



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

EUNICE BOBÔ DE CARVALHO

**DETECÇÃO DO FATOR V LEIDEN EM PACIENTES
TROMBOFÍLICOS NO ESTADO DO CEARÁ**

**FORTALEZA
2004**

EUNICE BOBÔ DE CARVALHO

**DETECÇÃO DO FATOR V LEIDEN EM PACIENTES
TROMBOFÍLICOS NO ESTADO DO CEARÁ**

**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 grau de Mestre em Patologia.**

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

**FORTALEZA
2004**

C 322 d

Carvalho, Eunice Bobô de

Detecção do fator V Leiden em pacientes trombofílicos no Estado do Ceará/ Eunice Bobô de Carvalho. – Fortaleza, 2005.

77f. il.

Orientadora: Prof (a) Dr (a) Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1.Trombofilia 2.Fator V – Genética 3.Trombose Venosa I. Rabenhorst, Silvia Helena Barem (orientadora) II. Título.

CDD 616.145

EUNICE BOBÔ DE CARVALHO

**DETECÇÃO DO FATOR V LEIDEN EM PACIENTES
TROMBOFÍLICOS NO ESTADO DO CEARÁ**

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.

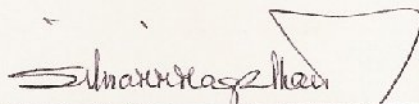
Aprovada em 06 de Agosto de 2004

BANCA EXAMINADORA

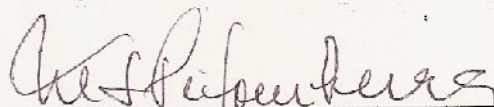
Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC



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



Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará-UFC



Prof.^a Dr.^a Maria Helena da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará-UFC

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 minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

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

À Prof.^a Dr.^a Silvia 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 Dr.^a Francisca Vânia Barreto Aguiar Ferreira Gomes e ao Dr. Murilo de Carvalho Martins. Meu respeito e admiração.

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

À Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria Meira Magalhães pelo apoio e incentivo.

Aos diretores da anterior e atual gestão do HEMOCE, Dr. Ormando Rodrigues Campos, Dr.^a Clara Maria Bastos Eloy da Costa, à Dr.^a Luciana Maria de Barros Carlos, Dr.^a Acy Telles de Sousa Quixadá e à Olga Rodrigues Campos pelo apoio no decorrer deste trabalho.

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

Ao Dr. Herivaldo Silva, à Dr.^a Alana Montenegro, à Dr.^a Fanca e à Dr.^a Vitória pelo incentivo constante durante este trabalho.

Aos meus amigos Marcos Antônio e Ana Cláudia, pela colaboração na realização deste trabalho e pelo apoio constante.

Às colegas do laboratório de hematologia, Suely, Ivoneide, Valéria, Ívina, Eleoneida e Michelly, pela ajuda na coleta das amostras de sangue dos pacientes.

À Regina Célia, Elza, Jeovani, Viviane, Cecília e Nazaré pelo carinho e amizade.

Aos demais funcionários do HEMOCE, pela ajuda prestada.

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

Aos amigos de pesquisa, Milena Holanda, Ary Gadelha, Lia Sanders, Ailton Telles, participantes do projeto de detecção do fator V Leiden.

A toda a equipe do LABGEM, Laboratório de Genética Molecular, minha admiração e gratidão.

RESUMO

As doenças trombóticas constituem um sério problema na saúde mundial. Diversas desordens hereditárias, que afetam o sistema fisiológico anticoagulante, estão atualmente estabelecidas como fatores de risco para a ocorrência do evento trombótico. Dentre estes o fator V Leiden é o mais freqüente. A associação entre alterações no gene do fator V e a ocorrência de eventos trombóticos desencadeou o desenvolvimento de diversas pesquisas. Neste estudo, 100 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 do fator V Leiden. O grupo controle consistiu de 110 voluntários sadios. A freqüência encontrada na população controle foi de 2,7% (03/110), enquanto que nos pacientes trombofílicos foi de 9% (09/100). Destes, 77,8% (07/09) eram do sexo feminino e 22,2% (02/09) do sexo masculino e a cor predominante foi a parda [66,7% (06/09)]. A faixa etária mais freqüente foi entre 26 e 33 anos [33,4% (03/09)]. Do total dos pacientes portadores do fator V Leiden, 88,9% (08/09) apresentaram trombose venosa profunda e 11,1% (01/09) trombose arterial com recorrência do evento trombótico de 22,2% (02/09). A correlação entre a presença do evento trombótico/presença do fator V Leiden e o uso de contraceptivo oral foi de 71,4% (05/07). Das pacientes portadoras e que usaram contraceptivo oral não ocorreu o aborto. A localização do primeiro evento trombótico, nos portadores, foi predominantemente nos membros inferiores [88,9% (08/09)] e 11,1% (01/09), nas artérias coronárias. Em 44,4% (04/09) havia um ou mais fatores de risco/morbidade associado. A freqüência da mutação encontrada no estado do Ceará mostrou-se inferior aos dados obtidos na região de Botucatu (SP) - 12% e ao estudo de Benson, em Atlanta (EUA)- 12,4 e ainda menor que os encontrados na região de Campinas (SP)- 20% e à população com ancestral europeu-18%. A diferença entre pacientes trombofílicos e população controle não foi estatisticamente significante ($p=0,19$), mas o risco estimado para o evento trombótico foi de 2,46.

Palavras-chaves: Fator V – Genética, Trombose Venosa, Trombofilia.

ABSTRACTS

Thrombotic diseases are a serious problem for world health. Several hereditary disorders, that affect physiological anticoagulant system, have been nowadays well established as risk factors for thrombosis. Among them factor V Leiden is the most frequent. The association between several modifications on factor V gene and the development of thrombotic events has brought about future searches. In this study, 100 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. The control group was made up 110 healthy volunteers. In this study, the frequency found out in the control population was of 2.7% (3/110), while in thrombophilic patients were of 9% (9/100). Of this, 77.8% (7/09) were female and 22.2% (2/09) were male patients and the predominant color was dark Brown 66.7% (6/9). The frequent age ranged between 26 and 33 years old [33.4% (3/09)]. The total of factor V Leiden carrier patients, 88.9% (8/09) had deep venous thrombosis and 11.1% (1/09) arterial thromboembolism. The recurrence of episode of thrombosis was of 22.2% (2/09). The correlativeness between the presence of thrombosis /presence of factor V Leiden and the usage of oral contraceptives were of 71.4% (5/09). The carriers and that they used oral contraceptives didn't happen the abortion. The first thrombotic events location, in carriers, were predominant on inferior members [88.9% (8/09)] and 11.1% (1/09) on coronary artery. In 44.4% (4/09) there was one or more factors of risk/morbidity associated. The frequency of mutation found in Ceará state lower than data from Botucatu (SP) region – 12% and Benson study, in Atlanta (USA) – 12.4% and was shown still smaller to the data obtained in Campinas (SP) region – 20% and of population with European ancestral – 18%. The difference between the patients and control population was not statistically significant ($p=0.19$) but the risk estimate of having a thrombotic event was 2.46.

Key words: factor V - genetic, venous thrombosis, thrombophilia.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1	Contato entre as plaquetas e o endotélio danificado. Adesão, agregação plaquetária e ativação do mecanismo de coagulação.....	19
Figura 2	Esquemática da fisiologia da coagulação.....	20
Figura 3	Fatores reguladores da coagulação.....	22
Figura 4	Esquema ilustrando a perda do sítio de restrição da enzima <i>MnlI</i> em consequência da mutação de ponto do fator V Leiden.....	40
Figura 5	Ilustração esquemática do resultado gerado da digestão do fragmento de 220pb PCR, pela enzima de restrição <i>MnlI</i>	40
Figura 6	Presença da mutação em pacientes trombofílicos.....	42
Figura 7	Presença da mutação no grupo controle.....	42
Figura 8	Distribuição da mutação em pacientes trombofílicos.....	43
Figura 9	Distribuição da mutação no grupo controle.....	43
Figura 10	Distribuição da mutação em pacientes trombofílicos em relação à cor.....	44
Figura 11	Distribuição da mutação no grupo controle em relação à cor.....	44
Figura 12	Distribuição da mutação em pacientes trombofílicos em relação à faixa etária.....	45
Figura 13	Distribuição da mutação no grupo controle em relação à faixa etária.....	45
Figura 14	Distribuição da mutação em relação ao tipo de evento trombótico.....	47
Figura 15	Distribuição de pacientes trombofílicos em relação à recorrência de trombose venosa profunda.....	48
Figura 16	Distribuição de pacientes trombofílicos em relação ao uso de contraceptivo oral.....	49
Figura 17	Distribuição do grupo controle em relação ao uso de	

	contraceptivo oral.....	49
Figura 18	Distribuição de pacientes trombofílicos em relação à ocorrência de aborto.....	50
Figura 19	Distribuição do grupo controle em relação à ocorrência de aborto.....	50
Figura 20	Distribuição de pacientes trombofílicos portadores em relação à localização do evento trombótico.....	51

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Fatores de risco hereditários e adquiridos para o desenvolvimento de tromboembolismo venoso.....	24
Tabela 2 Detecção do fator V Leiden em pacientes trombofílicos e população controle.....	42
Tabela 3 Distribuição da presença da mutação em pacientes trombofílicos e grupo controle portadores do fator V Leiden em relação ao sexo.....	43
Tabela 4 Distribuição da presença da mutação em pacientes trombofílicos e grupo controle portadores do fator V Leiden em relação à cor.....	44
Tabela 5 Distribuição da presença da mutação em pacientes trombofílicos e grupo controle portadores do fator V Leiden em relação à faixa etária.....	45
Tabela 6 Distribuição da presença da mutação em relação ao tipo de evento trombótico.....	46
Tabela 7 Distribuição de pacientes trombofílicos portadores da mutação, segundo a recorrência de trombose venosa profunda.....	47
Tabela 8 Distribuição de pacientes trombofílicos e grupo controle em relação ao uso de contraceptivo oral (CO).....	48
Tabela 9 Distribuição de pacientes trombofílicos e grupo controle em relação à ocorrência de aborto.....	49
Tabela 10 Distribuição de pacientes trombofílicos portadores do fator V Leiden em relação à localização do evento trombótico.....	50

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
Lista de Abreviaturas.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Fisiologia da Coagulação.....	19
1.2 Mecanismos Inibitórios da Coagulação.....	20
1.3 Fatores Predisponentes da Trombose – Hereditárias e/ou Adquiridos..	22
1.4 Deficiência de Antitrombina III.....	24
1.5 Deficiência de Proteína S.....	25
1.6 Deficiência de Proteína C.....	26
1.7 Resistência à Proteína C Ativada.....	26
1.8 Mutação no Gene da Protrombina G20210A.....	27
1.9 Mutação no Gene da Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR).....	27
1.10 Fator V – Seu Importante Papel na Coagulação.....	28
1.11 Alterações do Fator V.....	29
1.11.1 Haplótipo HR2 ou Alelo R2 do Fator V.....	29
1.11.2 Fator V Hong Kong e Fator V Cambridge.....	30
1.11.3 Fator V Leiden.....	31
1.11.4 Deficiência de Proteína Z.....	32
1.12 Aspectos Epidemiológicos.....	32
1.13 Justificativa.....	34
1.14 Objetivos.....	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1 Análise Genética.....	37

2.1.1 Extração do DNA.....	37
2.1.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP).....	38
3 RESULTADOS.....	42
3.1 Dados Epidemiológicos.....	42
3.2 Eventos Trombóticos.....	46
3.3 Recorrência de Eventos Trombóticos.....	47
3.4 Eventos Trombóticos x Uso de Contraceptivos Oral (CO).....	48
3.5 Eventos Trombóticos x Aborto.....	49
4 DISCUSSÃO.....	53
5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AT III: Antitrombina III

TFPI: Inibidor da Via do Fator Tissular

PC: Proteína C

PS: Proteína S

PCA: Proteína C Ativada

μ -PA: Ativador Uroquinase de Plasminogênio

t-PA: Ativador Tissular de Plasminogênio

RPCA: Reistência à Proteína C Ativada

MTHFR: Metileno Tetrahydrofolato Redutase

ZPI: Inibidor Protease Proteína Z Dependente

Fator Xa: Fator X Ativado

Fator Va: Fator V Ativado

Fator VIIIa: Fator VIII Ativado

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

RFLP: Fragmentos de Restrição com Polimorfismo de Comprimento

pb: pares de bases

TVP: Trombose Venosa Profunda

AVC: Doença Vascular Cerebral Isquêmica

TEP: Embolia Pulmonar

TA: Trombose Arterial

CO: Contraceptivo Oral

MI: Membro Inferior

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças trombóticas constituem um sério problema de saúde mundial. O tromboembolismo venoso afeta cerca de uma a cada 1000 pessoas por ano, sendo considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade (Rezende, 1999; Barrach, 2000).

O termo trombofilia, predisposição aumentada à trombose, é usualmente aplicado para indicar uma categoria de doenças hereditárias ou adquiridas que predispõe os eventos trombóticos. Este termo, às vezes, é usado somente para pacientes com trombose atípica, baseando-se em certas características, tais como: evento em idade jovem; recorrência; história familiar e eventos em locais incomuns (Lane, 1996a; Price & Ridker, 1997; Lorenzi, 1999). Dahlbäck e colaboradores, em 1993, foram os primeiros a descrever um defeito hereditário em pacientes trombofílicos.

A trombose ocorre quando há uma alteração do mecanismo hemostático no sistema vascular que pode desenvolver-se pelo desequilíbrio entre processos pró-trombóticos e anti-trombóticos (Lee, 1996).

Quando a integridade vascular é afetada, ocorre uma vasoconstrição de modo a diminuir o fluxo sangüíneo local e proporcionar um maior contato entre as plaquetas e o endotélio danificado, com conseqüente adesão plaquetária, seguida pela agregação destas e pela ativação do mecanismo de coagulação (Figura 1). O endotélio vascular tem um papel muito importante na hemostasia. Sua camada mais interna possui propriedades anticoagulantes, evitando a formação do trombo. A camada subendotelial tem características procoagulantes (Lorenzi, 1999). Assim, qualquer perturbação no equilíbrio hemostático pode levar à formação do trombo ou coágulo. Alterações nas paredes dos vasos, do fluxo sangüíneo e na composição dos constituintes do sangue são os principais fatores envolvidos na fisiopatologia da trombose (Lee, 1996). Estes fatores são conhecidos como a tríade de Virchow.

