



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA**

ANALICE MARQUES MOREIRA

**INFLUÊNCIA DO FATOR V DE LEIDEN E DA MUTAÇÃO
G20210A NO GENE DA PROTROMBINA NO
DESENVOLVIMENTO DE EVENTOS TROMBÓTICOS NO
MUNICÍPIO DE FORTALEZA**

**FORTALEZA
2008**

ANALICE MARQUES MOREIRA

**INFLUÊNCIA DO FATOR V DE LEIDEN E DA MUTAÇÃO
G20210A NO GENE DA PROTROMBINA NO
DESENVOLVIMENTO DE EVENTOS TROMBÓTICOS NO
MUNICÍPIO DE FORTALEZA**

**Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia, do
Departamento de Patologia e Medicina Legal
da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em Patologia.**

**Orientadora: Prof. ^a Dr. ^a Silvia Helena Barem
Rabenhorst**

**FORTALEZA
2008**

M836a Moreira, Analice Marques

Influência do fator V de Leide e da mutação G20210A no gene de proyrombina no desenvolvimento de eventos trombóticosno município de Fortaleza / Analice Marques Moreira – Fortaleza, 2008.

104 f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Curso de Pós Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

1. Trombose. 2. Protrombina. 3. Fator V. I. Rabenhorst, Silvia Helena (orient.). II. Título.

CDD 616.145

ANALICE MARQUES MOREIRA

**INFLUÊNCIA DO FATOR V DE LEIDEN E DA MUTAÇÃO
G20210A NO GENE DA PROTROMBINA NO
DESENVOLVIMENTO DE EVENTOS TROMBÓTICOS NO
MUNICÍPIO DE FORTALEZA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em: 05/09/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof.^a Dr.^a Maria Inês de Moura Campos Pardini
Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP

Prof.^o Dr.^o Herivaldo Ferreira da Silva
Médico Hematologista do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
(HEMOCE)

Prof.^o Dr.^o Emmerson Sousa Eulálio
Médico Hematologista do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
(HEMOCE)

Esse trabalho foi realizado com o apoio do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE, Hemocentro de Botucatu – UNESP-SP e do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará-UFC.

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e familiares, pela participação fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Sílvia Helena Barem Rabenhorst pela dedicação, companheirismo, facilidade de resolução e presença constante como orientadora.

À Prof.^a Dr.^a Maria Inês de Moura Campos Pardini, pelo apoio e suporte dado ao projeto.

À Prof.^a Dr.^a Maria Helena da Silva Pitombeira, pelos ensinamentos e sugestões.

Aos diretores do HEMOCE pelo apoio no decorrer deste trabalho.

À Dr.^a Rosângela de Albuquerque Ribeiro, pelo encaminhamento dos pacientes para análise laboratorial.

À Paula da Paz Palácio, Secretária do Mestrado, pelo seu apoio e orientações no decorrer do curso.

Aos funcionários do HEMOCE, pela ajuda prestada.

Aos meus amigos do curso de mestrado, por compartilharem momentos importantes.

Ao amigo de bancada e luta, Marcelo Nunes pela dedicação e estimável ajuda no decorrer deste estudo.

A toda a equipe do LABGEM, Laboratório de Genética Molecular, o meu muito obrigada.

RESUMO

As doenças trombóticas constituem um sério problema de saúde pública. Diversas desordens hereditárias e ambientais, que afetam o sistema fisiológico anticoagulante, estão atualmente estabelecidas como fatores de risco para a ocorrência do evento trombótico. Dentre os fatores hereditários, as mutações G1691A do gene do fator V e G20210A do gene da protrombina são os mais freqüentes. A associação entre estas alterações genéticas e a ocorrência de eventos trombóticos desencadeou o desenvolvimento de diversas pesquisas. Neste estudo, 189 pacientes portadores de eventos trombóticos, atendidos no ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE/SESA/UFC, foram analisados para a detecção da presença das mutações G1691A do gene do fator V e G20210A do gene da protrombina. O grupo controle consistiu de 349 voluntários. A freqüência encontrada na população controle foi de 2% (7/349) para a mutação do fator V e 1,7% (6/349) para a mutação da protrombina, enquanto que nos pacientes trombofílicos a freqüência destas mutações foi de 9% (17/189) e 2,1% (4/349), respectivamente. Dentre os fatores hereditários, apenas a mutação do fator V foi significativa ($p < 0,001$). Considerando os fatores ambientais de risco, o tabaco, idade ≥ 40 anos e sexo feminino apresentaram significância estatística ($p < 0,001$). Os riscos foram estimados em análises pareadas e não pareadas para o fator V de Leiden (4,8; 5,3; 9,8), tabaco (17,6; 14,9; 33,3), idade ≥ 40 anos (2) e sexo feminino (3,7 e 4,1). Os fatores de risco para eventos trombóticos no Ceará foram tabagismo, idade ≥ 40 anos, sexo feminino, e a mutação G1691A do fator V foram associados com o desenvolvimento de trombose no estado do Ceará.

Palavras-chaves: Fator V Leiden, mutação G20210A do gene da protrombina, trombose

ABSTRACT

Thrombotic diseases are a serious problem for public health. Several hereditary and environmental factors, that affect physiological anticoagulant system, have been nowadays well established as risk factors for thrombosis. Among hereditary factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation are the most frequent. The association between several modifications on factor V gene and prothrombin gene in the development of thrombotic events has brought about future searches. In this study, 189 patients with thrombosis attended at the Hematology and Hemotherapy Center of Ceará state –HEMOCE/ Brazil, were analyzed to find out the presence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation. The control group was made up 349 healthy volunteers. In this study, the frequency found of factor V Leiden the control population was of 2% (7/349) and in the patients was 9% (17/189) while the frequency found of prothrombin G20210A mutation the control population was of 1,7% (6/349) and in the patients was 2,1% (4/189). Among hereditary factors only factor V Leiden was significant statistic ($p < 0,001$). Among environmental factors studied, tabagism, age ≥ 40 anos and female were significant statistic ($p < 0,001$). The ODDS RATIO of the risk factors with significant statistic were factor V de Leiden (4,8; 5,3; 9,8), tabaco (17,6; 14,9; 33,3), age ≥ 40 years old (2) and female (3,7 e 4,1). Our results demonstrate that factor V Leiden, tabagism, age ≥ 40 years old and female were associated with development trombosis in Ceará.

Key words: factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation, thrombosis.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 - Contato entre as plaquetas e o endotélio danificado. Adesão, agregação plaquetária e ativação do mecanismo de coagulação.....	20
Figura 2 - Cascata da coagulação. Iniciada quando o sangue é exposto a uma superfície carregada negativamente (via intrínseca) ou exposto ao fator tecidual (via extrínseca).....	23
Figura 3 - Sistema da proteína C ativada. A ligação da trombina (IIa) ao receptor endotelial trombomodulina (TM) modifica as propriedades da trombina, transformando-a em um potente anticoagulante, por ativar a PC, que, juntamente com seu cofator (PS), inativa os fatores VIIIa e Va, suprimindo a gênese de trombina. EPCR: “endothelial PC receptor” (receptor endotelial da PC).....	25
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do fator V: a) fator V com seus domínios A1,A2,A3,B,C1,C2 b) fator V ativado e sem o domínio B c) fator V inativado e sem o domínio A2.....	28
Figura 5 - Representação esquemática do gene da protrombina e o local da mutação G20210A.....	31
Figura 6 - Esquema ilustrando a perda do sítio de restrição da enzima <i>MnII</i> em consequência da mutação de ponto do fator V Leiden.....	41
Tabela 7 - Representação de freqüências das mutações do fator V e protrombina em pacientes com trombose em diversas regiões do mundo.....	41
Figura 8 - Esquema ilustrando o sítio de restrição da enzima <i>Hind III</i> em consequência da mutação de ponto do gene da protrombina.	42
Figura 9 - Representação geográfica mundial do FV de Leiden e da mutação G20210A no gene da protrombina em pacientes (cor vermelha) e população (cor azul) (dados contidos nas tabelas 6 e 7).....	61

LISTA DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1- Distribuição dos pacientes quanto ao gênero.....	46
Gráfico 2- Distribuição do grupo controle quanto ao gênero.....	46
Gráfico 3- Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária.....	47
Gráfico 4- Distribuição do grupo controle quanto a faixa etária.....	47
Gráfico 5- Distribuição dos pacientes quanto à cor.....	48
Gráfico 6- Distribuição do grupo controle quanto á cor.....	48
Gráfico 7- Distribuição da freqüência do uso do tabaco nos pacientes e no grupo controle.....	49
Gráfico 8- Distribuição da freqüência do uso ACO nas pacientes e no grupo controle.....	49
Gráfico 9- Distribuição dos pacientes quanto à presença da mutação do FVL.....	50
Gráfico 10- Distribuição do grupo controle quanto à presença do FVL	50
Gráfico 11- Freqüência da mutação do fator II nos pacientes com trombose..	51
Gráfico 12- Freqüência da mutação do fator II na população controle.....	51

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 - Constituintes da fumaça do cigarro.....	34
Tabela 2 - Representação dos eventos trombóticos em pacientes trombofílicos.....	45
Tabela 3 - Representação dos eventos trombóticos relacionados com as mutações do fator V e da protrombina.....	52
Tabela 4 - Representação das características dos pacientes e população controle portadores das mutações do fator V e da protrombina.....	54
Tabela 5 - Análise univariada e multivariada do estudo caso-controle.....	55
Tabela 6 - Representação de freqüências das mutações do fator V e protrombina em populações de diversas regiões do mundo.....	63
Tabela 7 - Representação de freqüências das mutações do fator V e protrombina em pacientes com trombose em diversas regiões do mundo.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Fator V de Leiden (FVL)
AT III: Antitrombina III
TFPI: Inibidor da Via do Fator Tissular
PC: Proteína C
PS: Proteína S
PCA: Proteína C Ativada
Fator de von Willebrand (vWF)
GPIb (glicoproteína Ib)
GPIIb/IIIa (glicoproteína GPIIb/IIIa)
tromboxane A₂(TA₂)
adenosina difosfato (ADP)
μ-PA: Ativador Uroquinase de Plasminogênio
t-PA: Ativador Tissular de Plasminogênio
RPCA: Resistência à Proteína C Ativada
MTHFR: Metileno Tetrahydrofolato Redutase
ZPI: Inibidor Protease Proteína Z Dependente
fibrinogênio (fator I)
protrombina (fator II)
fator tecidual (FT) ou tromboplastina (fator III)
íon cálcio (fator IV)
proacelerina ou fator lábil (fator V)
proconvertina (fator VII)
fator anti-hemolítico (fator VIII)
fator Christmas (fator IX)
fator Stuart –Prower (fator X)
precursor da tromboplastina plasmática (fator XI)
fator de Hageman (fator XI)
fator estabilizador da fibrina (fator XIII)
fator de Fletcher (precalicreina)
cininogênio de alto peso molecular (HMWK)
Fator Xa: Fator X Ativado

Fator Va: Fator V Ativado

Fator VIIIa: Fator VIII Ativado

Terapia de Reposição Hormonal (TRH)

Metileno Tetrahydrofolato Redutase (MTHFR)

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

RFLP: Fragmentos de Restrição com Polimorfismo de Comprimento

pb: pares de bases

TVP: Trombose Venosa Profunda

AVC: Doença Vasculiar Cerebral Isquêmica

EP: Embolia Pulmonar

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

TP: Trombose Portal

TVM: Trombose da Veia Mesentérica

TVR: Trombose da Veia Retina

TR : Trombose Renal

CO: Contraceptivo Oral

MI: Membro Inferior

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Fisiologia da Coagulação.....	19
Hemostasia Primária.....	19
Hemostasia Secundária.....	21
Via Extrínseca.....	22
Via Intrínseca.....	23
Mecanismo Reguladores da Coagulação.....	24
Fibrinólise.....	25
1.2 Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Trombose Venosa....	26
Antitrombina.....	26
Fator V Leiden.....	28
Outras Alterações do Fator V.....	30
Fator V Hong Kong,Fator V Cambridge e Haplótipo HR2	30
Protrombina.....	31
1.3 Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Trombose Arterial....	32
Mutação no Gene da Enzima Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR).....	32
Tabaco.....	32
Anticoncepcionais Orais (ACO).....	36
1.4 Importância da Pesquisa dos Fatores Hereditários.....	36
2 OBJETIVOS.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
Processamento do Sangue.....	39
Análise Genética.....	40
Fator V de Leiden.....	40
Mutação G20210A do Gene da Protrombina.....	42
Análise Estatística.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Eventos Trombóticos.....	44
4.2 Pacientes e População – Características Epidemiológicas.....	45
4.3 Pacientes e População – Mutações.....	50

4.4 Características dos Pacientes – Mutados.....	52
4.5 Estudo Caso-Controle.....	54
5 DISCUSSÃO.....	56
Pacientes e População – Fatores Epidemiológicas e Clínicos.....	56
Fator V de Leiden e Mutação G20210A da Protrombina	59
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

As doenças trombóticas constituem um sério problema de saúde pública. Estima-se que o tromboembolismo venoso ocorre em cerca de uma a cada 1000 pessoas por ano, sendo considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade nas sociedades ocidentais (REZENDE, 1999; BARRACH, 2000). Acometem especialmente, doentes hospitalizados expostos a situações de risco, entre os quais se destacam os procedimentos cirúrgicos abdominais, ortopédicos e ginecológicos. (GILLUM, 1987; MAFFEI, 1987; ANDERSON *et al.*, 1991; NORDSTRÖM *et al.*, 1992; SILVERSTEIN *et al.*, 1998).

Pessoas que têm tendência aumentada para desenvolver trombose são denominadas trombofílicas. O termo trombofilia foi usado originalmente por Edberg, em 1965, para descrever a tendência à trombose venosa de uma família norueguesa. Atualmente ele é empregado para qualquer condição, adquirida ou genética, que se associa a maior propensão para tromboembolismo (D'AMICO, 2006). Alguns autores utilizam o termo somente para [□]pacientes com trombose atípica, baseando-se em características, tais como: evento em idade até 50 anos; recorrência; história familiar e eventos em locais incomuns (LANE, 1996a; PRICE & RIDKER, 1997; LORENZI, 1999).

Trombose é a formação de um coágulo fibrino-plaquetário no interior de um vaso sanguíneo. Ocorre quando há alteração do mecanismo hemostático vascular, desenvolvendo-se pelo desequilíbrio entre os processos pró-trombóticos e anti-trombóticos. Alterações nas paredes dos vasos, do fluxo sanguíneo e na composição dos constituintes do sangue são os principais envolvidos na fisiopatologia da trombose. Estes fatores são conhecidos como tríade de Virchow (LEE 1998).

VIRCHOW, em 1800, definiu as bases da trombogênese, para a compreensão do fenômeno. Estabeleceu que a trombose é consequência da alteração de um ou mais fatores relacionados à lesão endotelial, à diminuição do fluxo venoso e à alteração da composição do sangue. Considerando a possibilidade restrita de conhecimento da época, particularmente sobre a composição bioquímica do sangue, o aspecto intuitivo dessa afirmação foi espetacular (LEE 1998).

A despeito da valiosa contribuição de VIRCHOW, atravessou-se um longo período, durante o qual a trombose era considerada de causa predominantemente desconhecida, ficando óbvia a sua relação apenas em situações de risco bem definido. Não obstante, desde o começo do século XX, já se presumia a participação de fatores genéticos quando ocorreram os primeiros relatos de famílias com predisposição aumentada para eventos trombóticos (LEE 1998).

Hoje se sabe que trombooses venosa e arterial têm etiopatogênese diferentes. Isto se deve a constituição histológica de três camadas, íntima, média e adventícia, que constituem o endotélio dos vasos e que têm disposição e características diferentes. Nas veias, a disposição entre as camadas é menos nítida, tornando a parede vascular mais fina e a luz do vaso mais ampla. O endotélio das veias diferencia também pela presença de válvulas semilunares. (ROBBINS E CONTRAN, 2005).

As válvulas semilunares das veias facilitam o acúmulo de sangue em determinada parte do corpo quando não existe a movimentação dos músculos esqueléticos o que favorece a formação de trombo. A trombose venosa é representada, principalmente, por trombose venosa profunda (TVP) que ocorre nas veias dos membros inferiores. As complicações mais frequentes são a embolia pulmonar ou tromboembolismo, principal recorrência, e a síndrome pós-trombótica. (ROBBINS E CONTRAN, 2005).

Entre as condições hereditárias para o desenvolvimento de trombose venosa, estão as mutações em genes que codificam proteínas relacionadas à coagulação: deficiência das proteínas C e S; deficiência de antitrombina III; fator V de Leiden (FVL), mutação no gene da protrombina. Fatores de risco ambientais como imobilidade, neoplasias, varizes dos membros inferiores, idade, sexo, obesidade, traumatismo, insuficiência cardíaca, também estão envolvidos. (ROBBINS E CONTRAN, 2005).

Na maioria dos casos, a trombose arterial está relacionada, com o desenvolvimento da aterosclerose. Segundo a OMS, aterosclerose é o resultado da interação de fatores genéticos como a hiperhomocisteinemia relacionada ao polimorfismo da metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR), hiperlipidemia, tabagismo, hipertensão arterial e diabete, A aterosclerose se desenvolve nas artérias devido à elasticidade nas camadas histológicas que facilitam acúmulo de substâncias,

principalmente de lipídeos. Inicialmente as paredes dos vasos são lesadas e expõem o subendotélio que proporciona a adesão, agregação e ativação plaquetária formando trombos, os quais são compostos por massas coesas de plaquetas, com pequena quantidade de fibrina e poucos eritrócitos e leucócitos. Dependendo do tamanho da lesão poderá ocasionar a formação de coágulo grande o suficiente para ocluir o lúmen vascular. (ROBBINS E CONTRAN, 2005).

Embora possa ser encontrada em qualquer artéria de grande calibre, a doença é mais comum na aorta, especialmente na porção abdominal, e nos seus ramos principais, como artérias coronárias, carótidas, ilíacas e femurais; além de mesentéricas e renais, sendo representada principalmente por acidente vascular cerebral (AVC) e infarto agudo do miocárdio (IAM). (ROBBINS E CONTRAN, 2005).

Uma explanação dos fenômenos descritos na cascata de coagulação e das trombofilias hereditárias e adquiridas será descrito a seguir:

1.1 Fisiologia da Coagulação

A hemostasia é o resultado de uma série de processos responsáveis pela manutenção do sangue no estado líquido e livre de coágulos, formação do tampão hemostático em caso de lesão vascular. Didaticamente, a hemostasia normal é dividida em primária, secundária e terciária ou fibrinólise (ROBBINS E CONTRAN, 2005).

Hemostasia Primária

A hemostasia primária é o passo inicial da coagulação. Quando o tecido vascular é lesado, em um indivíduo normal, a coagulação é iniciada dentro de 20 segundos (LORENZI,1999). Primeiramente, ocorre a vasoconstrição, uma resposta imediata e transitória permitindo a diminuição do fluxo sanguíneo na área afetada e a manutenção das células endoteliais justapostas. As plaquetas formam imediatamente um tampão plaquetário no local da lesão, o tampão primário ou "trombo branco" (COLMAN *et al.*, 2006a; COLMAN *et al.*, 2006b).

As plaquetas desenvolvem função essencial no desencadeamento da

hemostasia primária, atravessando quatro etapas: adesão, ativação, agregação e secreção. (COLMAN *et al.*, 2006a; COLMAN *et al.*, 2006b).

Adesão plaquetária é a fixação de plaquetas ao subendotélio, principalmente às fibrilas do colágeno. O processo é multifatorial e envolve receptores específicos tanto no colágeno quanto nas plaquetas, como o fator de von Willebrand (vWF) ou fator VIII, e possivelmente outras proteínas adesivas (Figura 1). O vWF é essencial para que ocorra a adesão das plaquetas e pode constituir um ligante inicial com o colágeno, podendo ligar-se a membrana plaquetária por meio de dois receptores plaquetários distintos: GPIb (glicoproteína Ib), GPIIb/IIIa (glicoproteína GPIIb/IIIa) (COLMAN *et al.*, 2006b)

As três outras etapas através das quais as plaquetas desenvolvem a hemostasia primária ocorrem simultaneamente. A ligação do vWF em receptores de membrana das plaquetas ocasiona ativação e conseqüentes alterações morfológicas e secreção de substâncias vasoativas e agregantes como por exemplo, adrenalina, fator de ativação plaquetária, adenosina difosfato (ADP), serotonina, noradrenalina, produtos de oxidação do ácido aracdônico pela via cicloxigenase-PGH2 e seu produto - tromboxane A2 (TA2), potente agente agregrante. (FIGURA 1) (MONROE & HOFFMAN, 2006).

