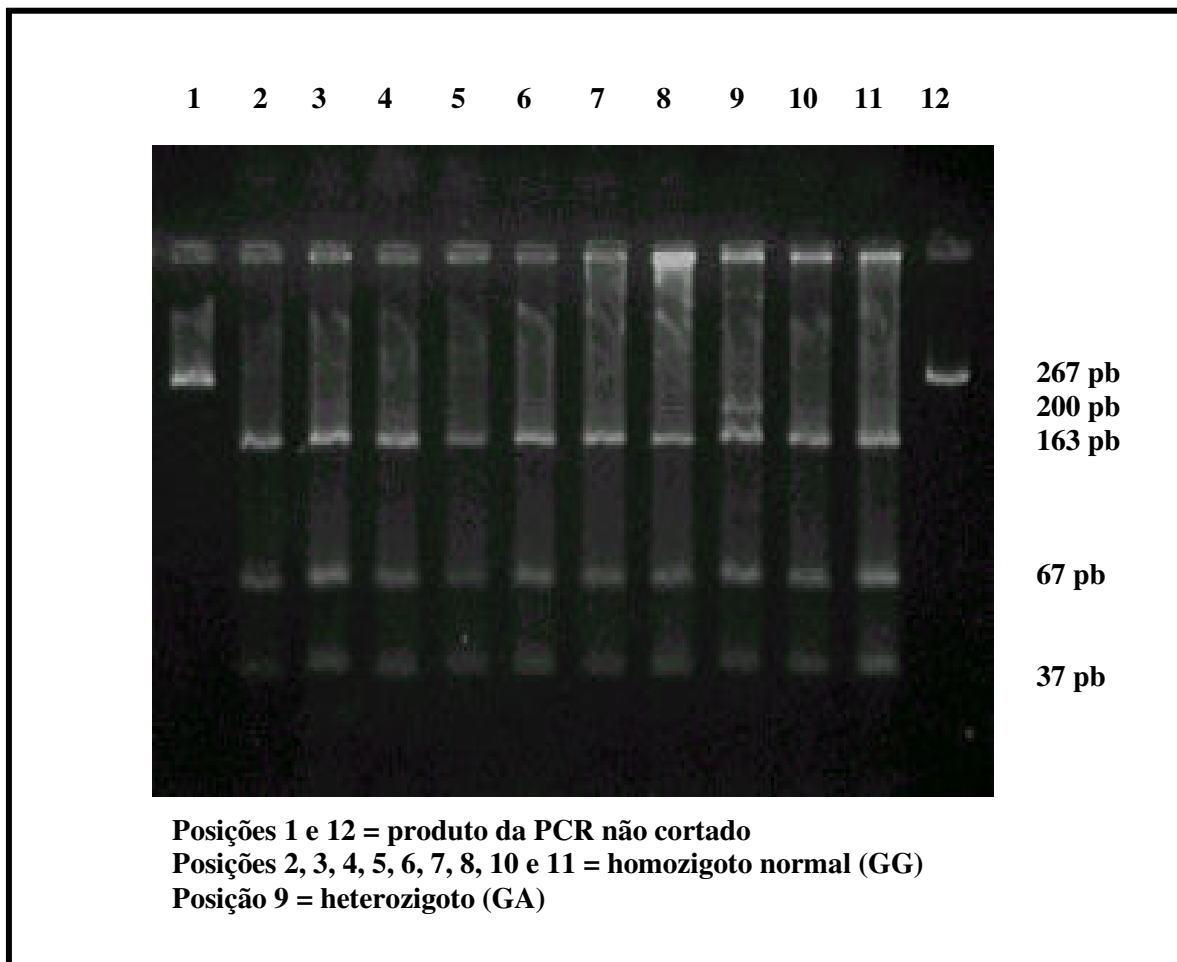


Figura 6. Produto da restrição enzimática da Mnl I para a mutação G1691A no gene do fator V da coagulação.

Na verificação da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação foram analisados 101 indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia e 102 doadores de sangue. Dos indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia, 76 (75%) apresentaram o diagnóstico de coronariopatia obstrutiva e 25 (25%) de ausência de coronariopatia.

Dos indivíduos com DAC, 69 (91%) apresentaram o genótipo homocigoto normal (GG), 7 (9%) heterocigotos (GA) e nenhum homocigoto

mutante. Por sua vez, entre os indivíduos com ausência de DAC, todos os 25 analisados (100%) apresentaram o genótipo homozigoto normal (GG).

Entre os doadores de sangue, 96 (94%) apresentaram genótipo homozigoto normal (GG) e 6 (6%) se mostraram heterozigotos (GA) (**Tabela 1**).

A comparação estatística, pelo qui-quadrado, das distribuições genóticas entre os portadores de DAC com os doadores de sangue evidenciou diferença estatística não significativa. O valor do *odds ratio* (OR) estimado entre portadores de DAC e doadores de sangue também evidenciou diferença estatística não significativa.

Entre os indivíduos sem DAC não foi possível realizar esses testes considerando que a totalidade destes apresentou o genótipo homozigoto normal (GG).

Os resultados obtidos quanto à distribuição genotípica permitiam calcular as frequências gênicas para os alelos G e A dessa mutação (**Tabela 2**), evidenciando frequências muito próximas entre os grupos de portadores de DAC, doadores de sangue e grupo total. Os indivíduos sem DAC apresentaram o alelo G em sua totalidade.

Quando estratificávamos nossos resultados com relação aos sexos, verificávamos que para o sexo masculino com DAC, 45 indivíduos (92%) apresentaram genótipo homozigoto normal (GG) e 4 (8%) mostraram-se heterozigotos (GA). Por sua vez, a totalidade do grupo com ausência de DAC revelaram-se homozigotos normais. Entre os doadores de sangue, 60 (97%) eram homozigotos normais e 2 (3%) heterozigotos (**Tabela 3**).

Para o sexo feminino, entre as portadoras de DAC, 24 indivíduos (89%) foram homozigotos normais e 3 (11%) heterozigotos. A totalidade das não portadoras de DAC apresentaram o genótipo homozigoto normal. As

doadoras de sangue evidenciaram 36 (90%) homozigotos normais e 4 (10%) heterozigotos (**Tabela 4**).

Do mesmo modo que para os grupos analisados sem a separação quanto aos sexos, o teste do qui-quadrado evidenciou diferenças estatísticas não significativas quando a comparação era realizada entre os portadores de DAC masculino e feminino com relação aos doadores de sangue masculino e feminino. Entre os não portadores de DAC dos sexos masculino e feminino essa comparação estatística não foi realizada, considerando que a totalidade apresentava apenas o genótipo homozigoto normal. O *odds ratio* aplicado para esses grupos também evidenciou diferença estatística não significativa.

Tabela 1. Distribuição dos genótipos da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GG	69	91	25	100	96	94	190	94
GA	7	9	0	0	6	6	13	6
Total	76	100	25	100	102	100	203	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (COM DAC : DOAD) = 0,71; P = 0,398 (ns)

OR (COM DAC : DOAD) = 0,62 [95% IC 0,20 – 1,91] (ns)

Tabela 2. Frequências dos alelos G e A com relação à mutação G1691A no gene do fator V da coagulação nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue.

Alelos	Com DAC	Sem DAC	Doadores	Total
G	0,95	1,00	0,97	0,97
A	0,05	0,00	0,03	0,03

Tabela 3. Distribuição dos genótipos da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo masculino da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GG	45	92	13	100	60	97	118	95
GA	4	8	0	0	2	3	6	5
Total	49	100	13	100	62	100	124	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (COM DAC : DOAD) = 0,52; P = 0,471 (ns)

OR (COM DAC : DOAD) = 0,38 [95% IC 0,07 – 2,14] (ns)

Tabela 4. Distribuição dos genótipos da mutação G1691A do gene do fator V da coagulação em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo feminino da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GG	24	89	12	100	36	90	72	91
GA	3	11	0	0	4	10	7	9
Total	27	100	12	100	40	100	79	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (COM DAC : DOAD) = 0,07; P = 0,793 (ns)

OR (COM DAC : DOAD) = 0,89 [95% IC 0,18 – 4,33] (ns)

Mutação G20210A no gene da Protrombina

Na **Figura 7** apresentamos a possibilidade da verificação da mutação G20210A para o gene da protrombina, podendo ser revelado, no indivíduo homozigoto normal, pela presença de uma banda de 345 pb. Do mesmo modo que para as análises anteriores, foi aplicado um produto da PCR sem a atuação enzimática, o que representa um balizamento de migração.