A trombose arterial geralmente ocorre quando a parede do vaso é afetada, como, por exemplo, pela aterosclerose ou pela homocisteinemia, com formação de agregação plaquetária e fibrina na superfície vascular. O processo

normal da coagulação, iniciado pela adesão plaquetária é seguido pela agregação e formação de trombos. A hipertensão, fluxo sanguíneo turbulento e hiperviscosidade parecem ser os principais fatores que contribuem para a trombose arterial, cuja consequência mais séria é a oclusão vascular. Seus trombos são compostos por massas coesas de plaquetas, com pequena quantidade de fibrina e poucos eritrócitos e leucócitos.

Na trombose venosa, os fatores extrínsecos aos vasos parecem ter papel fisiopatológico principal, já que freqüentemente a parede do vaso é normal histologicamente, exceto em trauma direto ou a erosão das veias. Os fatores predisponentes das trombozes venosas são o fluxo sanguíneo lento (estase venosa), a ativação local dos fatores da coagulação e a lesão do endotélio. O fator mais importante parece ser a estase venosa, tendo em vista ocorrer freqüentemente nas veias dos membros inferiores. A atividade fibrinolítica nas veias das pernas parece estar abaixo do normal quando comparada a outras veias. Uma redução generalizada no tônus venoso pode ser um fator fisiopatológico importante na trombose venosa em mulheres grávidas e naquelas que utilizam contraceptivos orais. Na trombose venosa, o trombo formado possui grande quantidade de fibrina e eritrócitos. Estes trombos podem ser de tamanho grande, podendo deles se desprender fragmentos que passam à circulação, levando a fenômenos de embolia. É importante enfatizar que o tromboembolismo venoso é um processo dinâmico; progressão e resolução podem ocorrer simultaneamente em diferentes sítios de trombose e o equilíbrio ou alterações entre estes dois processos podem resultar em exacerbações ou remissões clínicas. (Becattini *et* Agnelli, 2002; Kearon, 2003).

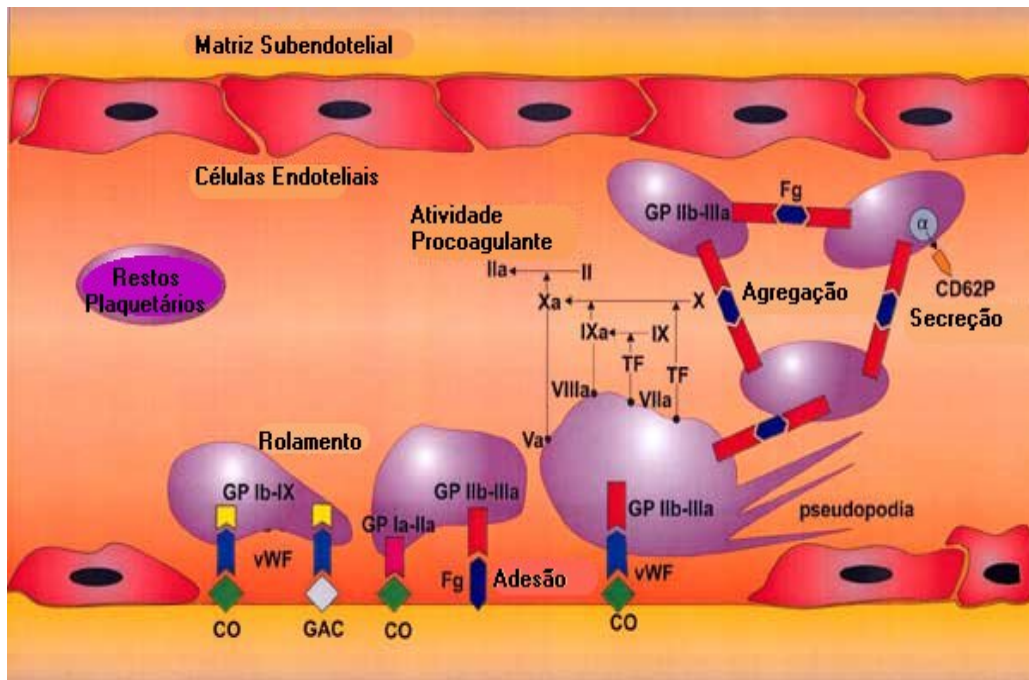


Figura 1 - Contato entre as plaquetas e o endotélio danificado.

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/

1.1 Fisiologia da Coagulação

A coagulação sanguínea é resultado da interação entre proteína tissular e proteínas plasmáticas pró e anticoagulantes, plaquetas e íons cálcio. A principal característica da coagulação está na ativação seqüencial de uma série de proenzimas ou proteínas precursoras inativas chamadas zimogênio, em enzimas ativas, que resultam passo a passo numa significativa resposta de amplificação (Kroegel, 2003). A coagulação é iniciada pela exposição do fator tecidual que se liga ao fator VII ativado (fator VIIa), convertendo o fator IX em fator IXa e fator X a fator Xa. O fator IX converte fator X a fator Xa. Este gera fator IIa (trombina) através do fator II (protrombina). Estas reações ocorrem na superfície da célula ativada. Com o fator IIa (trombina) gerado, há a clivagem do fibrinogênio plasmático solúvel para gerar fibrina, proteína insolúvel (Rosenberg & Aird, 1999; Crowther & Kelton, 2003). Os fatores da coagulação juntamente com os cofatores (fator V, VIII e cininogênio de

alto peso molecular), sobre a superfície plaquetária ativada, com múltiplos *feedback*, amplificam cada vez mais o processo, liberando grânulos protéicos plaquetários, promovendo a atividade procoagulante, aumentando a geração de trombina (Figura 2). Uma vez que o trombo adquira maior tamanho, poderá sofrer desintegração por influência da atividade fibrinolítica (Dalbäck, 1999; Kroegel, 2003).

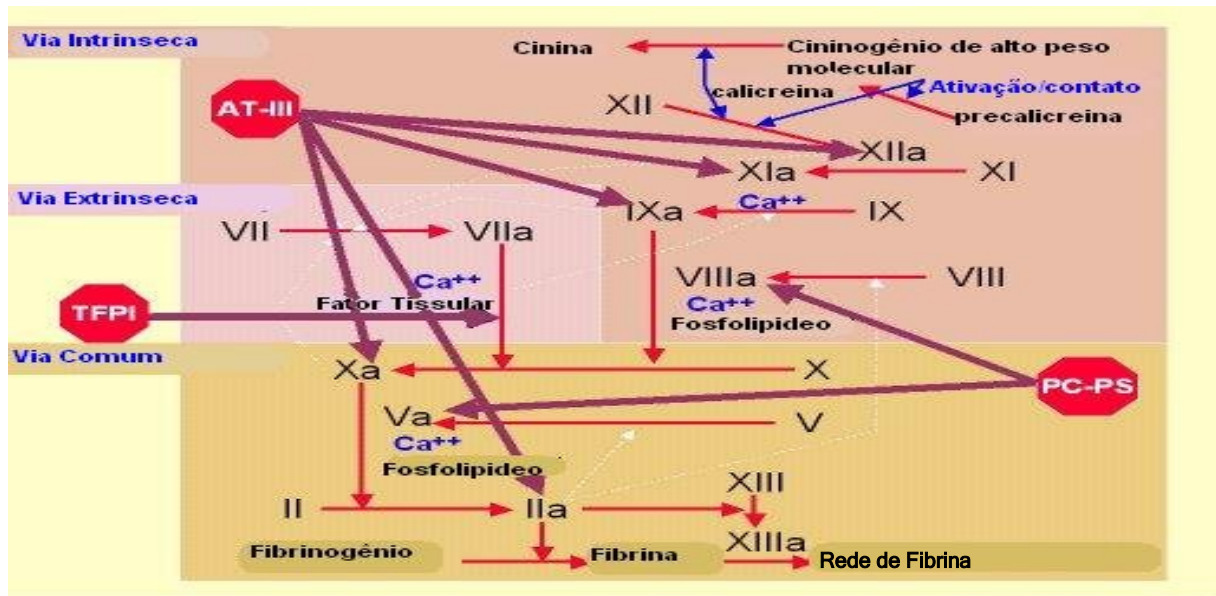


Figura 2 - Esquematização da fisiologia da coagulação.
(AT III-antitrombina III; TFPI-inibidor da via do fator tissular; PC-proteína C; PS-proteína S).
Retirada e modificada de www.life.sci.qut.edu.au/

1.2 Mecanismos Inibitórios da Coagulação

A coagulação sanguínea, do mesmo modo que forma o coágulo para obliteração da lesão vascular através da rede de fibrina entre as plaquetas agregadas, também é regulada por uma série de fatores que impedem o crescimento descontrolado do trombo ou coágulo no interior do vaso (Lorenzi, 1999).

A regulação da coagulação *in vivo* é feita por vários mecanismos que restringem as reações ao local da lesão, evitando desse modo a trombose intravascular maciça. Há diferentes mecanismos inibitórios que incluem fluxo sanguíneo e hemodiluição, depuração hepática ou reticuloendotelial, ação proteolítica da trombina, inibidores de serina-proteases e fibrinólise.

As serina-proteases ativas são diluídas e transportadas para o fígado para depuração através do fluxo sanguíneo rápido, o qual também dispersa e libera as plaquetas ligadas na periferia dos agregados, evitando o crescimento crescente do tampão hemostático. Após inativadas são retiradas da circulação pelos hepatócitos e células reticuloendoteliais do fígado e de outros órgãos.

A trombina acelera a deposição de fibrina no local da lesão tissular potencializando a ativação dos fatores XI, V e VIII da coagulação. No entanto, a trombina também atua na limitação da hemostasia, esta causa proteólise e degradação dos fatores XI, V e VIII, facilitando sua inativação e rápida degradação. Contribui também para o controle hemostático através da ativação do sistema fibrinolítico pela via da proteína C, o que causa a dissolução da fibrina, além de estimular os leucócitos, proporcionando a fibrinólise celular.

Os principais inibidores da coagulação sanguínea são a antitrombina III (AT III), o cofator II de heparina (HC II), a proteína C (PC), a proteína S (PS), o inibidor da via do fator tissular (TFPI), a nexina-1-protease (PN-1), o inibidor de C1 (C1-Inh.), a α_1 -antitripsina (α_1 -AT) e a α_2 -macroglobulina (α_2 -M). Com exceção do TFPI e da α_2 -M, a maioria dos inibidores pertence a superfamílias de proteínas homólogas com inibidor de α_1 -proteínase, denominada de serpinas. Este termo serpina é acrônimo de “*serine protease inhibitor*”. A função dos inibidores de serina-proteases, *in vivo*, é limitar a ativação do sangue formando rapidamente complexos com as serina-proteases. Este processo apesar de não parar totalmente a ativação da coagulação sanguínea, restringe a amplificação sistêmica da ativação, confinando ao local da lesão.

Os inibidores da coagulação, de acordo com seu mecanismo de ação, são agrupados como (1) serpinas (AT III, HC II, PN-1, C1-Inh., α_1 -AT); (2) cuninas (TFPI) proteínas homólogas à aprotinina (inibidor da tripsina pancreática) e (3) α_2 -macroglobulina (Schiffman, 2004).

O sistema Proteína C/ Proteína S/ Trombomodulina é o sistema inibidor de cofatores. A trombina quando ligada a trombomodulina, receptor específico ao nível da célula endotelial ativa a proteína C, que é por ela mesma inativa. Essa ligação, trombina-trombomodulina, faz a trombina perder a atividade de coagular o

fibrinogênio. A proteína C ativada (PCA), ao nível da superfície fosfolipídica, na presença de um cofator, a Proteína S, é capaz de inibir os cofatores Va e VIIIa, o que reduz a velocidade de formação de trombina (Figura 3) (Gouault-Heilmann, 1999; Solymoss, 2000; Bloomenthal *et al.*, 2002).

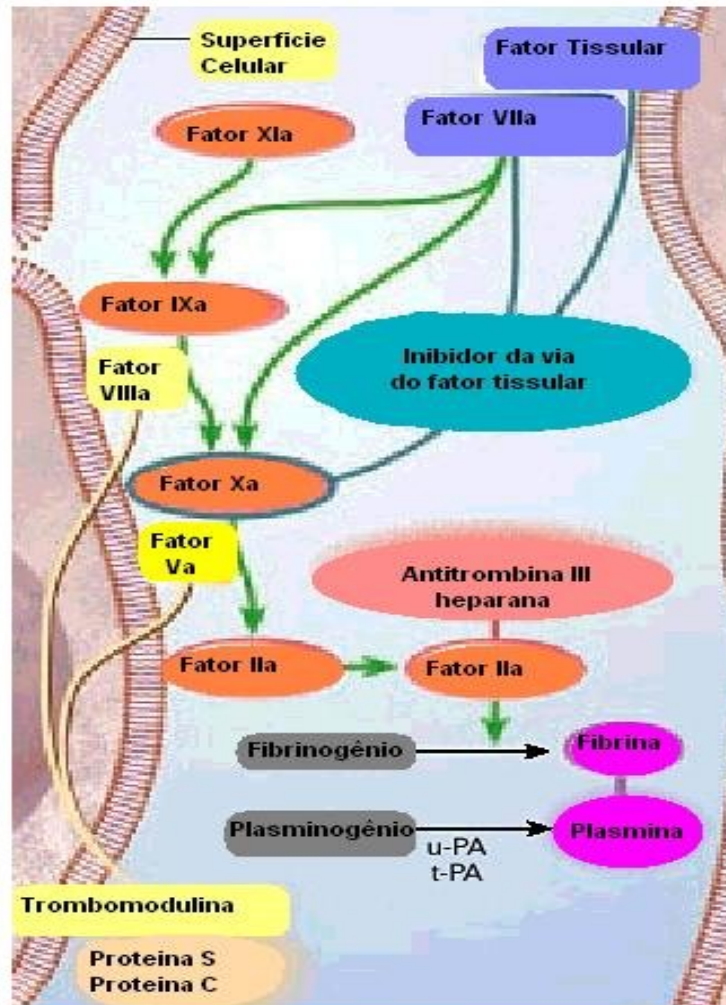


Figura 3 - Fatores reguladores da coagulação.