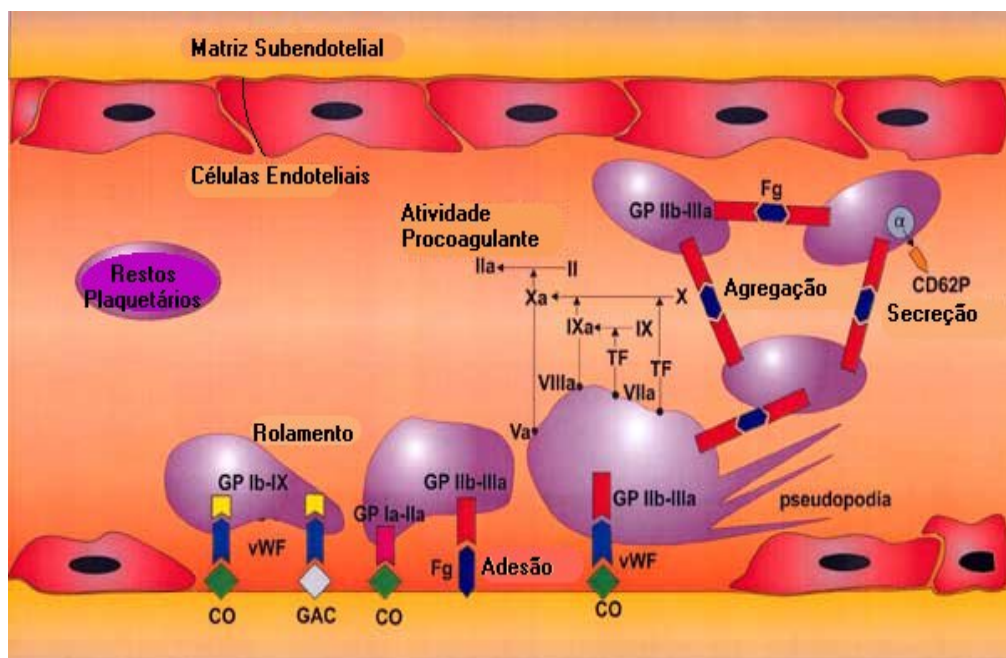


Figura 1 - Contato entre as plaquetas e o endotélio danificado. Adesão, agregação plaquetária e ativação do mecanismo de coagulação.vWF- fator de von Willebrand; GP- glicoproteína; Fg- fibrinogênio plaquetário; TF- fator tissular; CO-colágeno; GAC-asp. Ácido aspártico (aspartato).Retirada e modificada de www.bentham.org/

Hemostasia Secundária

A hemostasia secundária é uma seqüência de reações enzimáticas que convertem um grupo de pró-enzimas plasmáticas em suas formas ativas. A enzima final do processo é a trombina, que transforma o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, os quais ao se formarem sobre o tampão plaquetário primário tornam-no mais resistente. (BITHELL, 1998)

As pesquisas bioquímicas sobre a coagulação começaram no final do século IX por Alexander Schimidt e Paul Morawitz. Os autores descobriram reações fundamentais na formação do coágulo que incluíam ativação da protrombina e conseqüente formação de trombina pela tromboplastina e a conversão do fibrinogênio em fibrina pela trombina (NORRIS, 2003).

Em 1964 Mac Farlane & Davie Ratnoff propuseram a hipótese da cascata de coagulação. No modelo, a coagulação do sangue ocorre por meio de uma ativação proteolítica, resultando na formação de trombina que, então converte a molécula de fibrinogênio em fibrina. A hipótese divide a coagulação em duas vias, extrínseca (via do fator tissular) e intrínseca (via da ativação de contato), que convergem no ponto de ativação do fator X (LEE, 1998).

As enzimas que têm importância essencial na coagulação do sangue e seus precursores, os zimogênios, são membros da família das serinoproteases. Nas reações da cascata de coagulação, os zimogênios ou proteínas ainda não ativadas, são distinguidos na literatura, das enzimas proteolíticas pela ausência da "a", que aparece no nome do fator a partir de sua ativação. (MITROPOULUS *et al.*, 1995)

A cascata de coagulação é formada por fatores da coagulação que são representados, em sua maioria, por algarismos romanos: fibrinogênio (fator I), protrombina (fator II), fator tecidual (FT) ou tromboplastina (fator III), íon cálcio (fator IV), proacelerina ou fator lábil (fator V), proconvertina (fator VII), fator anti-hemolítico (fator VIII), fator Christmas (fator IX), fator Stuart –Prower (fator X), precursor da tromboplastina plasmática (fator XI), fator de Hageman (fator XII), fator estabilizador da fibrina (fator XIII), fator de Fletcher (precalicreina) e cininogênio de alto peso molecular (HMWK) (LORENZI, 1999)

Nos últimos 35 anos a pesquisa sobre a coagulação evoluiu muito e as primeiras teorias foram modificadas. Atualmente, são aceitos que os mecanismos hemostáticos estejam associados com três complexos enzimáticos procoagulantes - tenase extrínseco, tenase intrínseco e protrombinase - que envolvem serinoproteases dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX, e X) associadas a cofatores (fatores V e VIII). Embora cada complexo vitamina K-dependente tenha substrato e sítio proteolítico específicos, inicialmente eles são análogos com estruturas homólogas, consistindo de uma serinoprotease, cofator, íons de cálcio unidos a uma superfície de um fosfolípídeo (LEE 1998).

O principal evento regulado pelos complexos enzimáticos vitamina K-dependentes são a conversão do zimogênio em enzima ativa, ativação proteolítica dos procofatores em cofatores, no caso dos cofatores V e VIII e expressão na membrana no caso do fator tecidual ou trombomodulina. (BROZE, 1995)

Via Extrínseca

A via extrínseca da coagulação é desencadeada após a exposição do fator tecidual, que é constituído por fosfolípídeos e presente em muitas células do organismo, tais como: células inflamatórias, do endotélio, fibroblastos, subjacentes ao endotélio, queratinócitos, constitutivas do epitélio do trato gastrointestinal e respiratório, células do cérebro, musculares cardíacas e células dos glomérulos renais. As células têm sítios que comportam fatores de coagulação e íons Ca^{++} para que ocorra a interação entre os complexos procoagulantes. A contribuição da membrana para a formação dos complexos procoagulantes é necessária, no entanto, o mecanismo através do qual isso ocorre é pouco entendido, mas sabe-se que existe exposição a um agente que provoca dano à membrana celular e assim suportará a formação de complexo (ROSENBERG & AIRD, 1999).

Expresso, o fator tecidual ligar-se-á ao fator VIIa, que circula no plasma na sua forma ativa em pequenas quantidades (1 a 2%). O produto da ligação é a ativação dos fatores X e IX. O fator Xa, inicialmente formado quando em contato com membrana ativada, é capaz de transformar protrombina em quantidades ínfimas de trombina que

acelerará a ativação de plaquetas, fator V e fator VIII (ROSENBERG & AIRD, 1999; CROWTHER & KELTON, 2003).

O fator Xa então se liga ao fator Va na superfície de membrana e este catalisa a transformação da protrombina em trombina, sendo denominado complexo protrombinase e é 300.000 vezes mais eficaz do que Xa isolado (O'RIORDAN e HIGGINS, 2003).

Via Intrínseca

A via intrínseca consiste em um conjunto de proteínas presentes no plasma e ativadas ao interagir com uma superfície com carga elétrica negativa. A via tem início com a formação do fator XIIa, que na presença de cininogênio de alto peso molecular, transforma o fator XI em XIa, o qual transforma o fator IX em IXa. O fator IXa liga-se ao seu cofator (fator VIIIa), na presença de Ca^{2+} e de uma superfície lipídica adequada e ativa o fator X em Xa (Figura 2) (CROWTHER & KELTON, 2003).

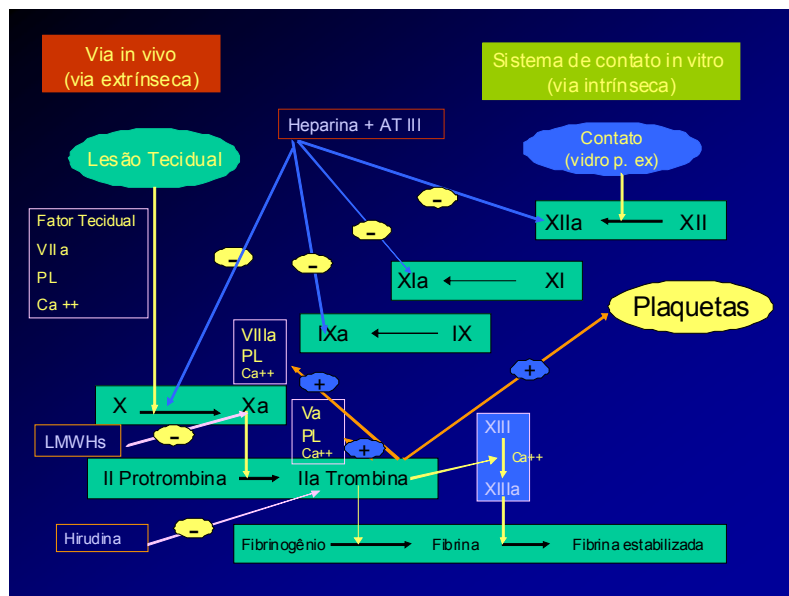


Figura. 2 – Cascata da coagulação. Iniciada quando o sangue é exposto a uma superfície carregada negativamente (via intrínseca) ou exposto ao fator tecidual (via extrínseca). www.sbacvsp.org.br

Mecanismos Reguladores da Coagulação

As reações de coagulação do sangue são controladas por mecanismos anticoagulantes que, em condições normais, sobrepõem as procoagulantes, evitando assim, a ativação excessiva do sistema e conseqüente oclusão de vasos. O sistema anticoagulante é formado por um mínimo de quatro proteínas plasmáticas: proteína C (PC), proteína S (PS), antitrombina-III (AT) e por uma proteína de membrana - a trombomodulina. Existem três principais tipos de diferentes processos anticoagulantes: inibidor da via do fator tissular (TFPI), o da antitrombina e o sistema anticoagulante da proteína C (SOLYMOSS, 2000; BLOOMENTHAL *et al.*, 2002).

O TFPI está presente em baixas concentrações no plasma (aproximadamente 2,5 nmol/L) e apresenta três domínios que se ligam ao complexo FT-FVIIa e ao fator X, limitando a produção dos fatores Xa e IXa. É responsável também por regular as serinoproteases (GOUAULT-HEILMANN, 1999).

A antitrombina III, inibidor primário da trombina, é o anticoagulante natural que está em maior quantidade no plasma (aproximadamente 3,5 μ mol/L), inibindo a ação procoagulante das serinoproteases, preferencialmente as que estão livres no plasma. Tem sua atividade bem maior quando está ligada a heparina ou ao sulfato de heparina, que estão presentes no endotélio. Inibe também o complexo FT-FVIIa mas em menor quantidade (ABRAMSON *et al.*, 2001).

A proteína C é vitamina K-dependente e exerce seu poder anticoagulante regulando a ativação dos FVIIIa e FVa, cofatores dos complexos tenase e protrombinase. O sistema através do qual a proteína C é ativada, é envolvido por diversas proteínas que processam a ativação e atividade proteolítica, além da atividade anticoagulante da proteína. A ativação é catalisada pela superfície do endotélio vascular, na qual a trombina está ligada ao seu cofator trombomodulina (T-TM-EPCR) (FIGURA 3). A proteína C exerce seu poder anticoagulante sobre os cofatores Va e VIIIa. Durante a desativação do cofator VIIIa ela necessita de dois cofatores: o fator V intacto e a proteína S (Figura 3) (DAHLBÄCK, 1994; ZÖLLER e DAHLBÄCK, 1994; SORIA *et al.*, 2003).

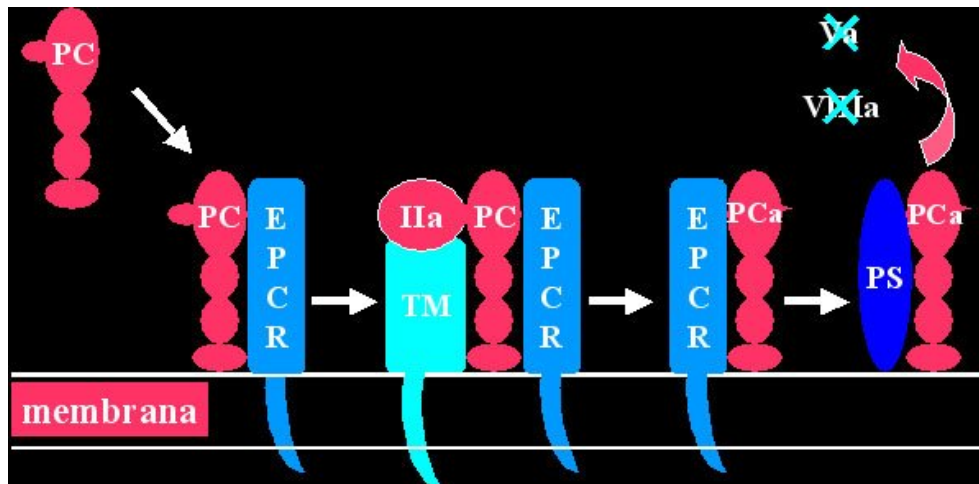


Figura 3: Sistema da proteína C ativada. A ligação da trombina (IIa) ao receptor endotelial trombomodulina (TM) modifica as propriedades da trombina, transformando-a em um potente anticoagulante, por ativar a PC, que, juntamente com seu cofator (PS), inativa os fatores Vlla e Va, suprimindo a gênese de trombina. EPCR: “endothelial PC receptor” (receptor endotelial da PC).

Modificada de Franco 2001.

Fibrinólise

A fibrinólise é o mecanismo final que se contrapõe ao processo da coagulação. Ela é considerada o principal meio fisiológico da degradação da fibrina e é de fundamental importância na dissolução ou solubilização do coágulo de fibrina no processo de cicatrização de ferimentos e recanalização dos vasos trombosados. No sangue, a fibrinólise resulta da conversão de uma enzima plasmática inerte (plasminogênio) em uma enzima proteolítica (plasmina), cujo principal papel fisiológico é degradar a fibrina. O processo de ativação do plasminogênio em plasmina ocorre devido aos ativadores do plasminogênio presentes na maioria dos tecidos normais e neoplásicos: o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e o ativador tipo uroquinase do plasminogênio (u-PA) (LIST *et al.*, 2000).

O t-PA é produzido pelas células endoteliais, sendo liberado após a estimulação celular pela trombina. Após sua liberação, ele se liga à fibrina, na qual também está ligado o plasminogênio. Assim a fibrina atua como importante co-fator que permite a ativação eficiente do plasminogênio em plasmina. A plasmina cliva o fibrinogênio e/ou

fibrina, gerando produtos de degradação de ambos que inibem a polimerização da fibrina. O u-PA produzido por vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, atua nos tecidos onde tem importante função de degradação da matriz extracelular, permitindo a migração celular (DOGGEN *et al.*, 1999).

Na ausência da fibrina, o t-PA é um ativador fraco do plasminogênio. Entretanto quando ocorre a formação de fibras e o t-PA e o plasminogênio se ligam, a atividade catalítica do t-PA sobre o plasminogênio aumenta, resultando na produção de plasmina, a qual inicia a proteólise da fibrina. A fibrina parcialmente digerida apresenta maior capacidade de ligação ao u-PA, promovendo sua ativação (LIST *et al.*, 2000).

O sistema fibrinolítico é controlado por mecanismos regulatórios. A α 2-antiplasmina é o inibidor direto da plasmina, além de interferir com a adsorção do plasminogênio. A α 2-macroglobulina é um inibidor de muitos componentes do sistema fibrinolítico, porém inibe de maneira mais lenta a plasmina. t-PA e o u-PA. O inibidor do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) é o principal inibidor do t-PA e o u-PA, sendo produzido principalmente por células endoteliais, adipócitos, e megacariócitos. O TAFI (inibidor da fibrinólise ativado pela trombina) reduz a fibrinólise por remover resíduos de lisina da fibrina. (DOGGEN *et al.*, 1999).

1.2 Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Trombose Venosa

Antitrombina (AT)

A ocorrência de trombose venosa em indivíduos jovens ou pertencentes à mesma família, já chamava a atenção de clínicos e cirurgiões há muito tempo. Entretanto, o reconhecimento de que alterações genéticas ou adquiridas da hemostasia poderiam ser a causa desta manifestação, foi reconhecido muito mais recentemente, e novos fatores estão sendo identificados (BERTINA, 1999). Atualmente, o índice de fatores hereditários associados a trombose venosa chega a 70% (BUCHANAN *et al.*, 2003).

A deficiência de AT foi a primeira alteração genética a ser reconhecida como fator associado à ocorrência de trombose venosa e foi descrita por Egeberg em 1965. É o principal inibidor da coagulação, atuando especialmente contra a trombina e fator Xa

em condições fisiológicas. Provavelmente, a deficiência de AT é o mais grave dos defeitos genéticos dentre os sistemas anticoagulantes, pois a maior parte dos indivíduos afetados apresenta tromboembolismo até a idade de 50 anos, além de que os pacientes heterozigotos apresentam tromboembolismo recorrente na segunda e terceira décadas de vida e a homozigose tende a ser incompatível com a vida (BUCHANAN *et al.*, 2003).

Muitas mutações do gene da AT foram descritas e as deficiências podem ser classificadas em Tipo I, onde um dos alelos não é expresso, e do Tipo II, em que uma proteína anômala é produzida (FRANCIS *et al.* 1998). A frequência da deficiência da antitrombina na população geral é de 1:2000 e em indivíduos com antecedente de trombose é de 1% a 3% (BUCHANAN *et al.*, 2003).b

Os progressos nessa linha de pesquisa foram lentos e, somente 16 anos mais tarde, na década de 80, foram identificadas as deficiências das proteínas C e S associadas a episódios de TEV recorrente, completando o período de descrição dos chamados anticoagulantes naturais (GRIFFIN *et al.*, 1981; COMP *et al.* ,1984). A ocorrência das deficiências destes anticoagulantes tem prevalência de cerca de 5% em pacientes com doença tromboembólica e é relativamente rara (0,2% a 0,4%) em indivíduos normais (BUCHHOLZ E THALER, 2003; NORRIS, 2003).

As três desordens genéticas nas deficiências da AT, PC e PS são transmitidas por herança autossômica dominante, no entanto, mais de 120 mutações já foram identificadas nos genes que codificam tais proteínas, o que torna inviável a pesquisa genética destas deficiências (BUCHANAN *et al.*, 2003).

Após a identificação da deficiência dos anticoagulantes naturais, ainda restaram situações não explicadas, uma vez que as alterações descritas eram encontradas em apenas 10 a 15% dos quadros trombóticos (GLADSON *et al.*, 1988; KOSTER *et al.*, 1995; MATEO *et al.*, 1997). Bertina *et al.* (1994) e Poort *et al.* (1996) na última década trouxeram avanços importantes com a identificação de dois fatores de risco genético, que são mais prevalentes na população geral, especialmente de origem caucasiana e determinam pontos de resistência à ação dos anticoagulantes naturais ou promovem ganho de função pró-trombótica.

Fator V de Leiden

O gene do fator V está localizado no locus cromossômico 1q23. Tem mais que 80Kb sendo composto de 25 exons e 24 íntrons. O fator V é uma glicoproteína de 330 kDa cuja concentração plasmática é de, aproximadamente, 20 nmol/L. Embora muitas células tenham sido citadas como sintetizadoras do fator V, é geralmente aceito que a principal fonte de síntese seja o fígado que o libera como uma cadeia molecular simples. Não se sabe se os megacariócitos produzem o fator V ou simplesmente endocitam para serem liberadas pelas plaquetas quando estão ativadas (TRACY *et al.*, 1982; CHESNEY *et al.*, 1981; CHIU *et al.*, 1985).

O fator V tem na sua estrutura um domínio que é similar ao fator VIII (A1-A2-B-A3-C1-C2). O domínio A do fator V e VIII têm uma proteína ancestral comum; além disso, os fatores V e VIII têm 40% da seqüência dos seus domínios A e C idênticas. Os três domínios A estão dispostos em forma de triângulo (FIGURA 4) (JENY *et al.*, 1987; GITSCHIER *et al.*, 1984; CHURCH *et al.* 1984).

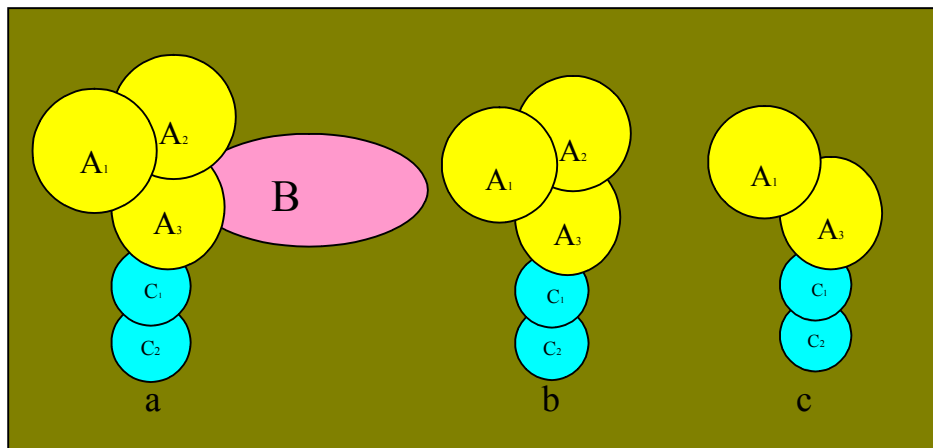


Figura. 4 – Representação esquemática da estrutura do fator V: a) fator V com seus domínios A1,A2,A3,B,C1,C2 b) fator V ativado e sem o domínio B c) fator V inativado e sem o domínio A2. Gerry A.F. Nicolaes, Björn Dahlbäck, 2002

O fator V é ativado pela trombina ou FXa, quando sofre proteólise no R709, R1018 e R1545 pela trombina, transforma-se em uma cadeia carboxi-terminal leve (A3-C1-C2) e em uma cadeia amino-terminal pesada (A1 E A2), perdendo o domínio B e ficando sendo compostos pelos domínios A1-A2-A3-C1-C2. (JENY *et al.*, 1987).

A desativação do fator V é realizada pela PC, através da qual sofre proteólise em três pontos: posição Arg306, Arg506, e Arg679. A perda completa da atividade procoagulante do FVa só acontece quando ocorre a proteólise na Arg306. A clivagem na Arg506 ocorre geralmente quando a concentração do fator V e da PC estão baixos, e na Arg679 é a menos importante de todas (NICOLAES *et al.*, 2002; MANN *et al.*, 1997; 2003).

