

Artigo / Article

Frequência do fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil

Frequency of factor V Leiden in individuals under thrombophilia investigation, Recife, Pernambuco, Brazil

Catarina P. S. Ramos¹

Júlia F. Campos¹

Fárida C. B. C. Melo¹

Washington B. das Neves¹

Maria E. dos Santos²

Fátima A. Araújo³

Raul A. M. Melo¹

As trombozes são eventos de etiopatogênese multifatorial resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais, constituindo na atualidade uma das causas mais comuns de morbimortalidade. Uma mutação de ponto no fator V da coagulação, o fator V Leiden (FVL), constitui o defeito genético mais comum associado com trombofilia. No Brasil, o estudo deste fator de risco é relativamente recente e se dispõe de poucos dados na literatura especializada. Este trabalho teve como objetivo determinar a frequência da mutação do fator V Leiden em 292 indivíduos sob investigação de trombofilia no Hemocentro de Pernambuco. A técnica molecular utilizada foi a RE/PCR (Enzima de Restrição/Reação em Cadeia da Polimerase), usando primers específicos e a enzima MnlI. A frequência do FVL encontrada foi de 13,3%, sendo 36 heterozigotos e 3 homozigotos. A presença da mutação foi semelhante em indivíduos com idade tanto inferior quanto superior a 45 anos. Os resultados da pesquisa mostraram que a frequência do FVL na população estudada é semelhante à descrita na literatura científica para indivíduos selecionados com tromboembolismo e confirmam a importância do estudo molecular nas diferentes faixas etárias. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006;28(2):131-134.

Palavras-chave: Trombofilia; fator V Leiden; tromboembolismo.

Introdução

O tromboembolismo é uma importante causa de morbimortalidade afetando cerca de uma pessoa a cada mil por ano.^{1,2} A trombofilia decorre da existência de alterações da hemostasia que determinam uma predisposição aumentada, genética ou adquirida, para a ocorrência de tromboembolismo.^{3,4} Múltiplas interações entre fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento do tromboembolismo.^{4,5}

A partir do relato de Dahlbäck, Carlsson e Svensson,⁶ descobriu-se um novo fator de risco para trombose: a resistência à proteína C ativada (RPCA). Em 95% dos casos, a RPCA é causada por uma mutação de ponto no gene do

fator V (FV). O gene do FV está localizado na região q21-25 do cromossomo 1 e contém 25 éxons. O FV é um regulador central da hemostase, cofator essencial para o fator Xa, sintetizado pelos megacariócitos e fígado. Esses fatores formam o complexo protrombinase que, na presença de cálcio e superfície fosfolipídica, converte protrombina em trombina ativa.¹⁵ Durante a coagulação sanguínea normal, a trombina liga-se ao receptor de membrana da célula endotelial, a tromboomodulina, sendo capaz de ativar a proteína C, que, na presença de proteína S, cliva e inativa os fatores VIIIa e Va da coagulação.^{8,9} A transição de G para A no nucleotídeo 1691 no éxon 10 resulta na síntese de uma variante da molécula do fator V (fator V de Leiden, FVR506Q ou FV: Q506) com a substituição de uma arginina por uma guanina na

¹Laboratório de Biologia Molecular – Hemope.

²Laboratório de Hemostasia – Hemope.

³Unidade de Hematologia Clínica – Hemope

Correspondência: Raul Antônio Morais Melo

Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco

Rua Joaquim Nabuco, 171 – Graças

52011-000 – Recife-PE

E-mail: rmelo@elogica.com.br

posição 506 do aminoácido.^{10,11} Esta mutação confere resistência parcial do FVa à proteína C ativada e reduz a degradação do fator VIIIa.^{11,12} No entanto, o FV defeituoso conserva sua atividade pró-coagulante, por não sofrer bloqueio natural da proteína C, o que predispõe à formação de trombos. Os indivíduos portadores do fator V Leiden (FVL) têm uma clara tendência trombótica.^{11,13,14,15} O FVL está presente em cerca de 20% a 50% dos casos de tromboembolismo.¹⁶ Entretanto, cerca de 5% a 10% dos casos de RPCA não apresentam o FVL, caracterizando a resistência adquirida à proteína C ativada, cujos mecanismos ainda não são claros, podendo se manifestar em condições fisiológicas como gravidez, pós-menopausa ou uso de contraceptivos orais.^{10,17,18}