(μ -PA: Ativador uroquinase de plasminogênio; t-PA: Ativador tissular de plasminogênio)
Retirada e modificada de www.medscape.com

1.3 Fatores Predisponentes da Trombose - Hereditários e/ou Adquiridos

A trombose pode ocorrer devido a causas hereditárias e/ou adquiridas. Fatores como cirurgia, trauma, mobilização, gravidez, uso de contraceptivos orais,

terapia com estrógenos, síndrome do antifosfolípido, doenças malignas (Leucemia Mielóide Aguda –M₃(LMA-M₃), Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial, Leucemia Mielóide Crônica-LMC, Mielofibrose) e nefropatias, Doença de Legg-Calvé-Perthes e diabete mellitus estão relacionadas a eventos trombóticos (Lane *et al.* 1996; Arruda *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 1998). Dentre os defeitos hereditários são freqüentemente citados: a deficiência das proteínas C e S; deficiência de antitrombina III; mutação no gene da protrombina (G20210A); mutação da metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) C677T e a mutação no gene do fator V (fator V Leiden; FV G1691A). Há também alterações do cofator da heparina, deficiência do ativador de plasminogênio tecidual e desfibrinogenemia (Boven *et al.*, 1996; Rezende, 1999; Godoy *et al.* 2000; Aiach & Alhenc-Gelas, 2002).

Nestes últimos trinta anos, as anomalias constitucionais do sistema inibidor da coagulação foram sucessivamente descritas: deficiências da antitrombina (1965), da proteína C (1981), da proteína S (1984), o fator V Leiden (1993), mutação da metileno tetrahydrofolato redutase (1994) e a mutação G20210A do gene da protrombina (1996). Combinadas ou associadas a fatores adquiridos favoráveis (tabela 1), estas anormalidades são encontradas com certa freqüência nas trombozes (Rosenstingl *et al.* 2002; Arruda *et al.*, 1998a; Perry, 1999; Dahlbäck, 1995a).

Tabela 1 - Fatores de risco hereditários e adquiridos para o desenvolvimento de tromboembolismo venoso.

Fatores de risco hereditários (primários)	Fatores de risco adquiridos (secundários)
Mutação G1691A no gene do fator V (fator V Leiden) Mutação G20210A no gene da protrombina Deficiência da proteína S Deficiência da proteína C Deficiência da antitrombina III Deficiência do cofator II da heparina Deficiência de plasminog�nio Deficiência do fator XII Desfibrinogenemia Aumento da atividade coagulante do fator VIII Hiperhomocisteinemia primária	Imobiliza�o prolongada Cirurgias dentro dos últimos três meses (especialmente grandes cirurgias abdominais, pélvicas e ortopédicas) Acidente vascular cerebral, paralisia de extremidades História de tromboembolismo venoso Malignidade Obesidade Fumantes Hipertensão Uso de contraceptivos orais, terapia de reposi�o hormonal Gravidez e puerpério Hiperhomocisteinemia secundária Síndromes antifosfolip�dicas (anticoagulante lúpico) Insuficiência cardíaca congestiva Doenças mieloproliferativas (por exemplo: policitemia vera, trombocitemia essencial) Síndrome nefr�tica Doença inflamatória intestinal Anemia falciforme Acentuada leucocitose

Esta tabela cont m dados fornecidos pelo estudo PIOPED, 1990.

1.4 Deficiência de Antitrombina III

A antitrombina, também conhecida como antitrombina III (ATIII), é uma proteína sintetizada no fígado, a qual inativa a trombina (fator IIa) e também os fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e calicreína. Sua deficiência pode ser causada pela

diminuição do seu nível ou pela disfunção protéica (Abramson *et al.*, 2001). É uma deficiência rara, ocorre em cerca de 0,2% na população em geral e em 0,5% a 7,5% em pacientes com tromboembolismo venoso. Cerca de 60% dos pacientes com deficiência de antitrombina poderão ter um episódio de trombose venosa aos seus 60 anos. Há três tipos de deficiência de ATIII. O tipo I é caracterizado pela diminuição tanto dos níveis funcionais como antigênico. No tipo II os níveis antigênicos estão normais e estão reduzidos os níveis funcionais. O tipo III está associado à interação entre antitrombina e heparina, sendo o nível antitrombínico antigênico e funcional normais, sua homozigose causa doença trombótica grave. A homozigose associada aos tipos I e II mostra que uma deficiência total de antitrombina não é compatível com a vida (Lane *et al.*, 1996; Arnaldi *et al.*, 2001; Crowther *et al.*, 2003).

1.5 Deficiência de Proteína S

A atividade da proteína S, dependente de vitamina K, difere das demais, por não ser uma serina protease. Atua como um cofator não enzimático para a proteína C ativada na degradação do FVa e FVIIIa. É sintetizada no fígado e nas células endoteliais. Há relatos de sua presença no cérebro, no tecido reprodutivo e nos megacariócitos, embora, nestes tecidos, sua função ainda não está bem clara (Hillarp, 1995). A deficiência de proteína S (PS) é uma doença autossômica dominante, classificada em três grupos I, II e III. O tipo I é caracterizado pela redução nos níveis de PS livre e total. A proteína S circula no plasma na forma livre (40%) ou ligada (60%) à proteína de ligação C4b (C4b-BP), sendo este complexo um regulador da via clássica do complemento. O tipo II, chamado de qualitativo é caracterizado pela diminuição da atividade e níveis normais da PS total e livre. O tipo III se caracteriza pelo nível normal de PS total e baixo nível de PS livre. A PS quando interage com a proteína C (PC), aumenta em 20x a degradação do fator V (Martinelli *et al.*, 1998; Rezende, 1999). A deficiência de PS é encontrada em 1,3% a 5% dos pacientes com trombose venosa. Sua deficiência em homozigose está associada à púrpura fulminante neonatal (Crowther *et al.*, 2003).

1.6 Deficiência de Proteína C

A proteína C é considerada o maior sistema procoagulante. Dependente de vitamina K, sintetizada no fígado e nos órgãos de reprodução masculina. Exerce atividade inibitória primária, inativando os cofatores FVa e FVIIIa, necessários à ativação da trombina e do fator Xa. Primeiramente, a PC é ativada pela trombina que forma a proteína C ativada (PCA), esta é uma protease serina e sua atividade é inibida pela antitrombina. Sua deficiência em heterozigose está associada a doenças tromboembólicas, aumentando cerca de 5-10x o risco de tê-las (Dahlbäck, 1995b). Na forma homozigótica, sua deficiência se manifesta de modo severo, freqüentemente fatal, onde a trombose já ocorre no período neonatal. Sua atividade é regulada por inibidores plasmáticos específicos, como o inibidor da PC e α_1 -antitripsina (Hillarp *et al.*, 1995; Gale *et al.*, 2002).

1.7 Resistência à Proteína C Ativada

A resistência à proteína C ativada (RPCA) é o mais comum dos fatores de risco correlacionados a eventos trombóticos (Dahlbäck, 1994; Zöller *et al.*, 1994; Soria *et al.*, 2003). Foi detectada em 20% a 50% dos pacientes com trombose venosa (Griffin *et al.*, 1995) e em cerca de 20% a 60% nos casos de trombofilia familiar (Soria *et al.*, 2003). O teste para detecção da resistência a PCA mede a resposta anticoagulante à PCA na reação do tempo parcial de tromboplastina parcial ativada. Numa resposta normal, o tempo de coagulação é prolongado devido a clivagem da proteína C ativada com conseqüente inibição dos fatores VIIIa e Va. O contrário ocorre, em plasma de pacientes que apresentaram evento trombótico com resistência à PCA (Dahlbäck, 1995c). Na presença de PCA, o tempo de coagulação do plasma de pacientes com tromboembolismo venoso não se alonga o suficiente, de onde o termo de resistência à proteína C ativada (Aboud, 2001; Aiach *et al.*, 2002).

1.8 Mutação no Gene da Protrombina G20210A

A mutação no gene da protrombina G20210A, associada ao elevado nível plasmático de protrombina, é considerada causa comum de trombofilia, principalmente da trombose arterial. Frenkel e Bick (1999) contradizem em seus relatos que haja correlação significativa entre elevado nível de protrombina plasmática e a presença da mutação G20210A. Em pacientes com doença arterial, como por exemplo, doença vascular cerebral, infarto do miocárdio e doença periférica, a prevalência foi de 5,7% (Arruda *et al.*, 1997). Há também outro estudo do mesmo autor, relatando a prevalência em pacientes com infarto do miocárdio de 3,2%, enquanto na população controle foi de 0,7% (Arruda *et al.*, 1998b). A presença concomitante do alelo G20210A e de outros fatores de risco, tais como: tabagismo, obesidade, diabetes, hipertensão ou anormalidades lipídicas são fatores de risco adicionais para doenças cardiovasculares, como por exemplo, infarto do miocárdio (Franco *et al.*, 1999). Robertorye & Rodgers, 2001, também acreditam ser necessários outros fatores de risco, associados à mutação, para o desencadeamento do tromboembolismo venoso.

1.9 Mutação no Gene da Enzima Metileno Tetrahydrofolato Redutase (MTHFR)

Em 1994 foi revelado um polimorfismo, na posição 677, do gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) (C677T), o qual resulta na substituição da alanina pela valina (Perry, 1999). Esta variação é responsável por uma termolabilidade da enzima MTHFR, conferindo uma atividade reduzida, resultando em um aumento do nível plasmático total da homocisteína. A concentração elevada da homocisteína está relacionada com o desenvolvimento da doença aterosclerótica. Sua elevação associa-se à doença vascular, possivelmente pela indução da atividade procoagulante monocítica e pela promoção da expressão do fator tissular endotelial. Sendo que, seu aumento sérico crônico, provoca efeito tóxico direto sobre a função endotelial. A elevação da homocisteína total inibe a

ativação da proteína C, o que contribui para eventos trombóticos, assim como também suprime o sulfato de heparina na superfície da célula endotelial, reduzindo a capacidade da antitrombina de agir como anticoagulante. Um desequilíbrio geral no ciclo da remetilação da homocisteína pode levar a efeitos trombogênicos. A homocisteína atua tanto no processo de coagulação como na anticoagulação, tendo papel importante na patogênese do tromboembolismo, aumentando o risco de ocorrência em 2 a 4 vezes (Nowak-Göttl *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2003). Engbersen *et al.*, em 1995, mostraram que em 28% de pacientes com doença vascular prematura, o metabolismo anormal da homocisteína pode ser atribuído à variante mutante.

1.10 Fator V – Seu Importante Papel na Coagulação

O fator V é uma glicoproteína de 330KDa. Sua concentração plasmática é cerca de 20nmol/L (0,007g/L). Encontra-se na forma livre no plasma e cerca de 25% do fator V total no sangue humano ligam-se aos grânulos α plaquetários. É sintetizado no fígado como uma molécula de cadeia simples e durante a coagulação, devido à ativação plaquetária, este é secretado. Ainda não está claro, se sua presença nas plaquetas resulta da circulação exógena do fator V via processo de endocitose pelos megacariócitos ou se estas próprias células são responsáveis pela sua produção.

O gene do fator V, localizado no *locus* gênico do cromossoma 1q23, se expande por mais de 80Kb e contém 25 exons. Possui múltiplos domínios, A₁-A₂-B-A₃-C₁-C₂, similares aos do fator VIII. Cerca de 40% da sequência entre os domínios A e C dos fatores V e VIII são idênticos. Na ativação da cascata da coagulação o FV (fator V) é proteoliticamente ativado pela trombina e pelo fator Xa. O domínio B é liberado nesta ativação e a cadeia pesada (A₁-A₂) e a cadeia leve (A₃-C₁-C₂), formam uma molécula de ligação heterodímera não covalente, o fator Va. Este, liga-se ao FXa e serve como cofator ao complexo protrombinase convertendo protrombina em trombina. O FV funciona também como um cofator anticoagulante na via da proteína C. A PCA inativa tanto o FVa como o FVIIIa. O FV juntamente com a PS servem como cofatores sinérgicos para a inativação do FVIIIa. O FV existe

em duas isoformas FV1 e FV2, com diferentes características em relação à atividade procoagulante, à inativação pela PCA e à função anticoagulante na via da proteína C. O FV1 tem um maior potencial para gerar mais trombina que o FV2 (Yamazaki *et al.*, 2002; Dargaud *et al.*, 2003; Bossone *et al.*, 2003).

A regulação da atividade procoagulante do fator Va é feita pela proteólise mediada pela PCA nas posições Arg306, Arg506 e Arg679. A clivagem no sítio Arg506 é preferida em baixas concentrações de PCA e fator Va. Nesta, há somente uma inativação parcial do fator Va, enquanto que, no sítio Arg306, a proteólise resulta numa completa inativação do fator Va. A terceira clivagem, no sítio Arg679 é a menos importante para desativação do fator Va. Na inativação do fator Va, está envolvida a proteína S, cofator da PCA, a qual possui grande afinidade pela membrana fosfolipídica carregada negativamente. Nestas clivagens, notam-se diferentes dependências da proteína S como cofator da PCA, mas, esta não afeta a taxa de clivagem no sítio Arg506, embora na presença da proteína S haja um aumento na taxa de clivagem no sítio Arg306 de 20x, o que mostra a importância da proteína S na regulação da atividade de cofator do fator Va (Prayoonwiwat *et al.*, 2001; Nicolaes *et al.* Dahlbäck, 2002).

1.11 Alterações do Fator V

1.11.1 Haplótipo HR2 ou Alelo R2 do Fator V

O haplótipo HR2, também conhecido como alelo R2 do fator V, relaciona-se ao tromboembolismo venoso. Associa-se com a redução dos níveis plasmáticos do fator V. Sua presença está associada ao aumento da resistência à PC ativada, tanto em indivíduos normais, como em pacientes trombofílicos, independente do fator V Leiden (Folsom *et al.*, 2002). Entretanto, parece não ser consistente a associação entre o haplótipo HR2 e a presença de tromboembolismo venoso, assim como não foi encontrado o aumento do risco para portadores heterozigotos HR2. O mesmo não ocorrendo em portadores homozigotos, onde este risco é aumentado. Para estes autores, tanto a presença de homozigose para o HR2 ou dupla

heterozigose para fator V Leiden e HR2 são bastante raras e a aplicabilidade do teste para HR2 é ainda questionável.

Este haplótipo consta de diferentes polimorfismos, alguns envolvendo regiões do domínio B, das cadeias leve e pesada do fator V. Dentre estes, são conhecidos: Met (metionina) 385 Thr (treonina); His (histidina) 1299 Arg (arginina); Met 1736 Val (valina) e Asp (aspartato) 2194 Gly (glicina), que consistem em múltiplas substituições nucleotídicas (Curvers *et al.*, 2002; Robertorye & Rodgers, 2001).