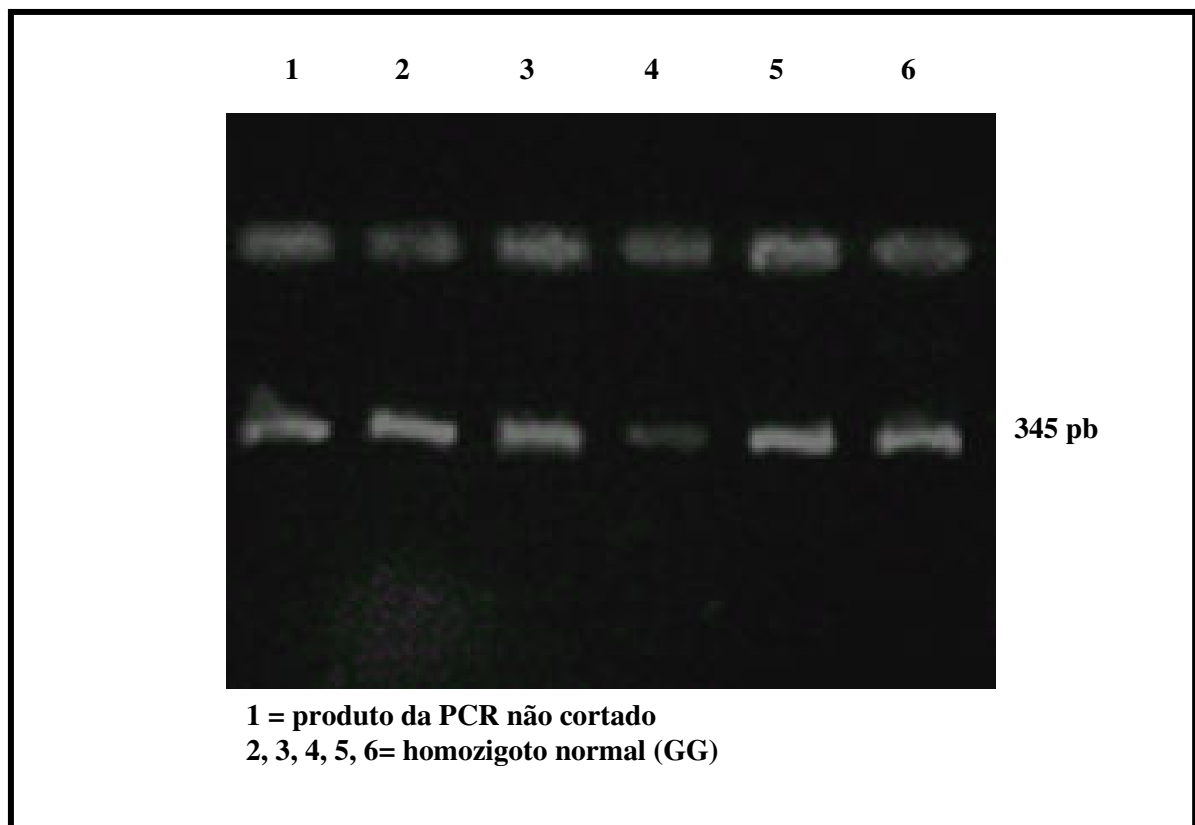


Figura 7. Produto da restrição enzimática da Hind III para a mutação G20210A no gene da protrombina.

Na busca da mutação G20210A no gene da protrombina foram analisados 105 indivíduos que passaram por cinecoronariografia e 103 doadores de sangue. Dos indivíduos submetidos à cinecoronariografia, 78

(74%) apresentaram coronariopatia obstrutiva e 27 (26%) ausência de coronariopatia obstrutiva.

Entre aqueles com presença de DAC, 53 (68%) eram do sexo masculino e 25 (32%) do feminino, os com ausência de DAC, 13 (48%) eram masculinos e 14 (52%) femininos e entre os doadores de sangue, 63 (61%) eram do sexo masculino e 40 (39%) do feminino.

No presente estudo, todos os indivíduos analisados apresentaram o genótipo homozigoto normal (GG) na verificação da presença da mutação G20210A.

Mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofato redutase

Na **Figura 8** apresentamos um exemplo do resultado da amplificação gênica na região do exon 4 do gene da MTHFR quando submetida à restrição enzimática com a Hinf I e válida na caracterização da mutação C677T. Nessa figura, a visualização de uma banda com 198 pb caracteriza o alelo homozigoto normal (CC) e as bandas de 198 e 175 pb caracterizam os alelos heterozigotos (CT) que por apresentarem migrações próximas foram aplicadas em um sistema de revelação em gel de agarose a 4%. Apesar de não ser visível por esse procedimento, uma banda de 23 pb deveria aparecer tanto para os alelos heterozigotos, como para os homozigotos mutantes, fato que não representa um impedimento para um correto diagnóstico. Do mesmo modo que os anteriores, uma amostra do produto da PCR sem atuação da enzima foi aplicada no gel.

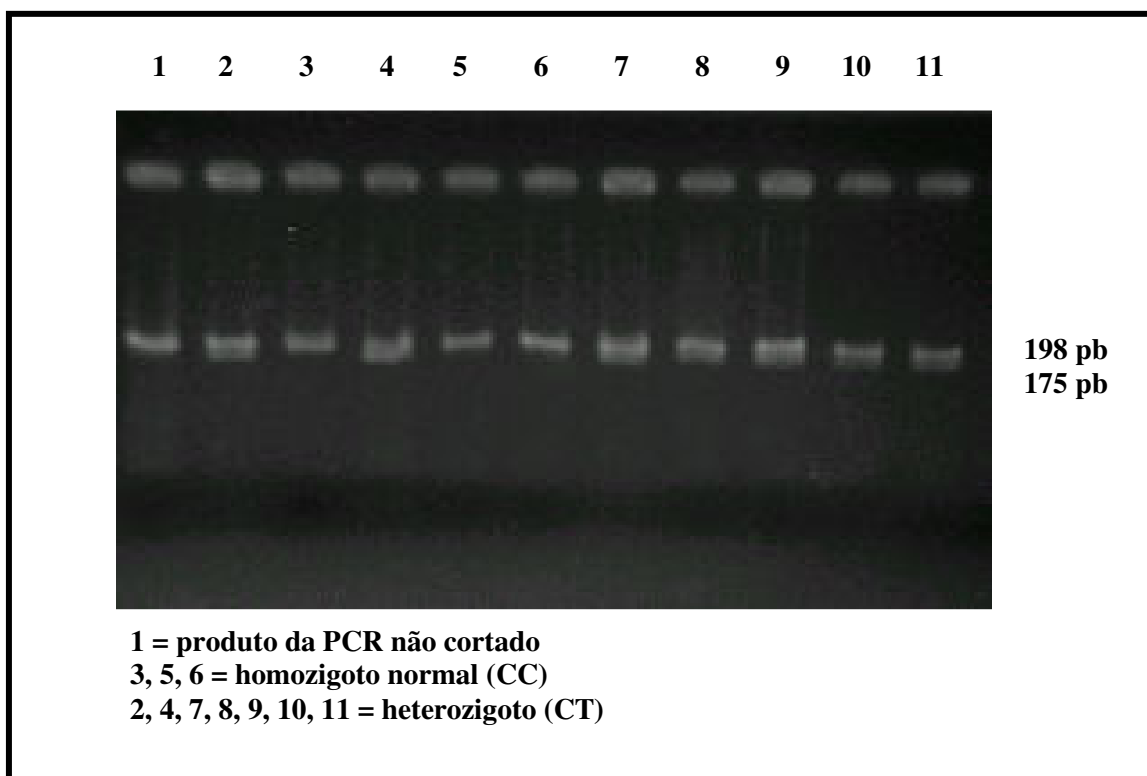


Figura 8. Produto da restrição enzimática da Hinf I para a mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase.

Para a mutação C677T do gene MTHFR foram analisados 112 indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia e 101 doadores de sangue. Dos indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia, 84 (75%) apresentaram diagnóstico de coronariopatia obstrutiva e 28 (25%) de ausência de coronariopatia.

Dos indivíduos com DAC, 57 (68%) apresentaram o genótipo homozigoto normal (CC), 25 (30%) heterozigoto (CT) e 2 (2%) homozigoto mutante (TT). Os com ausência de DAC, 14 (50%) apresentaram o genótipo homozigoto normal, 12 (43%) foram heterozigotos e 2 (7%) mostraram-se homozigotos mutantes. Entre os doadores de sangue, 67 (66%) apresentaram genótipo homozigoto normal, 27 (27%) heterozigoto e 7 (7%) homozigoto mutante (**Tabela 5**).

Foi nossa opção agruparmos os portadores heterozigotos e homozigotos que apresentavam alelo mutante considerando nosso propósito em verificar a influência ou não da mutação no aparecimento da DAC. Dessa forma o teste estatístico foi aplicado considerando o portador homozigoto normal contra a somatória dos observados heterozigotos e homozigotos mutantes.

O teste do qui-quadrado e o *odds ratio* aplicados nas comparações entre indivíduos com DAC versus doadores de sangue, sem DAC versus doadores de sangue e entre com DAC versus sem DAC evidenciaram diferenças estatísticas não significativas.

A partir das distribuições dos genótipos foi possível calcular as frequências dos alelos C e T com relação à mutação C677T no gene da MTHFR, evidenciando que as frequências são próximas entre os grupos de portadores de DAC, doadores de sangue e grupo total. Por sua vez os sem DAC não acompanham essa proximidade (**Tabela 6**). Essa observação pode ser melhor visualizada pela relação do alelo C contra alelo T.