Em 1993 foi relatado existência de duas formas de fator V no interior das plaquetas, FV1 e FV2 os quais têm diferenças de peso e afinidade pela membrana fosfolipídica; sendo que características influenciam nas propriedades procoagulantes e anticoagulantes do FV. O FV1 produz sete vezes mais trombina que o FV2 (VARADI *et al.*, 1996; ROSING *et al.*, 1993).

O termo Fator V de Leiden refere-se a mutação de ponto no nucleotídeo 1691 no exon 10, do gene do fator V, (FV:R506Q, Fator V-Leiden). A mutação resulta na substituição da argenina pela glutamina na posição 506 da proteína. A mudança em um sítio de clivagem resulta na resistência à proteína C ativada e por sua vez na inativação parcial do fator V ativado, provocando um estado de hipercoagulabilidade, aumentando o risco de trombose (BERTINA *et al.*, 1994).

A mutação afeta um dos três sítios do FVa reconhecido pela APC, o sítio R506 e evita que a proteína C clive o local. A falta de clivagem no sítio R506 também contribui para dificultar as clivagens posteriores R306 e R769. Conseqüentemente, pacientes com FVL têm resistência para inativação do FVa (MANN *et al.*, 1997; 2003).

A penetrância incompleta de trombose em fenótipos de Fator V de Leiden, em contraste com outras coagulopatias hereditárias, sugere que é necessária associação com outros fatores hereditários ou ambientais para que indivíduos venham a desenvolver o evento trombótico. Pessoas com FVL em heterozigose são estimados apenas 10% de probabilidade de vir a ter um evento durante a vida e mesmo em homozigose é compatível com a vida, em contraste, por exemplo, com as deficiências de

proteína C e S que em homozigose, causam púrpura neonatal fulminante (BRANSON *et al.*, 1983; MAHASANDANA *et al.*, 1990).

Pacientes com fator V de Leiden (FVL) geralmente estão associados com trombose venosa profunda (TVP) que se localiza nas veias dos membros inferiores ou TVP associado com embolia pulmonar (EP), no entanto, o risco de desenvolver EP é menor nos mutados para o fator V do que para os com a mutação G20210A do gene da protrombina. A razão para a seleção anatômica ainda não é sabida (de MOERLOOSE *et al.*, 2000; BOUNAMEAUX, 2000). Com menor frequência do que os eventos anteriores o FVL pode está associado com trombooses superficiais ou de cérebro, vísceras (fígado, rins), veias axilares; sendo ocorrências mais comuns em pacientes com história de estase venosa que pode ocorrer na gravidez, cirurgia, imobilização, o uso de anticoncepcional ou reposição hormonal. (RIDKER *et al.*, 1998; TORMENE *et al.*, 1999; DE STEFANO *et al.*, 1999).

Outras Alterações do Fator V

Fator V Hong Kong e Fator V Cambridge, Haplótipo HR2

Ao longo dos anos, muitos alelos variantes do FV foram descritos. Em 1998, duas novas mutações do FV, FV Hong Kong e FV Cambridge foram descobertas em pacientes com trombose. Resultam na substituição da Arg na posição 306 da proteína, em FV Hong Kong pela glicina (Gly) e em FV Cambridge pela treonina (Thr) (CHAN *et al.*, 1998; WILLIAMSON *et al.*, 1998). Destas duas mutações, apenas o FV Cambridge tem associação com resistência a proteína C e com eventos trombóticos, no entanto, ambas as anomalias genéticas associadas com outros fatores de risco genéticos ou adquiridos, podem aumentar as probalidades de desenvolvimento de eventos trombóticos (NORSTROM *et al.*, 2002).

Um conjunto de 13 diferentes polimorfismos ao longo do gene do fator V, denominado HR2 ou R2 foi recentemente descoberto. Sete destes ocasionam mudanças de aminoácidos e mudam a função da proteína. Foi associado a eventos trombóticos e resistência a proteína C (CASTOLDI *et al.*, 2000; HOEKEMA *et al.*, 2001).

Protrombina

A protrombina é um zimogênio vitamina K-dependente que quando ativada transforma-se em trombina (IIa) sendo, assim, uma enzima chave da coagulação do sangue. Ela é a mais abundante dos zimogênios que são vitamina K-dependentes e circula no plasma numa concentração média de $1,4\mu\text{mol/L}$ ou $100\mu\text{g/ml}$. É produzida primariamente no fígado. Baixos níveis de expressão de protrombina foram encontradas no cérebro, estômago, intestino, útero, rim, baço (LEE 1998).

A mutação do gene da protrombina consiste na substituição da guanina pela adenina no nucleotídeo 20210 na região 3' não traduzida do gene da protrombina (FIGURA 6). O gene é composto de 14 exons, 13 introns e está localizado no cromossomo 11 próximo ao centrômero. A presença da mutação está associada com elevados níveis de protrombina plasmática (POORT et al,1996).

A mutação da protrombina tem freqüência de 6,2% em pacientes não selecionados e 18% com histórico familiar de trombose. (POORT *et al.*, 1996).

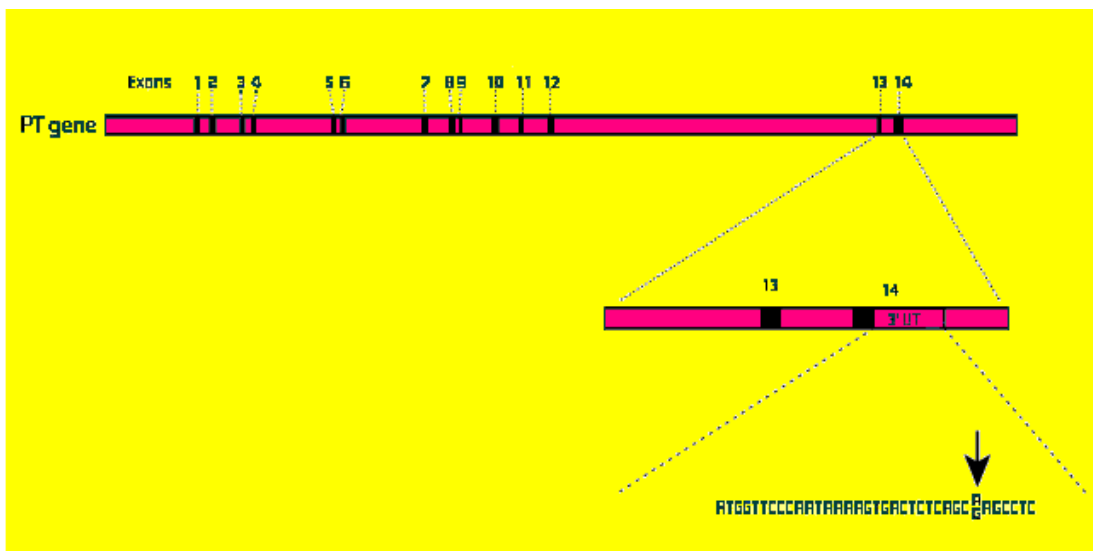


Figura. 5 : Representação esquemática do gene da protrombina e o local da mutação G20210A Dahlbäck J, 2005

1.3 Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Trombose Arterial

Mutação Ala677→Val no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR)

A mutação Ala677→Val no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase leva à formação da enzima metileno tetrahydrofolato redutase termolábil, que apresenta apenas 50% de atividade, e sua deficiência leva ao aumento da homocisteína plasmática. A hiper-homocisteinemia plasmática pode ser decorrente de condições herdadas ou adquiridas. O nível considerado como valor plasmático normal é de 5 a 16µMol/L. Ela é considerada severa quando atinge níveis superiores a 100µMol/L, moderada entre 25 e 100µMol/L e leve entre 16 e 24µMol/L (D'AMICO,2006).

A freqüência da hiper-homocisteinemia secundária à mutação da MTHFR, uma herança autossômica recessiva, ocorre em 5% da população geral (BUCHANAN *et al.*, 2003). A freqüência de homozigose para a mutação da MTHFR é de 5% a 15% na população geral. Em estudo na população brasileira foi encontrada maior incidência de homozigose em indivíduos caucasianos (10%) que em negros (1,45%) e índios (1,2%) (ARRUDA *et al.*, 1998). As causas mais comuns de hiper-homocisteinemia adquirida incluem as deficiências de cobalamina, folato ou piridoxina, insuficiência renal, lúpus eritematoso sistêmico e uso de drogas como metrotexato, anticonvulsivantes e óxido nítrico (BUCHANAN *et al.*, 2003; D'AMICO, 2006).

A hiper-homocisteinemia é considerada fator de risco para doença cerebrovascular, vascular periférica e coronariopatia, provavelmente por comprometimento do tecido endotelial. Um aspecto relevante da mutação MTHFR na reprodução humana é sua interferência em gestações gemelares dizigóticas. Os indivíduos homozigóticos C677T possuem 2,3 vezes menos chance de ter uma gestação gemelar (BUCHHOLZ, 2003).

Tabaco

O tabaco é originário do continente americano e no início do século XVI foi introduzido comercialmente na Europa, tornando o hábito de fumar uma das maiores

pandemias da história da humanidade após a Revolução Industrial (KONNO *et al*, 2008). Cerca de 4.720 mil elementos já foram identificados na fumaça do cigarro, sendo muitos farmacologicamente ativos, antigênicos, citotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (tabela 1). Sua composição varia conforme o tipo de folha do tabaco utilizado na manufatura, a região onde foi plantada, as técnicas de processamento (BARBIERI *et al*, 1986). A fumaça do cigarro é composta por uma fase gasosa na qual estão dispersos materiais particulados. Cerca de 90% dos componentes do peso total da fumaça estão presentes na fase gasosa e 10 % são compostos pela fase particulada (HARRISSOM, 2001).

Salienta-se dentre os constituintes do cigarro a nicotina e o monóxido de carbono como dois dos constituintes mais importantes do cigarro no que concerne aos malefícios provocados. A nicotina é reconhecida por sua atividade psicoativa, efeitos vasoconstritores e estimulação do aumento das lipoproteínas de baixa densidade, contribuindo para aumentar o risco de trombose, aterosclerose e infarto do miocárdio (HENNINGFIELD, 1998; GLANTZ *et al*, 1995 e 1996; U.S. SURGEON GENERAL, 1993). O monóxido de carbono se liga mais intensamente a hemoglobina do que o oxigênio formando a carboxihemoglobina o que provoca diminuição da distribuição de oxigênio, e conseqüentemente, hipóxia (HARRISSOM, 2001, HOFFMAN *et al.*, 1998).

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o principal fator de risco de morte evitável em todo o mundo. Ele é uma das principais ameaças à saúde, e suas conseqüências negativas são conhecidas há mais de 40 anos. O uso do cigarro está relacionado a várias doenças agudas e crônicas. A literatura pertinente ao tema é rica ao apontar as doenças associadas ao tabagismo revelando a abrangência dos efeitos nocivos do uso do fumo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997, 1998a, 1998b, 2000a, 2000b; ROSEMBERG, 1987). Os riscos individuais para desenvolvimento destes malefícios decorrentes do uso do tabaco variam amplamente. Os fatores que influenciam esses riscos incluem a duração, a intensidade e o tipo de exposição à fumaça; a susceptibilidade mediada geneticamente, exposições ocupacionais e ambientais, uso de medicamentos e presença de doenças concomitantes (HARRISSOM, 2001).

Dentre os malefícios causados a saúde são citadas: as cardiopatias, acidentes

vasculares cerebrais, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema pulmonar e neoplasias; e estes exemplos comprovam que o uso do tabaco está associado à morte prematura, à incapacidade física e a altos índices de morbidade e mortalidade (OMS, 1997).

As cardiopatias e os acidentes vasculares cerebral estão relacionados com o desenvolvimento da placa aterosclerótica. A gênese do ateroma pode está relacionado com os produtos da combustão do tabaco que causam dano endotelial, agregação plaquetária, aumento das prostaglandinas, aumento do número de leucócitos, com conseqüente aumento da viscosidade do sangue, ativação do fator de Hageman (DOOL, 1992), aumento dos níveis de lipídios aterogênicos LDL (lipoproteína de baixa densidade) e diminuição do HDL (lipoproteína de alta densidade) e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), elevação do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1). Os coágulos formados a partir do ateroma podem ficar presos em pequenas rachaduras nas paredes endoteliais, o que fecha o vaso, ocasionando a trombose (FREEMAN e PACKARD, 1995).

Tabela 1 : Constituintes da fumaça do cigarro

Substância	Efeito(s)
Fase Particulada	
Icatrão	Carcinogênico
Hidrocarbonetos aromáticos	Carcinogênico
Nicotina	Estimulante e depressor neuroendócrino; droga de dependência
Fenol	Carcinogênico e irritante
Cresol	Carcinogênico e irritante
B-naftilamina	Carcinogênico
N-nitrosornicotina	Carcinogênico
Benzol(a)pireno	Carcinogênico
Traços de metal (níquel, arsênio, polônio)	Carcinogênicos
Indol	Acelerador de tumores
Carbazol	Acelerador de tumores
Catecol	Cocarcinogênico

Fase Gasosa	
Monóxido Carbono	Prejudica o transporte e a utilização de oxigênio
	Ciliotoxina e irritante
Ácido hialurônico	Ciliotoxina e irritante
Aldeído	Ciliotoxina e irritante
Acroleína	Ciliotoxina e irritante
Amônia	Ciliotoxina e irritante
Formaldeído	Ciliotoxina e irritante
Óxidos de Nitrogênio	Carcinogênico
Nitrosaminas	Carcinogênico
Hidrazina	Carcinogênico
Cloreto de Vinil	

O tabagismo é o mais poderoso fator de risco para o desenvolvimento da tromboangiite obliterante, ou Doença de Buerger, uma enfermidade quase que exclusiva dos fumantes, pois 99% dos doentes que são acometidos deste mal são fumantes. A doença causa obstrução de vasos sanguíneos nas extremidades do corpo (pés, pernas, coxas), levando à necrose os tecidos, o que requer a amputação de tais membros. Ressalta-se também que, por promover a obstrução dos vasos, o ato de fumar favorece o surgimento de varizes precoces (HARISSOM, 2001).

Dentre todos os tipos de câncer, 30% são causados pelo tabaco. Dentre os casos de câncer de pulmão, pelo menos 85% são causados pelo fumo. Cânceres da cavidade oral, da faringe, da laringe e do esôfago têm estreita relação com o tabagismo. Mesmo cânceres mais distantes da via de entrada da fumaça do cigarro, como câncer de bexiga, dos rins e do pâncreas, são mais comuns entre os fumantes do que entre os não-fumantes. (SHOPLAND e BURNS, 1993, MINISTÉRIOD A SAÚDE, 1996).

A exposição prolongada dos brônquios à fumaça do cigarro inibe a capacidade do pulmão para captar oxigênio, perda da elasticidade do tecido pulmonar, destruição alveolar e provoca o conjunto de enfermidades denominado doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) do qual fazem parte a bronquite crônica e enfisema pulmonar. Esta síndrome ocorre, na maioria dos casos em pessoas viciados em tabaco

sendo a quinta causa de morte no país e afeta sete milhões de brasileiros (DORETTO, 2002).

Anticoncepcionais Orais (ACO)

Os efeitos dos estrógenos, principalmente no metabolismo lipídico, tônus vasomotor e placa aterosclerótica, associados ao fato da menor incidência de doença coronariana em mulheres antes do climatério, levaram à hipótese de um provável efeito vasoprotetor em relação à doença aterosclerótica coronariana, isquemia cerebral e periférica. A terapia de reposição hormonal (TRH) passou a ser indicada também para a prevenção primária e secundária dessas patologias. Estudos clínicos com um grande número de participantes foram iniciados, sendo interrompidos antes das datas previstas devido ao elevado índice de complicações constatado. Assim, conclui-se que as alterações da coagulação resultantes da ação dos estrógenos, aumentando a incidência de trombozes arteriais e venosas, superam os postulados efeitos benéficos no nível das coronárias e no cérebro (TEEDE, 2002; ARAÚJO *et al.*;1999).

O exato mecanismo através do qual os estrógenos atuam promovendo ativação da coagulação ainda não está elucidado, no entanto, ações sobre fatores da coagulação foram observadas. Ocasionalmente aumentos progressivos dos fatores VIII, VII, IX e X; diminuição dos anticoagulantes, proteínas C, S e antitrombina; diminuição da atividade fibrinolítica; aumento da trombina e da fibrina (KOH *et al.* 1999; ROSENDAAL *et al.*, 2001 e 2002; HERRINGTON *et al.* 2001; HOIBRAATEN *et al.* 2001).

1.4 Importância da Pesquisa dos Fatores Hereditários

O conhecimento de fatores adquiridos e hereditários envolvidos nas desordens da hemostasia pode elucidar os mecanismos envolvidos no processo de coagulação e possíveis interferências dos mesmos em diversas doenças trombóticas de tratamento ainda insatisfatório. Devido à importância clínica dos fenômenos trombóticos, a determinação de sua origem certamente fornecerá aos profissionais de saúde e a pacientes, benefícios no que se refere a diagnóstico, terapêutica e profilaxia. Pelo que

foi apresentado, embora seja um tema muito estudado nos últimos anos, restam ainda vários aspectos que precisam ser elucidados, entre os quais, os reais benefícios da confirmação laboratorial das trombofilias para estratégias de profilaxia das trombooses.

2 OBJETIVOS

Geral:

- Verificar a influência de fatores hereditários, sócio-demográficos e ambientais no desenvolvimento de eventos trombóticos em pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE/HUWC referência em hematologia para o estado do Ceará;

Específicos:

- Implantar a técnica para detecção da mutação do gene G20210A do gene da protrombina no Laboratório de Biologia Molecular – LABGEM;
- Determinar a frequência do fator V de Leiden e da mutação G20210A do gene da protrombina em pacientes apresentando pelo menos um evento trombótico, atendidos no ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE/HUWC referência em hematologia para o estado;
- Verificar a associação de eventos trombóticos com a presença do FV Leiden e da mutação da Protrombina;
- Verificar os riscos da idade, do sexo, hábito de fumar cigarro industrializado e de anticoncepcionais orais (ACO) em desenvolvimento de eventos trombóticos nos pacientes do HEMOCE/HUWC;
- Verificar os riscos dos fatores hereditários, mutação G1691A do gene do fator V e mutação G20210A do gene da protrombina para o desenvolvimento de trombose nos pacientes do HEMOCE/HUWC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, sendo incluídos 189 pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)/Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), entre dezembro de 2000 e dezembro de 2006.

Foram usados como critérios de inclusão: (1) diagnóstico de trombose, (2) ter idade inferior a 50 anos (idade limite do primeiro evento), (3) não apresentar diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico e/ou síndrome do anticorpo fosfolipídicos (SAAF), (4) não apresentar diagnóstico de neoplasia maligna, (5) não ser parente de primeiro ou segundo grau de outro paciente do grupo em estudo.

O grupo controle incluiu doadores de sangue do HEMOCE e voluntários sem história de trombose. Como critérios de exclusão foram considerados: histórico familiar de trombose, ser parente de paciente incluído no estudo.

Os pacientes e indivíduos da população controle, assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e responderam ao questionário que identificava idade, sexo, etnia, bem como se fazia uso do tabaco e do anticoncepcional oral (ACO). Foram considerados usuários de tabaco aqueles que fumavam pelo menos três cigarros por dia e do ACO aqueles que faziam uso durante a ocorrência do evento há mais de três meses.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará, segundo o protocolo N° 039.06.01.

Processamento do sangue

Foram coletados 5 mL de sangue em tubo contendo K3 EDTA (15%) 0,34M. O DNA genômico foi extraído dos leucócitos (*buffy-coat*), utilizando tampão TKM – 1 (10mM Tris-HCl; 10mM KCl; 10mM MgCl₂; 2mM de EDTA), TKM – 2 (10mM Tris-HCl, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,4M NaCl, 2mM EDTA) e SDS 10%, seguido da adição de NaCl 5M e álcool absoluto para precipitação do DNA. Depois de precipitado, o DNA foi lavado com álcool a 70%, ressuspenso em água estéril, submetido à corrida

eletroforética a 1%, para verificar a qualidade da extração e armazenado em *freezer* à – 14°C até sua utilização.

Análise genética

A presença das mutações G1691A do gene do fator V e G20210A do gene da protrombina foram detectadas através da Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP)

Fator V de Leiden

A PCR foi realizado utilizando-se 200ng de iniciadores (FV1 - CTTAAGGAAATGCCCCATTA 3' e FV2 - 5' CCATGCTTAACAAGACCA 3') para a região do *exon* 10 do gene do fator V, cuja seqüência foi descrita por Bertina (1994); 0,6 mM de desoxinucleotídeos; 2,5U de Taq DNA Polimerase (Pharmacia®); 200ng de DNA . As condições de realização da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento a 52°C por 40 segundos; alongamento a 72°C por 1 minuto; alongamento final a 72°C por 10 minutos com 30 ciclos de repetição, produzindo fragmentos de 220 pb. Após a verificação do sucesso da amplificação, foi realizada a restrição, utilizando a enzima *MnII*, capaz de clivar os produtos de PCR amplificado produzindo três fragmentos de 116pb, 37pb e 67pb em indivíduos sem a mutação. A presença de mutação foi detectada pela perda de um dos sítios de restrição, produzindo nos indivíduos homozigotos apenas dois fragmentos de 153pb e 67pb. Os indivíduos heterozigotos apresentam quatro fragmentos 37pb, 67pb, 116pb e 153pb (FIGURA 6 e 7).