Estes polimorfismos afetam moderadamente a transcrição, o processamento no RNA e/ou a estabilidade do RNA mensageiro *in vivo*, embora não resulte em mudança de um aminoácido (Yamazaki *et al.*, 2002).

1.11.2 Fator V Hong Kong e Fator V Cambridge

O Fator V Hong Kong resulta na substituição da Arg 306 pela glicina (Gly), embora esta clivagem ocorra em reação lenta, termina por desativar o fator V ativado, ao passo que a clivagem da Arg 506 é bem mais rápida que a clivagem da Arg 306, mas inativa parcialmente, permanecendo cerca de 40-45% da atividade procoagulante.

A outra mutação onde há uma clivagem na Arg 679, chamada de FV Cambridge, na qual há substituição da arginina pela treonina (Thr), ainda não está bem detalhada, mas é responsável pela perda de aproximadamente 30% da atividade do cofator. Esta foi relatada em pacientes com trombose e resistência à proteína C ativada inexplicável, na ausência do fator V Leiden.

No caso da mutação do FV Hong Kong não há casos ainda relatados de resistência à proteína C ativada. *In vitro*, a clivagem da Arg 506 não tem efeito direto sobre a atividade do cofator, mas é necessária para a inativação subsequente nos sítios de clivagem da Arg 306 e Arg 679 (Robertorye & Rodgers, 2001; Van Cott *et al.*, 2002).

Cerca de 5% dos pacientes com resistência à proteína C ativada não são portadores do fator V Leiden. Em alguns destes, o fator V Cambridge foi encontrado.

O fator V Cambridge e fator V Hong Kong não são considerados fatores de risco para trombose, embora possam aumentar o risco quando combinados com outros fatores genéticos ou adquiridos (Norstrøm *et al.*, 2002).

1.11.3 Fator V Leiden

Em 1993, Dahlbäck *et al* descreveram uma predisposição à trombose, devido uma pobre resposta anticoagulante à proteína C ativada, a qual foi denominada de resistência à proteína C. Um ano após, Bertina *et al*, 1994, descreveram uma mutação no fator V da coagulação associada à resistência à proteína C ativada. Esta mutação no gene do fator V, denominada de Fator V Leiden devido o nome do centro descobridor, ocorre devido à substituição da base guanina pela adenina na posição nucleotídica 1691 (1691G→A) no exon 10 do gene do fator V. Esta mutação ocasiona a mudança da arginina (R) na posição 506 na molécula do fator V pela glutamina (Q), sendo designado como FV: Q⁵⁰⁶, FVR⁵⁰⁶Q ou FV Leiden. A clivagem na posição 506, como dito anteriormente, está associada à perda da atividade pró-coagulante do fator V, embora uma completa inativação do fator V ativado requer também as clivagens nas posições 306 e 679. A molécula de fator V mutada é inativada mais lentamente que uma molécula de fator V normal, o que pode levar a um aumento na geração de trombina e a um estado mais prolongado de hipercoagulabilidade.

A degradação, tanto do fator V ativado normal como do mutado é menos marcante na presença que na ausência do fator Xa e proteína S. A interação entre fator V ativado e fator X ativado protege o sítio 506, mas não o sítio 306, da clivagem mediada pela proteína C ativada. Outro fator importante é que a proteína S age como cofator da PCA na clivagem 306, mas não na clivagem 506 (Zöller *et al.*, 1997; Aiach *et al.*, 2002).

O sítio de clivagem na posição 506 é necessário para que a função do fator V seja completa, tanto na inibição da degradação do fator V ativado pela PCA, quanto na função de cofator da PCA na degradação do fator VIII ativado.

A mutação no gene do fator V é encontrada em cerca de 90 a 95% dos pacientes com resistência à proteína C ativada, em aproximadamente 10% a 20% de pacientes trombofílicos e em 3% a 5% da população assintomática (Stefano, 1998; Rezende, 1999; Robertorye & Rodgers, 2001; Norstrøm *et al.*, 2002; Van Cott *et al.*, 2002).

1.11.4 Deficiência de Proteína Z

Há também relatos, em que outro fator está associado ao aumento considerável da tendência protrombótica do fator V Leiden que é a deficiência da proteína Z. A proteína Z humana foi isolada em 1984. É uma glicoproteína, vitamina K dependente, sintetizada no fígado. Sua função era desconhecida até 1991, quando foi demonstrado que a trombina somente se liga à superfície fosfolipídica na sua presença. Esta proteína circula no plasma em complexo com seu inibidor, o inibidor protease proteína Z dependente (ZPI). Quando da presença de fosfolípido e íons cálcio, a proteína Z aumenta a inibição do fator Xa pelo ZPI em 1000x.

Pacientes com o fator V Leiden e baixo nível de proteína Z sofrem o primeiro evento trombótico mais cedo que aqueles com o fator V Leiden e altos níveis de proteína Z, sendo esta considerada um fator adicional de risco importante em pacientes com fator V Leiden. Além disso, pacientes com níveis de proteína Z diminuídos sofrem complicações tromboembólicas mais sérias que pacientes com níveis de proteína Z elevados (Kemkes-Matthes *et al.*, 2002).

1.12 Aspectos Epidemiológicos

A associação entre a presença do fator V Leiden e a ocorrência de eventos trombóticos desencadearam o desenvolvimento de diversas pesquisas relacionadas ao gene do fator V da coagulação.

Estudos populacionais têm sido extensivamente realizados. Em diferentes países europeus a prevalência do fator V Leiden encontra-se na faixa de 2% e 6% (Soria *et al.* 2003). Enquanto cerca de 5% dos indivíduos com ancestrais europeus são portadores do fator V Leiden, a prevalência relatada em africanos não detectou a mutação em nenhum indivíduo estudado, mesmo em africanos-americanos prevalência foi baixa, 1,1%. A prevalência encontrada nos Estados Unidos foi de 5% e 6% (Stefano *et al.*, 1998). O fator V Leiden mostrou-se ausente em muitos países asiáticos ou em grupos com descendência asiática (esquimós, ameríndios, aborígenes australianos e polinésios) (Stefano *et al.*, 1998). Na população em Marrocos, a prevalência encontrada foi de 0%. O oposto foi encontrado na população da Palestina, Jordânia e em árabes israelenses cuja frequência foi alta, cerca de 7 a 13,6% (Giudicelli, 2002). Na população libanesa a prevalência variou de 2 a 15%, sugerindo que a origem da mutação esteja localizada no leste do Mediterrâneo (Almawi, 2002). No Brasil a prevalência encontrada foi em cerca de 2% da população em geral (Arruda *et al.*, 1995). No estudo de Franco *et al.*, em 1999, a prevalência encontrada na população brasileira foi de 2,6%.

Parece haver uma origem comum para a mutação de Leiden, possivelmente ocorrida após a separação de não-africanos de africanos, e após a separação de asiáticos de subpopulações caucasóides (Stefano, 1998).

Há uma prevalência de cerca de 10% a 20% em pacientes com tromboembolismo venoso (Rezende, 1999). Outro estudo realizado em indivíduos com idade, variando entre 18 e 65 anos, notou-se que a fração de eventos trombóticos associados ao fator V Leiden foi de 14% (Stefano, 1998). Kroegel e Reissig, em 2003, mostraram uma incidência de 20 a 25% do fator V de Leiden nestes pacientes. Rosenstingl *et al.*, 2002, encontraram uma prevalência de 12% em pacientes com doença cerebral vascular.

Outro grupo associado à presença do fator V Leiden é o de gestantes com complicações obstétricas, onde cerca de 20% apresentavam a mutação. Dentre estas complicações podem-se citar a pré-eclâmpsia, placenta prévia, retardo no crescimento fetal e natimorto. A presença de trombofilia nestas mulheres pode ser

uma importante consideração para o planejamento de futuras gestações (Kupferminc *et al.*, 1999; Lockwood, 2002; Souza *et al.*, 1999).

Outra associação encontrada foi com a doença de Legg-Calvé-Perthes. Esta doença se caracteriza por necrose da epífase femural, de etiologia ainda desconhecida. É possível que ocorra uma supressão sangüínea ao nível da cabeça do fêmur, talvez devido à compressão extrínseca dos vasos, com trombose intravascular. A trombose vascular é um evento incomum em crianças e um estudo realizado em pacientes com a doença de Legg-Calvé-Perthes mostrou uma prevalência de 4,9%, envolvendo jovens com trombose recorrente em locais incomuns (Arruda *et al.*, 1999).

1.13 Justificativa

A ocorrência de eventos trombóticos está relacionada à interação entre fatores de risco hereditários e adquiridos. Além do que, a variabilidade da presença da mutação em relação à população estudada, mostra a necessidade do conhecimento da prevalência do fator V Leiden no estado do Ceará, uma vez, que na população brasileira a miscigenação é marcante.

Devido à importância clínica dos fenômenos trombóticos, a determinação de sua origem certamente fornecerá a profissionais de saúde e a pacientes, benefícios no que se refere a diagnóstico, terapêutica e profilaxia.

1.14 Objetivos

Geral:

- Obter um perfil do paciente portador do fator V Leiden segundo aspectos epidemiológicos, tipo e local do evento trombótico, recorrência e associação a fatores de risco ambientais.

Específicos:

- Implantar a técnica para detecção da mutação do fator V (Fator V Leiden) no Laboratório de Biologia Molecular – LABGEM;
- Detectar a frequência da mutação no gene do fator V (fator V Leiden) em pacientes apresentando pelo menos um evento trombótico, atendidos no ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE/SESA/UFC, referência em hematologia para o estado;
- Correlacionar aspectos epidemiológicos (sexo, idade e cor), tipo de evento trombótico, recorrência e uso de contraceptivos orais nos pacientes trombofílicos analisados.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o teste para detecção do fator V Leiden 100 pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará-HEMOCE. Estes pacientes foram selecionados por apresentarem ao menos um evento trombótico (venoso e/ou arterial) e idade inferior ou igual a 45 anos de idade na época do seu primeiro evento. Como controle, foram realizados testes para detecção da mutação em 110 indivíduos aparentemente saudáveis, sem história familiar de trombose, todos voluntários. O grupo controle foi composto de candidatos à doação de sangue do HEMOCE, após sua aceitação, na triagem clínica médica, para a doação.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE (APÊNDICE A). Cada paciente e voluntário do grupo controle preencheu uma ficha com dados epidemiológicos (APÊNDICE B e C), bem como, assinou o termo de consentimento para realização da análise (APÊNDICE D e E). Cada paciente, ao final da análise, recebeu seu resultado (APÊNDICE F).

2.1 Análise Genética

A presença da mutação no gene do fator V (fator V Leiden) foi detectada através da análise do DNA, obtido a partir da sua extração de células nucleadas (*buffy-coat*), provenientes de 5mL de sangue total, após *lise* das hemácias, seguida pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e restrição RFLP (*restriction fragment length polymorphism* ou fragmentos de restrição com polimorfismo de comprimento), utilizando a enzima *MnII* (Barrach *et al.*, 2000).

2.1.1 Extração do DNA

Após coleta do sangue total em tubo com K₃ EDTA (15%) 0,34M, o DNA genômico foi extraído do *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%, ressuspendido 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.

2.1.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

A reação de PCR foi realizada utilizando *primers* específicos para a região do *exon* 10 do gene do fator V, produzindo fragmentos de 220 pb. Os fragmentos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, para visualização dos produtos amplificados.

A reação de PCR teve um volume final de 50µL, nas seguintes concentrações finais:

- 2µL de solução de DNA
- 200ng de *primers* FV1 (5' CTTAAGGAAATGCCCCATTA 3') e FV2 (5' CCATGCTTAACAAGACCA 3');
- 0,2mM de desoxinucleotídeos;
- 2,5U de Taq DNA Polimerase (Pharmacia®);
- Tampão Tris-HCl à 10mM, KCl à 50mM e MgCl₂ à 1,5mM.

A reação de PCR segue os seguintes passos com 30 ciclos de repetição:

- Desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto;
- Desnaturação a 94°C por 40 segundos;
- Anelamento a 52°C por 40 segundos;
- Elongamento a 72°C por 1 minuto;
- Elongamento final a 72°C por 10 minutos.

A cada reação foi colocado um tubo controle negativo (água no lugar do DNA). Após a PCR, 8µL de cada produto foram submetidos à eletroforese em gel de

agarose a 1% com um padrão de peso molecular de 100pb (pares de base) para visualização dos produtos da reação e confirmação da presença do fragmento de 220 pb.

Em seguida, fez-se a restrição do produto amplificado, utilizando a enzima *MnII* com incubação em Banho-Maria a 37°C por 18 horas. Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% para visualização dos fragmentos e posterior documentação dos resultados.

A enzima *MnII* cliva os produtos de PCR em dois sítios de restrição, produzindo três fragmentos de 116pb, 37pb e 67pb. A visualização dos fragmentos de restrição foi feita em gel de poliacrilamida a 7%, corado pelo brometo de etídeo e utilizando um padrão de peso molecular de 100pb. A presença de mutação foi detectada pela perda de um dos sítios de restrição, produzindo nos indivíduos homocigotos apenas dois fragmentos de 153pb e 67pb. Os indivíduos heterocigotos apresentam um fragmento adicional, maior, de 153pb, gerado pela perda do sítio de restrição de um dos alelos. O gel de poliacrilamida é mais indicado para a separação de fragmentos menores de DNA, permitindo uma análise mais segura dos padrões de restrição de cada caso.

A imagem do gel foi capturada em câmera digital e transferida para o computador para posterior documentação dos resultados.