O FVL está presente em 2% a 13% da população caucasiana assintomática, sendo de frequência menor ou praticamente inexistente em indivíduos de raça negra, asiáticos e indígenas americanos.^{7,19,20} O risco relativo de trombose venosa aumenta 3-8 vezes para os portadores heterozigotos e 50-80 vezes para os homozigotos.^{11,13,21} A incidência do tromboembolismo é maior nos indivíduos que, além do FVL, sofrem de deficiências de proteínas C ou S¹⁶ ou outro distúrbio genético ou adquirido para trombose.¹⁴ No Brasil, a frequência encontrada para o FVL tem sido de 20% em pacientes com trombose venosa profunda.²²

O principal objetivo do estudo foi determinar a frequência da mutação do fator V Leiden através do método molecular da RE/PCR (Enzima de Restrição/Reação em Cadeia da Polimerase) em indivíduos sob investigação de trombofilia.

Casuística e Métodos

O estudo foi do tipo série de casos, retrospectivo e prospectivo, realizado no período de julho de 2000 a agosto de 2005. As amostras de sangue periférico foram coletadas, após consentimento informado, de indivíduos de ambos os sexos e de qualquer idade encaminhados para investigação de trombofilia no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemope.

O sangue foi coletado em tubo estéril, tipo *vacutainer*, contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante. O DNA genômico foi extraído mediante técnicas convencionais utilizando-se kits de extração comerciais (Gentra Systems, BioRad, EZ-DNA). A detecção da mutação foi realizada através do método molecular RE/PCR (Enzima de Restrição/Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando *primers* e enzima de restrição específicos. Para a amplificação do éxon 10 do gene do fator V foi preparado um *mix* contendo água Milli Q tratada com DEPC 0,01% - dietil pirocarbonato (Merck); tampão PCR 10x - Tris-HCl, 200 mM, pH 8,4; KCl, 500 mM (Invitrogen); MgCl₂, 50 mM (Invitrogen); deoxinucleotídeos tri-fosfatos (dNTP's) numa concentração de 1,25 mM (Pharmacia Biotech); um

par de *primers* específicos para a mutação (oligonucleotídeos com o comprimento de vinte pares de base de nucleotídeos na concentração de 2,5 mM); Taq DNA polimerase recombinante 500 U, 5 U/μl (Invitrogen) e o DNA genômico de cada indivíduo.

Detecção do fator V Leiden

A amplificação do FVL por PCR foi realizada segundo o método de Saiki et al (1988)²³ utilizando um par de nucleotídeos (Gibco BRL) com o *primer* senso FV1: 5'-TCTCTTGAAGGAAATGCCCCATTA- 3' e *primer* anti-senso FV2: 5'-GGGCTAATAGGACTACTTCTAATC- 3'. A reação envolveu 35 ciclos de incubação com temperaturas de 94°C - 30s, 60°C - 30s e 72°C - 30s em termociclador (BioRad ou Perkin Elmer). Posteriormente, foi realizada a digestão do DNA amplificado utilizando-se uma alíquota de 8 μl da amostra amplificada e 8 μl de tampão de digestão NE Buffer 2 10x (Biolabs), 50 mM NaCl, 10 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol pH 7.9 suplementado com 100 μg/ml de albumina bovina sérica (BSA) contendo 0,2 μl de *MnII* (New England Biolabs) na concentração de 5000 U/ml que foi incubado a 37°C *overnight*. O produto digerido foi separado por eletroforese e analisado em gel de agarose a 3%, marcado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador (Vilber Lourmat) à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados foi realizada após fotodocumentação digital (Vilber Lourmat) e análise das bandas e marcadores. A digestão origina fragmentos de 120 e 42 pares de bases (pb) quando a adenina está presente na posição 1691 (alelo normal) enquanto a substituição pela guanina (alelo mutado) resulta em fragmentos de 162 pb para os portadores homozigotos e fragmentos de 162, 120 e 42 pb para os portadores heterozigotos para a mutação, pois esta determina a perda de um sítio de restrição pela enzima *MnII*.