Mutação G→A no exon 10 do gene do fator V (FV de Leiden)

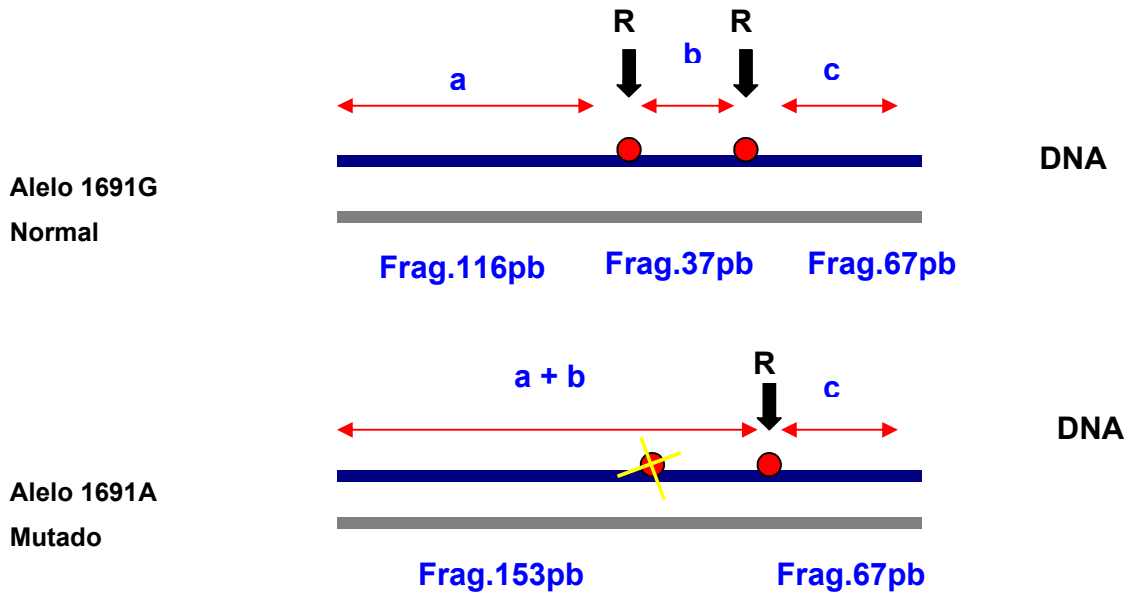


Figura 6 - Esquema ilustrando a perda do sítio de restrição da enzima *MnlI* em consequência da mutação de ponto do fator V Leiden.

● Sítio de Restrição da *MnlI*

R Enzima de Restrição *MnlI*

a, b, c: Fragmentos gerados pela ação da enzima de restrição

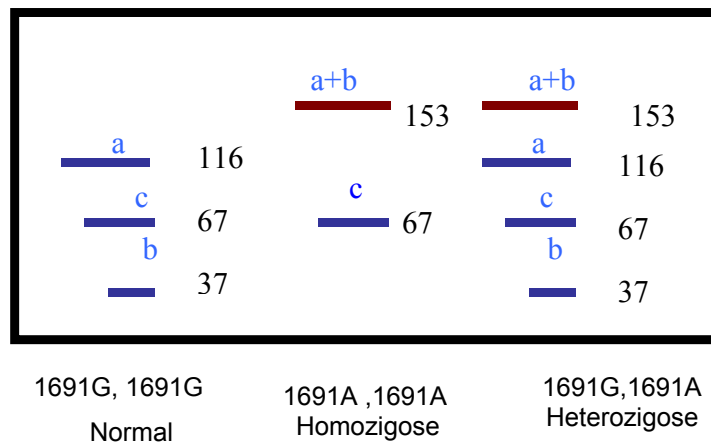


Figura 7: Ilustração esquemática da digestão do fragmento de 220pb gerado pela PCR, após digestão pela enzima de restrição *MnlI*

Mutação G20210A do gene da protrombina

A PCR foi realizado utilizando-se 200ng de iniciadores (PT-1:5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3' e PT-2:5'- ATAGCACTGGGAGCATTGAA*GC - 3') para a região não traduzida do gene da protrombina, cuja seqüência foi descrita por Poort (1996); 0,6mM de desoxinucleotídeos; 2,5U de Taq DNA Polimerase (Pharmacia®); 200ng de DNA . As condições de realização da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos; desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 57°C por 1 minuto; alongamento a 72°C por 1 minuto; alongamento final a 72°C por 10 minutos com 30 ciclos de repetição, produzindo fragmentos de 345 pb. Após a verificação do sucesso da amplificação, foi realizada a restrição, utilizando a enzima *Hind III*, capaz de clivar os produtos de PCR amplificado produzindo fragmentos de 322pb e de 23pb, quando existe a presença da mutação. (Figura 8)

Mutação G→A na Região não Traduzida do Gene da Protrombina

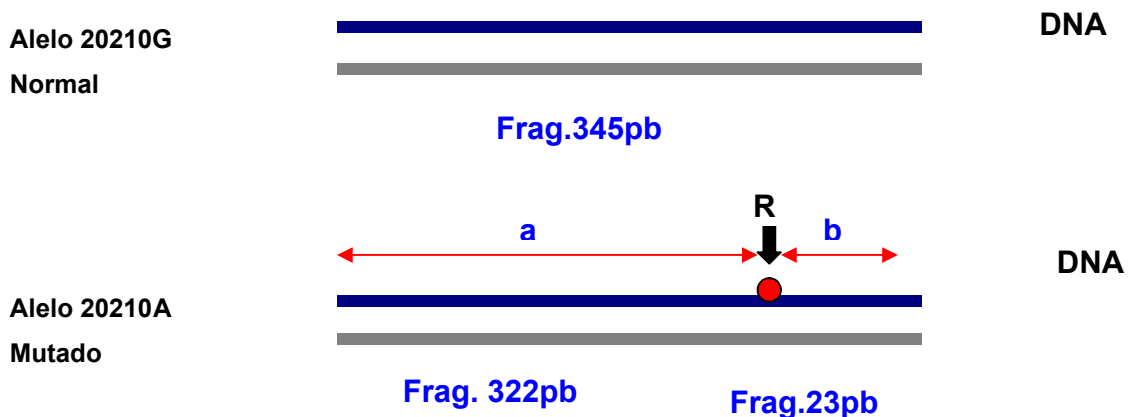


Figura 8 . Esquema ilustrando o sítio de restrição da enzima *Hind III* em consequência da mutação de ponto do gene da protrombina.

● Sítio de Restrição da *Hind III*

R Enzima de Restrição *Hind III*

a, b: Fragmentos gerados pela ação da enzima de restrição

A visualização dos fragmentos de PCR e restrição de ambas as mutações foram feitos em gel de poliacrilamida a 6%, corado pela prata e utilizando um padrão de

peso molecular de 100pb.

Análise Estatística

Foi realizado um estudo caso controle em grupos definidos como pacientes trombofilicos e população controle. O Teste Exato de Fisher verificou as possíveis distribuições dos fatores de risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos e permitiu fazer comparações entre os grupos designando as características significativas, quando encontrado $p < 0,05$. A partir daí os ODDS RATIO (OR) foram estimados em análise univariada.

A Regressão Logística foi utilizada para cálculo de ODDS RATIO (OR) na análise multivariada em fatores de risco significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Eventos Trombóticos

Foram estudados 189 pacientes com diagnóstico de trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EP), infarto agudo do miocárdio (IAM), trombose da veia da retina (TVR), trombose da veia mesentérica (TVM), trombose portal (TP), trombose renal (TR) e acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico. O diagnóstico por imagem foi realizado através de ultrason e/ou tomografia, ecografia com Doppler, arteriografia, tomografia, ressonância magnética.

A distribuição dos eventos trombóticos destes pacientes está sumarizada na Tabela 2. A maioria dos pacientes foi diagnosticada com TVP, sendo 93,1% (136/146) em membros inferiores e 6,9% (10/146) em membros superiores. Acidente vascular cerebral foi o segundo evento mais freqüente AVC, enquanto que os outros eventos trombóticos foram raros.

Quanto a recorrência de eventos trombóticos, apenas pacientes com TVP e AVC foram acometidos, sendo 32,9% (48/146) e 23,1% (6/26), respectivamente.

Tabela 2: Representação dos eventos trombóticos em pacientes trombofílicos

		PACIENTES TROMBOFÍLICOS
		N° (%)
TVP (Trombose Venosa Profunda)		98 (52,0)
TVP Recorrente	TVP-TVP	33 (17,5)
	TVP-AVC	05 (2,6)
	TVP-EP	09 (4,8)
	TVP-IAM	01 (0,5)
Total		146 (77,4)
AVC (Acidente Vascular Cerebral)		20 (10,6)
AVC-AVC Recorrente		06 (3,2)
Total		26 (13,8)
EP (Embolia Pulmonar)		04 (2,1)
IAM (Infarto Agudo do Miocárdio)		03 (1,6)
TP (Trombose Portal)		02 (1,0)
TVM (Trombose da Veia Mesentérica)		04 (2,1)
TVR (Trombose da veia da Retina)		02 (1,0)
TR (Trombose Renal)		02 (1,0)
Total		189 (100,0)

4.2 Pacientes e População – Características Epidemiológicas

Quanto ao gênero, 143 (75,7%) era feminino e 46 (24,3%) masculino (Gráfico 1). Na população controle estudada, (n=349), a distribuição dos sexos masculino e feminino

foi semelhante (Gráfico 2). Entre os dois grupos, pacientes e população, houve diferença significativa ($p < 0,001$) e o sexo feminino apresentou risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos. As análises de ODDS RATIO para a característica estão descritas na tabela 5.

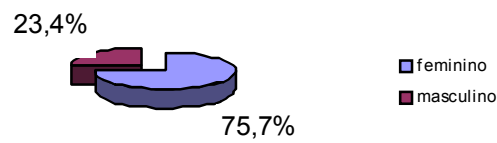


Gráfico 1- Distribuição dos pacientes quanto ao gênero



Gráfico 2- Distribuição do grupo controle quanto ao gênero

Considerando os pacientes que desenvolveram TVP (146) e recorrência de TVP (33), pacientes do sexo feminino foram mais frequentes com 81% (118) e 94% (31), respectivamente.

Os gráficos 3 e 4 indicam as faixas etárias dos pacientes e da população controle. A idade dos pacientes correspondeu à idade da ocorrência do primeiro evento trombótico e variou de 7 a 50 anos. A faixa etária entre 20 e 39 anos foi predominante, com 60,8% (115/189), seguida por de 25,4% (48/189) entre 40 e 50 anos. No grupo controle, a idade variou de 14 a 50 anos e houve predomínio da faixa etária de 20 a 29 anos com 45% (157/349), sendo as demais faixas etárias representadas com porcentagens muito inferiores. Entre os de faixas etárias, houve diferença significativa ($p < 0,001$), sendo a idade ≥ 40 anos risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos. As análises de ODDS RATIO para a característica estão descritas na tabela 5.

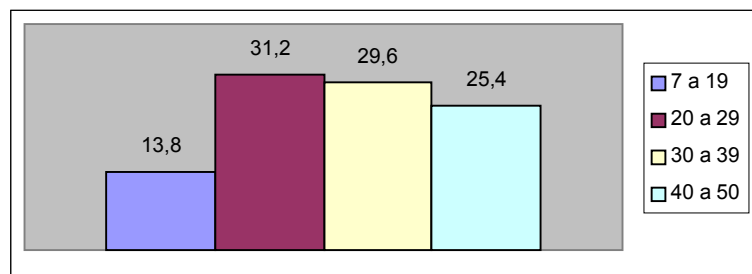


Gráfico 3: Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa

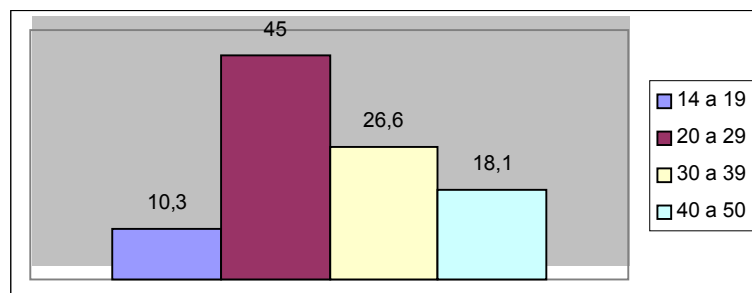


Gráfico 4-Distribuição do grupo controle quanto a faixa etária

Quanto à cor, os pacientes ficaram assim distribuídos: 51,9% (98/189) eram pardos, e 45% (85/189), eram brancos. Houve também predomínio da cor parda no grupo controle, sendo que a cor negra teve frequência baixa em ambos os grupos (Gráficos 5 e 6).

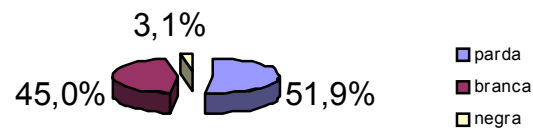


Gráfico 5- Distribuição dos pacientes quanto à cor

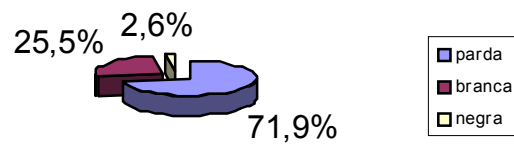


Gráfico 6- Distribuição do grupo controle quanto à cor

Quanto aos fatores de risco ambiental, a frequência do uso do tabaco em pacientes (20,1%) foi superior a da população controle (1,4%) como mostra o Gráfico 7. Entre os dois grupos, pacientes e população, houve diferença significativa ($p < 0,001$), sendo o uso do tabaco fator de risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos. As análises de ODDS RATIO para a característica estão descritas na tabela 5.

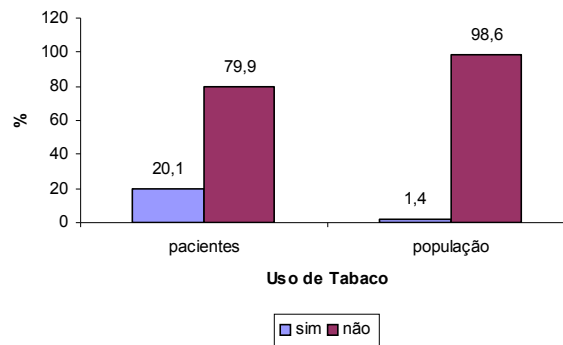


Gráfico 7-Distribuição da frequência do uso do tabaco nos pacientes e no grupo controle

Nas mulheres foi verificado que as frequências do uso de ACO no grupo de pacientes e população foram semelhantes, 61,5% (88/143) e 58,9% (93/158) (Gráfico 8). Entre os dois grupos, pacientes e população, não houve diferença significativa ($p = 0,640$).

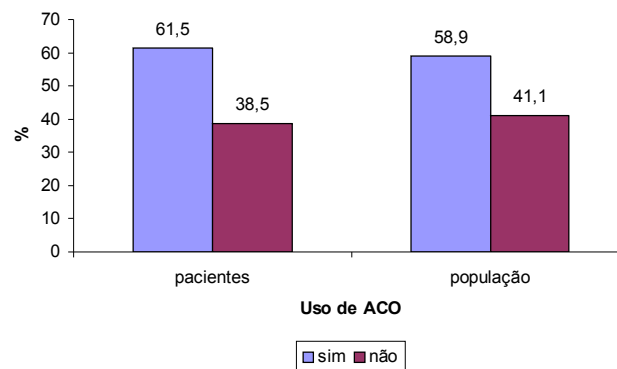


Gráfico 8- Distribuição da frequência do uso do ACO nas pacientes e no grupo controle

4.3 Pacientes e População Controle – Mutações

O fator V de Leiden foi encontrado em 9,0% (17/189) dos pacientes com trombose e em 2,0% (7/349) nos indivíduos da população controle. Todos foram portadores da mutação em heterozigose. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, pacientes e população, ($p < 0,001$). (Gráficos 9 e 10). As análises de ODDS RATIO para a característica estão descritas na tabela 5.

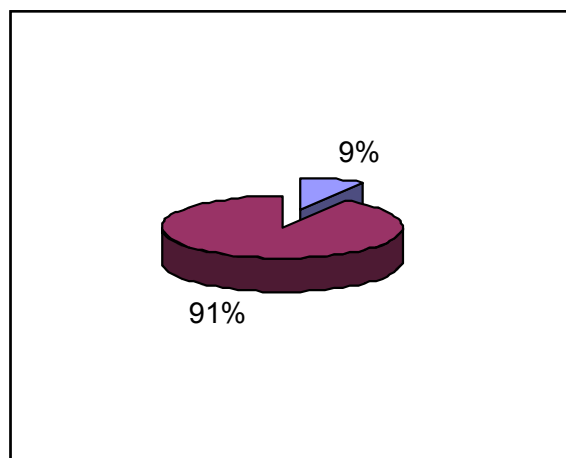


Gráfico 9: Distribuição dos pacientes quanto à presença da mutação do FVL

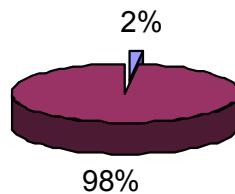


Gráfico 10: Distribuição do grupo controle quanto à presença do FVL

A mutação da protrombina foi encontrada em 2,1% (4/189) dos pacientes, sendo um homozigoto e três heterozigotos e em 1,7% (6/349) dos indivíduos da população controle, todos portadores da mutação em heterozigose. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,747$). (Gráfico 11 e 12)

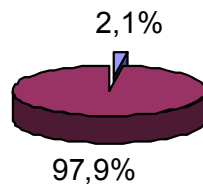


Gráfico 11: Frequência da mutação do fator II nos pacientes com trombose

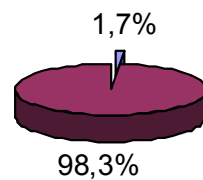


Gráfico 12: Frequência da mutação do fator II na população controle

Em relação a concomitância do FVL e da mutação do gene da protrombina, apenas um homem de 26 anos, pardo, da população controle foi portador de ambas as mutações.

4.4 Características dos Pacientes Mutados

A tabela 3 mostra os eventos trombóticos dos portadores da mutação do fator V e da protrombina. Observa-se que dentre os pacientes os mutados para o fator V, 82,3% (14/17) desenvolveram TVP. Três dos 4 portadores da mutação da protrombina desenvolveram TVP. De todos os pacientes que desenvolveram TVP (146), 17 (11,6%) apresentaram pelo menos um tipo de fator hereditário associado, sendo 14/146 (9,5%) portadores do FVL e 3/4 da mutação da protrombina. Apesar de AVC ser o segundo evento mais freqüente, nenhuma mutação foi relacionada com o seu desenvolvimento.

Em relação aos pacientes que apresentaram episódios de recorrências (n=54), 7 (13%) apresentaram pelo menos um fator de risco hereditário associado. Considerando o número total dentre os pacientes com TVP recorrente (n=48), 7 (14,6%) eram portadores de pelo menos um fator hereditário, sendo 6/48 (12,5%) portadores do FVL e 2,0% (1/48) portador da mutação da protrombina. Dentre os pacientes portadores do FVL 35,3% (6/17) sofreram recorrência (Tabela 3).

Tabela 3: Representação dos eventos trombóticos relacionados com as mutações do fator V e da protrombina

DIAGNÓSTICO	Pacientes Trombofílicos		
	Fator V(%)	Protrombina (%)	Total
TVP (Trombose Venosa Profunda)	8/98 (8,2)	2/98 (2)	10
TVP/EP	1/9 (11,1)	-	01
TVP/TVP	5/33 (15,1)	1/33 (3)	06
TM (Trombose Mesentérica)	1/4 (25)	-	01
TO (Trombose da Veia da Retina)	1/2 (50)	-	01
IAM (Infarto Agudo do Miocárdio)	1/3 (33,3)	-	01
Trombose Renal	-	1/2 (50)	01
Total	17	04	21

A tabela 4 mostra as características dos pacientes que desenvolveram trombose e população controle que são portadores das mutações do fator V e protrombina. . Dentre os pacientes mutados para o fator V, foi observado predominância do sexo feminino, estando representado por 70,6% (12/17). Os mutados do sexo masculino apresentaram apenas 29,4% (5/17). A faixa etária mais freqüente foi entre 30 e 39 anos com 8 (47,1%). Em relação a cor, a parda foi predominante sendo representada por 58,8% (10/17). Não foi observada a mutação em negros. Apenas 6/17 (35,3%) eram tabagistas. Dos 7 indivíduos da população controle portadores da mutação do fator V, 57,1% (4/7) eram do sexo masculino e 42,9% (3/7) do sexo feminino. A cor predominante foi a parda com 71,4% (5/7). Nenhum dos indivíduos sadios mutados para o fator V faziam uso de tabaco.

A mutação da protrombina em pacientes com trombose foi mais freqüente em mulheres 75% (3/4), e dentre as mutadas todas faziam uso de ACO na época do evento trombótico. A heterozigose foi prevalente, ocorrendo apenas um homozigoto do sexo feminino. A cor parda foi predominante, com 3/4 dos mutados e a maioria (2/4) tinha entre 20 e 29 anos. Dos indivíduos da população controle portadores da mutação da protrombina, 4 eram do sexo masculino e 2 do sexo feminino, todos eram pardos (Tabela 4).

Tabela 4: Representação das características dos pacientes e população controle portadores das mutações do fator V e da protrombina.