Quando realizávamos a verificação da distribuição dos genótipos para o sexo masculino (**Tabela 7**), observamos que entre os portadores de DAC, 39 (71%) eram homozigotos normais e 16 (29%) heterozigotos. Para os sem DAC foram observados 6 (46%) homozigotos normais, 5 (39%) heterozigotos e 2 (15%) homozigotos mutantes. Os doadores de sangue evidenciaram 40 (61%) homozigotos normais, 20 (31%) heterozigotos e 5 (8%) homozigotos mutantes.

Por sua vez, para o sexo feminino, entre as com DAC, 18 (62%) revelaram ser homozigotos normais, 9 (31%) heterozigotos e 2 (7%) homozigotos mutantes. As representantes das sem DAC evidenciaram 8 (53%) homozigotos normais e 7 (47%) heterozigotos. Entre as doadoras de

sangue, 27 (75%) eram homozigotos normais, 7 (19%) heterozigotos e 2 (6%) homozigotos mutantes (**Tabela 8**).

Do mesmo modo que o procedimento para a análise da mutação anterior, agrupamos os portadores de mutação, heterozigotos e homozigotos (CT + TT), para verificar existência de correlação com os homozigotos normais (CC).

O teste do qui-quadrado e o *odds ratio* aplicados nessas amostras, considerando os grupos separados quando aos sexos (**Tabelas 7 e 8**) evidenciaram diferenças estatísticas não significativas nas comparações entre portadores de DAC e dos não portadores de DAC com os seus respectivos grupos de doadores de sangue.

Tabela 5. Distribuição dos genótipos da mutação C677T do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	57	68	14	50	67	66	138	65
CT	25	30	12	43	27	27	64	30
TT	2	2	2	7	7	7	11	5
CT + TT	27	32	14	50	34	34	75	35
Total	84	100	28	100	101	100	213	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (CC : CT+TT) (COM DAC : DOAD) = 0,00; P = 0,950 (ns)

OR (CC : CT+TT) (COM DAC : DOAD) = 1,07 [95% IC 0,58 – 1,98] (ns)

χ^2 (CC : CT+TT) (SEM DAC : DOAD) = 1,85; P = 0,173 (ns)

OR (CC : CT+TT) (SEM DAC : DOAD) = 0,51 [95% IC 0,22 – 1,18] (ns)

χ^2 (CC : CT+TT) (COM DAC : SEM DAC) = 2,17; P = 0,140 (ns)

OR (CC : CT+TT) (COM DAC : SEM DAC) = 2,11 [95% IC 0,88 – 5,04] (ns)

Tabela 6. Frequências dos alelos C e T com relação à mutação C677T no gene da MTHFR nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue.

Alelos	Com DAC	Sem DAC	Doadores	Total
C	0,83	0,71	0,80	0,80
T	0,17	0,29	0,20	0,20
C : T	4,9	2,5	4,0	4,0

Tabela 7. Distribuição dos genótipos da mutação C677T do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo masculino da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	39	71	6	46	40	61	85	64
CT	16	29	5	39	20	31	41	31
TT	0	0	2	15	5	8	7	5
CT + TT	16	29	7	54	25	39	48	36
Total	55	100	13	100	65	100	133	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (CC : CT+TT) (COM DAC : DOAD) = 0,78; P = 0,376 (ns)

OR (CC : CT+TT) (COM DAC : DOAD) = 1,52 [95% IC 0,71 – 3,28] (ns)

χ^2 (CC : CT+TT) (SEM DAC : DOAD) = 0,52; P = 0,471 (ns)

OR (CC : CT+TT) (SEM DAC : DOAD) = 0,54 [95% IC 0,16 – 1,78] (ns)

Tabela 8. Distribuição dos genótipos da mutação C677T do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo feminino da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	18	62	8	53	27	75	53	66
CT	9	31	7	47	7	19	23	29
TT	2	7	0	0	2	6	4	5
CT + TT	11	38	7	47	9	25	27	34
Total	29	100	15	100	36	100	80	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (CC : CT+TT) (COM DAC : DOAD) = 0,73; P = 0,393 (ns)

OR (CC : CT+TT) (COM DAC : DOAD) = 0,55 [95% IC 0,19 – 1,58] (ns)

χ^2 (CC : CT+TT) (SEM DAC : DOAD) = 1,41; P = 0,234 (ns)

OR (CC : CT+TT) (SEM DAC : DOAD) = 0,38 [95% IC 0,11 – 1,35] (ns)

Mutação G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase

Na **Figura 9** apresentamos um exemplo do resultado da amplificação gênica no gene da MTHFR quando submetida à restrição enzimática com a BsrBI e válida para a caracterização da mutação G1793A. Nessa figura podemos verificar as bandas de 233 e 77 pb caracterizam o indivíduo homocigoto normal (GG), bandas de 310, 233 e 77 pb são características do genótipo heterocigoto (GA) e banda de 310 pb caracteriza o homocigoto mutante (AA). Nesse exemplo foi aplicado um marcador de tamanho de bases.

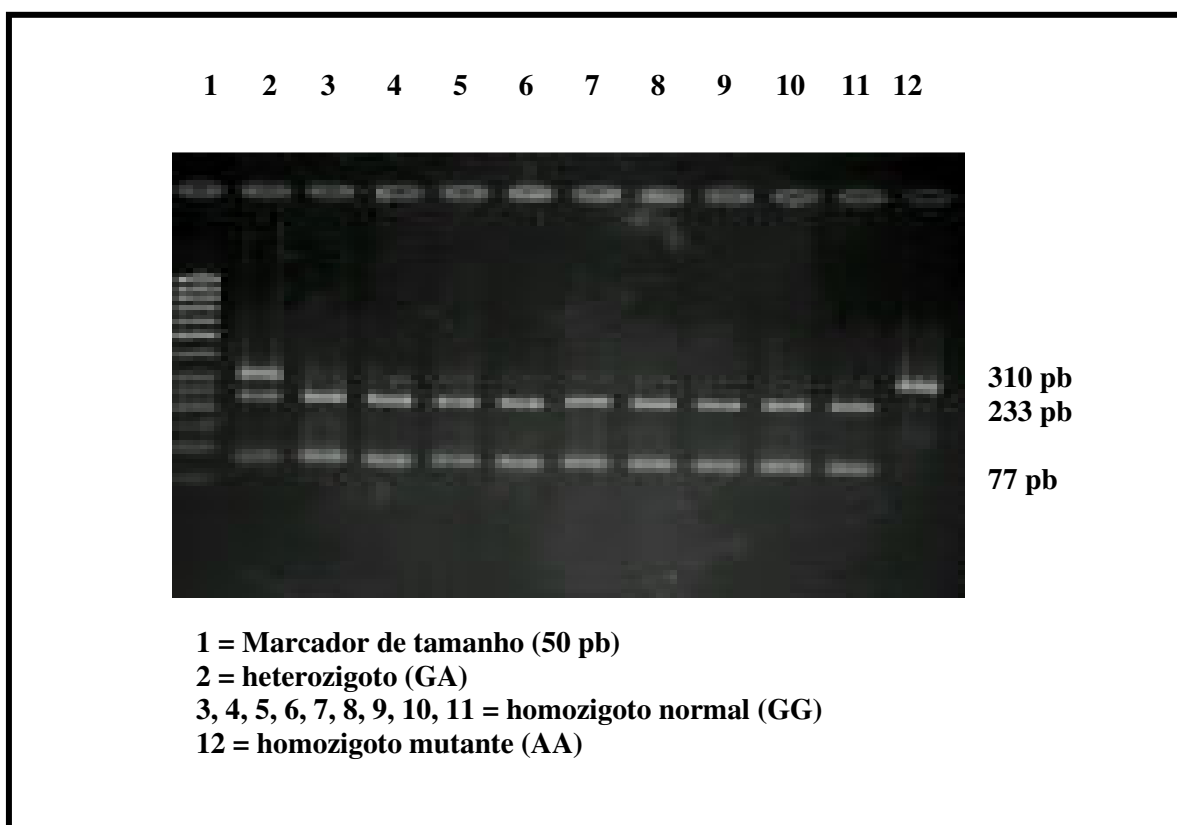


Figura 9. Produto da restrição enzimática da BsrBI para a mutação G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase

A mutação G1793A do gene MTHFR foi verificada em 101 indivíduos que se submeteram à cinecoronariografia e 100 doadores de sangue. Daqueles que realizaram cinecoronariografia, 77 (76%) apresentaram diagnóstico de coronariopatia obstrutiva e 24 (24%) de ausência de coronariopatia.

Dos indivíduos com DAC, 64 (83%) apresentaram o genótipo homozigoto normal (GG), 5 (7%) heterozigoto (GA) e 8 (10%) homozigoto mutante (AA). Os com ausência de DAC, 20 (83%) apresentaram o genótipo homozigoto normal, 3 (13%) heterozigoto e 1 (4%) apresentou genótipo homozigoto mutante. Dos doadores de sangue, 97 (97%) eram homozigotos normais e 3 (3%) heterozigotos (**Tabela 9**).

Na análise dessa mutação também agrupamos os portadores heterozigotos e homozigotos mutantes para a comparação com os portadores homozigotos normais.

O qui-quadrado entre os portadores de DAC e os não portadores de DAC versus os doadores de sangue quando considerávamos as freqüências do genótipo GG versus os genótipos GA somados a AA evidenciaram diferença estatística significativa. Essa observação não era observada na comparação entre os portadores de DAC versus os não portadores de DAC.