MUTAÇÃO G → A NO EXON 10 DO GENE DO FATOR V (FV LEIDEN)

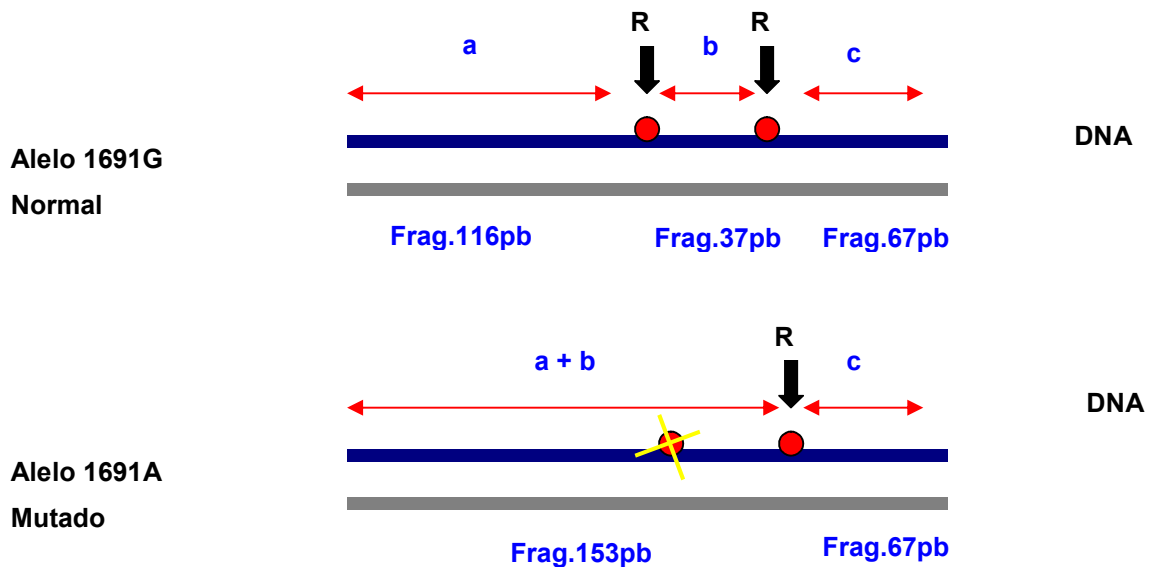


Figura 4. Esquema ilustrando a perda do sítio de restrição da enzima *MnlI* em consequência da mutação de ponto do fator V Leiden.

● Sítio de Restrição da *MnlI*

R Enzima de Restrição *MnlI*

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

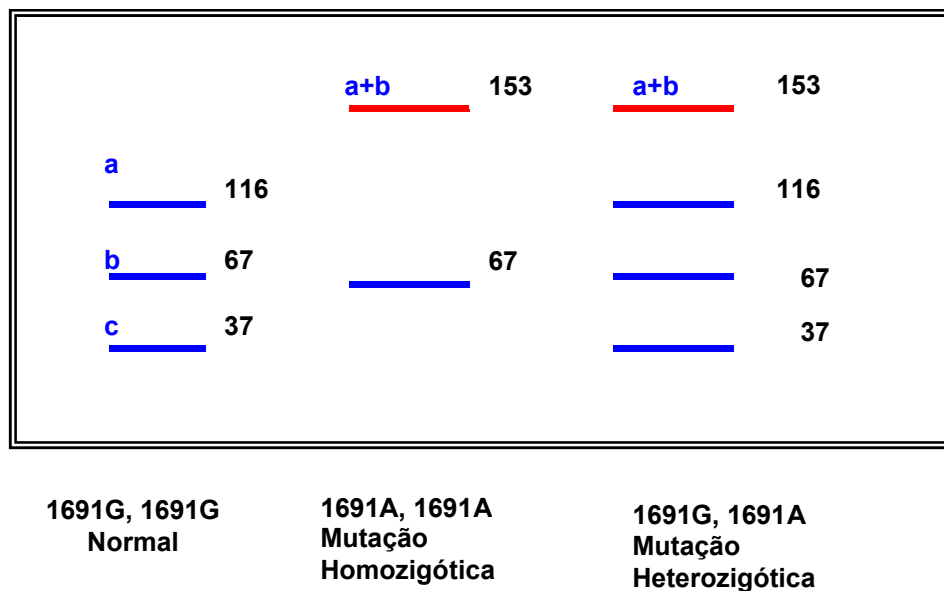


Figura 5. Ilustração esquemática do resultado gerado da digestão do fragmento de 220pb PCR, pela enzima de restrição *MnlI*.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Dados epidemiológicos

Dos pacientes trombofílicos estudados, a presença da mutação no gene do fator V (fator V Leiden) foi encontrada em 9 de 100 (9%) e no grupo controle em 3 de 110 (2,7%), Tabela 2-Figuras 6 e 7.

Tabela 2 - Detecção do fator V Leiden em pacientes trombofílicos e população controle

FATOR V LEIDEN	Pacientes Trombofílicos	Grupo Controle
	N° (%)	N° (%)
Presença	09 (9,0)	03 (2,7)
Ausência	91 (91,0)	107 (97,3)
Total	100 (100)	110 (100)

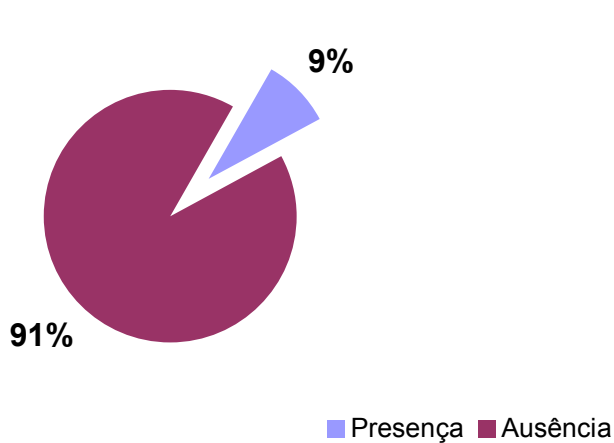


Figura 6 - Presença da mutação em pacientes trombofílicos

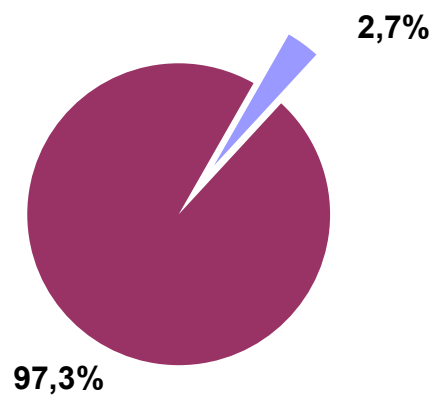


Figura 7 - Presença da mutação no grupo controle

Observou-se que quanto ao sexo, em 100 pacientes trombofílicos estudados, 77% eram do sexo feminino e 23% do sexo masculino. Nestes pacientes, a mutação apresentou-se apenas no seu estado heterozigótico, 7 de 9 (77,8%) eram do sexo feminino e 2 de 9 (22,2%) do sexo masculino. No grupo controle, 68 de 110 (61,8%) eram do sexo feminino e 42 de 110 (38,2%) eram do sexo masculino. Neste grupo, a mutação também ocorreu apenas no estado heterozigótico acometendo 100% do sexo feminino (Tabela 3-Figuras 8 e 9).

Tabela 3 - Distribuição da presença da mutação em pacientes trombofílicos e grupo controle portadores do fator V Leiden em relação ao sexo

SEXO	Pacientes Trombofílicos		Grupo Controle	
	Com mutação (%)	Sem mutação (%)	Com mutação (%)	Sem mutação (%)
Masculino	02 (22,2)	21 (23,1)	-	42 (39,3)
Feminino	07 (77,8)	70 (76,9)	03 (100)	65 (60,7)
Total	09 (100)	91 (100)	03 (100)	107 (100)

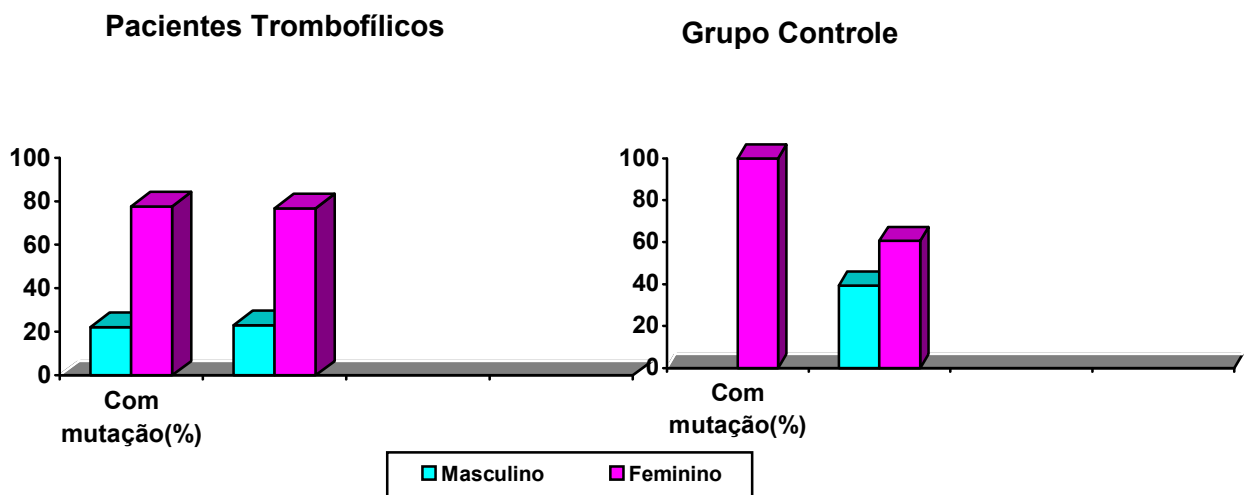


Figura 8 - Distribuição da mutação em pacientes trombofílicos

Figura 9 - Distribuição da mutação no grupo controle

A cor predominante entre os pacientes trombofílicos estudados foi a parda, representando 59% (59/100), seguida pela cor branca com 37% (37/100). Em 66,7% (06/09) dos pacientes trombofílicos portadores da mutação foi observada a cor parda e em 33,3% (03/09), a cor branca. Houve também predomínio da cor parda no grupo controle, representando 69,1% (76/110). A cor branca representou neste grupo, 27,3% (30/110). O predomínio da cor parda no grupo controle portador da mutação foi de 100% (Tabela 4-Figura 10 e 11).

Tabela 4 - Distribuição da presença da mutação em pacientes trombofílicos e grupo controle portadores do fator V Leiden em relação a cor

COR	Pacientes Trombofílicos		Grupo Controle	
	Com mutação (%)	Sem mutação (%)	Com mutação (%)	Sem mutação (%)
Parda	06 (66,7)	53 (58,2)	03 (100)	73 (68,2)
Branca	03 (33,3)	34 (37,4)	-	30 (28,1)
Negra	-	04 (4,4)	-	04 (3,7)
Total	09 (100)	91 (100)	03 (100)	107 (100)

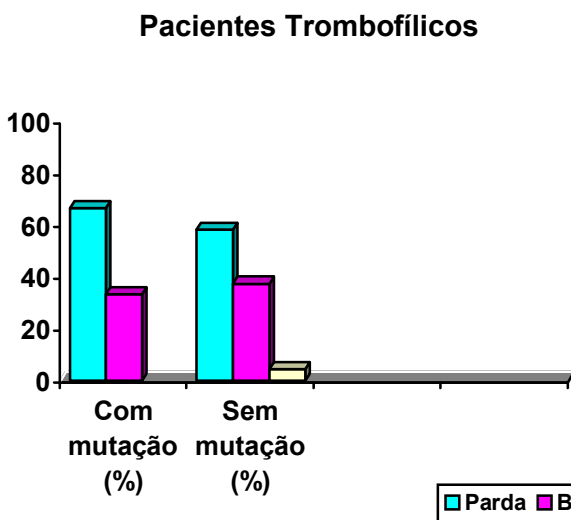


Figura 10 - Distribuição da mutação em pacientes trombofílicos em relação à cor

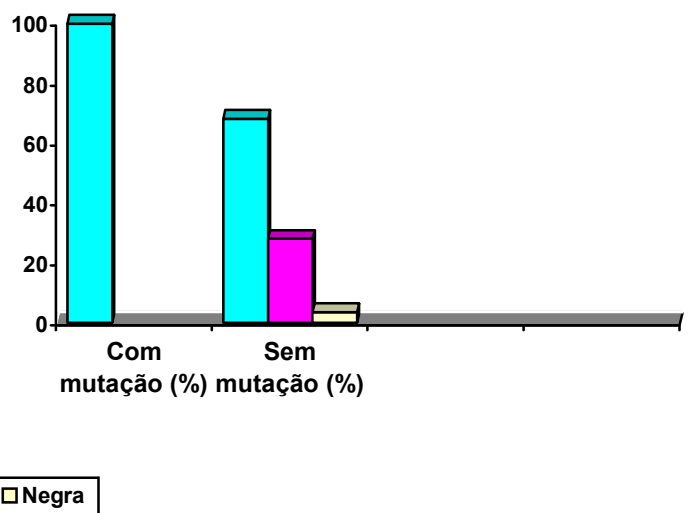


Figura 11 - Distribuição da mutação no grupo controle em relação à cor

A tabela 5 indica a faixa etária dos pacientes em geral. Representa a idade correspondente à época da ocorrência do primeiro evento trombótico. Houve predomínio do evento trombótico de 25,3% (23/91) entre 26 e 33 anos e de 26,4% (24/91) entre 40 e 47 anos de idade nos pacientes trombofilicos não portadores da mutação. Seguida por 19,8% (18/91) entre 33 e 40 anos de idade. A faixa etária, da ocorrência do primeiro evento trombótico, entre os portadores da mutação, predominou entre 26 e 33 anos de idade, representando 33,4% (03/09) dos pacientes. No grupo controle houve predomínio de 30,8% (33/107) entre os não portadores na faixa etária entre 19 e 26 anos. Entre os portadores da mutação no grupo controle, 66,7% (02/03) estão na faixa etária entre 40 e 47 anos de idade. Dados mostrados na tabela 5-Figuras 12 e 13.

Tabela 5 - Distribuição da presença da mutação em pacientes trombofilicos e grupo controle portadores do fator V Leiden em relação a faixa etária

IDADE	Pacientes Trombofilicos		Grupo Controle	
	Com mutação (%)	Sem mutação (%)	Com mutação (%)	Sem mutação (%)
12 19	02 (22,2)	12 (13,1)	-	07 (6,5)
19 26	02 (22,2)	14 (15,4)	01 (33,3)	33 (30,8)
26 33	03 (33,4)	23 (25,3)	-	23 (21,5)
33 40	02 (22,2)	18 (19,8)	-	21 (19,7)
40 47	-	24 (26,4)	02 (66,7)	23 (21,5)
Total	09 (100)	91 (100)	03 (100)	107 (100)

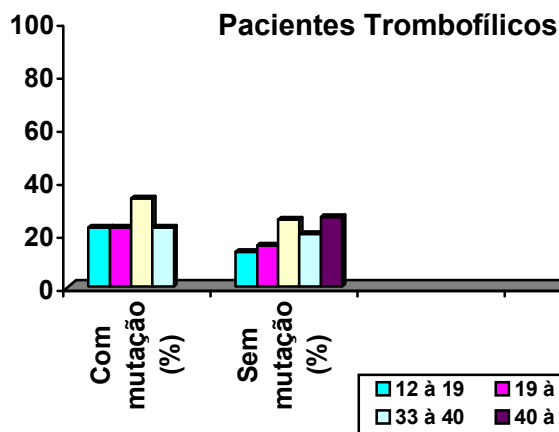


Figura 12 - Distribuição da mutação em pacientes trombofilicos em relação à faixa etária

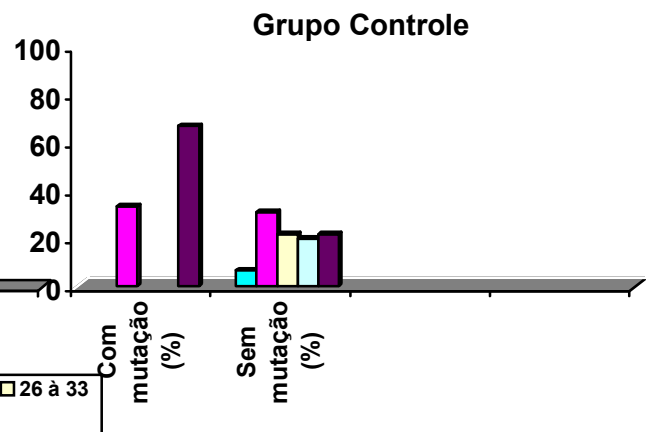


Figura 13 - Distribuição da mutação no grupo controle em relação à faixa etária

3.2 Eventos trombóticos

Os diferentes tipos de eventos trombóticos sofridos pelos pacientes estudados, estão apresentados na tabela 6-Figura 14. Houve predomínio de trombose venosa profunda (TVP), em 77% dos pacientes, seguido da doença vascular cerebral isquêmica (AVC) em 14%. Houve embolia pulmonar (TEP) em 2% dos pacientes e trombose arterial (TA) em 2% dos pacientes. Além destes casos, a associação entre trombose venosa profunda e doença cerebral vascular isquêmica ocorreu em 1% dos pacientes, a associação com embolia pulmonar em 3% dos pacientes e com trombose arterial em 1%. Nos pacientes portadores da mutação 88,9% (08/09) sofreram trombose venosa profunda e 11,1% (01/09) trombose arterial.

Tabela 6 - Distribuição da presença da mutação em relação ao tipo de evento trombótico

DIAGNÓSTICO	Pacientes Trombofílicos		
	Com Mutação(%)	Sem Mutação(%)	Total(%)
TVP (Trombose Venosa Profunda)	08(88,9)	69(75,8)	77
AVC (Acidente Vascular Cerebral Isquêmico)	-	14(15,4)	14
TEP (Tromboembolia Pulmonar)	-	02(2,2)	02
TA (Trombose Arterial)	01(11,1)	01(1,1)	02
TVP/TEP	-	03(3,3)	03
TVP/TA	-	01(1,1)	01
TVP/AVC	-	01(1,1)	01
Total	09(100)	91(100)	100



Figura 14 - Distribuição da mutação em relação ao tipo de evento trombotico

3.3 Recorrência de eventos tromboticos

Em portadores do fator V Leiden houve recorrência somente em pacientes com trombose venosa profunda (TVP). Do total de pacientes com TVP, 23,4% (18/77) apresentaram recorrência. Em portadores da mutação 22,2% (02/09) sofreram recorrência de TVP, enquanto 77,8% (07/09) apresentaram um único evento. Em pacientes não portadores da mutação, 23,5% (16/68) sofreram recorrência (Tabela 7-Figura 15).

Tabela 7- Distribuição de pacientes trombofílicos portadores da mutação, segundo a recorrência de trombose venosa profunda

RECORRÊNCIA DE TVP	Pacientes Trombofílicos		
	Total de pacientes(%)	Com Mutação(%)	Sem Mutação(%)
Sim	18(23,4)	02(22,2)	16(23,5)
Não	59(76,6)	07(77,8)	52(76,5)
TOTAL	77(100)	09(100)	68(100)

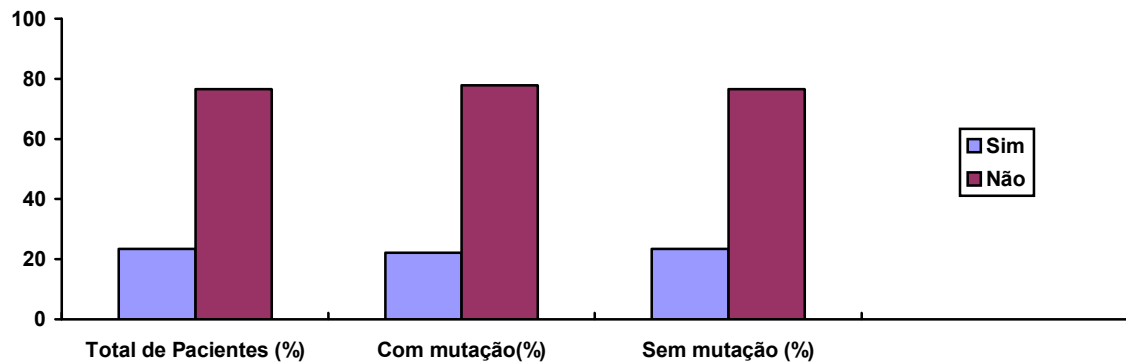


Figura 15-Distribuição de pacientes trombofilicos em relação a recorrência de trombose venosa profunda

3.4 Eventos Trombóticos x Uso de Contraceptivo Oral (CO)

O uso de contraceptivos orais está bastante relacionado a eventos trombóticos. Do total de 77 mulheres que sofreram eventos trombóticos, 50,6% (39/77) fizeram uso de contraceptivo oral. Dos portadores da mutação, 71,4% (05/07) fizeram uso de contraceptivo oral. No grupo controle, do total de 68 mulheres estudadas, 47,8% (33/68) usaram contraceptivos orais. Dos portadores deste grupo, 33,3% (01/03) com uso de contraceptivo. (Tabela 8-Figura 16 e 17).

Tabela 8 - Distribuição de pacientes trombofilicos e grupo controle em relação ao uso de contraceptivo oral (CO)

USO DE CO	Pacientes Trombofilicos			Grupo Controle		
	Total (%)	Com Mutação(%)	Sem Mutação (%)	Total (%)	Com Mutação(%)	Sem Mutação (%)
Sim	39(50,6)	05(71,4)	34(48,6)	33(47,8)	01(33,3)	32(49,2)
Não	38(49,4)	02(28,6)	36(51,4)	35(52,2)	02(66,4)	33(50,8)
Total	77(100)	07(100)	70(100)	68(100)	03(100)	65(100)

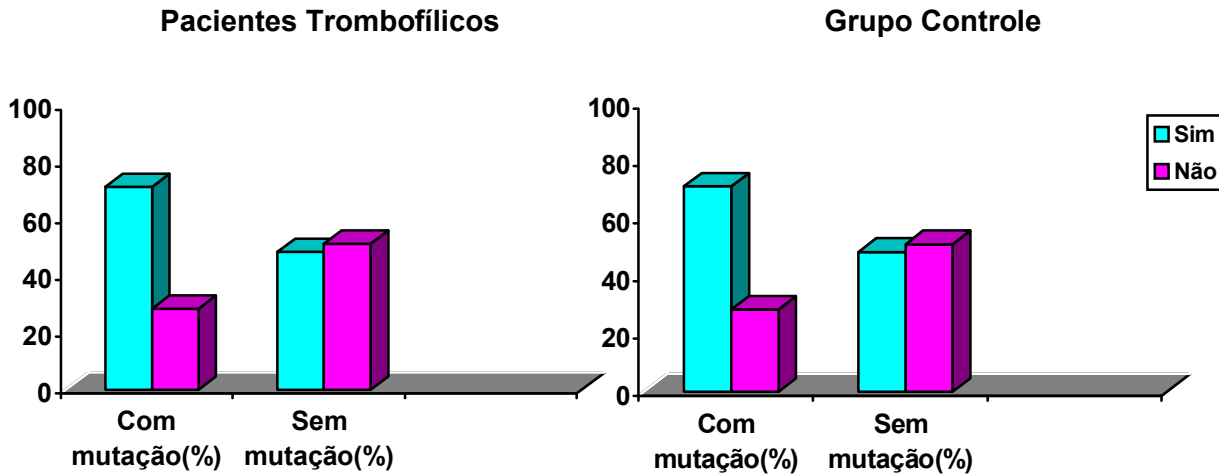


Figura 16 - Distribuição de pacientes trombofilicos em relação ao uso de contraceptivo oral

Figura 17 - Distribuição do grupo controle em relação ao uso de contraceptivo oral

3.5 Eventos Trombóticos x Aborto

Das mulheres trombofilicas analisadas, 36,4% (28/77) sofreram aborto, dentre estas não havia portadoras do fator V Leiden. No grupo controle, sofreram aborto, 20,6%(14/68), destas 66,7%(02/03) eram portadoras da mutação. Tabela 9- Figuras 18 e 19.

Tabela 9 - Distribuição de pacientes trombofilicos e grupo controle em relação à ocorrência de aborto

ABORTO	Pacientes Trombofilicos			Grupo Controle		
	Total (%)	Com Mutação (%)	Sem Mutação (%)	Total (%)	Com Mutação (%)	Sem Mutação (%)
Sim	28(36,4)	-	28(41,2)	14(20,6)	02(66,7)	12(18,5)
Não	49(63,6)	09(100)	40(58,8)	54(79,4)	01(33,3)	53(81,5)
Total	77(100)	09(100)	68(100)	68(100)	03(100)	65(100)

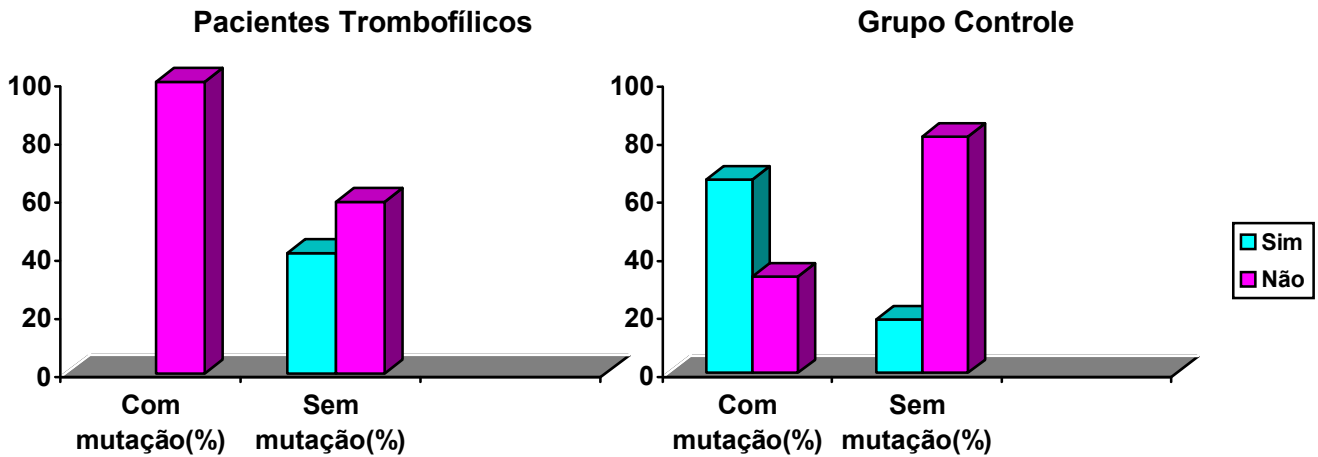


Figura 18 - Distribuição de pacientes trombofílicos em relação à ocorrência de aborto

Figura 19 - Distribuição do grupo controle em relação à ocorrência de aborto

Na maioria dos pacientes portadores do fator V Leiden, a localização do evento foi nos membros inferiores, representando 88,9% (08/09) dos casos. Um paciente, (11,1%), apresentou localização nas artérias coronárias (infarto do miocárdio) (Tabela 10-Figura 20).

Tabela 10 - Distribuição de pacientes trombofílicos portadores do fator V Leiden em relação à localização do evento trombótico

LOCALIZAÇÃO DO EVENTO TROMBÓTICO	Pacientes Trombofílicos Portadores do Fator V Leiden N° (%)
Membro Inferior	08(88,9)
Artérias Coronárias	01(11,1)
TOTAL	09(100)



Figura 20 - Distribuição de pacientes trombofílicos portadores em relação à localização do evento trombótico

Do total de pacientes portadores, 44,4% (04/09) apresentaram um fator adicional de risco/morbidade associado. Visto no APÊNDICE G, sobre o perfil do portador do fator V Leiden encontrado neste estudo.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Em pacientes com tromboembolismo venoso, o fator de risco mais comumente encontrado é o fator V Leiden. Existem diferenças na frequência desta mutação de acordo com a etnia. Este fato justifica estudos em diferentes populações. O Brasil é caracteristicamente formado por uma população heterogênea. Rezende (1999) relata que, no Brasil, 10% a 20% de pacientes trombofílicos são portadores do fator V Leiden. No estado do Ceará, a frequência da população controle de 2,7% (03/110) mostra-se um pouco superior da encontrada por Arruda *et al.*, 1995 (2%). Entretanto, esta porcentagem pode não ser representativa da população cearense devido ao pequeno número da amostras para um estudo populacional. A frequência do fator V Leiden em pacientes com eventos trombóticos foi de 9% (09/100). Estes dados mostram-se inferiores aos encontrados por Barrach *et al.*, 2000, em pacientes da região de Botucatu (SP) e por Benson *et al.*, 2001, em pacientes norte-americanos, com frequências em torno 12% em ambos os estudos. No estudo realizado por Arruda *et al.*, 1995, com pacientes da região de Campinas foi encontrada uma frequência de 20%, dado semelhante ao encontrado na Alemanha feito por Kroegel *et Reissig*, 2003.

Do total de 100 pacientes trombofílicos analisados para a detecção do fator V Leiden, 77% (77/100) eram do sexo feminino e 23% (23/100) do sexo masculino. Nos pacientes portadores do fator V Leiden, 77,8% (07/19) eram do sexo feminino e 22,2% (02/09) eram do sexo masculino. Um índice também elevado foi encontrado por Barrach *et al.*, 2000, que mostra uma prevalência de 67% no sexo feminino portador da mutação e por Rosenstingl *et al.*, 2002, em que havia 73,4% do sexo feminino. Essas frequências superiores, em pacientes trombofílicos do sexo feminino, são justificadas por alguns autores, pelos fatores de risco aumentados com o uso de contraceptivos orais, alterações nas proteínas do sistema anticoagulante em gestantes, além da terapia de reposição hormonal na menopausa (Vandenbroucke *et al.*, 1994; Rintelen *et al.*, 1996; Kupferminc *et al.*, 1999; Pampus *et al.*, 2001; Peverill, 2003). Entretanto, a relação entre os sexos pode modificar dependendo da idade da população, onde quanto maior a idade, menor será a diferença, Oger *et al.*, 2002. Pacientes com idade abaixo de 45 anos, como

selecionados neste estudo, a exposição a fatores de risco adquiridos aumenta (veja Tabela 1, pág. 24).

A cor predominante dos pacientes estudados foi parda com 59% (59/100), seguida pela cor branca com 37% (37/100). Nos pacientes portadores da mutação, houve predomínio da cor parda em 66,7% (06/09), seguida pela cor branca presente em 33,3% (03/09). Este predomínio é devido a grande miscigenação existente no estado do Ceará. Assim, a cor parda, resultante principalmente da miscigenação entre brancos e negros ou de brancos e índios, mostra a possibilidade de se encontrar características genóticas da raça branca nestes indivíduos, como no caso do fator V Leiden, cuja mutação é comumente encontrada em populações de origem caucasiana (Dalbäck, Zöller *et Hillarp*, 1996).

Quanto ao primeiro evento trombótico a faixa etária predominante foi entre 26 e 33 anos de idade, representando 25,3% (23/91) e a faixa etária entre 40 e 47 anos com 26,4% (24/91) para os pacientes de ambos os sexos. Entre os pacientes portadores do fator V Leiden, houve predomínio na faixa etária de 26 e 33 anos, representado por 33,4% (03/09) para ambos os sexos. Apesar da faixa etária do evento trombótico ser a mesma para a maioria da população mutada, a presença da mutação e a ocorrência de eventos trombóticos em idades jovens é bem estabelecido. Rosendaal *et al.*, 1995 relata que a idade média em pacientes portadores homozigotos de terem seu primeiro evento trombótico é de 31 anos, em heterozigotos a idade média é de 44 anos e naqueles em que a mutação é ausente é de 46 anos. Barrach *et al.*, 2000 encontrou em seu estudo 83% dos portadores da mutação entre as idades de 21 a 40 anos. No estudo de Rosenstingl *et al.*, 2002, a idade média na época do evento trombótico foi de 37,7 anos.

A associação entre o fator V Leiden e a trombose venosa está bem estabelecida. Há também, citações sobre a associação com o aumento do risco de infarto do miocárdio (trombose arterial, comprometendo as artérias coronárias), com seu maior efeito em mulheres jovens e em fumantes (Gerhardt *et al.*, 2000; Selligson & Zivelin, 1998; Prohaska *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 1994). Outra associação é com a trombose vascular cerebral (Rosenstingl *et al.*, 2002; Rosenberg & Aird, 1999; Zuber *et al.*, 1995).

Neste estudo, os pacientes apresentaram diferentes tipos de eventos trombóticos, 77% (77/100) sofreram trombose venosa profunda (TVP), 14% (14/100) doença vascular cerebral isquêmica e 2% (2/100) com trombose arterial e embolia pulmonar em 2%. Em pacientes portadores da mutação, os tipos de eventos encontrados foram a trombose venosa profunda [88,9% (08/09)] e a trombose arterial [11,1% (01/09)]. Apesar de descrito na literatura, não foi encontrado o fator V Leiden associado à doença vascular cerebral. O maior encontro de TVP nestes pacientes analisados está de acordo com a literatura, onde Simioni *et al.*, 2002, Robertorye & Rodgers, 2001 mostraram uma prevalência de 67% e 70%, respectivamente, em pacientes com tromboembolismo venoso portadores do fator V Leiden.

A recorrência está também associada ao fator V Leiden (Ridker *et al.* 1995; Simioni *et al.*, 1997). Em pacientes com trombose venosa, a incidência de recorrência da doença encontrada foi de 23,4% (Prandoni *et al.*, 1996). Dentre os portadores do fator V Leiden 22,2% (02/09) apresentaram recorrência.

A freqüência de recorrência encontrada neste estudo foi mais alta que o relatado por Simioni *et al.*, 1997 (18,3%), e inferior à encontrada nos portadores da mutação (23,4% vs 39,7%). Entretanto, a freqüência de recorrência em portadores relatada por Rintelen *et al.*, 1996, foi de 9,5% em pacientes portadores homozigotos, por paciente por ano, não sendo relatada diferença do grupo controle para portadores em heterozigose. No estudo aqui apresentado não foram encontrados portadores homozigotos. Apesar dos dados contraditórios da literatura, a recorrência representou um índice indicativo da presença de mutação, mesmo sendo os portadores heterozigotos.

O uso de contraceptivos orais aumenta significativamente o risco da ocorrência de eventos trombóticos em mulheres com trombofilia hereditária. Há relatos que o uso de contraceptivo oral pode estimular o sistema procoagulante, inibir o sistema anticoagulante e estimular a fibrinólise (Lindqvist *et al.*, 2002; Bloemenkamp *et al.*, 1998).

Do total de mulheres com doença trombótica analisadas, 50,6% (39/77) fizeram uso de contraceptivo oral. Nas mulheres trombofílicas portadoras do fator V Leiden, 71,4% (05/09), fizeram uso de contraceptivo oral.

Bloemenkamp *et al.*, 1998, relata sobre a interação do fator V Leiden e o uso de contraceptivos orais. Em mulheres que não fizeram uso de contraceptivos, o fator V Leiden aumentou em 7x o risco de trombose, por outro lado, a combinação do uso de contraceptivo e a presença da mutação aumentou o risco em 30x a 50x.

A ocorrência de aborto é também um dos fatores associados à mutação do fator V Leiden (Facchinetti *et al.*, 2003; Rades *et al.*, 2003; Many *et al.*, 2001). O fator V Leiden foi encontrado em 25% em mulheres com perda na gravidez quando comparado a 7,6 em mulheres com gravidez normal (Sarig *et al.*, 2002). Neste estudo a presença de pacientes com relato de aborto foi de 36,4% (28/77) dos casos. Do total de portadoras do fator V Leiden, nenhuma paciente teve relato de aborto.

Neste estudo, a diferença entre pacientes trombofílicos e população controle não foi estatisticamente significativa ($p=0,19$), mas o risco estimado para o evento trombótico foi de 2,46. Cabe a sugestão de aumentar tanto o número de pacientes estudados quanto o número da população controle. A avaliação de pacientes trombofílicos em relação ao fator V Leiden na prevenção de futura recorrência é muito importante, pois, além da melhoria da conduta terapêutica e diagnóstica, tem grande valia na prevenção familiar.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

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

- 1- O fator V Leiden contribuiu em 9 % dos casos estudados. A diferença entre pacientes trombofílicos e população controle não foi estatisticamente significativa ($p=0,19$), mas o risco estimado para o evento trombótico foi de 2,46;
- 2- A faixa etária predominante da população portadora foi de 26-33 anos (33,4%), sendo a população feminina a mais freqüente. Contrariamente aos dados literários a cor parda foi a mais associada, indicando que na miscigenação entre brancos e índios como ditos na população cearense, perpetuam características genotípicas da raça branca;
- 3- A Trombose Venosa Profunda foi o evento predominante, como já descrito na literatura, mas a associação com a trombose arterial, controversa na literatura, suscita a que mais estudos sejam feitos envolvendo esta associação;
- 4- A presença de recorrência de eventos trombóticos, apesar de não ser em freqüência elevada, pode ser considerada um indicativo da presença da mutação;
- 5- O fator de risco associado ao fator V Leiden predominante foi o uso de contraceptivo oral, presente em 71,4% das portadoras;
- 6- A grande heterogeneidade da população brasileira pode ser observada nas diferentes freqüências do fator V Leiden, encontradas inter e intra-regiões do país, tanto da população controle quanto na de estudo, reforçando a necessidade de estudos associados a eventos trombóticos e populacionais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABOUD, M. R. Case report. Increased incidence of venous thrombosis in patients with shortened activated partial thromboplastin times and low ratios for activated protein C resistance. **Clin. Lab. Haem.** v. 23, p. 411-416, 2001.

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

AIACH, M.; ALHENC-GELAS, M. Choix raisonné des examens biologiques dans la pathologie thrombotique. **Gynécol Obstét Fertil.** v. 30. p. 611-5, 2002.

ALMAWI, W. Y. Prevalence of two thrombophilia predisposing mutations: factor V G1691A (R506Q; Leiden) and prthrombin G20210A, among health leanese. **Thromb. Haemost.** v. 88, p. 691-2, 2002.

ARNALDI, L. A. T.; PRETTI, F. A.; ZAMPIERI, J. P.; RAMOS, C. F.; ARRUDA, V. R.; ANNICHINO-BIZZACCI, J.M. Antithrombin deficiency in brazilian patients with venous thrombosis. Molecular characterization of a single splice site mutation, an insertion and a de novo point mutation. **Thrombosis Research.** v. 104, p. 397-403, 2001.

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.** v. 49, p. 242-243, 1995.

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

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.** v. 78, p. 332-335, 1998a.

ARRUDA, V. R.; SIQUEIRA, 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.** v. 37, n. 1, p. 42-45, 1998b.

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**. v. 19, p. 84-87, 1999.

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.

BARRACH, F.H; PARDINI, M.I.M.C.; SALES, M.M.; MAFFEI, F.H.A.; MACHADO, P.E.A. Detecção de mutação no gene do fator V (Fator V Leiden) em pacientes com trombose venosa. **Jornal Brasileiro de Patologia**., v. 37, n. 2, p. 88-92, 2001.

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

BENSON, J. M.; ELLINGSEN, D.; EL-JAMIL, M.; JENKINS, M.; MILLER, C. H.; DILLEY, A.; EVATT, B. L.; HOOPER, W. C. Factor V Leiden and factor V R2 allele: High-throughput analysis and association with venous thrombophilism. **Thromb. Haemost.** v. 86, p. 1188-92, 2001.

BERTINA, R. M.; KOELEMAN, B. P. C.; 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**. v. 369, p. 64-67, 1994.

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.

BLOEMENKAMP, K. W. M.; HELMERHORST, F. M.; ROSENDAAL, F. R.; VANDENBROUCKE, J. P. Thrombophilias and gynaecology. **Best Practice & Research Clin. Obstetr. & Gynaecol.** v.17, n. 3, p. 509-528, 2003.

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.

BOSSONE, A.; CAPPUCI, F.; D'ANDREA, G.; BRANCACCIO, V.; CIBELLE, G.; IANNACCONE, L.; GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M. The factor V (FV) gene ASP79HIS polymorphism modulates FV plasma levels and affects the activated

protein C resistance phenotype in the presence of the FV Leiden mutation. **Haematologica/journal of hematology**. v. 88, n. 3, p. 286-289, 2003.

BOVEN, H. H.; REITSMA, P. H.; ROSENDAAL, F. R.; BAYSTON, T. A.; CHOWDHURY, V.; BAUER, K. A.; SHARRER, I.; CONARD, J.; LANE, D. A. Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 75, n. 3, p. 417-21, 1996.

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.

CURVERS, J.; THOMASSEN, M. C. L. G. D.; RIMMER, J.; HAMULYAK, K.; VAN DER MEER, J.; TANS, G.; PRESTON, F. E.; ROSING, J. Effects of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test. **Thromb Haemost.** v. 88, p. 5-11, 2002.

DAHLBÄCK, B.; CARLSSON, M.; SVENSSON, P. J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 90, p. 1004-1008, 1993.

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. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. **Blood**. v. 85, n. 3, p. 607-614, 1995a.

DAHLBÄCK, B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg⁵⁰⁶ to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 74, n. 1, p. 139-148, 1995b.

DAHLBÄCK, B. Molecular genetics of venous thromboembolism. **Annals of Medicine**. v. 27, p. 187-192, 1995c.

DAHLBÄCK, B.; ZÖLLER, B.; HILLARP, A. Inherited resistance to activated protein C caused by presence of the FV:Q⁵⁰⁶ allele as a basis of venous thrombosis. **Haemostasis**. v. 26, suppl. 4, p. 301-314, 1996.

DAHLBÄCK, B. Activated protein resistance and thrombosis: Molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 25, n. 3, p. 273-289, 1999.

DARGAUD, Y.; TRZECIAK, M. C.; MEUNIER, S.; ANAGEI, C.; PELLECHIA, D.; NÉGRIER, C.; VINCIGUERRA, C. Two novel factor V null mutations associated with activated protein C resistance phenotype/genotype discrepancy. **British Journal of Haematology**. v. 123, p. 342-345, 2003.

ENGBERSEN, A. M. T.; FRANKEN, D. G.; BOERS, G. H. J.; STEVENS, E. M. B.; TRIJBELLS, F. J. M.; BLOM, H. J. Thermolabile 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. **Am. J. Hum. Genet.** v. 56, p. 142-150, 1995.

FACCINETTI, F.; MAROZIO, L.; GRANDONE, E.; PIZZI, C.; VOLPE, A.; CHIARA, B. Thrombophilic mutations are a main risk factor for placental abruption. **Haematologica/J. Hematology**. v. 88, n. 07, p. 785-788, 2003.

FOLSOM, A.R.; CUSHMAN, M.; TSAI, M.Y.; ALEKSIC, N.; HECKBERT, S.R.; BOLAND, L.L.; TSAI, A.W.; YANEZ, D.; ROSAMOND, W.D. A prospective study of venous thromboembolism in relation factor V Leiden and related factors. **Blood**.v. 99, n. 8, p. 2720-2725, 2002.

FRANCO, R. F.; TRIP, M. D.; CATE, H. T.; VAN DEN ENDE, A.; PRINS, M. H.; KASTELEIN, J. J. P.; REITSMA, P. H. The 20210G→A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. **British Journal of Haematology**. v. 104, p. 50-54, 1999.

FRENKEL, E.P.; BICK, R. L. Prothrombin G20210A gene mutation, heparin cofactor II defects, primary (essential) thrombocythemia, and thrombohemorrhagic manifestations. **Semin. Thromb. Haemost.** v. 25, p. 375-386, 1999.

GALE, A.J.; XU, X.; PELLEQUER, J. L.; GETZOFF, E. D.; GRIFFIN, J. H. Interdomain engineered disulfide bond permitting elucidation of mechanisms of inactivation of coagulation factor Va by activated protein C. **Protein Science**. v 11, p. 2091-2101, 2002.