Características	Mutados Fator V		Mutados Protrombina	
	Pacientes (n=17)	População (n=7)	Pacientes (n=4)	População (n=6)
Idade do evento (anos)				
12 a 19	4 (23,5%)	–	1 (25%)	–
20 a 29	5 (29,4%)	–	2 (50%)	–
30 a 39	8 (47,1%)	–	1 (25%)	–
40 a 50	–	–	–	–
Cor				
Parda	10 (58,8%)	5 (71,4%)	3 (75%)	6 (100%)
Branca	7 (41,2%)	2 (28,6%)	1 (25%)	0 (0,0%)
Negra	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Sexo				
Masculino	5 (29,4%)	4 (57,1%)	1 (25%)	4 (66,6%)
Feminino	12 (70,6%)	3 (42,9%)	3 (75%)	2 (33,3%)
ACO	8/12 (66,7%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/2 (50%)
Tabagismo	6 (35,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

4.5 Estudo Caso-controle

Os dados foram analisados com e sem pareamento. O grupo não pareado foi constituído por todos os indivíduos da população controle e pacientes (n=538).

O pareamento foi feito com 97 pacientes e 97 indivíduos da população controle, selecionados de acordo com características comuns como, uso de ACO, idade, sendo com um intervalo de 2 anos para mais ou para menos. Neste grupo estão incluídos todos os mutados tanto para o FVL quanto para a protrombina.

Na Tabela 5 estão sumarizados os fatores de riscos que influenciaram no desenvolvimento de eventos trombóticos, representados pelas análises univariada, multivariada e pareados. As análises foram realizadas independentemente do tipo de

trombose ou sua localização, sendo considerados apenas os dois grupos, pacientes e população.

Tabela 5: Análise univariada e multivariada do estudo caso-controle

*pareados para ACO e idade.

FATORES DE RISCO	NÃO PAREADOS (n=358)		PAREADOS* (n=194)
	UNIVARIADA OR (IC 95%)	MULTIVARIADA OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Sexo Feminino	3,7 (2,3 A 5,6)	4,1 (2,6 a 6,7)	-----
Idade \geq 40 anos	2,0 (1,2 a 3,3)	-----	-----
Tabaco	17,3 (6,7 a 44,8)	14,9 (5,3 a 41,3)	33,3 (4,4 a 251,8)
Fator V de Leiden	4,8 (1,9 a 11,9)	5,3 (1,8 a 15,1)	9,8 (1,2 a 79,0)

5 DISCUSSÃO

As doenças trombóticas constituem um grave problema de saúde pública, representando uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade nas sociedades ocidentais, podendo ter etiopatologia multifatoriais onde fatores de risco ambientais e hereditários estão envolvidos em seu desenvolvimento. (DAHLBACK *et al.* 2008) Os hereditários mais freqüentes são o fator V de Leiden e a mutação G20210A do gene da protrombina, os quais variam de acordo com a etnia. Tal implicação étnica é de extrema importância para a distribuição da freqüência das mutações nas diversas amostras populacionais e explica as variações geográficas das doenças trombóticas.

O Brasil é formado por uma população miscigenada, formada por europeus, asiáticos, africanos bem como grupos indígenas e o Ceará possui formação étnica peculiar com populações asiáticas e africanas quase ausentes (ARRUDA *et al.* 1995). Apesar de vários estudos terem sido realizados em outros países, principalmente europeus, relacionando a associação entre mutações e o desenvolvimento de trombose, no Brasil, as pesquisas na área estão restritas ao sudeste do país, havendo apenas um relato na região nordeste. Portanto, faz-se necessário o estudo das freqüências das mutações por região (ARRUDA *et al.*, 1995, RAMOS *et al.* 2006, RODRIGUES *et al.* 2004).

PACIENTES E POPULAÇÃO – Fatores Epidemiológicos, e Clínicos

Segundo os dados encontrados a TVP foi o evento trombótico mais freqüente no estudo. No entanto, Giuntini *et al.* (1995) e Golin *et al.* (2002), afirmaram que a incidência de TVP é inferior a de IAM e AVC, sendo a terceira doença trombótica mais comum. Os achados podem ser explicados devido ao curso subclínico da TVP, a qual pode ser referenciada para centros ambulatoriais, como o HEMOCE, enquanto que os outros eventos trombóticos aqui considerados, inclusive AVC e IAM, têm a necessidade de atendimento de urgência e emergência, sendo referenciados para cardiologistas, neurologistas, gastroenterologistas e oftalmologistas, especialistas não disponíveis no

centro estudado.

Bombeli *et al.* (2002) e Bontempo *et al.* (1997) encontraram freqüências de TVP (53% e 66%) e AVC (9,2% e 10%) inferiores às do presente estudo (77,4% e 13,8%) e freqüências superiores das trombozes da veia mesentérica (4%), retina (12,3% e 7%), porta (7,6%), além de IAM (7%) e EP (31%).

Tromboembolismo venoso ou embolia pulmonar é a principal e mais grave recorrência consequência de TVP (ANDERSON *et al.*, 1991). Os pacientes do estudo com TVP recorreram com EP em 4,8%, sendo inferior a de outros autores os quais encontraram de 13,1% a 45% de TVP que recorreu com EP (NIZANKOWSKA-MONGILICKA 2003, JUN 2006, EHRENFORT 1999).

Quanto à distribuição dos pacientes pelo gênero, na amostra estudada, o sexo feminino apresentou número de participantes superior (75%) ao masculino e foi estatisticamente mais susceptível ao desenvolvimento de trombose, com um risco 3 vezes maior, tanto na análise univariada quanto na multivariada. Entretanto, o sexo por si não é um fator de risco hereditário para tromboembolismo e, de modo geral, a incidência do primeiro evento trombótico é igual entre homens e mulheres (ANDERSON 1991, NORDSTROM 1992, WHITE 2003). A freqüência superior, em pacientes trombofilicos do sexo feminino, é justificada por alguns autores, pela exposição a fatores de risco como o uso de anticoncepcionais orais, alterações nas proteínas do sistema anticoagulante em gestantes, além da terapia de reposição hormonal no climatério (VANDENBROUCKE 1994; RINTELEN 1996; KUPFERMINEC 1999; PAMPUS 2001; PEVERILL, 2003).

O uso de anticoncepcionais orais aumenta significativamente o risco da ocorrência de eventos trombóticos em mulheres. Há relatos que o uso de ACO pode estimular o sistema pró-coagulante, inibir o sistema anti-coagulante e estimular a fibrinólise (LINDQVIST *et al.* 2002, BLOEMENKAMP *et al.*, 1998). Do total de mulheres analisadas com doença trombótica, 88 (61,5%) fizeram uso de ACO. Portanto, existe uma associação com o uso de ACO e o desenvolvimento de eventos trombóticos nas pacientes estudadas.

A freqüência de TVP e suas recorrências foram maiores em mulheres, sendo 81% (118/146) e 94% (31/33), respectivamente. Alguns estudos prévios concordam que

as mulheres têm recorrência mais freqüentes com um segundo ou mais eventos que os homens. No entanto, Kyrle *et al.*, 2004 e Baglin *et al.*, 2004, encontraram 2,6 e 3,5 vezes maior risco de recorrência do primeiro evento trombótico em homens do que em mulheres (ANDERSON, 1991; NORDSTROM, 1992; WHITE, 2003).

Em relação à idade do primeiro evento, somente pacientes com primeiro evento ocorrido anterior a 50 anos foram selecionados. Este critério foi utilizado por diversos autores que visaram o estudo de fatores hereditários associados a eventos trombóticos e a conseqüente exclusão de fatores ambientais como hipertensão, diabetes, reposição hormonal, traumas, câncer, hiperlipidemia, mais comuns a partir desta idade, os quais são interferências ambientais para ocorrência de eventos trombóticos (EHRENFORTH *et al.*, 1999, RUIZ-ARGUELLES *et al.*, 2004, ALMAWI. *et al.*, 2005).

A faixa etária mais prevalente do primeiro evento dentre os que participaram do estudo foi entre 20 e 39 anos (60,8%), concordante com o relatado por Alhenc-Gelas *et al.* (1999) que encontraram a idade média de seus pacientes para o primeiro evento de 38,1 anos, caracterizando a ocorrência da trombose em indivíduos jovens.

Pacientes com faixa etária entre 40 e 50 anos desenvolveram 2 vezes mais eventos trombóticos. A idade mais avançada associada ao risco de evento trombótico corrobora com achados de autores como Glynn *et al.* (2005) que descreveram maiores riscos de ocorrer AVC e tromboembolismo venoso em pacientes acima de 40 anos; Ridcker *et al.* (1999) observaram que pacientes com idade igual ou superior a 60 anos tiveram maior probabilidade de desenvolver trombose venosa e/ou arterial; Tsai *et al.* (2002) concluíram que pacientes com idade igual ou superior a 80 anos desenvolveram trombose mais freqüentemente do que aqueles entre 45 a 84 anos, o que caracteriza que o risco de trombose aumenta com a idade.

Quanto aos fatores clínicos, encontrou-se que os pacientes fizeram maior uso do tabaco (20,1%) do que a população controle (1,4%). Os produtos que constituem o cigarro, como a nicotina, induzem estado pro-trombótico, através da ativação plaquetária sendo associado com o desenvolvimento de trombose arterial (HIOKI *et al.*, 2001). O uso do tabaco foi o fator de risco mais relevante para a ocorrência de trombose arterial ou venosa, concordando com Hansson *et al.* (1999) e Reny *et al.* (2004) os quais já haviam constatado a influência do tabagismo no desenvolvimento de tais eventos.

Contraditoriamente, alguns autores, não encontraram associação entre tabagismo e trombose (HEIT *et al.*, 2000, GLYNN *et al.*, 2005, TSAI *et al.*, 2002, SUGIMURA *et al.*, 2006).

Fator V de Leiden e Mutação G20210A da Protrombina

O fator V de Leiden foi descoberto por Bertina *et al.* (1994) na cidade de Leiden, Holanda, daí sua denominação. Está relacionado com a resistência da proteína C ativada e é a causa mais comum de trombose venosa dentre os fatores hereditários já descritos. Está presente em 20% a 60% dos pacientes com história pessoal ou familiar de trombose venosa profunda (BERTINA *et al.*, 1994; EHRENFORTH *et al.*, 2004).

A mutação G20210A do gene da protrombina é a segunda mais comum alteração genética presente em pacientes trombofílicos e está relacionada com o aumento da protrombina circulante de aproximadamente 25% (Poort *et al.*, 1996).

O fator V de Leiden e a mutação G20210A do gene da protrombina têm aparecimento posterior à separação dos caucasóides e mongolóides e apresentam idades estimadas, através de microssatélites e *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), em 23.270 anos para a protrombina e 21.340 anos para o FVL (ZIVELIN *et al.*, 1997, 1998 e 2006) Especula-se que o Oriente Médio seja o local de origem das mutações devido às elevadas prevalências em países da região. Assim o FVL está presente em 12% a 14% em árabes residentes em Israel, Jordânia e Síria e a mutação da protrombina tem freqüência de 6,7% em judeus da Arábia, 5,5% em judeus do norte da África e 4% em judeus do Iraque, enquanto que freqüências inferiores foram encontradas em países europeus, sugerindo, assim a origem monocêntrica das mutações (ROSENDAAL *et al.*, 1998; SELIGSOHN *et al.* 1997; IRANI-HAKIME *et al.*, 2000).

Segundo Lucotte e Mercier (2001) em estudo realizado em 6000 indivíduos oriundos de 26 populações diferentes da Europa e países vizinhos, o FVL tem origem na Anatólia (região asiática da Turquia) e se dispersou para a Europa Ocidental, via Grécia e Europa Central, com a difusão da agricultura no período Neolítico migraram com os agricultores. Elas teriam migrado também para a Índia, Arábia Saudita, cidades da

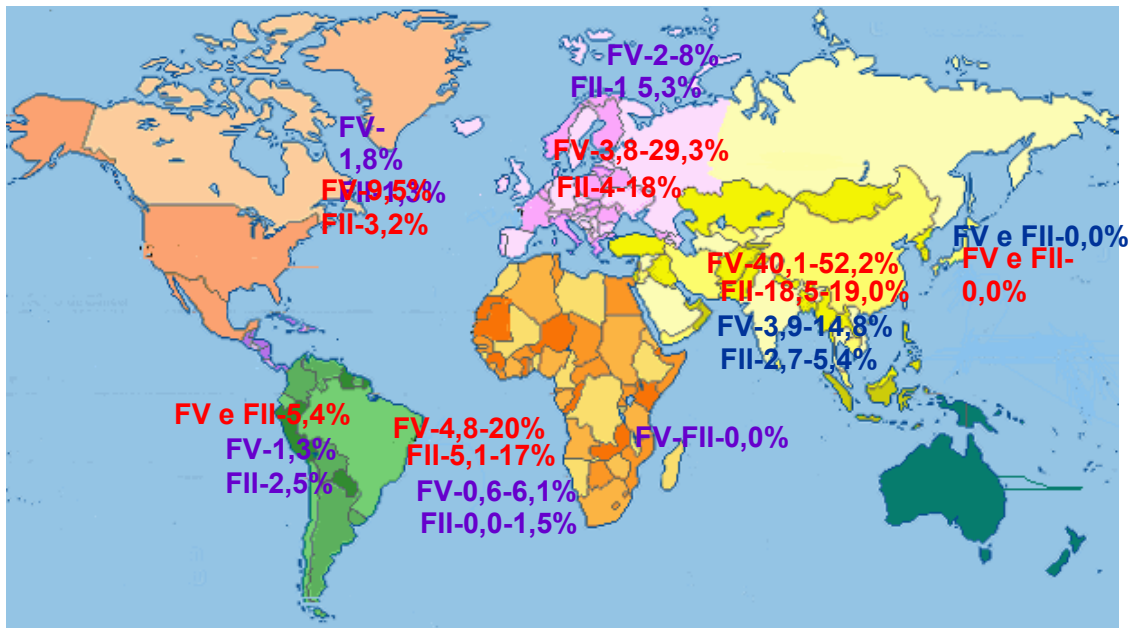
região do Mar Mediterrâneo e norte da África (AKAR *et al.*, 1997; CAVALLI-SFORZA, 1988 e 1993; DZIMIRI e MEYER 1996; GAREWAL *et al.*, 1997). O fato explica a variabilidade entre as freqüências das mutações, as quais são mais freqüentes entre caucasianos e menos freqüentes ou ausentes em negros africanos, chineses, japoneses e índios (REES, COX, CLEGG, 1995; RIDKER *et al.*, 1997).

Ao longo dos séculos, o fator V de Leiden e a mutação da protrombina sobreviveram a inúmeras combinações genéticas entre as populações. O fato pode ser resultado de um seletivo avanço em portadores heterozigotos por oferecer grande contribuição benéfica e de sobrevivência quando os recursos em atendimento de urgência e emergência médica eram muito rudimentares. Elas protegiam seus portadores em situações graves que ocasionariam mortalidade ou morbidade como infecções e hemorragias menstruais, pós-parto, intracranianas, cirúrgicas e seguidas de traumas. Uma segunda hipótese para a consagração das duas mutações por tantos mil anos se deve ao fato de que a freqüência de eventos trombóticos eram muito inferiores aos encontrados hoje, já que muitos fatores de risco ambientais para tal doença, tais como alimentação rica em lipídeos, vida sedentária, maior número de cirurgias e internamentos, uso de ACO e reposição hormonal, são resultado das mudanças no estilo de vida moderna (LINDQVIST *et al.*, 1998 e 2001; REES 1996; ZIVELIN *et al.*, 1997 e 1998; CORRAL *et al.*, 2001; NICHOLS *et al.*, 1996; DONAHUE *et al.*, 2003).

O atual estudo encontrou 2,1 e 1,7% freqüências do fator V de Leiden e mutação da protrombina respectivamente em indivíduos livre de trombose. Apesar de freqüências para as mutações G1691A do fator V e G20210A da protrombina no Brasil variarem de 0,0% a 2,0% e 0,6% a 6,1%, respectivamente; estudos realizados em São Paulo e Rio de Janeiro encontraram freqüências semelhantes ao estudo, mostrando que apesar de colonizadores europeus terem vindo tanto para o sudeste quanto para o nordeste, os grupos de japoneses e índios que colonizaram o sudeste e Ceará respectivamente, diminuíram as freqüências de ambas as mutações nos estados (tabelas 6). Em estudos realizados em países da América, os resultados do atual estudo coincidiram com os dos Estados Unidos, mas diferiram do Chile (tabela 6). Em países europeus, o resultado do estudo coincidiu com os da Itália, Espanha quando se considerou a mutação do fator V e com os da Alemanha, Suécia e Holanda, considerando a mutação da protrombina

(tabela 6 e figura 9).

Figura 9: Representação geográfica mundial do FV de Leiden e da mutação G20210A no gene da protrombina em pacientes (cor vermelha) e população (cor azul) (dados contidos nas tabelas 5 e 6). www.colegiosaofrancisco.com.br



Considerando o número total de pacientes trombofílicos (189), foi encontrado 9% de freqüência do FVL. De acordo com a tabela 7, os resultados deste estudo coincidiram com outros realizados no Brasil, (São Paulo - 8,5%) e América do Norte (Estados Unidos - 9,5%), mas foi inferior ao estado de Pernambuco (13,6%) e superior ao do Chile (5,4%). Comparando com países europeus, apesar de terem freqüências variáveis de 3,8% a 30%, houve semelhança com freqüências encontradas na Suécia (11,4%) (tabela 7 e figura 9).

Comprovadamente o FVL está associado ao desenvolvimento de trombose venosa, sendo encontrado em 20% a 40% dos casos. Estima-se que os portadores da mutação em homozigose e aproximadamente 10% dos heterozigotos apresentarão pelo menos um evento de TVP ao longo de suas vidas. (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997; KUJOVICH & GOODNIGHT, 1999). Dentre os pacientes do estudo que desenvolveram apenas TVP (146), 11,6% (17) portavam pelo menos um fator hereditário associado, sendo que 9,5% portavam apenas o FVL. Dentre os pacientes com TVP recorrentes

(48), 14,6% (7/48) eram portadores de pelo menos um fator de risco hereditário para trombose, sendo que 12,5% (6/48) eram portadores do FVL. Os dados indicam uma tendência dos pacientes que portaram o FVL de desenvolver TVP ou recorrência, corroborando com a literatura. (tabela 7)

Em relação ao desenvolvimento de trombose na veia da retina, apesar de apenas 2 pacientes terem desenvolvido, um foi portador da mutação G1691A do fator V. Outros autores encontraram o FVL em pacientes com trombose da retina com frequência que variou de 2% e 11%, no entanto, salienta-se que a associação é limitada tendo em vista que o número de pacientes utilizado na literatura foi muito superior ao estudo. (DERMICI *et al.*, 1999, HODGKINS *et al.*, 1995, GRAHAM *et al.*, 1996, RAGUENES *et al.*, 1996, LARSSON *et al.*, 1997, LINNA *et al.*, 1997, GOTTIEB *et al.* 1998, CIARDELLA *et al.*, 1998 e TRAIPE *et al.*, 2005). Os estudos são importantes para o diagnóstico e prognóstico da trombose da veia da retina, visto que em adultos jovens as causas não são elucidadas na maioria dos casos (FONG e SCHATZ 1993).

Pacientes com trombose da veia mesentérica, embora em pequena quantidade (4), um apresentou a mutação do FV. Margaglione *et al.* (2001) e Amitrano *et al.* (2001) estudaram a presença do fator V de Leiden em pacientes com trombose mesentérica e encontraram frequência da mutação em 5% e 75% respectivamente. No entanto nos estudos o número de pacientes foi muito superior ao nosso.

No que se refere ao risco, o FVL aumentou em 4 e 9 vezes, em análises dos não pareados e pareados, respectivamente, as probabilidades de desenvolver eventos trombóticos. De acordo com a tabela 7 os resultados foram semelhantes aos encontrados por Palomo *et al.* (2005) e Hessner *et al.* (1999) e Alwawi *et al.* (2005) em estudos realizados no Chile, Estados Unidos e Líbano, mas foram inferiores aos encontrados em outros países da Europa, exceto França e Espanha (Tabela 6).

A frequência da mutação do gene da protrombina em pacientes com trombose no estado do Ceará foi de 2%. O resultado foi inferior a outros estudos realizados no Brasil, outros países da América, norte da Europa e Ásia, exceto Japão, que apresentou frequência de 0,0% da mutação (tabela 7 e figura 9). A história da população brasileira, formada pela contribuição de grande número de componentes étnicos, está refletida na diferença de frequência de mutações na população brasileira e pode ajudar a explicar

Tabela 6: Representação de freqüências das mutações do fator V e protrombina em populações diversas regiões do mundo.