Análise estatística

Para a criação do banco de dados e análise estatística foi utilizado o programa Epi-Info 6.04 da Organização Mundial de Saúde (OMS). Como recurso estatístico descritivo foram utilizadas tabelas, e, como medida de tendência central, a mediana. Como recurso inferencial foi utilizado o teste do qui-quadrado com o nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos em valores absolutos e relativos.

Resultados

Dos 292 indivíduos analisados para o FVL, 39 (13,3%) foram positivos. Destes, 28 (71,8%) eram do sexo feminino, sendo 25 heterozigotos e 3 homozigotos, e 11 (28,2%) do sexo masculino e heterozigotos. Aplicando-se o teste do qui-quadrado (p<0,05) observou-se que não houve diferença significativa quanto ao gênero e à presença da mutação.

No grupo estudado, a relação feminino-masculino obtida foi de 1,97 para 1, respectivamente, 194 e 98 indivíduos. A mediana das idades foi de 34 anos, com extremos de 1 e 92 anos.

A mediana de idade dos indivíduos com a mutação foi de 30 com extremos de 1 e 64 anos, semelhante aos indivíduos sem a mutação (34 anos). Não houve diferença significativa no número de indivíduos positivos para a mutação do FVL com o limite de idade a 45 anos (Tabela 1).

Tabela 1
Frequência quanto à faixa etária em indivíduos encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemope para detecção da mutação do FVL no período de julho de 2000 a agosto de 2005

Faixa Etária	Fator V de Leiden	
	Nº de indivíduos	Indivíduos positivos
≤ 45 anos	233	30
> 45 anos	59	9
Total	292	39

Fonte: Setor de Arquivo Médico da Fundação Hemope

Discussão

A história e estrutura da população brasileira, formada pela contribuição de um grande número de componentes étnicos, está refletida na diferença de frequência e distribuição regional de muitas doenças hereditárias comuns.⁷ A clientela atendida pelo Hospital Hemope é predominantemente miscigenada, apesar deste aspecto não ter sido analisado neste estudo. Várias mutações têm sido associadas com o aumento ou diminuição do risco para a trombose venosa.²⁵ As diferentes frequências dessas mutações nos grupos étnicos que formam a população brasileira podem ajudar a explicar diferenças na prevalência de doenças trombóticas.⁷

O estudo mostrou frequência de 13,3% para a mutação do FVL. Estes dados são semelhantes à literatura científica para indivíduos com tromboembolismo venoso.^{8,22}

Os dados da literatura sobre presença da mutação e gênero são conflitantes. Bauer e cols¹³ encontraram uma maior frequência da mutação em mulheres. Segundo Kyrle e cols²⁴ há um maior risco de tromboembolismo venoso recorrente nos homens. No presente estudo, não houve diferença significativa quanto ao gênero entre os casos positivos para a mutação.

A mediana das idades dos portadores da mutação do FVL foi de 30 anos, sendo semelhante à literatura científica, que associa a presença de fator de risco genético a eventos trombóticos em pacientes antes dos 45 anos.^{14,25} No entanto, De Stefano e cols¹⁴ recomendam que a pesquisa do FVL não seja seletiva por idade, visto que a exclusão de

indivíduos acima de 45 anos levaria à não identificação de uma significativa parcela de pacientes portadores de trombofilia hereditária. No presente estudo, a ocorrência do fator V Leiden pode ter sido determinante para o surgimento dos quadros trombóticos dos pacientes. Porém, outras condições genéticas ou ambientais também podem estar associadas.

Conclusões

Os resultados da pesquisa mostraram a frequência da mutação do fator V Leiden semelhante à literatura científica para indivíduos selecionados com tromboembolismo.