GERHARDT, A. SCHARF, R. E.; BECKMANN, M. W.; STUVE, S.; BENDER, H. G.; PILLNY, M.; SANDMANN, W.; ZOTZ, R. B. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. **N. Engl. J. Med.** v. 342, p. 374-380, 2000.

GIUDICELLI, Y. Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G20210a mutation prevalence in a healthy moroccan. **Thromb. Haemost.** v. 88, p. 1073-4, 2002.

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

GRIFFIN, J. H.; HEEB, M. J.; KOJIMA, Y; FERNÁNDEZ, J. A.; KOJIMA, K.; HACKENG, T. M.; GREENGARD, J. Activated protein C resistance: molecular mechanism. **Thrombosis and Haemostasis.** v. 74, n. 1, p. 444-448, 1995.

HILLARP, A.; DAHLBÄCK, B.; ZÖLLER, B. Activated protein C resistance: from phenotype to genotype and clinical practice. **Blood Reviews.** v. 9, p. 201-212, 1995.

HOLM, J.; ZOLLER, B.; SVENSSON, P.; BERNTORP, E.; ERHARDT, L.; DAHLBÄCK, B. Myocardial infarction associated with homozygous resistance to activated protein C. **Lancet.** v. 344, p. 952-3, 1994.

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

KEMKES-MATTHES, B.; NEES, M.; KÜHNEL, G. MATZDORFF, A.; MATTHES, K. J. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in a factor V Leiden patients. **Thrombosis Research.** v. 106, p. 183-185, 2002.

KROEGEL, C.; REISSIG, A. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: Epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. **Respiration.** v. 70, p. 7-30, 2003.

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.

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.

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 2. **Thrombosis and Haemostasis.**, v. 76, n. 6, p. 824-34, 1996b.

LEE, R. V. Thromboembolic disease and pregnancy: are all women equal? [Editorial]. **Ann. Intern. Med.** v.125, p. 1001-3, 1996.

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.

LOCKWOOD, C. J. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. **Obstetrics & Gynecology**. v. 99, n. 2, p. 333-341, 2002.

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

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.** v. 338, p. 1793-7, 1998.

MANY, A.; SCHREIBER, L.; ROSNER, S.; LESSING, J. B.; ELDOR, A.; KUPFERMINC, M.J. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. **Obstetrics & Gynecology**. v. 98, n. 6, p. 1041-1044, 2001.

NICOLAES, G.A.F.; DAHLBÄCK, B. Factor V and thrombotic disease. Description of a janus-faced protein. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 22, p. 530-538, 2002.

NORSTRØM, E.; THORELLI, E.; DAHLBÄCK, B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. **Blood**. v. 100, n. 2, p. 524-530, 2002.

NORSTROM, E.; THORELLI E.; DAHLBÄCK B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. **Blood**. v. 100, p. 524-530, 2002.

NOWAK-GÖTTL, U.; STRÄTER, R.; HEINECKE, A.; JUNKER, R.; KOCH, H. G.; SCHUIERER, G.; VON ECKARDSTEIN, A. Lipoprotein(a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. **Blood**. v. 94, n. 11, p. 3678-3682, 1999.

OGER, E.; LACUT, K.; LE GAL, G.; van DREDEN, P.; BRESSOLLETE, L.; SCARABIN, P. Y.; LEROYER, C.; MOTTIER, D. Is a resistance a risk factor for thromboembolism in patients over 70 years? **Thromb. Haemost.** v. 88, p. 587-91, 2002.

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.

PERRY, D. J. Hyperhomocysteinaemia. **Baillière's Clinical Haematology**. v. 12, n. 3, p. 451-477, 1999.

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

PIOPED Investigators: Value of the ventilation/ perfusion scan in acute pulmonary embolism: Results of the prospective investigation of pulmonary embolism (PIOPED). **JAMA**. v. 263, p. 2753-2759, 1990.

PRANDONI, P.; LESSING, A. W.; COGO, A.; CUPPINI, S.; VILLATA, S.; CARTA, M. The long term clinical course of acute deep venous thrombosis. **Ann. Intern. Med.** v. 125, p. 1-7, 1996.

PRAYOONWIWAT, W.; ARNUTTI, P.; NATHALANG, O.; SUWANASOPHON, C.; VIPUTTIGUL, K. Mutations at the activated protein C cleavage sites Arg562 of factor VIII in Thai patients with venous thrombosis. **Southeast Asian J. trop. Med. Public Health**. v. 32, n. 4, p. 880-883, 2001.

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.

PROHASKA, W.; MANNEBACH, H.; SCHMIDT, M.; GLEICHMANN, U.; KLEESIEK, K. Evidence against heterozygous coagulation factor V 1691 G→A mutation with resistance to activated protein C being a risk factor for coronary artery disease and myocardial infarction. **J. Mol. Med.** v. 73, p. 521-4, 1995.

RADES, E.; BARROS, V. V.; FORTUNATO, L.; ZUGAIB, M. Trombofilias e mau passado obstétrico. **Femina**. v. 31, n. 1, p. 41-43, 2003.

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

RIDKER, P. M.; HENNEKENS, C. H.; LINDPAINNER, K.; STAMPFER, M. J.; EISENBERG, P. R.; MILETICH, J. P. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. **N. Engl. J. Med.** v. 332, p. 912-7, 1995.

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.

ROBERTORYE, R. S.; RODGERS, G. M. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. **American Journal of Haematology.** v. 68, p. 256-268, 2001.

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, F. R.; KOSTER, T.; VANDENBROUCKE, J. P.; REITSMA, P. H. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood.** v. 85, p. 1504-8, 1995.

ROSENSTINGL, S.; RUIVARD, M.; MELON, E.; SCHAEFFER, A.; GOUAULT-HEILMANN. Thrombophlébite cérébral: étude rétrospective de vingt-sept cas. **La revue de médecine interne.** v. 23, p. 973-982, 2002.

RYAN, D.H.; CROWTHER, M.A.; GINSBERG, J.S.; FRANCIS, C.W. Relation of factor V Leiden genotype to risk for acute deep venous thrombosis after joint replacement surgery. **Ann. Intern. Med.** v. 128, p. 270-276, 1998.

SARIG, G.; YOUNIS, J. S.; HOFFMAN, R.; LANIR, N.; BLUMENFELD, Z.; BRENNER, B. Thrombophilia is a common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. **Fertility and Sterility.** v. 77, n. 2, p. 342-347, 2002.

SCHIFFMAN, F. R. Hemostasia e trombose. **Fisiopatologia Hematológica.** Cap. 6, p. 161, 2004.

SELIGSOHN, U.; ZIVELIN, A. Thrombophilia as a multigenic disorder. **Thrombosis and Hemostasis.** v. 78, n. 1, p. 297-301, 1998.

SIMIONI, P.; PRANDONI, P.; LENSING, A. W.; SCUDELLER, A.; SARDELLA, C.; PRINS, M. H. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg506®Gln mutation in the gene for factor V (factor V Leiden). **N. Engl. J. Med.** v. 336, p. 399-403, 1997.

SIMIONI, P.; TORMENE, D.; PRANDONI, P.; ZERBINATI, P.; GAVASSO, S.; CEFALO, P.; GIROLAMI, A. Incidence of venous thromboembolism in a asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. **Blood.** v. 99, n. 6, p. 1938-1942, 2002.

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.

SOUZA, S. S.; FERRIANI, R. A.; PONTES, A. G.; ZAGO, M. A.; FRANCO, R. F. Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in a patients with recurrent abortion. **Human Reproduction**. v. 14, n. 10, p. 2448-2450, 1999.

STEFANO, V.; CHIUSOLO, P.; PACIARONI, K.; LEONE, G. Epidemiology of factor V Leiden: Clinical implications. **Seminars in thrombosis and hemostasis**. v. 24, n. 4, 1998.

TSAI, A. W.; CUSHMAN, M.; TSAI, M. Y.; HECKBERT, S. R.; ROSAMOND, W. D.; ALEKSIC, N.; YANEZ, N. D.; PSATY, B. M.; FOLSOM, A. R. Serum homocysteine, thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), and venous thromboembolism: longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). **American Journal of Hematology**. v. 72, p. 192-200, 2003.

VAN COTT, E. M.; SODERBERG, B. L.; LAPOSATA, M. Activated protein C resistance, the factor V Leiden mutation, and a laboratory testing algorithm. **Arch Pathol Lab Med**. v. 126, p. 577-582, 2002.

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 carries of factor V Leiden mutation. **Lancet**. v. 344, p. 1453-7, 1994.

YAMAZAKI, T.; NICOLAES, G. A. F.; SORENSEN, K. W.; DAHLBÄCK, B. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated. **Blood**. v. 100, n. 7, p. 2515-2521, 2002.

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.

ZÖLLER, B.; HILLARP, A.; BERNTORP, E.; DAHLBÄCK, B. Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis. **Annu. Rev. Med**. v. 48, p. 45-58, 1997.

ZUBER, M.; TOULON, P.; MAS, J. L. Resistance to activated protein in cerebral thromboembolis: a case control study. **Cerebrovascular Disease**. V. 5, p. 189, 1995.

**APÊNDICE A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (UFC)**



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 258/2001

Fortaleza, 29 de outubro de 2001

Protocolo COMEPE nº 178/01

Pesquisador responsável: Dra. Silvia Helena Barem Rabenrorst

Dept°./Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: "Mutação do fator V-Leiden: Estudo de frequência populacional e detec o em pacientes portadores de fatores de risco para trombose"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de  tica em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolu o n 196 de 10 de outubro de 1996 e Resolu o n  251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de outubro de 2001.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, aparentemente de uma mulher, com o nome "Mara" visivelmente legível.

Dr^a M^o Elisabete Amaral de Moraes
Coordenadora do Comitê de  tica em Pesquisa
COMEPE/HUWCUFC

APÊNDICE B – FICHA DO PACIENTE

PACIENTES COM FATORES DE RISCO PARA TROMBOSE	
Data: ____/____/____	N° _____
Nome: _____	
Prontuário: _____	
Procedência: _____	
Telefone (contato): _____	
Sexo: F ____ M ____ Idade: ____ Cor: _____	
Ascendência Familiar: _____	
Uso de Terapia Estrogênica: Sim ____ Não ____ Já usou _____	
• Contraceptivos _____	
• Reposição _____	
• Quanto tempo _____	
• Quantos _____	
Aborto: Sim ____ Não ____ Quantos _____	
Diagnóstico: _____	
Fatores associados: _____	
História anterior de trombose _____	
Infarto _____	
Outro fator relevante: _____	
Pesquisa por Biologia Molecular, da Mutação para o Fator V Leiden.	
Pesquisa de mutação no exon 10 alelo 1691G/1691A	
Resultado:	

APÊNDICE C - FICHA DO VOLUNTÁRIO

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

APÊNDICE D – TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Instituição: Departamento de Patologia e Medicina Legal

Setor: Genética/ Laboratório de Genética Molecular

Endereço: Rua Monsenhor Furtado S/N. Bairro: Rodolfo Teófilo.

Investigador Responsável: Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Título: Pesquisa de Fatores de Predisposição à Trombofilia”

Protocolo: Amplificação do Exon 10 do Gene do Fator V Seguido de Restrição

Eu, _____ por este meio, fui informado (a), em detalhes, sobre o estudo intitulado - Pesquisa de Fatores de Predisposição à Trombofilia”. Serei um dos participantes deste estudo em diversas instituições.

O estudo em questão pretende associar fatores genéticos de risco que podem levar a fenômenos trombóticos de modo a efetuar medidas preventivas, de forma a obter o máximo de benefícios para o paciente. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária.

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.

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

Se eu tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a este estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar _____, no telefone _____.

Assinatura do paciente:

Data: _____

Endereço e telefone do paciente: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: _____

Assinatura do investigador: _____

APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO

Instituição: Departamento de Patologia e Medicina Legal

Setor: Genética/ Laboratório de Genética Molecular

Endereço: Rua Monsenhor Furtado S/N. Bairro: Rodolfo Teófilo.

Investigador Responsável: Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Título: Pesquisa de Fatores de Predisposição à Trombofilia

Protocolo: Amplificação do Exon 10 do Gene do Fator V Seguido de Restrição

Eu, _____ por este meio, fui informado (a), em detalhes, sobre o estudo intitulado - Pesquisa de Fatores de Predisposição à Trombofilia. Serei um dos participantes deste estudo em diversas instituições.

O estudo em questão pretende associar fatores genéticos de risco que podem levar a fenômenos trombóticos de modo a efetuar medidas preventivas, de forma a obter o máximo de benefícios para o paciente. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária.

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.

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

Se eu tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a este estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar _____, no telefone _____.

Assinatura do Voluntário:

Data: _____

Endereço e telefone do voluntário: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: _____

Assinatura do investigador: _____

APÊNDICE F – MODELO DO RESULTADO DO EXAME DE DETECÇÃO DO FATOR V LEIDEN

Pesquisa, por Biologia Molecular, da Mutação para o Fator V - Leiden
Nome:
Prontuário:
Instituição de origem:
Indicação:
Pesquisa de mutação no exon 10 alelo 1691G/1691 A
Resultado: Ausência de Mutação
 <p>100pb Ladder paciente 100pb Ladder</p> <p>200pb 116pb 100pb</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Ausência do fragmento de 153pb

Universidade Federal do Ceará
Laboratório de Genética Molecular
Depto. de Patologia e Medicina Legal

Silvia Helena Barem Habenhorst (Prf^ª Orientadora)

Eunice Bobô de Carvalho (Mestranda)

APÊNDICE G – PERFIL ENCONTRADO DO PACIENTE TROMBOFÍLICO PORTADOR DO FATOR V LEIDEN

<i>Sexo</i>	<i>Cor</i>	<i>Idade</i>	<i>Tipo de Evento</i>	<i>Local</i>	<i>Uso de CO</i>	<i>Fator de Risco Associado/Morbidade</i>
Feminino	Branca	12	TVP	MI	Não	Suspeita de Síndrome de Turner
Feminino	Branca	18	TVP	MI	Sim	-
Feminino	Parda	23	TVP	MI	Sim	-
Feminino	Branca	25	TVP (02 eventos)	MI	Não	-
Feminino	Parda	27	TVP	MI	Sim	-
Masculino	Parda	30	TA	Artérias Coronárias	-	Tabagismo (5-10 cigarros/dia)
Feminino	Parda	32	TVP (02 eventos)	MI	Sim	-
Feminino	Parda	36	TVP	MI	Sim	Obesidade, Diabete hipertensão, tabagismo
Masculino	Parda	37	TVP	MI	-	Síndrome nefrótica