Autor	N	FV (%)	FII (%)	População
Rodrigues et al. 2004	134	2,2	0,7	Brasil (SP) capital
Arruda et al. 1995	Ne	2,0	Ne	Brasil (SP) Campinas
Arruda et al. 1998	295	Ne	0,7	Brasil (SP) Campinas
Arruda et al. 1999	296	0,7	0,7	Brasil (SP) Campinas
Arruda et al. 1997	130	6,1	1,5	Brasil (SP) Campinas
Gadelha et al. 2005	217	1,0	2,0	Rio de Janeiro (RJ)
Franco et al. 1998	148	NE	0,0	Brasil (AM) ameríndios
Franco et al. 1999	151	0,6	ne	Brasil (AM) ameríndios
Palomo et al. 2005	160	1,3	2,5	Chile
Hessner et al. 1999	192	1,8	1,3	USA
Cattaneo et al. 1999	416	3,2	2,3	Itália – Milão
Martinelli et al. 1999	277	2,5	2,5	Itália – Milão
Martinelli et al. 1998	12	3,0	3,0	Itália – Milão
Cattaneo et al. 1999	351	2,6	2,6	Itália – Milão (norte)
De Stefano et al. 1998	198	2,5%(0,5%)	2,5	Itália – Milão
De Stefano et al. 1998	559	2,9	2,5	Itália – Roma (central)
Margaglione et al. 1998	850	5,1	4,6	Itália – Nápoles e Palermo (sul)
Alhec-Gelas et al. 1999	398	3,5	2,8	França
Emmerich et al. 1997	398	3,8	2,8	França
Nizankowska-Mogilnicka et al. 2003	100	3,0	1,0	Polônia
Francês et al. 2006	498	2,0	5,3	Espanha
Ehrenforth et al. 1999	450	ne	2,0	Alemanha
Hillarp et al. 1997	281	2,8	1,8	Suécia
Cumming et al. 1997	161	4,3	1,3	Reino Unido (Manchester)
Bowen et al. 1998	300	8,0	1,0	Reino Unido (Cardiff)
Rosendaal et al. 1998	474	3,0	2,3	Holanda
Arsov et al. 2006	200	5,5	Ne	Macedônia
Djordjevic et al. 2004	120	5,8	4,2	Sérvia (ER)
Alwawi et al. 2005	1353	9,7	2,7	Arábia Saudita (Ásia)
Salomon et al. 1999	336	3,9	5,4	Israel
Alwawi et al. 2005	697	13,8%(1%)	3,6	Líbano
Jun et al. 2006	102	0,0	0,0	Japão
Franco et al. 1998	40	Ne	0,0	Japão
Franco et al. 1999	40	0,0	Ne	Japão
Franco et al. 1998	97	0,0	Ne	África

Ne – não encontrado

Tabela 7: Representação de freqüências das mutações do fator V e protrombina em pacientes com trombose em diversas regiões do mundo.

Autor	N	FV (%)	FII (%)	OR	População
Rodrigues et al. 2004	42	4,8	16,7	2,2/26,6	Brasil (SP) Capital
Arruda et al. 1995	Ne	20,0	Ne	Ne	Brasil (SP) Campinas
Arruda et al. 1997	176	8,5	5,1	Ne	Brasil (SP) Campinas
Gadelha et al., 2005	26	8,0	23,0	6,0/21,0	Rio de Janeiro (RJ)
Ramos et al. 2006	292	12,3(1)	Ne	Ne	Brasil (PE)
Palomo et al. 2005	149	5,4	5,4	4,2/2,0	Chile
Hessner et al. 1999	330	9,5	3,2	4,5/2,4	USA
Cattaneo et al. 1999	118	18,3(2,9)	15,9	7,8/8,7	Itália - Milão
Martinelli et al. 1999	148	16,5	9,4	9,7/5,7	Itália – Milão
Martinelli et al. 1998	120	13(5)	18,0	Ne	Itália - Milão
Margaglione et al. 1998	348	18,9	14,9	Ne	Itália – Nápoles e Palermo
Cattaneo et al. 1999	435	19,7	11,7	Ne	Itália – Milão
De Stefano et al. 1998	314	18,8	8,0	Ne	Itália – Roma
De Stefano et al. 1998	72	5,5	8,3(2,8)	Ne	Itália - Milão
Alhec-Gelas et al. 1999	250	19,5	10,0	3,3/4,0	França
Emmerich et al. 1997	270	20,4	11,9	Ne	França
Nizankowska-Mogilnicka et al. 2003	149	18,4(0,6)	4,0	6,9/3,2	Polônia
Francês et al. 2006	131	3,8	5,3	2,0/1,0	Espanha
Ehrenforth et al. 1999	263	Ne	11,4	Ne	Alemanha
Hillarp et al. 1997	99	11,4	7,0	Ne	Suécia
Cumming et al. 1997	194	14,9	5,7	Ne	Reino Unido - Manchester
Rosendaal et al. 1998	474	19,5	6,2	Ne	Holanda
Simioni et al. 2000	251	16,3	10,0	Ne	Holanda
Djordjevic et al. 2004	175	29,3(0,6)	10,9(0,6)	6,6/2,8	Sérvia (ER)
Arsov et al. 2006	190	20(1,8)	Ne	Ne	Macedônia (ER)
Salomon et al. 1999	162	31,5(8,6)	16,7(1,8)	16,0/3,5	Israel
Alwawi et al. 2005	198	44,4(7,6)	18,7(0,5)	4,8/7,4	Líbano
Jun et al. 2006	267	0,0	0,0	Ne	Japão

Ne – não encontrado

diferenças na prevalência de doenças trombóticas (ARRUDA *et al*, 1995).

Em relação à mutação da protrombina, não foi encontrada associação para o desenvolvimento de eventos trombóticos, arterial ou venoso ($p=0,747$). Contrariamente Salomon *et al* (1999), Nizankowska-mogilnicka *et al* (2003) e Pallomo *et al* (2005), em estudos anteriores encontraram que a mutação da protrombina aumentou em 3,5; 2,3 e

2,0 vezes as probabilidades de pacientes desenvolver eventos em tromboembólicos (Tabela 7).

No que concerne à presença da mutação G20210A da protrombina segundo o desenvolvimento de trombose venosa profunda, dentre os quatro pacientes portadores da mutação da protrombina, três desenvolveram TVP e um sofreu recorrência de TVP. A frequência foi inferior ao de outros estudos da literatura que encontraram variação de 5,1% a 19% em pacientes com único evento de TVP e 17% a 19% e, pacientes com TVP recorrentes (DE PAULA SABINO *et al.* 2007, MARTINELLI *et al.* 1998, PALOMO *et al.*, 2005, CATTANEO *et al.* 1999).

O número de pacientes com trombose renal e a mutação da protrombina foi baixa (1/2). Heller *et al.* (2000) encontraram 3,2% de pacientes com TR portadores da mutação. Estudos caso-controle em pacientes com trombose renal são incomuns e o resultado sugere a importância de estudos adicionais em pacientes com tromboembolismos abdominais e fatores hereditários.

Fatores hereditários, tais como o FVL e a mutação do gene da protrombina, raramente são associados com o desenvolvimento de tromboembolismos arteriais, como AVC e IAM. Os resultados do estudo corroboram com a afirmação e não apresenta nenhum paciente mutado com acidente vascular cerebral e apenas um (1/3) indivíduo que desenvolveu infarto agudo do miocárdio e portador da mutação G1691A do fator V. Estudos mostram que IAM e AVC foram relatados com a presença destas mutações. Falik-Zaccai *et al.* (2003), Rallids *et al.* (2003) e Domez *et al.* (2004) encontraram FVL em pacientes com IAM, numa frequência de 1,3% a 6,3%, enquanto que outros autores citaram a presença de 4,8% e 16% do FVL em estudos feitos com pacientes com AVC (MARTINELLI *et al.*, 1998; DE STEFANO *et al.*, 1998; LUDEMANN *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2004; HILLIER *et al.*, 1998).

6 CONCLUSÕES

Pelos dados apresentados no presente estudo, concluiu-se que:

- 1 O fator V de Leiden foi um fator hereditário freqüente nos pacientes (9%) com doenças trombóticas; enquanto que a freqüência da mutação G20210A do gene da protrombina em pacientes com trombose foi baixa, semelhante a da população controle;
- 2 O risco estimado para o desenvolvimento de trombose em um individuo portador do FV Leiden foi de 4 vezes na análise com os não pareados e 9 vezes na análise dos pareados;
- 3 Existe uma tendência para o desenvolvimento da TVP nos indivíduos portadores do FV Leiden, indicada pelo fato de que a grande maioria dos pacientes mutados para o FV desenvolveram TVP;
- 4 A mutação da protrombina não foi fator de risco para o desenvolvimento de trombose, no entanto, mais da metade dos pacientes mutados tiveram TVP (3/4), indicando que a mutação, apresenta tendência para desenvolver o evento trombótico;
- 5 As mutações do fator V e da protrombina podem estar relacionadas com o desenvolvimento de trombozes abdominais e ocular, pois mesmo em pequena quantidade de pacientes com eventos, pelo menos 1/4 deles tinham pelo menos uma mutação;
- 6 Existe associação entre o uso de ACO e o desenvolvimento de trombose;
- 7 O tabagismo foi o fator ambiental que mais influenciou no desenvolvimento de

trombose na população estudada;

- 8** Indivíduos na faixa etária igual ou acima de 40 anos possuem maior risco para o desenvolvimento de trombose.

7 BIBLIOGRAFIA

ABRAMSON, N.; ABRAMSON, S.; Hypercoagulability: clinical assessment and treatment. **South Med J.** 94(10):997-1001, 2001.

AKAR N, AKAR E, DALGIN G, SÖZÜÖZ A, OMÜRLÜ K, CIN S. Frequency of Factor V (1691 G --> A) mutation in Turkish population. **Thromb Haemost.**;78(6):1527-8. Dec 1997.

ALHENC-GELAS, M.; ARNAUD, E.; NICAUD, V.; AUBRY; M. L., FIESSINGER, J. N.; AIACH, M.; EMMERICH, J. Venous thromboembolic disease and the prothrombin, methylene tetrahydrofolate reductase and factor V genes. **Thromb Haemost.**; 81(4):506-10. Apr 1999.

ALMAWI, W.Y.; KELESHIAN, S.H.; BORGI, L.; FAWAZ, N. A.; ABOUD, N.; MTIRAOUI, N.; MAHJOUR, T. Varied prevalence of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single nucleotide polymorphisms among Arabs. **J Thromb Thrombolysis.**;20(3):163-8. Dec 2005.

ALMAWI, W. Y.; TAMIM, H.; KREIDY, R.; TIMSON, G.; RAHAL, E.; NABULSI, M.; FINAN, R. R.; IRANI-HAKIME, N. A case control study on the contribution of factor V-Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of deep venous thrombosis. **J Thromb Thrombolysis.**;19. Jun 2005.

AMITRANO, L.; BRANCACCIO, V.; GUARDASCIONE, M. A.; MARGAGLIONE, M.; IANNACCONE, L.; DANDREA, G.; AMES, P. R.; MARMO, R.; MOSCA, S.; BALZANO, A. High prevalence of thrombophilic genotypes in patients with acute mesenteric vein thrombosis. **Am J Gastroenterol.**;96(1):146-9. Jan 2001.

ANDERSON, F. A. J. R., WHEELER, H. B.; GOLDBERG, R. J.; HOSMER, D. W.; PATWARDHAN, N. A.; JOVANOVIC, B.; FORCIER, A.; DALEN, J. E. A population-

based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. **Arch Intern Med.**;151(5):933-8. May 1991.

ARAÚJO, J. D. A terapêutica de reposição hormonal e o tromboembolismo venoso **Revista Socesp**;9:6. 1999.

ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F. F.; REITSMA, P.H. Factor V Leiden (FVQ506) Is a comon in a brazilian population. **American Journal of Hematology.** (49).242-243, 1995.

ARRUDA, V. R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; GONÇALVES, M. S.; COSTA, F. F. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. **Thromb Haemost**; 78: 1430-3. 1997.

ARRUDA, V.R.; FIGUEIREDO, M. S. Temas de Hematologia: biologia molecular para o hematologista clínico. In: Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia.(16) **Anais.** 187, 1997.

ARRUDA, V. R.; SIQUIERA, L. H.; CHIAPARINI, L. C.; COELHO, O. R.; MANSUR, A. P.; RAMIRES, A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Prevalence of the prothrombin gene variant 20210 G --> A among patients with myocardial infarction. **Cardiovasc Res.**; 37(1):42-5. Jan 1998.

ARRUDA, V. R.; SIQUEIRA, L. H.; GONÇALVES, M. S.; ZUBEN, P. M.; SOARES, M. C. P.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; COSTA, F. F. Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **American Journal of Medical Genetics.** (78)332-335, 1998a.

ARRUDA, V. R.; BELANGERO, W. D.; OZELO, M. C.; OLIVEIRA, G. B.; PAGNANO, R. G.; VOLPON, J. B.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Inherited risk factors for thrombophilia among children with legg-calvé-perthes disease. **Journal of Pediatric**

Orthopaedics. (19) 84-87, 1999.

ARSOV, T.; MILADINOVA, D.; SPIROSKI, M. Factor V Leiden is associated with higher risk of deep venous thrombosis of large blood vessels. **Croat Med J.**;47(3):433-9. Jun 2006.

BAGLIN, T.; LUDDINGTON, R.; BROWN, K.; BAGLIN, C. High risk of recurrent venous thromboembolism in men. **J Thromb Haemost.**;2(12):2152-5. Dec 2004.

BARBIERI, R. L.; MCSHANE, P. M.; RYAN, K. J. Constituents of cigarette smoke inhibit human granulosa cell aromatase. **Fertil. Steril.** 46:232-36. 1986.

BARRACH, F.H; BAREA, J.A.; SALES, M.M.; PARDINI, M.I.M.C.; MACHADO, P.E.A. O laboratório de análises clínicas e a identificação de predisposição genética para trombose venosa. **NewsLab.** Edição 38, p. 96-105, 2000.

BECATTINI, C.; AGNELLI, G. Pathogenesis of venous thromboembolism. **Current Opinion in Pulmonary Medicine.** v. 8, p. 360-364, 2002.

BERTINA R. M.; KOELEMAN B. P.; KOSTER, T.; ROSENDAAL, F. R.; DIRVEN, R. J.; DE RONDE, H.; VAN DER VELDEN, P. A.; REITSMA, P. H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**; 369(6475):64-7. . May 5 1994

BERTINA, R. M. Molecular risk factors for thrombosis. **Thrombos Haemost**; 82(2):601-609. 1999.

BITHELL, T. C. **Coagulação sanguínea.** In: **Wintrobe. Hematologia Clínica.** São Paulo:Manole;. p.615-54. 1998.

BLOEMENKAMP, K. W. M.; ROSENDAAL, F.R.; HELMERHORST, F.M.; KOSTER, T.; BERTINA, R.M.; VANDENBROUCKE, J. P. HEMOSTATIC Effects Of Oral

contraceptives in women who developed deep-vein thrombosis while using oral contraceptives. **Thromb. Haemost.** v. 80, p. 382-7, 1998.

BLOOMENTHAL, D.; VON DADELSZEN, P.; LISTON, R.; MAGEE, L.; TSANG, P. The effect of factor V Leiden carriage on maternal and fetal health. **CMAJ.** v. 167, n. 1, p. 48-54, 2002.

BOMBELI T.; BASIC, A.; FEHR, J. Prevalence of hereditary thrombophilia in patients with thrombosis in different venous systems. **Am J Hematol.**; 70(2):126-32. Jun 2002

BONTEMPO, F. A.; HASSETT, A. C.; FARUKI, H.; STEED, D. L.; WEBSTER, M. W.; MAKAROUN, M. S. The factor V Leiden mutation: spectrum of thrombotic events and laboratory evaluation. **J Vasc Surg.**;25(2):271-5; discussion 276. Feb 1997

BOUNAMEAUX, H. Factor V Leiden paradox: risk of deep-vein thrombosis but not of pulmonary embolism. **Lancet.** 15;356(9225):182-3. Jul 2000.

BOWEN, D. J.; BOWLEY, S.; JOHN, M.; COLLINS, P. W. Factor V Leiden (G1691A), the prothrombin 3'-untranslated region variant (G20210A) and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase (C677T): a single genetic test genotypes all three loci--determination of frequencies in the S. Wales population of the UK. **Thromb Haemost.**;79(5):949-54. May 1998.

BRANSON, H. E.; KATZ, J.; MARBLE, R.; GRIFFIN, J. H. Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant. **Lancet.**;2(8360):1165-8. Nov 19 .1983

BROZE, G. J. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. **Blood Coagul Fibrinolysis**; 6 (1): 7-13. 1995.

BUCHANAN, G. S.; RODGERS, G. M.; BRANCH, D. W. The Inherited thrombophilias:

genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology** 2003; 17(3): 397-411.

BUCHHOLZ, T.; THALER, C. J. Inherited Thrombophilia: Impact on Human Reproduction. **Am J Reprod Immunol**; 50 (1): 20-32. 2003.

CASTOLDI, E.; ROSING, J.; GIRELLI, D.; HOEKEMA, L.; LUNGI, B.; MINGOZZI, F.; ET AL. Mutations in the R2 FV gene affect the ratio between the two FV isoforms in plasma. **Thromb Haemost**; 83:362-5. 2000.

CATTANEO, M.; CHANTARANGKUL, V.; TAIOLI, E.; SANTOS, J. H.; TAGLIABUE, L. The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episode of deep-vein thrombosis: prevalence and association with factor V G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and plasma prothrombin levels. **Thromb Res**; 93: 1-8. 1999.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; PIAZZA, A.; MENOZZI, P.; MOUNTAIN, J. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. **Proc Natl Acad Sci U S A**;85(16):6002-6. Aug 1988.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. Demic expansions and human evolution. **Science**. 1993 Jan 29;259(5095):639-46. **Erratum in: Science**;261(5128):1508. Sep 17 1993.

CHAN, W. P.; LEE, C. K.; KWONG, Y. L.; LAM, C. K.; LIANG, R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. **Blood**.; 91:1135-1139. 1998.

CHESNEY, C. M.; PIFER, D.; COLMAN, R. W. Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. **Proc Natl Acad Sci U S A**.;78(8):5180-4. Aug 1981.

CHIU, H. C.; SCHICK, P. K.; COLMAN, R. W. Biosynthesis of factor V in isolated guinea

pig megakaryocytes. **J Clin Invest.**;75(2):339-46. Feb 1985.

CHURCH, W. R.; JERNIGAN, R. L.; TOOLE, J.; HEWICK, R. M.; KNOFF, J.; KNUTSON, G. J.; NESHEIM, M. E.; MANN, K. G.; FASS, D. N. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; 81(22):6934-7. Nov 1984.

CIARDELLA, A. P.; YANNUZZI, L. A.; FREUND, K. B.; DIMICHELE, D.; NEJAT, M.; DE ROSA, J. T.; DALY, J. R.; SISCO, L. Factor V Leiden, activated protein C resistance, and retinal vein occlusion. **Retina.**;18(4):308-15. 1998.

COLMAN, R. W.; CLOWES, A. W.; GEORGE, J. N.; GOLDHABER, S. Z.; MARDER, V. J. Overview of Hemostasis. In: Colman R W, Marder V J, Clowes A W, George J N, Goldhaber S Z. **Hemostasis and thrombosis: basic principles & clinical practice.** 5nd.ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins,. p. 3-16, 2006a.

COLMAN, R. W.; MARDER, V. J.; CLOWES, A. W. Overview of Coagulation, Fibrinolysis, and Their Regulation. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ. **Hemostasis and thrombosis: basic principles & clinical.** 5nd.ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins,. p. 17-20.2006b.

COMP, P.C.; ESMON, C. T. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. **N Engl J Med**, 311: 1525-28, 1984.

CORRAL, J.; INIESTA, J. A.; GONZÁLEZ-CONEJERO, R.; VILLALÓN, M.; VICENTE V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. **Blood.**;97(10):2979-82. May 15 2001.

CROWTHER, M.A.; KELTON, J.G. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: A qualitative overview and proposed classification system. **Ann. Intern. Med.** v. 138, p. 128-134, 2003.

CUMMING, A. M.; KEENEY, S.; SALDEN, A.; BHAVNAN, M.; SHWE, K. H.; HAY, C. R. M. The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a UK anticoagulant clinic population. **Br J Haematol**; 98: 353-5. 16. 1997.

DAHLBÄCK, B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. **Haemostasis**. v. 24, p. 139-1351, 1994.

DAHLBÄCK B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. **Blood**.;112(1):19-27. Review. Jul 1 2008.

D'AMICO, E. A. Trombofilia. In: Lorenzi TF. Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara koogan;. 657-712006.

DEMIRCI, F. Y.; GÜNEY, D. B.; AKARÇAY, K.; KIR, N.; OZBEK, U.; SIRMA, S.; UNALTUNA, N.; ONGÖR, E. Prevalence of factor V Leiden in patients with retinal vein occlusion **Acta Ophthalmol Scand**.;77(6):631-3. Dec 1999.

DE MOERLOOSE, P.; REBER, G.; PERRIER, A.; PERNEGER, T.; BOUNAMEAUX, H. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. **Br J Haematol**.;110(1):125-9. Jul 2000.

DE PAULA SABINO, A.; GUIMARÃES, D. A.; RIBEIRO, D. D.; PAIVA, S. G.; SANT'ANA DUSSE, L. M.; DAS GRAÇAS CARVALHO, M.; FERNANDES, A. P. Increased Factor V Leiden frequency is associated with venous thrombotic events among young Brazilian patients. **J Thromb Thrombolysis**. Dec;24(3):261-6. Epub 2007 Mar 31. 2007.

DE STEFANO, V.; CHIUSOLO, P.; PACIARONI, K.; CASORELLI, I.; DI MARIO, A.; ROSSI, E.; LEONE, G. Prevalence of the factor II G20210A mutation in symptomatic patients with inherited thrombophilia. **Thromb Haemost**; 80: 342-3. 1998.

DE STEFANO, V.; MARTINELLI, I.; MANNUCCI, P. M.; PACIARONI, K.; CHIUSOLO,

P.; CASORELLI, I.; ROSSI, E.; LEONE, G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. **N Engl J Med.**;341(11):801-6. Sep 9 1999.

DOGGEN, C. J.; BERTINA, R. M.; CATS, V. M.; REITSMA, P. H.; ROSENDAAL, F. R. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. **Thromb Haemost**; 82(1):115-20. 1999.

DJORDJEVIC, V.; RAKICEVIC, L. J.; MIKOVIC, D.; KOVAC, M.; MILJIC, P.; RADOJKOVIC, D.; SAVIC, A. Prevalence of factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. **Acta Haematol.**; 112(4):227-9. 2004.

DOOL, R. Metabolic effects of cigarette smoking. **J Appl Physiol.**; 72(2): 401-9. 1992.

