

Artigo / Article

Discriminação alélica do fator V da coagulação por PCR em tempo real: diagnóstico simples e preciso

Allelic discrimination of coagulation factor V by real time PCR: a simple and accurate diagnosis

Aldemir B. Oliveira Filho¹Júlia F. Campos²Magaly B. P. L. V. Lima³Farida C. B. C. Melo³Washington B. Neves⁴Raul A. M. Melo⁵José Alexandre R. Lemos⁶

Dentre as doenças cardiovasculares, a trombose venosa (TV) destaca-se pela associação entre fatores de riscos adquiridos e fatores genéticos. A resistência hereditária à proteína C ativada tem sido identificada como a principal causa dos casos de trombose venosa, sendo frequentemente associada à mutação fator V Leiden (G1694A). Em indivíduos homocigotos, o risco de trombose venosa é 50 a 100 vezes maior que em pacientes homocigotos normais, enquanto em pacientes heterocigotos o risco é de 5 a 10 vezes. Baseado na necessidade de avaliação e acompanhamento de pacientes com casos de trombose venosa e prevenção de seus respectivos familiares, foi desenvolvido um método simples de discriminação alélica do fator V da coagulação utilizando PCR em tempo real. Foram selecionados 67 pacientes com histórico de TV e 51 indivíduos sem histórico de TV. Primeiramente, a discriminação alélica do fator V foi realizada através de PCR convencional seguida de digestão enzimática (Mnl). Posteriormente, o diagnóstico foi realizado por PCR em tempo real. Ambos os métodos foram baseados no polimorfismo G1691A, sendo no segundo utilizado fluoróforos VIC e FAM para marcar os nucleotídeos G e A, respectivamente. A técnica de PCR-RFLP foi utilizada para diagnosticar 95 indivíduos homocigotos normais, 21 heterocigotos e 2 homocigotos FVL. Utilizando PCR em tempo real foram obtidos os mesmos resultados. A máxima similaridade entre os resultados obtidos por PCR em tempo real e PCR-RFLP indicou precisão significativa do novo método de discriminação e visualização alélica do fator V. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(1):25-28.

Palavras-chave: Trombose venosa; fator V Leiden; PCR em tempo real.

Introdução

Mundialmente, as doenças trombóticas constituem um problema de saúde de origem multifatorial e multigênica. As trombozes são caracterizadas pela formação aguda de trombos em veias e artérias. Dentre as doenças cardiovasculares, a trombose venosa (TV) destaca-se pela asso-

ciação entre fatores de riscos adquiridos, como imobilização prolongada, cirurgias, fraturas, gestação, etc, e fatores genéticos, mutações nos genes da proteína C, proteína S e antitrombina III.^{1,2,3}

A resistência hereditária à proteína C ativada (RPCA) tem sido identificada como a principal causa da maioria dos casos de trombose venosa, 95% dos casos de RPCA estão

¹Biomédico.

²Bióloga, Fundação Hemope.

³Farmacêutica-Bioquímica, Fundação Hemope.

⁴Químico, Fundação Hemope.

⁵Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco.

⁶Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará e Pesquisador convidado da Fundação Hemopa.

Correspondência: José Alexandre R. Lemos

Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Pará, Hemopa.

Travessa Padre Eutíquio, 2109 – Batista Campos

66033-000 – Belém-PA – Brasil

Email: alexandre.lemos@me.com

associados à mutação pontual G1691A no exon 10 do gene do fator V da coagulação, o fator V Leiden (FVL).^{4,5} Esse polimorfismo não-sinonímico causa a perda da clivagem do fator V, gerando um quadro de hipercoagulopatia e, conseqüentemente, aumentando o risco de trombose venosa.^{3,6} Em indivíduos homozigotos FVL, o risco de trombose venosa é cinquenta a cem vezes maior que em pacientes homozigotos normais, enquanto em pacientes heterozigotos o risco é de cinco a dez vezes.⁶ As maiores incidências de FVL são detectadas em países europeus.⁷ No Brasil, diversas pesquisas indicaram que a frequência do FVL poderia variar de 1,6% a 2,6%.^{8,9,10} Entretanto, tal incidência torna-se maior na população do estado de Pernambuco (13,3%), sendo evidenciada a potencialização do risco de TV através da associação FVL e genótipo sanguíneo não-O.^{11,12}

Baseado na necessidade de avaliação e acompanhamento de pacientes com casos de trombose venosa e prevenção de seus respectivos familiares, este trabalho demonstrou um modelo simples e preciso de discriminação alélica do fator V da coagulação (G1691A) utilizando PCR em tempo real.

Este estudo foi constituído por 67 pacientes com histórico de TV e 51 indivíduos sem histórico de tal evento, ambos os grupos atendidos pelo Ambulatório de Doenças Trombóticas do Hospital da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope). Foram coletados de cada participante 3-5 mL de sangue em tubo estéril (Vacutainer) contendo ácido etileno-diamino tetracético (EDTA), sendo posteriormente extraído o DNA utilizando-se o kit comercial DNA GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante. Como experimento controle para discriminação alélica do fator V foi utilizado PCR-RFLP seguindo o protocolo de Ramos.¹⁰ A digestão originou fragmentos de 120 e 42 pb quando G estava presente na posição 1691 (alelo normal), enquanto a substituição G A (alelo mutado, FVL) resultou em fragmentos de 162 pb para os portadores homozigotos e fragmentos de 162, 120 e 42 pb para os portadores heterozigotos para a mutação, resultado da perda do sítio de clivagem pela enzima *MnlI*.

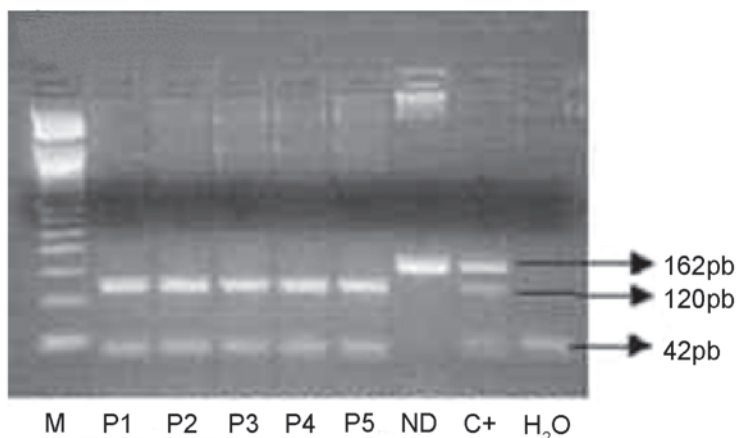


Figura 1

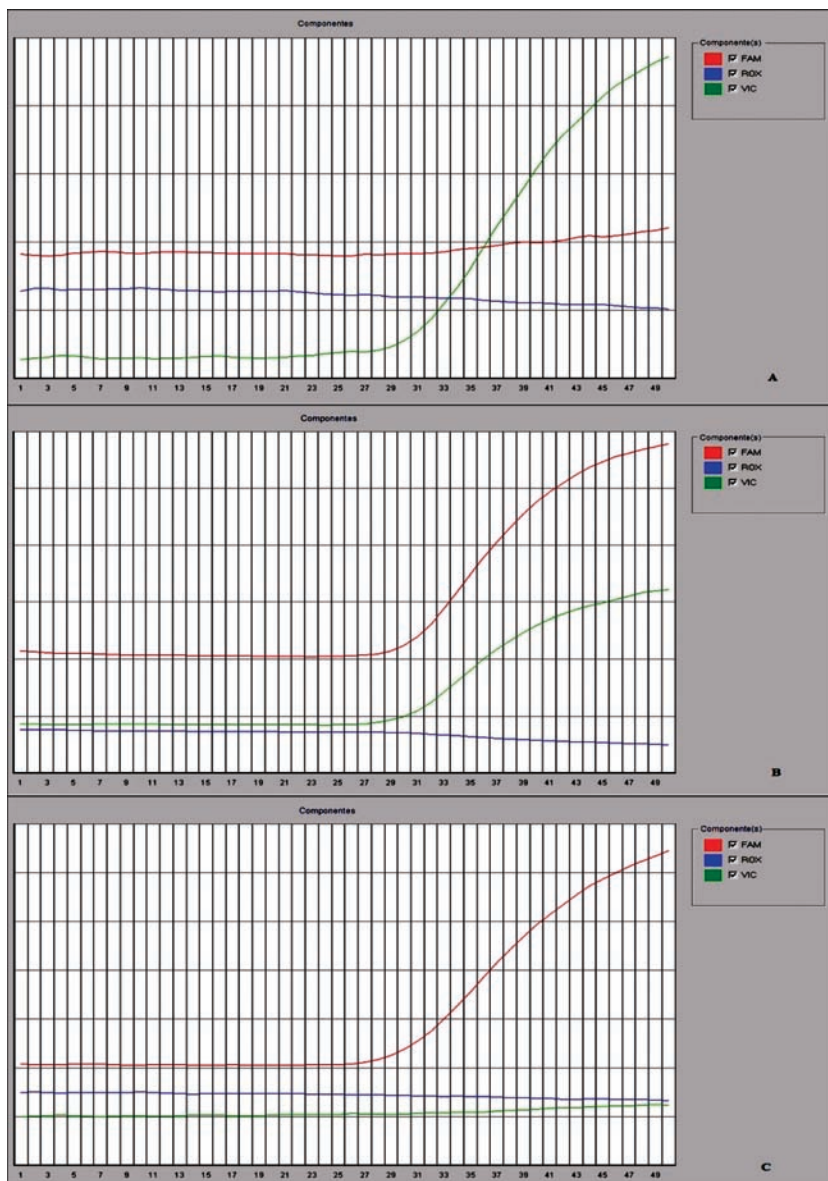


Figura 2

Por outro lado, a discriminação alélica do fator V por PCR em tempo real foi realizada utilizando aparelho ABI Prism 7000 e kit comercial TaqMan Universal PCR Master Mix, ambos da Applied Biosystems. Cada reação foi constituída de 12,5 µL de tampão universal PCR master mix 2x, 0,5 µL (10mM) da solução contendo iniciadores (5'-CTGGGCTAATAGGACTACTT CTAATCTGT-3' e 5'-CATGTTCTAGCCAGAAGAAATTCTCAGA-3') e sondas alelo-específico (VIC-AGGCGAGGA ATAC-MGB e FAM-CAGGCAAGGAATAC-MGB), 9,0 µL de água deionizada e 3 µL de amostra de DNA. A amplificação foi feita utilizando a seguinte ciclagem: 50°C/2 min, 95°C/10 min e 50 ciclos de 95°C/15 s e 60°C/1 min. A mistura contendo iniciadores e sondas foi sintetizada por encomenda à empresa Applied Biosystems. A discriminação alélica do fator V por PCR em tempo real foi baseada no polimorfismo nucleotídico único G1691A, sendo utilizado fluoróforos VIC e FAM para marcar os nucleotídeos G (alelo normal) e A (alelo mutado, FVL), respectivamente.

Por PCR-RFLP foram diagnosticados 95 indivíduos homozigotos normais, 21 heterozigotos e 2 homozigotos FVL (Figura 1). Utilizando-se PCR em tempo real foram obtidos resultados idênticos (Figura 2). A máxima similaridade entre os diagnósticos obtidos pelos dois métodos (PCR em tempo real e PCR-RFLP) indicaram precisão significativa do novo experimento de discriminação alélica do fator V da coagulação.

A detecção do fator V Leiden por PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan foi baseada na hibridização de oligonucleotídeo alelo-específico com diferenciação de uma única base (G→A), sendo a identificação alélica realizada a partir de curva de utilização dos respectivos oligos durante a reação em cadeia da polimerase (Figura 2). Happich¹³ e Barrach¹⁴ também desenvolveram metodologias para discriminação alélica do fator V da coagulação baseadas na mutação G1691A utilizando PCR em tempo real e PCR-RFLP, respectivamente. Entretanto, a performance da nossa metodologia reduziu o tempo de análise, eliminou etapas laboriosas de pós-PCR e facilitou demasiadamente a visualização do resultado sem alterar a precisão do diagnóstico. Sendo que, para estabelecer as condições de detecção do experimento foi necessário somente ajustar as concentrações dos iniciadores e dos oligonucleotídeos alelo-específicos compatíveis com a amplificação do fragmento alvo. Não houve a necessidade de alterar qualquer outro parâmetro da reação. Além disso, contrastando com a PCR-RFLP,¹⁴ a detecção de ambos os alelos foi realizada numa única etapa e num único tubo, fato que reduziu potencialmente o risco de contaminação por produto de PCR, haja vista que o diagnóstico é realizado numa única etapa sem a necessidade de abertura de tubos para análise de produto de PCR.

Nossa metodologia ainda apresenta a vantagem de discriminar alelos sem necessitar de formação dos agrupamentos homozigoto normal, heterozigoto e homozigoto FVL

utilizada por Happich,¹³ o diagnóstico é individualizado e visualizado através das curvas de utilização dos oligonucleotídeos marcados com fluorescência. Em suma, este trabalho mostrou que a discriminação e a visualização alélica do fator V por PCR em tempo real pode ser realizada por um método simples, preciso e seguro contra possível contaminação.

Abstract

Among cardiovascular diseases, venous thrombosis is important due to the association between acquired and genetic risks factors. Hereditary resistance to activated protein C has been identified as the main cause of venous thrombosis, and is frequently associated to the factor V Leiden mutation (G1694A). In homozygotic individuals, the risk of venous thrombosis is 50 to 100 times higher than in normal patients, while in heterozygotic patients the risk is 5 to 10 times higher. Based on the need of evaluation and follow up of patients with venous thrombosis and prevention in their respective families, a simple method of allelic discrimination of coagulation V factor was developed using real time PCR. Sixty-seven patients with a history of venous thrombosis and 51 individuals without venous thrombosis were selected for this study. First, identification of the factor V allele was achieved through conventional PCR followed by enzymatic digestion (Mnl). Subsequently, diagnosis was attained by real time PCR. Both the methods investigated the G1691A polymorphism using VIC and FAM fluorophores to mark nucleotides G and A, respectively. By PCR-RFLP, 95 individuals were diagnosed as normal homozygotes, 21 as heterozygotes and 2 as homozygotic factor V Leiden individuals. The same results were obtained using real time PCR. Maximum similarity between the results of real time PCR and PCR-RFLP indicates high precision of the new method for allelic identification and visualization of factor V Leiden. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(1):25-28.

Key words: Venous thrombosis; factor V Leiden; real time PCR.

Referências Bibliográficas

- Bertina RM. Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):601-9.
- Kalafatis M, Mann KG. Factor V Leiden and thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(4):620-7.
- Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000;95(5):1517-32.
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369 (6475): 64-7.
- de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood.* 1999;93(4):1271-6.
- Dahlbäck B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1995; 74(1): 139-48.

7. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27(2):362-7.
8. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *Am J Hematol.* 1995;49(3):242-3.
9. Franco RF, Elion J, Santos SEB, Araújo AG, Tavella MH, Zago MA. Heterogeneous ethnic distribution of the factor V Leiden mutation. *Genet Mol Biol.* 1999;22(2):143-5.
10. Yoshioka FKN, Araújo AG, Tavella MH, Hamoy IG, Guerreiro JF. Prevalence of hereditary risk factors for thrombophilia in Belém, Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol.* 2006;29(1):38-40.
11. Ramos CPS, Campos JF, Melo FCBC, Neves WB, Santos ME, Araújo FA, et al. Frequência do fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006;28(2):131-4.
12. Lima MPBLV, Oliveira Filho AB, Campos JF, Melo FCBC, Neves WB, Magalhães MG, et al. Risco significativo de trombose venosa em portadores dos genótipos fator V Leiden e grupo sanguíneo não-O em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007;29(Suppl.3):99.
13. Happich D, Schwaab R, Hanfland P, Hoernschemeyer D. Allelic discrimination of factor V Leiden using a 5' nuclease assay. *Thromb Haemost.* 1999 Oct;82(4):1294-6.
14. Barrach FH, Pardini MIMC, Sales MM, Maffei FHA, Machado PEA. Detecção de mutação no gene do fator V (fator V Leiden) em pacientes com trombose venosa. *J Bras Patol Med Lab.* 2001; 37(2):88-92.

Suporte Financeiro: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Pará, Hemopa.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 17/06/2008

Aceito: 16/09/2008