Os *odds ratio* considerados para todos esses agrupamentos evidenciou diferença estatística não significativa.

As distribuições dos genótipos expressas na **Tabela 9** permitia calcular as freqüências dos alelos G e A possíveis de estarem presentes na mutação G1793A no gene da MTHFR (**Tabela 10**). Essas freqüências apresentavam uma diferença quanto a sua expressão, sendo que a relação do alelo G sobre o alelo A era de 6,1 para os com DAC; de 9,0 para os sem DAC; de 49,0 para os doadores de sangue e de 13,3 para o grupo total

analisado. Esse resultado evidencia que entre o grupo com DAC a frequência do alelo A (mutante) é muito maior do que nos outros grupos.

Quando observamos no estudo dessa mutação as distribuições genótípicas com relação ao sexo masculino (**Tabela 11**), verificamos entre os portadores com DAC, 46 (90%) com genótipo homozigoto normal (GG), 3 (6%) heterozigoto (GA) e 2 (4%) homozigoto mutante (AA). Os com ausência de DAC, 9 (90%) revelaram-se homozigotos normais e 1 (10%) homozigoto mutante. Entre os doadores de sangue, 57 (95%) eram homozigotos normais e 3 (5%) heterozigotos.

Para o sexo feminino (**Tabela 12**), entre as com DAC foram observadas 18 (69%) homozigotos normais, 2 (8%) heterozigotos e 6 (23%) homozigotos mutantes. As sem DAC evidenciaram 11 (79%) homozigotos normais, 3 (21%) heterozigotos e nenhum homozigoto mutante. Para as doadoras de sangue foram observadas todas desse grupo como homozigotos normais.

Do mesmo modo que no estudo das mutações anteriores, agrupamos os genótipos mutantes para a aplicação das análises estatísticas. O qui-quadrado e o *odds ratio* aplicados para o grupo masculino revelaram diferenças estatísticas não significativas, sendo que para o grupo feminino essa análise não foi realizada considerando ausência de indivíduos com outros genótipos no grupo das doadoras de sangue.

Tabela 9. Distribuição dos genótipos da mutação G1793A do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipo	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GG	64	83	20	83	97	97	181	90
GA	5	7	3	13	3	3	11	5
AA	8	10	1	4	0	0	9	5
GA + AA	13	17	4	17	3	3	20	10
Total	77	100	24	100	100	100	201	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (GG : GA+AA) (COM DAC : DOAD) = 8,58; P = 0,003 (*)

OR (GG : GA+AA) (COM DAC : DOAD) = 0,15 [95% IC 0,04 – 0,56] (ns)

χ^2 (GG : GA+AA) (SEM DAC : DOAD) = 4,46; P = 0,030 (*)

OR (GG : GA+AA) (SEM DAC : DOAD) = 0,15 [95% IC 0,03 – 0,75] (ns)

χ^2 (GG : GA+AA) (COM DAC : SEM DAC) = 0,08; P = 0,773 (ns)

OR (GG : GA+AA) (COM DAC : SEM DAC) = 0,98 [95% IC 0,29 – 3,36] (ns)

Tabela 10. Frequências dos alelos G e A com relação à mutação G1793A no gene da MTHFR nos pacientes submetidos à cinecoronariografia e nos doadores de sangue.

Alelos	Com DAC	Sem DAC	Doadores	Total
G	0,86	0,90	0,98	0,93
A	0,14	0,10	0,02	0,07
G : A	6,1	9,0	49,0	13,3

Tabela 11. Distribuição dos genótipos da mutação G1793A do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo masculino da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GG	46	90	9	90	57	95	112	93
GA	3	6	0	0	3	5	6	5
AA	2	4	1	10	0	0	3	2
GA + AA	5	10	1	10	3	5	9	7
Total	51	100	10	100	60	100	121	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

χ^2 (GG : GA+AA) (COM DAC : DOAD) = 0,37; P = 0,543 (ns)

OR (GG : GA+AA) (COM DAC : DOAD) = 0,48 [95% IC 0,11 – 2,13] (ns)

χ^2 (GG : GA+AA) (SEM DAC : DOAD) = 0,01; P = 0,916 (ns)

OR (GG : GA+AA) (SEM DAC : DOAD) = 0,47 [95% IC 0,04 – 5,07] (ns)

Tabela 12. Distribuição dos genótipos da mutação G1793A do gene da MTHFR em pacientes submetidos à cinecoronariografia e em doadores de sangue do sexo feminino da região de São José do Rio Preto - SP.

Genótipos	Com DAC*		Sem DAC**		Doadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
GG	18	69	11	79	40	100	69	86
GA	2	8	3	21	0	0	5	6
AA	6	23	0	0	0	0	6	8
GA + AA	8	31	3	21	0	0	11	14
Total	26	100	14	100	40	100	80	100

* Paciente com coronariopatia obstrutiva

** Paciente com ausência de coronariopatia obstrutiva

Na Tabela 13 estão expressas as prevalências da soma dos mutantes heterozigotos e homozigotos observadas no presente estudo e a representação dos *odds ratio*, com um intervalo de confiança de 95%, para cada grupo quando isso foi possível de ser realizado. Todos os resultados evidenciaram diferenças estatísticas não significativas.

Tabela 13. Prevalência da soma dos heterozigotos e homozigotos mutantes observadas nos indivíduos analisados.

Mutações	Com DAC		Sem DAC		Doadores		Odds Ratio (IC 95%)
	(a)		(b)		(c)		
	n	%	n	%	n	%	
G1691A	7	9	0	0	6	6	(a:c) 0,62 [0,20–1,91]
G20210A	0	0	0	0	0	0	-
C667T	27	32	14	50	34	34	(a:c) 1,07 [0,58-1,98] (b:c) 0,51 [0,22-1,18]
G1793A	13	17	4	17	3	3	(a:c) 0,15 [0,04-0,56] (b:c) 0,15 [0,03-0,75]

DISCUSSÃO

A doença arterial coronariana representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade das populações, principalmente naquelas que habitam regiões desenvolvidas. Os considerados “fatores de risco” para o desenvolvimento dessa doença são bastante conhecidos e analisados, o que propiciou vários estudos na tentativa de conhecê-los e que, associados a um maior entendimento da fisiopatologia da insuficiência coronariana, uma melhoria das condições socioeconômicas das populações, poderia permitir uma progressiva redução da mortalidade causada por essa doença (Mansur, 2000).

Dentre os principais fatores de risco para a DAC poderíamos considerar a hipertensão arterial, o aumento do índice de massa corporal, o fumo do cigarro, o aumento do colesterol, principalmente da fração LDL e o *diabetes mellitus*. Alguns outros fatores, considerados independentes, para a DAC poderiam estar relacionados ao aumento das lipoproteínas, fibrinogênio e triglicerídeos. A participação de um desses fatores de risco ou da associação entre eles fica também na dependência de componentes ambientais e da propensão genética de cada indivíduo (Mansur, 2000).

Nos últimos tempos verifica-se uma importância cada vez maior com relação aos riscos genéticos, bem como a associação de sistemas polimórficos humanos, alterações observadas nas seqüências de bases do material genético, com a propensão a desenvolver uma determinada doença. A partir desses estudos foi possível imaginar a ocorrência dos denominados marcadores genéticos, sendo que os autores realizam uma tentativa com vistas às possibilidades de correlacionar esses marcadores com a doença analisada (Fletcher & Kessler, 1998; Kim & Becker, 2003).

Em virtude dos elevados riscos com relação a DAC na população mais produtiva de nosso país, do reconhecimento da atuação de alguns marcadores genéticos correlacionados com o aparecimento das mesmas, das controvérsias com relação à atuação desses marcadores no aparecimento dessa doença, optamos por pesquisar possíveis associações da mutação G1691A (fator V de Leiden) no gene do fator V da coagulação, da mutação G20210A no gene da protrombina e das mutações C677T e G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase com a doença arterial coronariana.

Para tanto, foram estabelecidos inicialmente dois grupos de estudo, representados por indivíduos que foram indicados a realizar cinecoronariografia e que foram classificados como portadores e não portadores de doença arterial coronariana na dependência de padrões estabelecidos para isso. Apesar de o segundo grupo ser constituído por indivíduos diagnosticados com ausência de DAC é necessário ressaltar que os mesmos tiveram uma indicação clínica para a realização desse exame, o que não descartaria a possibilidade de no presente momento pertencerem a um grupo e, depois de algum tempo, pertencerem a outro.

Por esse motivo foi nossa opção constituirmos um terceiro grupo formado por doadores de sangue que poderiam representar um grupo válido para nosso balizamento, mas que de qualquer forma também não poderia representar um grupo controle, considerando as diferenças de idade entre os portadores e não portadores e que variava dos 36 aos 84 anos com relação aos doadores de sangue com faixa etária variando dos 18 aos 53 anos, apesar de que alguns desse último grupo estarem incluídos na faixa etária dos primeiros.

Alterações moleculares no DNA podem ser detectadas por várias metodologias e muitas mutações podem ser analisadas por mais de um tipo de procedimento, sendo que todos podem ser realizados com ou sem

amplificação do material genético. No entanto, as análises feitas com a amplificação do DNA possuem inúmeras vantagens, uma vez que a amplificação gera em torno de 10^6 a 10^7 cópias da seqüência de DNA ou RNA de interesse e o resultado pode ser obtido em apenas um dia de análise (Boehm, 1989).

Dessa forma, foi nossa opção realizarmos a verificação ou não da presença das mutações de nosso interesse em nossa população alvo pela amplificação do material genético, através da PCR, seguida de restrição enzimática (PCR-RE), que dentre as técnicas moleculares tem se mostrado a mais rápida e com custos mais acessíveis.

Outra nossa intenção era estabelecer uma metodologia possível de ser realizada em nosso laboratório, que apresentasse reprodutibilidade e confiabilidade e que pudesse ser repetida em qualquer outro laboratório que se interessasse em realizar esse tipo de estudo.

A extração do material genético foi realizada pelo kit comercial, sendo que a mesmo se mostrou de fácil realização, rápido e com excelente recuperação do DNA. Outra vantagem no uso de kit foi representada pela rapidez da extração, pois era possível obter um material de boa qualidade e concentração em torno de 5 horas do processo, quer seja para uma amostra ou para 20 amostras, o que permitia a agilização do processo como um todo.

Encontramos uma pequena dificuldade no procedimento de análise do produto de amplificação após ação da endonuclease de restrição com relação ao tempo de digestão enzimática e a concentração do gel de agarose necessário para a visualização das frações de bandas após restrição. Atenção especial foi dispensada ao tempo da digestão enzimática, pois quando insuficiente podia gerar falsos resultados e quando com tempo prolongado poderia promover a desnaturação do DNA. Por outro lado, concentrações

baixas da agarose constituem géis que não permitiam a visualização de bandas com pequenos número de bases.

Após as necessárias standardizações da metodologia aplicada no presente trabalho, foi possível estabelecer protocolos laboratoriais válidos e reproduzíveis para necessária caracterização das mutações G1691A no gene do fator V da coagulação, G20210A no gene da protrombina, C677T e G1793A no gene da metilenotetrahidrofolato redutase.

Os grupos analisados no presente trabalho foram oriundos da mesma região, ou seja, de uma população com a mesma origem antropológica e com o propósito de minimizar possíveis variabilidades genéticas na distribuição das mutações analisadas. O estabelecimento dos grupos portadores e não portadores de DAC foi realizado com o auxílio de clínicos intervencionistas cardiologistas do Serviço de Hemodinâmica do Hospital de Base da FUNFARME, da cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo.

Uma outra dificuldade encontrada foi a de obter um número maior de indivíduos com ausência de DAC e mais próximo dos nossos interesses, considerando que a maioria dos pacientes que procuravam o serviço, ou que eram aconselhados a realizar a cinecoronariografia, apresentavam algum tipo de obstrução.

No presente estudo a idade dos pacientes com DAC do sexo masculino variava de 34 a 76 anos e no sexo feminino de 41 a 84 anos.

É reconhecido que o sexo feminino teoricamente apresenta, como se fosse, uma proteção com relação à doença cardiovascular durante a idade fértil pelo possível papel dos estrógenos, sendo assim esta doença, em geral, se manifesta 10 anos mais tarde que no homem. Todavia se considerarmos a possibilidade do aumento de múltiplos fatores de risco e a várias possíveis doenças em faixas etárias mais avançadas, o prognóstico dessa doença nesse sexo parece ser mais desfavorável (Luz & Solimene, 1999).

Esse fato talvez justifique em nosso grupo de estudo com DAC termos uma amostra maior do sexo masculino do que no feminino, enquanto no grupo com ausência de DAC o grupo feminino ser maior, com exceção dos analisados para a mutação G1691A do gene do fator V da coagulação sendo que, nesse caso, o grupo feminino se equipara ao masculino. Somados a isso, é reconhecido que apenas 50% das mulheres com sintomas sugestivos de angina apresentam lesão obstrutiva significativa na cinecoronariografia (Smanio, 2007).

Mutação G1691A no gene do fator V da coagulação (fator V de Leiden)

Essa mutação resulta em uma falha na proteína C ativada em reconhecer um sítio de quebra do fator V e como conseqüência à ativação da protrombina permanece inalterada. Esse defeito é reconhecido em 90% dos casos de resistência a proteína C ativada, sendo o alelo responsável pelo fator V de Leiden presente entre 4 a 5% dos estudos populacionais realizados em caucasóides, mas ausente em populações indígenas da Ásia, África, América e Austrália (Zivelin et al, 1997, Sykes et al., 2000).

A considerada principal manifestação clínica da presença do alelo do fator V de Leiden é representada por trombose venosa profunda, sendo que o risco relativo, calculado por *odds ratio*, para esse tipo de evento é de 2,3 para os portadores heterozigotos, embora esses resultados não sejam conclusivos (Sykes et al., 2000).

Nossos resultados com relação à mutação do fator V de Leiden evidenciam, para os grupos constituídos no presente trabalho, uma distribuição muito semelhante para os portadores de DAC (9%) e os doadores de sangue (6%) com diferença estatística não significativa, tanto referentes ao qui-quadrado, como ao odds ratio, que demonstrou um risco relativo de 0,62.

O grupo de não portadores de DAC evidenciou a totalidade dos indivíduos com o genótipo homozigoto normal (**Tabela 1**).

Essa distribuição permitiu calcular as frequências gênicas para cada alelo envolvido nesse tipo de mutação (**Tabela 2**), evidenciando que o alelo mutante (A), para a população analisada, não tem influência no estabelecimento da DAC e que uma associação entre essa mutação e a doença não pode ser estabelecida. As frequências observadas quando eram separados os grupos quanto as características sexuais apresentavam essas mesmas considerações (**Tabelas 3 e 4**).

Dentre os trabalhos realizados no mundo, destacamos os de Dönmez e colaboradores (2004) que analisando uma amostra da população turca constituída por pacientes que sofreram infarto do miocárdio e com idade inferior a 55 anos quando comparados com um grupo controle de mesma origem populacional, demonstraram prevalência da mutação do fator V de Leiden de 6,3% e 5,2% em pacientes e controles respectivamente. O risco relativo calculado pelo *odds ratio* foi de 0,6, mas com diferença estatística não significativa, resultado esse, muito semelhante ao obtido no presente trabalho.

No Brasil, em uma amostra da população paulista, foram observados 2% da prevalência dessa mutação (Arruda et al., 1995); 1,7% em uma população feminina do Estado de Minas Gerais (Guimarães, 2003); 1,9% em outra amostra da população mineira portadora de *diabetes mellitus* (Soares et al., 2005) e 13,3% em uma amostra da população do Estado de Pernambuco (Ramos et al., 2006). Arruda e colaboradores (1996) observaram frequências bastante baixas em população negra brasileira e entre indígenas do Amazonas.

Por esses resultados percebe-se uma grande heterogeneidade na distribuição dessa mutação no Brasil, muito provavelmente pela grande mistura étnica de nossa população.

Mutação G20210A no gene da protrombina (fator II da coagulação)

Com relação à mutação G20210A no gene da protrombina, nossos resultados evidenciaram que todos os indivíduos analisados eram homocigotos normais (genótipo GG), o que permite afirmar, para esse estudo e para essa população, que a mutação não apresenta correlação com a doença analisada.

Essa mutação tem sido responsabilizada como um dos mais comuns defeitos genéticos responsáveis por trombozes. Diferentes estudos realizados em diferentes populações têm evidenciado que essa mutação é bastante variável entre as populações tendo sido relatada de modo global entre 1 e 5% (Gundogdu et al., 2007). Nos países europeus a mesma tem se mostrado variável entre 0,7 a 2,6% na Inglaterra (Brown et al., 1997; Cumming et al., 1997); 2% na Áustria (Watzke et al., 1997); 1,2 a 2,3% na Holanda (Doggen et al., 1998; Poort et al., 1996); 3,15% na Espanha (Corral et al., 1997); 1,8% na Suécia (Hillarp et al., 1997) e 4% na Itália (Ferraresi et al., 1997). Por sua vez, esse polimorfismo raramente é observado (< que 1%) em descendentes de povos asiáticos e africanos (Rosendaal et al., 1998).

Desses estudos podemos destacar, como bastante atual e semelhante aos nossos, ao que se refere aos objetivos, os resultados obtidos por Gundogdu e colaboradores (2007) que, analisando a mutação G21210A no gene da protrombina em pacientes turcos de ambos os sexos, distribuídos em 137 pacientes com DAC e 131 sem DAC, considerado esse último como grupo controle, observam diferença estatística não significativa entre os dois

grupos. Somados a isso, os autores não observaram indivíduos homozigotos mutantes em seu estudo.

Alguns dos estudos realizados no Brasil demonstram em uma amostra da população do Estado de São Paulo frequências de 0,7% (Arruda et al., 1998). Por sua vez em uma amostra da população do estado de Minas Gerais, Soares e colaboradores (2005), observam 3,8% dessa mutação e Guimarães (2003) observou em mulheres desse Estado, frequências de 6,9%, valores esses que indicam, muito possivelmente, que em Minas Gerais a incidência da mutação no gene do fator II deva ser mais elevada.

Apesar de controverso, alguns estudos evidenciam uma forte associação entre a presença desse polimorfismo e a ocorrência de DAC. Doggen et al (1998) reportam que a presença de uma variante da mutação G20210A aumenta o risco para o infarto do miocárdio. Arruda e colaboradores (1998), Burzotta e colaboradores (2002) confirmam a associação entre DAC e a G20210A. Outros estudos falham em evidenciar a associação entre o mesmo e a DAC (Corral et al., 1997; Eikelboom et al., 1998; Croft et al., 1999; Prohasha et al., 1999; Ridker et al., 1999; Coulet et al., 2000; Russo et al., 2001; Abu-Amero et al., 2002), o que condiz com os nossos resultados.

Mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase

A MTHFR desempenha um importante papel no metabolismo da homocisteína e a presença da mutação C677T permite o aparecimento de uma forma termolábil de MTHFR que reduz a atividade enzimática. Indivíduos homozigotos para essa mutação têm sido associados com o aumento, no plasma dos níveis de homocisteína, e isso tem sido descrito como um fator de risco para DAC, embora essa associação ainda seja controversa (Brattstrom et al., 1998).

Evidências recentes tem enfatizado que ambos os fatores, deficiências nutricionais e variações genéticas, podem contribuir no envolvimento enzimático do metabolismo da homocisteína, podendo contribuir para um aumento do risco para DAC, defeito do tubo neural, vários tipos de cânceres e doenças neurodegenerativas (Botto et al, 2003).

Na análise da distribuição dos genótipos para a mutação C677T no gene da MTHFR, quando comparamos os valores observados para o alelo homozigoto normal (CC) com os valores da soma dos alelos heterozigotos e homozigotos mutantes (CT + TT) observamos diferença estatística não significativa entre portadores de DAC e não portadores de DAC comparados com os doadores de sangue. Essa mesma observação foi verificada na comparação entre os portadores e não portadores de DAC (**Tabela 5**).

Quando as frequências gênicas eram calculadas a partir desses resultados (**Tabela 6**) o alelo C mostra-se efetivamente prevalente com relação ao alelo T (mutante) em todos os grupos analisados. Todavia a relação do alelo C contra o alelo T evidencia valores diferentes para cada grupo, pois, enquanto para os com DAC o alelo T está 4,9 ponto com relação ao alelo C, para os sem DAC o alelo T está 2,5 vezes, o que resulta um valor menor do alelo T mutante para os portadores de DAC.

Quando a nossa verificação considerava a distribuição dos genótipos dessa mutação estratificada com relação aos sexos, os resultados se mostraram do mesmo modo que sem essa separação, ou seja, evidenciavam diferenças estatísticas não significativas para os dois sexos (**Tabelas 7 e 8**).

Um estudo retrospectivo foi realizado em uma população muito semelhante a do presente estudo e residente na região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo (Guerzoni et al, 2007), onde foram avaliados 127 indivíduos caucasóides que passaram por cineangiocoronariografia, sendo 91 considerados portadores de DAC e 36 não portadores de DAC, com relação a

outros fatores de risco e quanto ao polimorfismo da MTHFR, especificamente da mutação C677T, investigado por PCR-RE e correlacionado com o número de artérias afetadas e grau de obstrução arterial e com o nível de homocisteína plasmática. Os resultados, quanto ao aspecto mutação C677T, evidenciaram que o alelo C foi prevalente para pacientes de ambos os grupos. O polimorfismo MTHFR da C677T não apresentou associação com níveis de homocisteína plasmática, sendo que entre pacientes homozigotos mutantes observou-se a prevalência de obstrução coronariana acima de 95% e a presença de duas artérias lesadas. Com relação à distribuição genotípica esses resultados foram semelhantes aos observados no presente trabalho.

Mutação G1793A no gene da MTHFR

Em 2002, Rady e colaboradores descreveram pela primeira vez a existência de um novo polimorfismo no exon 11 do gene da MTHFR, o G1793A, e que estaria implicado no metabolismo da homocisteína e do ácido fólico, com possível reflexo em defeitos de recém-nascidos, fenômenos tromboembólicos e em vários outros problemas de saúde relacionados a MTHFR.

Nesse trabalho, um dos raros encontrados na literatura sobre esse polimorfismo, os autores relatam uma variabilidade da frequência gênica dependente da etnia analisada. Assim, com relação à incidência desse polimorfismo quando em heterozigose, observam 2,6% entre judeus Ashkenazi, 6,2% entre afro-descendentes americanos, 11,6% entre espanhóis e 12,6% entre caucasóides, sendo esses dois últimos grupos moradores do Sul do Texas, EUA. Genótipo homozigoto mutante foi observado apenas entre o grupo caucasóide e com uma frequência alélica de 0,6% (Rady et al, 2002).

No Brasil foi realizado um trabalho da prevalência desse polimorfismo em idosos de uma região do Estado de Santa Catarina (Persuhn

et al, 2006), por metodologia semelhante à aplicada em nosso trabalho, onde os autores reportam o encontro de 96,4% de homozigotos normais (genótipo GG), 3,64% de heterozigotos (genótipo GA) e nenhum homozigoto mutante (genótipo AA), o que fornecia 1,8% de frequência alélica referente ao mutante A.

Em nosso trabalho, a distribuição dos genótipos no estudo da mutação G1793A (**Tabela 9**) evidenciou na população total 90% de genótipo homozigoto normal, 5% para ambos genótipos heterozigotos e homozigotos mutantes.

A comparação realizada entre os grupos analisados evidenciou que os portadores e não portadores de DAC demonstraram, através do teste do qui-quadrado, diferenças estatísticas significativas em nível de 5% quando comparados com os doadores de sangue. Foi nossa opção realizarmos essa comparação entre os genótipos GG contra a soma dos genótipos GA e AA, considerando a presença do alelo mutante.

Os resultados permitem caracterizar uma associação entre os portadores dessa mutação, quer sejam portadores ou não portadores de DAC, com o aparecimento da DAC, mas a mesma pode ser considerada modesta, em vista de que os *odds ratio* forneceram, para ambos os grupos, resultados com diferenças estatisticamente não significativas.

As frequências dos alelos (**Tabela 10**) evidenciam que o alelo G é prevalente com relação ao alelo A (mutante) em todos os grupos analisados. A relação do G contra o A evidencia valores muito diferentes para cada grupo, pois, enquanto para os portadores de DAC o alelo A está 6,1 pontos com relação ao alelo G, para os sem DAC o alelo A está 9,0 vezes e para os doadores de sangue essa relação é de 49,0 pontos, apresentando um valor muito maior do alelo A para os portadores e não portadores de DAC.

As distribuições dos genótipos para essa mutação, quando os resultados eram observados com relação aos sexos, forneceram resultados do qui-quadrado e do odds ratio com diferenças estatísticas não significativas para o sexo masculino (**Tabela 11**). Para o sexo feminino os resultados observados não permitiam calcular esses índices (**Tabela 12**).

Análise dos quatro polimorfismos conjuntamente

A prevalência das mutações analisadas no presente trabalho (**Tabela 13**) permite afirmar que as mutações G1691A do gene do fator V da coagulação, G20210A do gene da protrombina, C677T do gene da MTHFR e G1793A do gene da MTHFR não podem ser usadas como um fator de risco independente para a DAC, pois apenas a mutação G1793A do gene da MTHFR demonstrou uma pequena tendência quanto a essa associação, sendo a mesma modesta e não comprovada por um teste estatístico que demonstraria uma razão das chances ou das possibilidades mais acertadamente.

A presença da DAC estaria então muito mais provavelmente associada a outros fatores de risco, tais como o fumo do cigarro, idade, sexo, hiperfibrinogenemia, diabetes e hipertensão, ou seja, não poderia ser somente uma simples interação entre influências ambientais em conjunto com outros fatores genéticos predisponentes.

Kim & Becker (2003) realizaram um excelente apanhado, utilizando pesquisa na literatura pertinente publicadas entre 1990 a 2002, sobre a existência ou não de associações entre o fator V de Leiden, a mutação G20210A da protrombina e da mutação C677T da MTHFR com eventos do sistema circulatório arterial (eventos vasculares periféricos, cerebrovasculares e coronários). Nessa análise conseguiu acompanhar os resultados de mais de 17.000 pacientes chegando à conclusão de que as anormalidades genéticas ligadas especificamente ao fator V, a protrombina e ao metabolismo da

homocisteína aumentam o risco para o infarto do miocárdio e para derrames isquêmicos particularmente entre pacientes com idade inferior a 55 anos e entre mulheres, considerando nessas últimas mais especificamente o fator V de Leiden e a mutação G20210A da protrombina. Consideram ainda que, como de um modo geral essas associações são somente modestas, os estudos de triagem deveriam ser limitados a grupos populacionais selecionados muito criteriosamente. Assinalam também que a propensão individual para trombooses arteriais e venosas está fortemente influenciada por diferentes mecanismos locais, mecanismos sistêmicos ou até mesmo por ambos.

Almawi e colaboradores (2004) analisaram 500 libaneses que foram estratificados em 96 pacientes que demonstraram DAC pela angiografia e 404 indivíduos que após exames laboratoriais, clínicos e história familiar, foram considerados saudáveis. Ambos os grupos eram constituídos por homens e mulheres e com faixa etária variando dos 26 aos 78 anos. Observaram que os valores das freqüências do fator V de Leiden e da G20210A eram similares entre pacientes e controle, enquanto o polimorfismo da C677T evidenciou diferença estatística significativa, com o genótipo TT significativamente elevado entre os pacientes comparados com o grupo controle.

Martinelli e colaboradores (2008) avaliaram o efeito combinado de dez variantes genéticas comuns e reconhecidas como apresentando um efeito, denominado pelos autores de modesto no balanço hemostático, e dentre elas, o fator V de Leiden e a mutação G20210A da protrombina. Analisaram 804 pacientes da região Norte da Itália e com condições socioeconômicas semelhantes, sendo que dentre estes, 489 passaram por angiografia e revelaram severa DAC, sem e com infarto do miocárdio. Os resultados permitiram concluir que esses polimorfismos não apresentam relação positiva com a DAC, destacando-se o fato de que nesse grupo analisado não

encontraram nenhum dos analisados com o genótipo AA para a mutação G20210A da protrombina.

Apesar dessas populações não apresentarem muita similaridade com a população brasileira, fica clara a quase inexistência de correlações entre os sistemas polimórficos analisados no presente trabalho e o estabelecimento da doença arterial coronariana. Por outro lado, fica sempre o questionamento do número de indivíduos analisados e portanto a necessidade de se analisar um maior e significativo número de amostras.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir:

1. A caracterização das mutações G1691A do gene do fator V da coagulação, G20210A do gene da protrombina, C677T do gene da MTHFR e G1793A do gene da MTHFR pela metodologia da amplificação do material genético (PCR), seguidas da restrição enzimática (RE), mostrou ser uma técnica rápida, de fácil realização e própria para a análise desses polimorfismos.
2. Fica clara a quase inexistência de correlações entre os sistemas polimórficos analisados no presente trabalho e o estabelecimento da doença arterial coronariana para uma amostra da população paulista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-AMERO, K.K.; WYNGAARD, C.A.; KAMBOURIS, M.; DZIMIRI, N.; Prevalence of the 20210 G → A prothrombin variant and its association with coronary artery disease in a Middle Eastern Arab population. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 126, p. 1087 – 1090, 2002.

ALMAWI, W.Y.; AMEEN, G.; TAMIM, H.; FINAN, R.R.; IRANI-HAKIME, N. factor V G1691A, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase [MTHFR] C677T gene polymorphism in angiographically documented coronary artery disease. **J. Thromb. Thrombol.**, vol. 17, p. 199 – 205, 2004.

ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F.; REITSMA, P.H. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. **Am. J. Hematol.**, vol. 49, p. 242 – 243, 1995.

ARRUDA, V.R.; SIQUEIRA, L.H.; CHIAPARINI, L.C., COELHO, O.R.; MANSUR, A.P.; RAMIREZ, A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Prevalence of the prothrombin gene variant 20210 G → A among patients with myocardial infarction. **Cardiovasc. Res.**, vol. 37, p. 42 – 45, 1998.

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. Very low incidence of Arg506→G in mutation in the factor V gene among Amazonian Indians and the Brazilian black population. **Thromb. Haemost.**, v. 75, p. 860-861, 1996.

BERTINA, R.M.; VAN TILBURG, N.H.; DE FOUW, N.J.; HAVERKATE, F. Thrombin, a link between coagulation activation and fibrinolysis. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 667, p. 239-248, 1992.

BOEHM, C.D. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. **Clin. Chem.**, v. 35, p. 1843-1848, 1989.

BOTTO, N.; ANDREASSI, M.G.; MANFREDI, S.; MASETTI, S.; COCCI, F.; COLOMBO, M.G.; STORTI, S.; RIZZA, A.; BIAGINI, A. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. **Eur. J. Hum. Genet.**, vol. 11, p. 671 – 678, 2003.

BRATTSTRÖN, L.; WILCKEN, D.E.L. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 15-323, 2000.

BRATTSTROM, I.; WILCHEN, D.E.; OHRVIK, J.; BRUDIN, L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. **Circulation**, vol. 98, p. 2520 – 2526, 1998.

BROWN, K.; LUDDINGTON, R.; WILLIAMSON, D.; BAKER, P.; BAGLIN T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. **Br. J. Haematol.**, vol. 98, p. 907 – 909, 1997.

BRUGADA, R.; MARIAN, A.J. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary

artery disease or myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 128, p. 107-112, 1997.

BURZOTTA, F.; PACIARONI, K.; DE STEFANO, V.; CHIUSOLO, P.; MANZOLI, A.; CASORELLI, I.; LEONE, A.M.; ROSSI, E.; LEONE, G.; MASERI, A.; ANDREOTTI, F. Increased prevalence of the G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without metabolic or acquired risk factors or with limited extend of disease. **Eur. Heart. J.**, vol. 23, p. 26 – 30, 2002.

CECIL, R. **Medicina interna básica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 323 – 353.

CHEITUN, M. D.; ZIPES, D.P. Doença cardiovascular no idoso. In: _____ BRAUNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. **Tratado de medicina cardiovascular**. 2 vols., 6ª ed., Rio de Janeiro:Editora Roca, 2003. p. 2091 – 2110.

CORRAL, J.; GONZALEZ-CONEJERO, R.; LOZANO, M.L.; RIVERA, J.; HERAS, I.; VICENTE, V. The venous trombosis risk factor 20210 A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. **Br. J. Haematol.**, v. 99, p. 304 – 307, 1997.

COULET, F.; GODARD, V.; VERDY, E.; SOUBRIER, F. Lack of association of the prothrombin gene variant G20210A with myocardial infarction in Caucasian males. **Thromb. Haemost.**, v. 83, p. 796 – 796, 2000.

CUNNING, A.M.; KEENEY, S.; SALDEN, A. BHAVNANI, M.; SHWE, K.H.; HAY, C.R. The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in UK

anticoagulant clinic populations. **Br. J. Haematol.**, vol. 93, p. 353 – 355, 1997.

DANG, Q.D.; VINDIGNI, A.; DI CERA, E. An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 5977-5981, 1995.

DEVLIN, M.T. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo:Edgard Blücher, 2003.

DOGGEN, C.J.; CATS, V.M.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. **Circulation**, v. 97, p. 1037 – 1041, 1998.

DÖNMEZ, Y.; KANADASI, M.; TANRIVERDI, K.; DEMIR, M.; DEMIRTAS, M.; ÇAYLI, M.; ALHAN, C.; BASLAMISLI, F. Prothrombin 20210GA and factor V Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. **Jpn. Heart J.**, vol. 45, p. 505 – 512, 2004.

DOUGLAS, P. S. Doença das artérias coronarianas em mulheres. In: _____ BRAUNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. **Tratado de medicina cardiovascular**. 2 vols., 6ª ed., Rio de Janeiro : Editora Roca, 2003. p. 2111 – 2115.

FERRARESI, P.; MARCHETTI, G.; LEGNANI, C.; CAVALLARI, E.; CASTILDI, E.; MASCOLI, F.; ARDISSINO, D.; PALARETI, G.; BERNARDI, F. The heterozygous 20210 GA prothrombin genotype is

associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, vol. 17, p. 2418 – 2422, 1997.

FLETCHER, O.; KESSLING, A.M. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? **Hum. Genet.**, v.103, p. 11-21, 1998.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.J.H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.J.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.**, v. 10, p. 111-113, 1995.

GAZIANO, J.M. Considerações gerais sobre doença cardiovascular. In: _____ BRAUNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. **Tratado de medicina cardiovascular**. 2 vols., 6ª ed., Rio de Janeiro : Editora Roca, 2003. p. 1 – 9.

GREENGARD, J.S.; SUN, X.; XU, X.; FERNANDEZ, J.A.; GRIFFIN, J.H.; EVATT, B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. **Lancet**, v. 343, p. 1361-1362, 1994.

GUERZONI, A.R.; PAVARINO-BERTELLI, E.C.; GODOY, M.F. DE; GRAÇA, C.R.; BISELLI, P.M.; SOUZA, D.R.S.; BERTOLLO, E.M.G. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and its association with coronary artery disease. **São Paulo Med. J.**, vol. 125, p. 4 - 8, 2007.

GUIMARÃES, D.A.M. **Avaliação da hemostasia, do perfil lipídico e de fatores genéticos predisponentes a trombofilia em mulheres em terapia de reposição hormonal (TRH)**. 2003. Tese (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

GUNDOGDU, F.; GULERTOP, Y.; PIRIM, I.; ARSLAN, S.; IKBAL, M.; ISLAMOGLU, Y.; AKSOY, H.; SENOCAK, H. G20210A prothrombin gene variant in Turkish patients with angiographically documented coronary artery disease. **J. Thromb. Thrombolysis**, v. 24, p. 255 – 259, 2007.

GUPTA, N.; KHAN, F.; TRIPATHI, M.; SINGH, V.P.; TEWARI, S.; RAMESH, V.; SINHA, N.; AGRAWAL, S. Absence of factor V Leiden (G1691A) mutation, FII G20210A allele in coronary artery disease in North India. **Indian J. Med. Sci.**, v. 57, p. 535-542, 2003.