DONAHUE, B. S.; GAILANI, D.; HIGGINS, M. S.; DRINKWATER, D. C.; GEORGE, A. L. J. R. Factor V Leiden protects against blood loss and transfusion after cardiac surgery. **Circulation.**;107(7):1003-8. Feb 25 2003.

DÖNMEZ, Y.; KANADASI, M.; TANRIVERDI, K.; DEMIR, M.; DEMIRTAS, M.; CAYLI, 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.**;45(3):505-12. May 2004.

DORETTO, J. DPOC é a 5ª causa de morte e pouco conhecida. **Folha de S. Paulo**, São Paulo, 24 out. 2002. Equilíbrio, p. 11.

DZIMIRI, N.; MEYER, B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet.**;347(8999):481-2. Feb 17 1996.

EHRENFORTH, S.; VON DEPKA PRONDSINSKI, M.; AYGÖREN-PÜRSÜN, E.;

NOWAK-GÖTTL, U.; SCHARRER, I.; GANSER, A. Study of the prothrombin gene 20201 GA variant in FV:Q506 carriers in relationship to the presence or absence of juvenile venous thromboembolism. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**;19(2):276-80. Feb 1999.

EHRENFORTH, S.; NEMES, L.; MANNHALTER, C.; ROSENDAAL, F. R.; KODER, S.; ZOGHLAMI-RINTELEN, C.; SCHARRER, I.; PABINGERS, I. Impacto of enviromental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V: G1691A. **J Thromb Haemost.**; 2(3): 430-6. 2004.

EMMERICH, J.; ALHENC-GELAS, M.; AILLAUD, M. F.; JUHAN-VAGUE, I.; JUDE, B.; GARCIN, J. M.; DREYFUS, M.; DE MOERLOOSE, P.; LE QUERREC, A.; PRIOLLET, P.; BERRUYER, M.; VALLANTIN, X.; WOLF, M.; AIACH, M.; FIESSINGER, J. N. Clinical features in 36 patients homozygous for the ARG 506-->GLN factor V mutation. **Thromb Haemost**; 77: 620-3. 1997.

FALIK-ZACCAI, T. C.; HARON, Y.; EILAT, D.; HARASH , B.; GOLINKER, E.; HUSSEIN, O.; EISIKOVITS, R.; BOROCHOWITZ, Z.; LINN, S. .Coronary heart disease among Circassians in Israel is not associated with mutations in thrombophilia genes. **Hum Biol.**;75(1):57-68. Feb 2003.

FRANCÈS, F.; PORTOLÈS, O.; GABRIEL, F.; CORELLA, D.; SORLÍ, J. V.; SABATER, A.; ALFONSO, J. L.; GUILLÉN, M. [Factor V Leiden (G1691A) and prothrombin-G20210A alleles among patients with deep venous thrombosis and in the general population from Spain]**Rev Med Chil.** 2006 Jan;134(1):13-20. Epub 2006 Mar 8. Spanish. 2006.

FRANCIS, J. L. Laboratory investigation of hypercoagulability. **Semin Thromb Hemost**; 24(2):111-26. 1998.

FRANCO, R. F.; SANTOS, S. E.; ELION, J.; TAVELLA, M. H.; ZAGO, M. A. Prevalence

of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. **Acta Haematol.**;100(1):9-12. 1998.

FRANCO, R. F.; ELION, J.; TAVELLA, M. H.; SANTOS, S. E.; ZAGO, M. A. The prevalence of factor V Arg306-->Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg306-->Gly mutations in different human populations. **Thromb Haemost.**;81(2):312-3. Feb 1999.

FREEMAN, D. J.; PACKARD, C. J. Smoking and plasma lipoprotein metabolism (editorial). *Clin Sci (Colch)*.1995; 89 (4):333-42.

GADELHA, T.; ANDRÉ, C.; JUCÁ, A. A.; NUCC, I M. Prothrombin 20210A and oral contraceptive use as risk factors for cerebral venous thrombosis. **Cerebrovasc Dis.** 2005; 19(1):49-52. Epub 2004 Nov 3.

GAREWAL, G.; DAS, R.; TREHAN, U. Factor V Leiden: prevalence in the indigenous population and cases of thrombosis in North India. **Br J Haematol.**;97(4):940. Jun 1997.

GILLUM, R. F. Pulmonary embolism and thrombophlebitis in the United States. *Am Heart J*, 114: 1262-4, 1987.

GITSCHIER, J.; WOOD, W. I.; GORALKA, T. M.; WION, K. L.; CHEN, E. Y.; EATO, D. H.; VEHAR, G. A.; CAPON, D. J.; LAWN, R. M. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature.**;312(5992):326-30. Nov 22-28 1984

GIUNTINI, C.; DI RICCO, G.; MARINI, C.; MELILLO, E.; PALLA, A. Pulmonary embolism: epidemiology. **Chest.**;107(1 Suppl):3S-9S. Jan 1995

GLADSON, C. L.; SCHARRER, I.; HACH, V.; BECK, K. H.; GRIFFIN, J. H. The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. **Thromb Haemost**, 59: 18-22, 1988.

GLANTZ, S. A.; PARMLEY, W. W. Passive smoking and heart disease. Mechanisms and risk. **JAMA**, 273:1047-1053. 1995.

GLANTZ, S. A.; SLADE, J.; BERO, L. A. et al. Addiction and cigarettes as nicotine delivery devices. In: **The Cigarettes Papers** (Glantz A.S., org). Berkeley: University of California Press. 1996.

GLYNN, R. J.; ROSNER, B. Comparison of risk factors for the competing risks of coronary heart disease, stroke, and venous thromboembolism. **Am J Epidemiol.**; 162(10):975-82. Oct 5. Epub 2005 Oct 5. Nov. 15 2005.

GOLIN, V.; SPROVIERI, S. R.; BEDRIKOW, R.; SALLES, M. J. Pulmonary thromboembolism: retrospective study of necropsies performed over 24 years in a university hospital in Brazil. **Sao Paulo Med J.**;120(4):105-8. Jul 4 2002.

GOTTLIEB, J.L.; BLICE, J. P.; MESTICHELLI, B.; KONKLE, B. A.; BENSON, W. E. Activated protein C resistance, factor V Leiden, and central retinal vein occlusion in young adults. **Arch Ophthalmol.**;116(5):577-9. May 1998.

GOUAULT- HEILMANN, M. Aide-mémoire d'hémostase: Physiologie de la coagulation. **Médecine-Sciences. Flammarion.** 1999.

GRAHAM, S. L. ; GOLDBERG, I. ; MURRAY, B. ; BEAUMONT, P. ; CHONG, B.H. Activated protein C resistance--low incidence in glaucomatous optic disc haemorrhage and central retinal vein occlusion. **Aust N Z J Ophthalmol.**;24(3):199-205. Aug 1996.

GRIFFIN, J.H.; EVATT, B.; ZIMMERMAN, T. S. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. **J Clin Invest**, 68: 1370-73, 1981.

HANSSON, P. O.; ERIKSSON, H.; WELIN, L.; SVÄRDSUDD, K.; WILHELMSSEN, L. Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among

middle-aged men: "the study of men born in 1913". **Arch Intern Med.**;159(16):1886-90. Sep 13 1999.

HEIT, J. A.; SILVERSTEIN, M. D.; MOHR, D. N.; PETTERSON, T. M.; O'FALLON, W. M.; MELTON, L. J. 3RD. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. **Arch Intern Med.**; 160(6):809-15. Mar 27 2000.

HELLER, C.; SCHOBESS, R.; KURNIK, K.; JUNKER, R.; GÜNTHER, G.; KREUZ, W.; NOWAK-GÖTTL, U. Abdominal venous thrombosis in neonates and infants: role of prothrombotic risk factors - a multicentre case-control study. For the Childhood Thrombophilia Study Group. **Br J Haematol.**;111(2):534-9. Nov 2000.

HENNINGFIELD, J. E. **Tudo sobre drogas:** nicotina. São Paulo: Nova Cultural, 1988.

HERRINGTON, D. M.; KLEIN, K. P. Genome and hormones: gender differences in physiology. Invited review: pharmacogenetics of estrogen replacement therapy. **J Appl Physiol**; 91: 2776-84. 2001.

HESSNER, M. J.; LUHM, R. A.; PEARSON, S. L.; ENDEAN, D. J.; FRIEDMAN, K. D.; MONTGOMERY, R. R. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. **Thromb Haemost.**;81(5):733-8. May 1999.

HILLARP, A.; ZÖLLER, B.; SVENSSON, P. J.; DAHLBÄCK, B. The 20210A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. **Thromb Haemost**; 78: 990-2. 1997.

HILLIER, C. E.; COLLINS, P. W.; BOWEN, D. J.; BOWLEY, S.; WILES, C. M. Inherited prothrombotic risk factors and cerebral venous thrombosis. **QJM**. Department of Neurology, University Hospital of Wales, Cardiff, UK. Oct;91(10):677-80. 1998.

HIOKI, H.; AOKI, N.; KAWANO, K.; HOMORI, M.; HASUMURA, Y.; YASUMURA, T.; MAKI, A.; YOSHINO, H.; YANAGISAWA, A.; ISHIKAWA, K. Acute effects of cigarette smoking on platelet-dependent thrombin generation. **Eur Heart J**;22(1):56-61. Jan 2001.

HODGKINS, P. R.; PERRY, D. J.; SAWCER, S. J.; KEAST-BUTLER, J. Factor V and antithrombin gene mutations in patients with idiopathic central retinal vein occlusion. **Eye**;9 (Pt 6):760-2. 1995.

HOEKEMA, L.; CASTOLDI, E.; TANS, G.; GIRELLI, D.; GEMMATI, D.; BERNARDI, F. et al. Functional properties of factor V and factor Va encoded by the R2-gene. **Thromb Haemost**; 85:75-81. 2001

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I., Chemistry and Toxicology. In: Cigars. Health and trends. Smoking and tobacco control. Monograph 9 . U. S. **National Institutes of Health**. 1998.

HOIBRAATEN, E.; QVIGSTAD, E.; ANDERESSEN, T. O.; MOWINCKEL, M. C.; SANDSET, P. M. The effects of hormone replacement therapy (HRT) on hemostatic variables in women with previous venous thromboembolism – results from a randomized, double-blind, clinical trial. **Thromb Haemost**.;85:775-781. 2001

IRANI-HAKIME, N.; TAMIM, H.; KREIDY, R.; ALMAWI, W. Y. The prevalence of factor V R506Q mutation-Leiden among apparently healthy Lebanese. **Am J Hematol**.;65(1):45-9. Sep 2000.

JENNY, R. J.; PITTMAN, D. D.; TOOLE, J.J.; KRIZ, R. W.; ALDAPE, R. A.; HEWICK, R. M.; KAUFMAN, R. J.; MANN, K. G. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. **Proc Natl Acad Sci U S A**.;84(14):4846-50. Jul 1987.

JUN, Z. J.; PING, T.; LEI, Y.; LI, L.; MING, S. Y.; JING, W. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Chinese patients with deep venous thrombosis and pulmonary embolism. **Clin Lab Haematol.**; 28(2):111-6. Apr 2006.

KEARON, C. Natural history of thromboembolism. **Circulation.** v. 107, p. I-22-I-30, 2003.

KOH, K. K.; HOME, M. K. I.; CSAKO, G.; WACLAWIW, M. A. Cannon RO. Relation of fibrinolytic potentiation by estrogen to coagulation pathway activation in postmenopausal women. **Am J Cardiol**; 83:466-69. 1999.

KOSTER, T; ROSENDAAL, F. R.; BRIET, E.; VAN DER MEER, F. J. M.; COLLY, L. P.; TRIENEKENS, P. H., et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). **Blood**, 85: 2756 – 2761, 1995.

KYRLE, P. A.; MINAR, E.; BIALONCZYK, C.; HIRSCHL, M.; WELTERMANN, A.; EICHINGER, S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. **N Engl J Med.** Jun 17;350(25):2558-63. 2004.

KUJOVICH, J.; GOODNIGHT, S. – Factor V de Leiden thrombophilia: hereditary resistance to activated protein C; factor V R506Q; University of Washington, **Seattle**, 1999.

KUPFERMINC, M. J.; ELDOR, A.; STEINMAN, N.; MANY, A.; BAR-AM, A.; JAFFA, A.; FAIT, G.; LESSING, J.B. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. **N. Engl. J. Med.** v. 340, n. 1, p. 9-13, 1999.

KONNO, F. Y.; SANTOS, F.; PINHO, F. M.; MASSABKI, P. S, Tabagismo na Mulher. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica.** 6(1):23-26 2008.

KYRLE PA, MINAR E, BIALONCZYK C, HIRSCHL M, WELTERMANN A, EICHINGER

S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. **N Engl J Med.**;350(25):2558-63. Jun 17 2004

LANE, D. A.; MANNUCCI, P. M.; BAUER, K. A.; BERTINA, R. M.; BOCHKOV, N. P.; BOULYJENKOV, V.; CHANDY, M.; DAHLBÄCK, B.; GINTER, E.K.; MILETICH, J.P.; ROSENDAAL, F.R.; SELIGSOHN, U. Inherited thrombophilia: part 1. **Thrombosis and Haemostasis.**, v. 76, n. 5, p. 651-62, 1996a.

LARSSON J, SELLMAN A, BAUER B. Activated protein C resistance in patients with central retinal vein occlusion. **Br J Ophthalmol.**; 81(10):832-4. Oct 1997.

LEE, R. G.; BITHELL, T. C.; FORSTER, J. F.; ATHENS, J. W.; LEKENS, J. N. **Hematologia Clínica** 9ª Edição Editora Manole. 1998.

LEITE, F. Em SP, fumo e barriga facilitam o infarto. **Folha de S.Paulo**, São Paulo, 9 jul. 2002. Cotidiano, p. C2.

LINDQVIST, P. G.; SVENSSON, P. J.; DAHLBÄCK, B.; MARSÁL, K. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss--a possible evolutionary selection mechanism. **Thromb Haemost.**; 79(1):69-73. Jan 1998.

LINDQVIST, P. G.; ZÖLLER, B.; DAHLBÄCK, B. Improved hemoglobin status and reduced menstrual blood loss among female carriers of factor V Leiden--an evolutionary advantage? **Thromb Haemost.**;86(4):1122-3. Oct 2001.

LINDQVIST, P.G.; OLOFSSON, P.; DAHLBÄCK, B. Use of selective factor V Leiden screening in pregnancy to identify candidates for anticoagulants. **Obstetrics & Gynecology.** v. 100, n. 2, p. 332-336, 2002.

LINNA, T.; YLIKORKALA, A.; KONTULA, K.; PUSKA, P.; TERVO, T. Prevalence of factor V Leiden in young adults with retinal vein occlusion. **Thromb**

Haemost.;77(1):214-6. Jan 1997.

LIST, K.; JENSEN, O. N.; BUGGE, T. H.; LUND, L.R.; PLOUG, M.; DANO, K. et al. plasminogenindependentinitiation of the pro-urokinase activation cascade in vivo. Activation ofpro-urokinase by glandular kallikrein (mGK-6) in plasminogen-deficient mice.*Biochemistry*; 39(3): 508-15. 2000.

LORENZI, T.F. Manual de hematologia. **Propedêutica e Clínica**. 2ª edição, 1999.

LUCOTTE, G.; MERCIER, G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. **Blood Cells Mol Dis**;27(2):362-7. Mar-Apr 2001.

LÜDEMANN, P.; NABAVI, D. G.; JUNKER, R.; WOLFF, E.; PAPKE, K.; BUCHNER, H.; ASSMANN, G.; RINGELSTEIN, E. B. Factor V Leiden mutation is a risk factor for cerebral venous thrombosis: a case-control study of 55 patients. **Stroke.**;29(12):2507-10. Dec 1998.

MAFFEI, F.H.A. Epidemiologia do tromboembolismo venoso no Brasil. **Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Angiologia e Cirurgia Vascular**, 283, 1987.

MAHASANDANA, C.; SUVATTE, V.; CHUANSUMRIT, A.; MARLAR, R. A.; MANCO-JOHNSON, M. J.; JACOBSON, L. J.; HATHAWAY, W. E. Homozygous protein S deficiency in an infant with purpura fulminans. **J Pediatr.**;117(5):750-3. Nov 1990.

MANN, K. G.; HOCKIN, M. F.; BEGIN, K. J.; KALAFATIS, M. Activated protein C cleavage of factor Va leads to dissociation of the A2 domain. **J Biol Chem.**;272:20678 – 20683. 1997.

MANN, K. G.; KALAFATIS, M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. **Blood**. Jan 1;101(1):20-30. Epub 2002 Aug 8. Review. 2003.

MARGAGLIONE, M.; BRANCACCIO, V.; GIULIANI, N.; D'ANDREA, G.; CAPPUCCI, G.; IANNACCONE, L.; VECCHIONE, G.; GRANDONE, E.; DI MINNO, G. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G->A20210 gene variant.

Ann Intern Med; 129: 89-93. 1998.

MARTINELLI, I.; SACCHI, E.; LANDI, G.; TAIOLI, E.; DUCA, F.; MANNUCCI, P. M. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. **N Engl J Med**.;338(25):1793-7. Jun 18 1998.

MARTINELLI, I.; TAIOLI, E.; BUCCIARELLI, P.; AKHAVAN, S.; MANNUCCI, P. M. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**.;19(3):700-3. Mar 1999.

MATEO, J.; OLIVER, A.; BORRELL, M.; SALA, N.; FONTCUBERTA, J.; and the EMET GROUP. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism – results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia. **Thromb Haemost**, 77: 444-451, 1997.

MILETICH, J. P.; PRESCOTT, S. M.; WHITE, R.; MAJERUS, P. W.; BOVILL, E. G. Inherited predisposition to thrombosis. **Cell**.;72(4):477-80. Review. Feb 26 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo e Prevenção Primária do Câncer. Falando sobre tabagismo. 2ª ed. Rio de Janeiro.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo e Prevenção Primária do Câncer. Falando sobre tabagismo. 3ª ed. Rio de Janeiro. 1998b.

MINISTERIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer/Fundação Getúlio Vargas. Cigarro Brasileiro. Análises e Propostas para Redução do Consumo. Rio de Janeiro. 2000^a.

MINISTERIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas de Câncer. 2000b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo e Prevenção Primária do Câncer. Falando sobre Câncer e seus Fatores de Risco. 2^a ed. Rio de Janeiro. 1998 a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo e Prevenção Primária do Câncer. Ajudando seu Paciente a Deixar de Fumar. Rio de Janeiro. 1997.

MITROPOULUS, K. A.; MARTIN, J. C.; STIRLING, Y.; MORRISEY, J. H.; COOPER, J. A. Activation of factors XII and VII induced in citrated plasma in the presence of contact surface. **Thromb Res.**; 78 (1): 67-75. 1995.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **ArteriosclerThromb Vasc Biol**; 26: 41-8. 2006.

MOREIRA, L. B.; FUCHS, F.D.; MORAES, R.S. et al. Prevalência de tabagismo e fatores associados em área metropolitana da região do sul do Brasil. **Ver.de Saúde Publica**, v.29, n. 1, p.46-51,1995.

NICHOLS, W. C.; AMANO, K.; CACHERIS, P. M.; FIGUEIREDO, M. S.; MICHAELIDES, K.; SCHWAAB, R.; HOYER, L.; KAUFMAN, R. J.; GINSBURG, D. Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. **Blood.**;88(4):1183-7. Aug 15 1996.

NICOLAES, G.A.; DAHLBÄCK, B. Factor V and thrombotic disease: description of a

janus-faced protein. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** ;22(4):530-8. Review. Apr 1 2002.

NIZANKOWSKA-MOGILNICKA, E.; ADAMEK, L.; GRZANKA, P.; DOMAGALA, T. B.; SANAK, M.; KRZANOWSKI, M.; SZCZEKLIK, A. Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. **Eur Respir J.**;21(1):25-30. Jan 2003.

NORDSTRÖM, M.; LINDBLAD, B.; BERGQVIST, D.; KJELLSTRÖM, T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. **J Intern Med.**;232(2):155-60. Aug 1992.

NORSTROM, E.; THORELLI, E.; DAHLBÄCK, B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. **Blood.** Jul 15;100(2):524-30. 2002

NORRIS, L. A. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**; 17(3): 369-83. 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 1997. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – Décima Revisão- (CID10). Traduzido pela Faculdade de Saúde Pública de São Paulo - Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças em Português - 4a ed – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Cuidados inovadores para condições crônicas: componentes estruturais de ação. Relatório Mundial. Brasília: **Organização Mundial de Saúde (OMS)/MS**,.105p,2003.87.

O'RIORDAN, M. N.; HIGGINS, J. R. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**; 17(3): 385-96. 2003.

PALOMO, I.; PEREIRA, J.; ALARCÓN, M.; PINOCHET, C.; VÉLEZ, M. T.; HIDALGO,

P.; SKAGERBERG, K.; POBLETE, F. Factor V Leiden and prothrombin G20210A among Chilean patients with venous and arterial thrombosis **Rev Med Chil.** Dec;133(12):1425-33. Epub 2006 Jan 27. Spanish. 2005.

PAMPUS, M.G.; WOLF, H.; KOOPMAN, M.M.W.; VAN EN ENDE, A.; BULLER, H.R.; REITSMA, P.H. Prothrombin 20210G:A mutation and factor V Leiden mutation in women with a history of severe preeclampsia and (H)ELLP syndrome. **Hypertension in Pregnancy.** v. 20, n. 3, p. 291-298, 2001.

PEVERILL, R.E. Hormone therapy and venous thromboembolism. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 17, n. 1, p. 149-164, 2003.

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.**, 88(10):3698-703, 15 Nov.1996.