A presença de fatores de risco genéticos em diferentes faixas etárias é confirmada pela semelhança na ocorrência da mutação do FVL nos indivíduos com idade tanto inferior quanto superior a 45 anos.

Abstract

Thrombosis is a multifactorial disease involving genetic and environmental factors and constitutes one of the most common causes of morbimortality. A point mutation in coagulation factor V – factor V Leiden (FVL), constitutes the most prevalent genetic defect associated with thrombophilias. The study of this risk factor is relatively recent in Brazil and only a few reports have been published to date. The aim of this study was to determine the frequency of FVL in 292 individuals being investigated for thrombophilia at the Pernambuco State Blood Center. The molecular biology technique used was RE/PCR (Restriction Enzyme / Polymerase Chain Reaction), using specific primers and the MnlI enzyme. The frequency of FVL was 13.3% including 36 heterozygous and 3 homozygous individuals. The presence of the mutation was similar among individuals under and over 45 years old. Our findings are similar to results published for selected patients who suffered from thromboembolism and they confirm the importance of molecular testing at different ages. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006;28(2):131-134.

Key words: *Thrombophilia; factor V Leiden; thromboembolism.*

Referências Bibliográficas

1. Mannucci PM. The measurement of multifactorial thrombophilia. *Thromb Haemost* 2002; 88: 1-2.
2. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism - results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET- Study). *Thromb Haemost* 1997;77(3):444-51.
3. Lourenço DM. Trombofilia. In: Pitta GBB, Castro AA, Burihan E, editores. *Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado*. Maceió: Uncisal/Ecmal, 2000.
4. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet North Am Ed* 1999;353:1.167-73.
5. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; 86(1):92-103.

6. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: a prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90 (3):1.004-8.
7. Zago MA, Silva Jr WA, Franco RR. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. *Cienc Cult* 1999;51(3/4):226-34.
8. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica* 2002;87(10):1.095-108.
9. Miles AM, Monga M. Factor V Leiden mutation: the most commonly inherited risk factor for venous thromboembolism. *Cardiovascular Update* 1999;6 (5):141-6.
10. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, *et al*. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
11. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, *et al*. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med Overseas Ed* 1999;341: 801-6.
12. Dahlbäck B. Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. *Sem Thromb Hemost* 1999; 25 (3): 273-89.
13. Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA. Hipercoagulability: too many tests, too much conflicting data. *Hematology* 2002; 353-68.
14. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, D'Orazio A, Cina G, Marchitelli E, *et al*. Different circumstances of the first venous thromboembolism among younger or older heterozygous carriers of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Haematologica* 2003;88 (1):61-6.
15. Yang TL, Cui J, Rehumtulla A, Yang A, Moussalli M, Kaufman RJ, *et al*. The structure and function of murine factor V and its inactivation by protein C. *Blood* 1998; 91:4593-99.
16. Duque FLV, Mello NA. Trombogênese-Trombofilia. *J Vasc Br* 2003; 2 (2): 105-18.
17. Dahlbäck B. Resistance to Activated Protein C caused by the factor V R⁵⁰⁶Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78 (1):483-8.
18. Mira Y, Aznar J, Estelles A, Vaya A, Villa P, Ferrando F. Congenital and acquired thrombotic risk factors in women using oral contraceptives: clinical aspects. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000;6 (3):162-8.
19. Gregg JP, Yamane AJ, Grody WW. Prevalence of the Factor V Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am J Med Gen* 1997;73(3):334 -6.
20. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet North Am Ed* 1995;346:1.133-4.
21. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). *Blood* 1995;85(6):1.504-8.
22. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian Population. *Am J Hematol* 1995;49:242-3.
23. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al*. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;29;239 (4839):487-91.
24. Kyrle PA, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, Eichinger S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med Overseas Ed* 2004;350:2.558-63.
25. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med Overseas Ed* 2001;344 (16):1.222-31.

Avaliação: Editor e dois revisores externos.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 10/02/2006

Aceito após modificações: 20/04/2006

Recursos financeiros: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco – Facepe.