HASHIMOTO, K.; SHIZUSAWA, Y.; SHIMOYA, K.; OHASHI, K.; SHIMIZU, T.; AZUMA, C.; MURATA, Y. The factor V Leiden mutation in Japanese couples with recurrent spontaneous abortion. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1872-1874, 1999.

HEEB, M.J.; KOJIMA, Y.; GREENGARD, J.S.; GRIFFIN, J.H. Activated protein C resistance: molecular mechanisms based on studies using purified Qln506-factor V. **Blood**, v. 85, p. 3405-3411, 1995.

HEZARD, N.; CORNILLET, P.; DROULLE, C.; GILLOT, L.; POTRON, G, NGUYEN, P. Factor V Leiden: detection in whole blood by ASA PCR using

and additional mismatch in antepenultimate position. **Tromb. Res.**, 88: 59 – 66, 1997.

HILLARP, A.; ZOLLER, B.; SVENSSON, P.J.; DAHLBACK, B. The 20210 A allele of the prothrombin gene in a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. **Thromb. Haematol.**, vol. 78, p. 990 – 992, 1997.

JACKSON, C.M. Physiology and biochemistry of prothrombin. In: _____ BLOOM, A.L.; FORBES, C.D.; THOMAS, D.P.; TUDDENHAM, E.G.D. (eds): **Haemostasis and Thrombosis**. Edinburgh, UK:Churchill Livingstone, 1994. p. 397.

KALAFATIS, M.; BERTINA, R.M.; RAND, M.D.; MANN, K.G. Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 4053-4057, 1995.

KANG, S.S.; ZHOU, J.; WONG, P.W.K.; KOWALISYN, L.; STROKOSCH, G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 43, p. 414-421, 1988.

KIM, R.J.; BECKER, R.C. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: A meta-analysis of published studies. **Am. Heart J.**, v. 146, p. 948-957, 2003.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.C.; FERNANDES, A.P.; SABINO, A.P.; LOURES-VALE, A.A.; FONSECA NETA, C.P. da; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J.A.; SOUZA, M.O. Homocisteína e metilenotetrahidrofolato redutase em indivíduos submetidos à angiografia coronariana. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, p. 167 - 172, 2007.

LOTUFO, P.A.; LOLIO, C.A. Coronary heart disease mortality trends in São Paulo, Brazil. **CVC Epidemiol. Newsletter**, v. 49, p. 150-151, 1994.

LUZ, P.L.; SOLIMENE, M.C. Peculiaridades da doença arterial coronária na mulher. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, v. 45, p. 45 – 54, 1999.

MANSUR, A.P. Análise do componente genético da doença coronariana. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 74, p. 531 – 533, 2000.

MAO, R.; FAN, Y.; CHEN, F.; SONGBIN, F. Genetic polymorphism of MTHFR G1793A in Chinese populations. **European Journal of Epidemiology**, v. , p. , 2008.

MARIAN, A.J. Genetic markers: genes involved in atherosclerosis. **J. Cardiovasc. Risk**, v. 4, p. 333-339, 1997.

MARTINELLI, N.; TRABETTI, E.; PINOTTI, M.; OLIVIERI, O.; SANDRI, M.; FRISO, F.; BOZZINI, C.; CARUSO, P.P.; CAVALLARI, U.; CHENG, S.; PIGNATTI, P.F.; BERNARDI, F.; CORROCHER, R.; GIRELLI, D. Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients with advanced coronary atherosclerosis. **PLoS ONE**, vol 3, e1523, p. 1 – 8, 2008.

NICOLAES, G.A.; TANS, G.; THOMASSEN, M.C.; HEMKER, H.C.; PABINGER, I.; VARADI, K.; SCHWARZ, H.P.; ROSING, J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 21158-21166, 1995.

PERSUHN, D.C.; SACKL, D.; SCHUTZ, T.L.; MELO, S.S. Prevalência do polimorfismo G1793A da metilenotetrahidrofolato redutase em idoso – Itajaí, (SC). *Rev. Bras. An. Clin.*, vol. 38, p. 47 – 5-, 2006.

POORT, S.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, v. 88, p. 3698-3703, 1996.

PYERITZ, F.E. Genética e doença cardiovascular. In: _____ BRAUNWALD, E.; ZIPES, D.P.; LIBBY, P. **Tratado de medicina cardiovascular**. 2 vols., 6ª ed., Rio de Janeiro : Editora Roca, 2003. p. 2047 – 2090.

RADY, P.L.; SZUCS, S.; GRADY, J.; HUDNALL, S.D.; KELLNER, L.H.; NITWSKY, H.; TYRING, S.K.; MATALON, R.K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. **Am. J. Med Genet.**, v. 107, p. 162-168, 2002.

RAMOS, C.P.S.; CAMPOS, J.F.; MELO, F.C.B.C.; NEVES, W.B. das; SANTOS, M.E. dos; ARAUJO, F.A.; MELO, R.A.M. Frequência do fator V

Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, vol. 28, p. 131 – 134, 2006.

RESS, D.C.; COX, M.; CLEGG, J.B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, v. 346, p. 1133-1134, 1995.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; MILETICH, J.P. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. **Circulation**, v. 99, p. 999 – 1004, 1999.

ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J.; ZIVELIN, A.; ARRUDA, V.R.; AIACH, M.; SISCOVICK, D.S.; HILLARP, A.; WATZKE, H.H.; BERNARDI, F.; CUMMING, A.M.; PRESTON, F.E.; REITSMA, P.H. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 706-708, 1998.

ROSING, J.; HOEKEMA, L.; NICOLAES, G.A.; THOMASSEN, M.C.; HEMKER, H.C.; VARADI, K.; SCHWARZ, H.P.; TANS, G. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va R506Q by activated protein C. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 27852-27858, 1995.

RUSSO, C.; GIRELLI, D.; OLIVIERI, O., GUARANI, P.; MANZATO, F.; PIZZOLO, F.; ZAIA, B.; MAZZUCCO, A.; CORROCHER, R. G20210A prothrombin gene polymorphism and protrombin activity in subjects with or without angiographically documented coronary artery disease. **Circulation**, v. 103, p. 2436 – 2440, 2001.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T.; KANE, E.; ROMAN, E; ROLLINSON, S.; CARTWRIGHT, R.A.; MORGAN, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **PNAS**, v. 96, p. 12810-12815, 1999.

SMANIO, O. Doença cardiovascular em mulheres diabéticas assintomáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 305 – 311, 2007.

SOARES, A.I.; SOUZA, M.O.; LASMAR, M.C.; GACIA, M.L.; NOVELLI, B.A.; LAGES, G.F.G.; CARDOSO, J.E.; DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; FERNANDES, A.P.; CARVALHO, M.G. Avaliação da incidência das mutações G1691A no gene do fator V (fator V Leiden) e G20210A no gene da protrombina em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, vol. 27, p. 192 – 196, 2005.

SYKES, T.C.F.; FEGAN, C.; MOSQUERA, D. Thrombophilia, polymorphisms and vascular disease. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, v. 53, p. 300-3006, 2000.

ZAK, I.; NIEMIEC, P.; SARECKA, B.; BALCERZYK, A.; CIEMNEWSKI, Z.; RUDOWSKA, E.; DYLAG, S. Carrier-state of D allele in ACE gene insertion/deletion polymorphism is associated with coronary artery disease, in contrast to the C667→T transition in the MTHFR gene. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 527-539, 2003.

ZIVELIN, A.; GRIFFIN, J.H.; XU, X.; PABINGER, I.; SAMAMA, M.; CONARD, J.; BRENNER, B.; ELDOR, A.; SELIGSOHN, U. A single

genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. **Blood**, v. 89, p. 397-402, 1997.

WALTON, K.G.; SCHNEIDER, R.H.; NIDICH, S. Review of controlled research on the transcendental meditation program and cardiovascular disease. Risk factors, morbidity, and mortality. **Cardiology in Review**, v. 12, p. 262-266, 2004.

WATZKE, H.H.; SCHUTTRUMPF, J.; GRAF, S.; HUBER, K.; PANZER S.; Increased prevalence of a polymorphism in the gene coding for human prothrombin in patients with coronary heart disease. **Thromb. Res.**; vol. 87, p. 521 – 526, 1997.

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG
_____, estado civil _____, idade ____
anos, residente na _____, nº _____, bairro
_____, cidade _____,
telefone _____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade verificar a associação de mutações genéticas com doença arterial coronariana;
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para o estabelecimento da distribuição de marcadores reconhecidos no diagnóstico laboratorial da doença arterial coronariana;
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico: sangue;
4. Não corro nenhum risco ao participar dessa pesquisa, sendo que possível pequeno desconforto será decorrente do processo da coleta de sangue, considerando a sensibilidade pessoal;
5. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis, assegurando a minha proteção;

6. Deverei voltar ao laboratório todas as vezes que houver solicitação dos pesquisadores desse projeto;
7. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
8. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros portanto, não cabe indenização;
9. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado dos resultados dessa pesquisa;
10. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (0XX16) 3301-6545 (Araraquara).

São José do Rio Preto, _____ de _____ de 200_____.

Assinatura do voluntário

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)