PRICE, D.T.; RIDKER, P.M. Factor V Leiden mutation and the risk for thromboembolic disease: a clinical perspective. **Ann. Intern. Med.** v. 127, p. 895-903, 1997.

RAGUENES, O.; MERCIER, B.; ESCOFFRE, M.; TRAORE, L.; BLOUCH, M. T.; ROBINET, A.; ABGRALL, J. F.; FEREC, C.; GETBO. Activated protein C resistance--low incidence in glaucomatous optic disc haemorrhage and central retinal vein occlusion. **Aust N Z J Ophthalmol.**; 24(3):199-205. Aug 1996.

RALLIDIS, L. S.; BELESI, C. I.; MANIOUDAKI, H. S.; CHATZIOAKIMIDIS, V. K.; FAKITSA, V. C.; SINOS, L. E.; LAOUTARIS, N. P.; APOSTOLOU, T. S. Myocardial infarction under the age of 36: prevalence of thrombophilic disorders. **Thromb Haemost.**;90(2):272-8. Aug 2003.

RAMOS, CATARINA P. S; CAMPOS, JÚLIA F; MELO, FÁRIDA C. B. C; NEVES, WASHINGTON B. DAS; SANTOS, MARIA E. DOS; ARAÚJO, FÁTIMA A; MELO, RAUL

A. M. Frequência do fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil / Frequency of factor V Leiden in individuals under thrombophilia investigation, Recife, Pernambuco, Brazil. **Rev. bras. hematol. hemoter**;28(2):131-134, abr.-jun. 2006. tab.

REES, D. C.; COX, M.; CLEGG, J. B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**.;346(8983):1133-4. Oct 28 1995.

REES, D. C. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln) **Br J Haematol**.;95(4):579-86. Review. Dec 1996.

RENY, J. L.; ALHENC-GELAS, M.; FONTANA, P.; BISSERY, A.; JULIA, P. L.; FIESSINGER, J. N.; AIACH, M.; EMMERICH, J. The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case-control study. **J Thromb Haemost**.;2(8):1334-40. Aug 2004.

REZENDE, S. M. Mini-review: genes, thrombosis and thrombophilia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**., v. 21, n. 2, p. 73-81, 1999.

RIDKER, P. M.; MILETICH, J. P.; BURING, J. E.; ARIYO, A. A.; PRICE, D. T.; MANSON, J. E.; HILL, J. A. Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. **Ann Intern Med**.;128(12 Pt 1):1000-3. Jun 15 1998.

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**.; 99(8):999-1004. Mar 2 ; 1999.

RIDKER, P. M.; MILETICH, J. P.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. **JAMA**.;277(16):1305-7. Apr 23-30 1997.

RINTELEN, C.; PABINGER, I.; KNOBL, P.; LECHNER, K.; MANNHALTER, C.

Probability of recurrence of thrombosis in patients with and without factor V Leiden. **Thromb. Haemost.** v. 75, p. 229-32, 1996.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S., **Bases patológicas das doenças**. 7 edição. 2005.

RODRIGUES, C. A.; ROCHA, L. K.; MORELLI, V. M.; FRANCO, R. F.; LOURENÇO D. M. Prothrombin G20210A mutation, and not factor V Leiden mutation, is a risk factor for cerebral venous thrombosis in Brazilian patients. **J Thromb Haemost.**;2(7):1211-2. Jul 2004.

ROSENBERG, R. D.; AIRD, W. C. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. **Mechanism of Disease**. v. 340, n. 20, p. 1555-64, 1999.

ROSENDAAL FR, HELMERHOST FM, VANDERBROUCKE JP. Female hormones and thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 22:201-10. 2002.

ROSENDAA, 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.**;79(4):706-8. Apr 1998.

ROSENDAAL, F. R.; HELMERHOST, F. M.,; VANDENBROUCKE, J. P. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis **Thromb Haemost**; 86:112-23 2001.

ROSEMBERG, J. 1987. Ação fisiopatológica dos componentes do fumo do tabaco. In: Tabagismo, um sério problema de saúde pública. 2ª edição, São Paulo, (SP) ALMED Editora e Livraria Ltda.

ROSING J, BAKKER HM, THOMASSEN MC, HEMKER HC, TANS G. Characterization of two forms of human factor Va with different cofactor activities. **J Biol Chem.**;268(28):21130-6. Oct 5 1993

RUIZ-ARGÜELLES, G. J.; POBLETE-NAREDO, I.; REYES-NÚÑEZ, V.; GARCÉS-EISELE, J.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, B.; GÓMEZ-RANGEL, J. D. Primary thrombophilia in Mexico IV: frequency of the Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool and HR2 haplotype polymorphisms in the factor V gene of a group of thrombophilic Mexican Mestizo patients. **Rev Invest Clin.**; 56(5):600-4. Sep-Oct 2004.

SALOMON, O.; STEINBERG, D. M.; ZIVELIN, A.; GITEL, S.; DARDIK, R.; ROSENBERG, N.; BERLINER, S.; INBAL, A.; MANY, A.; LUBETSKY, A.; VARON, D.; MARTINOWITZ, U.; SELIGSOHN, U. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; 19(3):511-8. Mar 1999.

SELIGSOHN U, ZIVELIN A. Thrombophilia as a multigenic disorder. **Thromb Haemost.**;78(1):297-301. Review. Jul 1997.

SHOPLAND, D.R. and BURNS, D.M., 1993. Medical and Public Health Implications of Tobacco Addiction. In: Nicotine Addiction. Principles and Management (Orleans, C.T. and Slade, J., org.), New York, Oxford University Press.

SILVERSTEIN M. D., HEIT J. A., MOHR D. N., PETTERSON T. M., O'FALLON W. M., MELTON L. J. 3RD. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. **Arch Intern Med.**; 158(6):585-93. Mar 23 1998.

SIMIONI P, PRANDONI P, LENSING AW, MANFRIN D, TORMENE D, GAVASSO S, GIROLAMI B, SARDELLA C, PRINS M, GIROLAMI A. Risk for subsequent venous thromboembolic complications in carriers of the prothrombin or the factor V gene mutation with a first episode of deep-vein thrombosis. **Blood.**;96(10):3329-33. Nov 15 2000.

SOLYMOSS, S. Risk factors for thromboembolism: pathophysiology and detection.

JAMC. V. 163, n. 8, p. 991-994, 2000.

SORIA, J.M.; ALMASY, L.; SOUTO, J.C.; BUIL, A.; MARTINEZ-SÁNCHEZ, E.; MATEO, J.; BORRELL, M.; STONE, W.H.; LATHROP, M.; FONTCURBETA, J.; BLANGERO. A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. **Blood.** v. 101, n. 1, p. 163-167. 2003.

SUGIMURA K., SAKUMA M., SHIRATO K. Potential risk factors and incidence of pulmonary thromboembolism in Japan: results from an overview of mailed questionnaires and matched case-control study. **Circ J.**; 70(5):542-7. May 2006.

TEEDE, H. J. Hormone replacement therapy and the prevention of cardiovascular disease. *Hum Reprod Update* 2002;3:201-15 Araújo JD. A terapêutica de reposição hormonal e o tromboembolismo venoso. **Revista Socesp.** 9:6 1999. ou 2002.

TORMENE D, SIMIONI P, PRANDONI P, LUNI S, INNELLA B, SABBION P, GIROLAMI A. The risk of fetal loss in family members of probands with factor V Leiden mutation. **Thromb Haemost.**; 82(4):1237-9. Oct 1999.

TRACY PB, EIDE LL, BOWIE EJ, MANN KG. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. **Blood.**; 60(1):59-63. Jul 1982.

TRAIPE L, CONTE G, CONTE FJ, IBÁÑEZ S, MEZA P, ROJAS B, CUNEO M, VERDAGUER J. [Markers of thrombophilia in patients with retinal vein thrombosis] **Rev Med Chil.** Feb;133(2):167-74. Epub 2005 Apr 7. 2005.

TSAI A. W., CUSHMAN M., ROSAMOND W. D., HECKBERT S. R., POLAK J. F., FOLSOM A. R. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. **Arch Intern Med.**; 162(10):1182-9. May 27 2002.

U. S. SURGEON GENERAL. The health consequences of smoking. Cardiovascular disease. A report of the Surgeon General. Rockville, Maryland: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Centers for Disease Control, Centers for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. **Office on Smoking and Health**. 1983.

VANDENBROUCK, J. P.; KOSTER, T.; BRIET, E.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M.; ROSENDAAL, F.R. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet**. v. 344, p. 1453-7, 1994.

VÁRADI K, ROSING J, TANS G, PABINGER I, KEIL B, SCHWARZ HP. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor V R506Q mutation. **Thromb Haemost.**;76(2):208-14. Aug 1996.

WHITE R. H. The epidemiology of venous thromboembolism. **Circulation.**;107(23 Suppl 1):I4-8. Review. Jun 17 2003

WILLIAMSON D, BROWN K, LUDDINGTON R, BAGLIN C, BAGLIN T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg3063Thr) associated with resistance to activated protein C. **Blood.**;91:1140-1144. 1998.

ZIVELIN A, MOR-COHEN R, KOVALSKY V, KORNBROT N, CONARD J, PEYVANDI F, KYRLE PA, BERTINA R, PEYVANDI F, EMMERICH J, SELIGSOHN U. Prothrombin 20210G>A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24,000 years ago. **Blood**. 2006 Jun 15;107(12):4666-8. Epub Feb 21. 2006.

ZIVELIN A, ROSENBERG N, FAIER S, KORNBROT N, PERETZ H, MANNHALTER C, HORELLOU MH, SELIGSOHN U. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. **Blood.**;92(4):1119-24. Aug 15 1998.

ZIVELIN A, GRIFFIN JH, 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.**; 89(2):397-402. Jan 15 1997.

ZÖLLER, B.; DAHLBÄCK, B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. **Lancet.** v. 343, p. 1536-1538, 1994.

ANEXOS

ANEXO A – PERFIL ENCONTRADO DO PACIENTE TROMBOFÍLICO PORTADOR DO FATOR V LEIDEN

PACIENTE	EVENTO	IDADE	SEXO	FATOR DE RISCO
15	TVP	23 ANOS	M	
65	IAM	30 ANOS	M	FUMANTE
68	TVP	12 ANOS	F	ACO
71	TVP – R	35 ANOS	M	
72	TVP	25 ANOS	F	
74	TVP	26 ANOS	F	FUMANTE ACO
81	TVP – R	32 ANOS	F	ACO
90	TVP	36 ANOS	F	ACO FUMANTE
103	TVP	14 ANOS	M	
109	T OLHO	23 ANOS	F	ACO
111	TVP	32 ANOS	F	ACO
112	T MESENT.	24 ANOS	F	FUMANTE
128	TVP – R	33 ANOS	F	
132	TVP	39 ANOS	M	
133	TVP + EP	39 ANOS	F	ACO
155	TVP – R	18 ANOS	F	FUMANTE ACO
175	TVP-R	19 ANOS	F	FUMANTE

ANEXO B – PERFIL ENCONTRADO DO PACIENTE TROMBOFÍLICO PORTADOR DA MUTAÇÃO G20210A DA PROTROMBINA

PACIENTE	EVENTO	IDADE	SEXO	FATOR DE RISCO
19	TVP	18 ANOS	M	
23	TVP-TVP	32 ANOS	F	ACO
34	TVP	27 ANOS	F	ACO
84	TRenal	27 ANOS	F	ACO

ANEXO C- FICHA DE PACIENTE

Data: ____/____/____	Nº _____
Nome: _____	
DADOS	
Prontuário: _____	Procedência: _____
Naturalidade _____	
Telefone (contato): _____	
Endereço: _____	
Idade _____	Nasc ____/____/____
Cor _____	ascendência _____
Grau de instrução _____	
Profissão _____	
Hábitos: [] Frutas [] Verduras verdes	
[] Tabagista Tipo _____ Freqüência _____ Na gravidez _____ Fum. passivo []	
[] Álcool Tipo _____ Freqüência _____ Na gravidez _____	
TERAPIA ESTROGÊNICA	
Sim [] Não [] Já usou []	
Contraceptivos [] Reposição [] Quanto tempo _____ Tipo _____	
HISTÓRIA PRÉVIA.	
História anterior de trombose [] não [] sim. Nº de eventos _____ idade _____ data ____/____/____	
TVP [] Nº de eventos _____ idade _____ data ____/____/____	
AVC [] Nº de eventos _____ idade _____ data ____/____/____	
Enfarto [] Nº de eventos _____ idade _____ data ____/____/____	
Aborto [] Nº de eventos _____ idade _____ data ____/____/____	
HISTORIA FAMILIAR	
Familiares com história de eventos trombóticos [] aborto [] complicações na gravidez []	
[] Avô Materno [] Paterno [] Avó materna [] Paterna [] Mãe [] Pai [] Tio(a) materno ()	
paterno () Nº de irmãos (as) _____ Com história de câncer [] Irmão(a)(s)	
Pesquisa por Biologia Molecular, da Mutação para o Fator V Leiden, MTHFR, Protrombina	
Resultado:	

ANEXO D - FICHA DO VOLUNTÁRIO

FICHA DE VOLUNTÁRIO PARA A PESQUISA DA MUTAÇÃO PARA O FATOR V LEIDEN	
Data: ____/____/____ Nome: _____	Nº _____
Procedência: _____	
Telefone (contato): _____	
Sexo: F ____ M ____ Idade: _____ Cor: _____	
Ascendência Familiar: _____	
Uso de Terapia Estrogênica: Sim _____ Não _____ Já usou _____	
<ul style="list-style-type: none"> • Contraceptivos _____ • Reposição _____ • Quanto tempo? _____ • Quantos? _____ 	
Aborto: Sim _____ Não _____ Quantos? _____	
Fatores associados: _____	
Outro fator relevante: _____	
Pesquisa por Biologia Molecular, da Mutação para o Fator V Leiden.	
Pesquisa de mutação no exon 10 alelo 1691G/1691A	
Resultado:	

ANEXO E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa denominada MUTAÇÃO DA PROTROMBINA E DOS POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DO CICLO DO FÓLATO EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS COM EVENTOS TROMBO-EMBÓLICOS, que tem como objetivo principal verificar se seu corpo possui alguma alteração que pode estar relacionada com um maior risco de você desenvolver doenças associadas com trombose.

O propósito deste folheto é esclarecer aberta e claramente todos os procedimentos envolvidos no estudo clínico, antes de sua decisão quanto à participação. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Cerca de 200 pacientes e 300 indivíduos sadios serão incluídos no presente estudo. Portanto, se concordar em participar você será um deles. O estudo em questão pretende associar fatores herdados de família e que podem levar a doenças associadas com trombose. Conhecer tal relação possibilitará a adoção de medidas de prevenção, as quais, dependendo dos resultados você se beneficiará, pois o seu médico saberá o seu risco no desenvolvimento das doenças trombóticas, além do que você também estará contribuindo para que se entenda melhor os fatores que podem ser responsáveis pelo aparecimento destas doenças.

Será feita a coleta de uma amostra de sangue, em torno de 5mL (uma colher de sobremesa) para se examinar a existência ou não desta alteração em seu organismo. Esta coleta será realizada por um profissional especializado, o que não determinará nenhum risco adicional e será utilizada única e exclusivamente nesta pesquisa.

Paralelamente serão anotadas algumas questões referentes a você no que diz respeito à data de nascimento, idade e dados relativos a sua doença. Estas informações serão retiradas do seu prontuário e algumas delas serão perguntadas pessoalmente a você.

É importante entender que você não é obrigado a participar do estudo. Se você decidir não participar ou desejar suspender a participação, você não precisa dar explicações e pode ficar certa de que continuará sendo assistida e tratada com o melhor cuidado possível, devendo comunicar esta decisão a seu médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos.. Fique à vontade para formular pergunta aos pesquisadores, cujos nomes e endereços são encontrados ao final deste folheto, mesmo que pareça muito simples sua dúvida. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com alguém da sua confiança.

Todos os seus dados pessoais serão tratados de maneira estritamente confidencial, ficando sua identificação inteiramente protegida.

A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como de resultados de seus exames individualmente.

Se porventura, surgir alguma informação que possa vir a lhe beneficiar, você será imediatamente comunicada.

Se você tiver alguma dúvida posteriormente, você poderá contar os pesquisadores descritos abaixo, a qualquer momento, bem como se você tiver alguma preocupação com o seu tratamento ou a extensão de sua doença.

Se você decidir participar então assine o termo abaixo na presença de seu

médico e mantenha uma cópia do formulário e desse folheto para sua informação.

Você terá mais tempo para pensar se ainda estiver inseguro quanto à participação.

Obrigado por ter lido esse folheto e por considerar sua participação no presente estudo.

Confirmando que li e entendi o folheto informativo sobre o estudo acima mencionado e tive a oportunidade de questionar e tirar as dúvidas que me surgiram e estou ciente que serei um dos pacientes participantes deste estudo.

O estudo em questão pretende detectar a frequência e o risco de fatores herdados de família relacionados com trombose. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária. Participando deste estudo, autorizo o preenchimento de uma ficha contendo dados relativos a minha doença, bem como a coleta de 5mL de sangue (desnecessário jejum), que serão utilizados exclusivamente nesta pesquisa. Também me disponibilizo para nova coleta de sangue, caso necessário.

Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao meu prontuário.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico.

Se tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a esse estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar:

Instituição: DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM
R . Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabussu

Dra. Sílvia Helena Rabenhorst (coordenadora) (085) 3366.8251 ou 9994 5689. ou
Analice Marque Moreira (mestranda) (085) 3366. 8306 ou 9174.3892
Comitê de Ética Em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas da
Universidade Federal do Ceará .
TELEFONE(85) 3366.8589/4011.8213

Fortaleza – CE, ____/____/____.

Nome completo do Paciente: _____
Endereço: _____

_____. Telefone: _____ Assinatura:
_____.

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do investigador: _____

ANEXO F - TERMO DE CONSENTIMENTO DA POPULAÇÃO CONTROLE

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa denominada MUTAÇÃO DA PROTROMBINA E DOS POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DO CICLO DO FOLATO EM PACIENTES COM DOENÇAS RELACIONADAS COM EVENTOS TROMBO-EMBÓLICOS, que tem como objetivo principal verificar se seu corpo possui alguma alteração que pode estar relacionada com um maior risco de você desenvolver doenças associadas com trombose.

O propósito deste folheto é esclarecer aberta e claramente todos os procedimentos envolvidos no estudo clínico, antes de sua decisão quanto à participação. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Cerca de 200 pacientes e 300 indivíduos sadios serão incluídos no presente estudo. Portanto, se concordar em participar você será um deles. O estudo em questão pretende associar fatores herdados de família e que podem levar a doenças associadas com trombose. Conhecer tal relação possibilitará a adoção de medidas de prevenção, as quais, dependendo dos resultados você se beneficiará, pois o seu médico saberá o seu risco no desenvolvimento das doenças trombóticas, além do que você também estará contribuindo para que se entenda melhor os fatores que podem ser responsáveis pelo aparecimento destas doenças.

Será feita a coleta de uma amostra de sangue, em torno de 5mL (uma colher de sobremesa) para se examinar a existência ou não desta alteração em seu organismo. Esta coleta será realizada por um profissional especializado, o que não determinará nenhum risco adicional e será utilizada única e exclusivamente nesta pesquisa.

Paralelamente serão anotadas algumas questões referentes a você no que diz respeito à data de nascimento, idade, sexo, hábitos alimentares. Estas informações serão perguntadas pessoalmente a você.

É importante entender que você não é obrigado a participar do estudo. Se você decidir não participar ou desejar suspender a participação, você não precisa dar explicações. Fique à vontade para formular pergunta aos pesquisadores, cujos nomes e endereços são encontrados ao final deste folheto, mesmo que pareça muito simples

sua dúvida. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com alguém da sua da sua confiança.

Todos os seus dados pessoais serão tratados de maneira estritamente confidencial, ficando sua identificação inteiramente protegida.

A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como de resultados seus exames individualmente estarão a sua disposição no Laboratório de Genética Molecular-LABGEM. Caso você tenha um risco herdado relevante, um dos pesquisadores envolvido no estudo entrará em contato para orientação quanto ao significado deste risco e as medidas preventivas a serem tomadas.

Se você tiver alguma dúvida posteriormente, você poderá contar os pesquisadores descritos abaixo, a qualquer momento.

Se você decidir participar então leia e assine o formulário abaixo e mantenha uma cópia do formulário e desse folheto para sua informação.

Você terá mais tempo para pensar se ainda estiver inseguro quanto à participação.

Obrigado por ter lido esse folheto e por considerar sua participação no presente estudo.

Confirmando que li e entendi o folheto informativo sobre o estudo acima mencionado e tive a oportunidade de questionar e tirar as dúvidas que me surgiram e estou ciente que serei um dos participantes deste estudo.

O estudo em questão pretende detectar a frequência e o risco de fatores herdados de família relacionados com trombose. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária. Participando deste estudo, autorizo o preenchimento de uma ficha contendo dados relativos a mim, bem como a coleta de 5mL de sangue (desnecessário jejum), que serão utilizados exclusivamente nesta pesquisa. Também me disponibilizo para nova coleta de sangue, caso necessário.

Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao

meu prontuário.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento.

Se tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a esse estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar:

Instituição: DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM
R . Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

Dra. Sílvia Helena Rabenhorst(coordenadora): (085) 3366.8251ou 9994 5689. ou

Analice Marques Moreira (mestranda) (085) 3366.8306 ou 9174.3892

Comitê de Ética Em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará .

TELEFONE(85) 3366.8589/4011.8213

Fortaleza – CE, ____ / ____ / ____.

Nome completo _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Assinatura: _____

Nome da testemunha:

Assinatura da testemunha:

Assinatura do investigador:
