

# ESTUDOS DOS GENES DO FATOR V DE LEIDEN E DA PROTROMBINA EM ACADÊMICOS DO INTERIOR DE SÃO PAULO: UM PERFIL POLIMÓRFICO

*FACTOR V LEIDEN AND THE PROTHROMBIN GENES IN ACADEMICS FROM THE INTERIOR OF SÃO PAULO STATE: A STUDY ON POLYMORPHIC PROFILE*

Aline Terezinha Ruoso FERNANDES<sup>2</sup>; Hugo Gabriel GIROLDO<sup>2</sup>; Camila Andréa de OLIVERIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Hermínio Ometto.

<sup>2</sup>Graduação em Farmácia Centro Universitário Hermínio Ometto.

Autor responsável: Aline Terezinha Ruoso Fernandes. Endereço: Rua Uruguai, n. 70, Vila Esperança. Pirassununga – SP. CEP. 13.635-100. E-mail: [aline\\_pingu@hotmail.com](mailto:aline_pingu@hotmail.com)

## RESUMO

Os eventos trombofílicos podem ser desencadeados por vários motivos, entre os quais se destaca a influência do fator genético sobre a predisposição à formação de trombos. A presença de mutações em genes que codificam os fatores da cascata de coagulação pode acarretar sérios danos à saúde do indivíduo. A trombose é uma doença que atinge 1 em cada 1.000 indivíduos adultos por ano e está ligada ao perfil genético. Por isso, descobrir a mutação tanto no gene do fator V de Leiden quanto no gene da PTCR (protrombina G20210A) é importante para a população, já que esses fatores estão ligados à coagulação sanguínea. O objetivo deste estudo é verificar a prevalência das mutações no gene do fator V de Leiden e no gene da PTCR em 153 indivíduos da população acadêmica da Fundação Hermínio Ometto (FHO|Uniararas), localizada na cidade de Araras-SP. A análise das amostras foi realizada por meio da técnica de reação de cadeia da polimerase, seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP). A prevalência da mutação do gene do fator V de Leiden foi encontrada em 10,2% (5/49) em heterozigose de somente 49 indivíduos estudados, e não foi encontrada, nas amostras (0/153), a prevalência para a mutação do gene da PTCR. Assim, pode-se afirmar que a prevalência encontrada no gene do fator V de Leiden está dentro dos parâmetros encontrados por outros autores. Este estudo contribui no sentido de ressaltar a importância de se pesquisar a relação entre fatores genéticos e doenças trombolíticas.

**Palavras-chave:** Fator V de Leiden; Protrombina; Trombose; Perfil genético.

## ABSTRACT

Thrombophilic events can be triggered for several reasons, among which the influence of the genetic factor on the predisposition to thrombus formation is highlighted. The presence of mutations in genes encoding the factors of the coagulation cascade can lead to serious damage to the health of the individual. Thrombosis is a disease that affects 1 in 1,000 adult individuals per year and is linked to the genetic profile. Therefore, finding the mutation in both the Leiden factor V gene and the PTCR gene (prothrombin G20210A) is important for the population, since these factors are linked to blood clotting. The objective of this study is to verify the prevalence of mutations in the Leiden factor V gene and the PTCR gene in 153 individuals from the academic population of the Hermínio Ometto Foundation (FHO|Uniararas), located in the city of Araras, SP, Brazil. Samples were analyzed using the polymerase chain reaction technique, followed by enzyme restriction (PCR-RFLP). The prevalence of the Leiden factor V gene mutation was found in 10.2% (5/49) in heterozygosis of only 49 subjects studied, and the prevalence of the mutation of the Leiden factor V gene was not found in the samples (0/153), the gene of the PTCR. Thus, it can be stated that the prevalence found in the Leiden factor V gene is within the parameters found by other authors. This study contributes to highlight the importance of researching the relationship between genetic factors and thrombolytic diseases.

**Keywords:** Factor V of Leiden; Prothrombin; Thrombosis; Genetic profile.

## INTRODUÇÃO

*A genética médica não aborda apenas o paciente, e sim a família como um todo. Uma história familiar abrangente é uma etapa inicial importante na análise de qualquer doença, seja esta sabidamente genética ou não [...]. A história familiar é importante porque pode ser crucial no diagnóstico, pode demonstrar que um determinado transtorno é hereditário, fornece informações sobre a história natural de uma doença e variações em sua expressão, e pode esclarecer o padrão de herança. Além disso, a descoberta de um componente familiar em um transtorno médico permite estimar o risco em outros membros da família de modo que o tratamento apropriado, prevenção e consulta genética seja oferecida ao paciente e à família (NUSSBAUM et al., 2008, p. 1).*

Segundo Konopka et al. (2010), a trombose é uma doença de caráter multifatorial que atinge em média 1 em cada 1.000 indivíduos adultos por ano. Sua incidência varia de acordo com a idade dos indivíduos da população: entre 20 e 40 anos, por exemplo, a ocorrência de trombose é dez vezes menor do que em indivíduos de faixas etárias mais avançadas.

Em pesquisa realizada nos Estados Unidos, estima-se que, anualmente, são internadas 300 mil pessoas em decorrência de trombose venosa profunda e 600 mil com tromboembolismo pulmonar, quadro grave que causa a morte de 50 mil pessoas por ano. No Brasil, a partir de dados de internações do SUS (Sistema Único de Saúde), estima-se que 28 mil pessoas são hospitalizadas em decorrência de embolia pulmonar, quadro que causa a morte de 4.247 pessoas por ano.

Diferentemente das doenças monogênicas, cuja mutação em um único gene resulta na enfermidade, nas doenças multigênicas, como a trombose venosa, as várias mutações em diferentes genes fazem com que a interação destes favoreça o adoecimento. Assim, a predisposição à trombose venosa associada à presença de uma alteração genética isolada é relativamente baixa; porém, quando se tem mutações em vários genes, o risco de predisposição a esta doença aumenta significativamente (GUIMARÃES et al., 2009). Segundo Guimarães et al. (2009), as trombofilias hereditárias ocorrem, em geral, em decorrência de mutações nos genes que

codificam os fatores da cascata de coagulação, como a mutação G1691A no gene do fator V e a mutação G20210A no gene da protrombina (fator II), ou de alterações relacionadas a inibidores fisiológicos da coagulação, como a antitrombina, a proteína C e a proteína S. A mutação G1691A, também conhecida como fator V de Leiden, resulta no fenótipo chamado resistência à proteína C ativada e é encontrada em 20% a 40% dos pacientes com trombose. Já a mutação G20210A, conhecida como protrombina mutante, pode elevar em 30% os níveis plasmáticos de protrombina (hiperprotrombinemia) e, conseqüentemente, causar coagulação exacerbada, o que aumenta o risco de trombose.

O diagnóstico que indica alteração no gene da protrombina é obtido por meio de métodos de biologia molecular. A investigação laboratorial por meio de exames considerando-se os níveis de protrombina não é aconselhável, já que existe uma grande sobreposição entre os valores apresentados por indivíduos normais e os valores encontrados nos indivíduos portadores da mutação (RAMOS et al., 2008).

No início de 1990, Svensson e Dahlback apresentaram os resultados de seus estudos populacionais realizados em pacientes com trombose venosa idiopática. Inicialmente, observaram que em um laboratório ocorria certa anormalidade em relação à resistência específica à proteína C ativada, que se encontrava em uma taxa muito mais frequente nos casos que estavam sendo estudados do que nos controles. A partir dessa observação, começaram a procurar por polimorfismos em regiões do gene do fator V, que codificava para locais de clivagem da proteína C. Uma única substituição de base, adenina por guanina na posição 1.691, codificada para a substituição de glutamina por arginina no aminoácido 506, foi evidenciada em quase todos os casos. A partir disso, o fator V, o qual possuía a mutação, foi encontrado, e, posteriormente, sua função normal de pró-coagulante foi testada em *in vitro*. Verificou-se, assim, que o fator V é resistente à inativação pela proteína C, o que demonstrou que a resistência à proteína C observada na população estudada vinha da mutação nele presente. A mutação, então denominada fator V de Leiden, foi encontrada com uma taxa de prevalência de 5 a 10%, sendo mais comum em etnias europeias e escandinavas (DONAHUE, 2004).

Segundo Godoy (2005), o risco de trombose venosa em pessoas homocigotas para a

mutação pode aumentar de cinquenta a cem vezes em relação aos indivíduos normais; no entanto, muitas delas podem não desenvolver a doença, a não ser que sejam expostas aos fatores de risco, como traumas, cirurgia, gravidez, uso de anticoncepcionais, terapia hormonal, além de tabagismo.

Existem relatos de que o uso de medicamentos contraceptivos orais pode acarretar alterações em alguns sistemas, tais como o pró-coagulante e o anticoagulante, assim como alterar a fibrinólise, fazendo com que o risco de eventos trombóticos aumentem (MOREIRA, et.al., 2009)

As interações entre os fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento do tromboembolismo. Além do fator V de Leiden, a protrombina G20210A (PTCR) é também uma alteração genética comumente associada à predisposição à trombose (RAMOS et al., 2006). Vale dizer que a protrombina mutante não foi encontrada em pacientes negros ou asiáticos até o momento, o que indica que, nesses grupos, a mutação não tem frequência ou possui frequência extremamente rara (HERKENHOFF et al., 2012).

Segundo Pujol-Perez; Aras; Escolar (2012), a trombose venosa (VT) ocorre como resultado de uma combinação dos fatores de riscos genéticos e ambientais, tais como a idade, realização de cirurgia, traumatismo, câncer, gravidez e terapia hormonal. Para Moreira et al. (2009), o uso do cigarro pode ser associado à elevação dos níveis de fibrinogênio plasmático e com isso a via intrínseca da coagulação é ativada, causando danos à parede vascular e favorecendo a formação de trombos. O objetivo deste estudo é trazer mais informações sobre o perfil genético do fator V de Leiden e da protrombina mutante na população do interior do estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética e Pesquisa sob protocolo n° 876.060. A extração e purificação do DNA foram realizadas utilizando-se os reagentes fenol-clorofórmio (BioAgency, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Após a obtenção do DNA genômico, foi realizado a amplificação deste por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As análises moleculares nos genes do fator V de Leiden e da protrombina foram realizadas em 153 indivíduos, sendo 111 mulheres e 42 homens, com faixa etária entre 18 e 54 anos. Para o estudo, foram coletados 5 mL de sangue venoso de alunos e funcionários voluntários presentes na instituição Fundação Hermínio Ometto (FHO|Uniararas) para ser realizada a extração e purificação do DNA.

### Análise da mutação no gene Fator V de Leiden

Para a amplificação do gene fator V de Leiden (FVL), utilizou-se Água Milli Q (30,5 µL), tampão PCR (Tris-HCl, 200 mM) 10x (5 µL), MgCl<sub>2</sub> (3 µL), deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (5 µL); um par de *primers* específicos, sendo: FV1 (5'- CTTAAGGAAATGCCCCATTA-3') (2 µL) e FV2 (5'- CCATGCTTAACAAGACCA-3') (2 µL) (Invitrogen, USA), *Taq* DNA polimerase recombinante (5 U/µL) (0,5 µL) (Invitrogen, Brasil); e DNA genômico de cada indivíduo (2 µL). A reação foi realizada em 35 ciclos de amplificação nas temperaturas de: 94°C (30s), 53°C (30s) e 72°C (30s) em termociclador Amplitherm TX96.

Para a digestão do DNA amplificado do FVL, foi preparado um *mix* contendo Água Milli Q (17 µL), tampão NEBuffer 4 (10X) (2 µL) (Thermo Scientific, USA), alíquota da amostra amplificação (10 µL) e enzima de restrição *MnlI* (1 µL) (Thermo Scientific, USA), levado para incubação a 37° C por 30 minutos. O produto final da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% marcado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador sob luz violeta. A interpretação dos resultados foi realizada após a fotodocumentação digital feita por meio do programa GeneSys<sup>1</sup>, no qual as marcações e a banda foram comparadas. Após a digestão, o alelo normal apresenta fragmentos de 120 e 42 pares de base (pb); já o homocigoto apresenta fragmentos de 162 pb; e o heterocigoto apresenta fragmentos de 162, 120 e 42 pb.

### Análise de mutação no gene da Protrombina

Para a amplificação do gene da protrombina (PTCR) utilizou-se Água Milli Q (30,5 µL), tampão PCR (Tris-HCl, 200 mM) 10x (5 µL), MgCl<sub>2</sub> (3 µL), deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (5 µL); um par de *primers* específicos;

<sup>1</sup> Programa de aquisição de imagem.

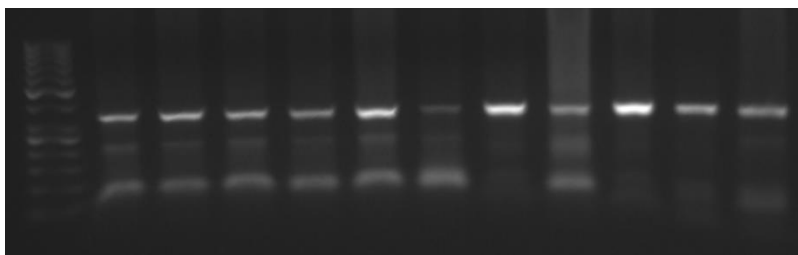
sendo: PTCR1 (5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3') (2 µL) e PTCR2 (5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3') (2 µL) (Invitrogen, USA), *Taq* DNA polimerase recombinante (5 U/µL) (0,5 µL) (Invitrogen, Brasil); e DNA genômico de cada indivíduo (2 µL). A reação foi realizada em 35 ciclos de amplificação nas temperaturas de: 94°C (1min), 53°C (1min) e 72°C (1min) em termociclador Amplitherm TX96.

Para a digestão do DNA amplificado do PTCR, foi preparado um *mix* contendo Água Milli Q 17 µL, tampão NEBuffer 2 (2 µL) (Thermo Scientific, USA), alíquota da amostra amplificação (10 µL) e enzima de restrição *Hind* III (1 µL) (Thermo Scientific, USA), levado à incubação a 37° C por 30 minutos. O produto final da digestão

foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% marcado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador sob luz violeta. A interpretação dos resultados foi realizada após a fotodocumentação digital feita por meio do programa GeneSys, no qual as marcações e a banda foram comparadas. Após a digestão o alelo normal apresenta fragmento único de 345 pb; o heterozigoto, fragmentos de 345, 322 e 23 pb; e o homozigoto, fragmentos de 322 e 23 pb.

## RESULTADOS

Dentre as 153 amostras de DNA analisadas, a mutação G20210A no gene PTCR não foi observada em nenhum indivíduo (Figura 1).



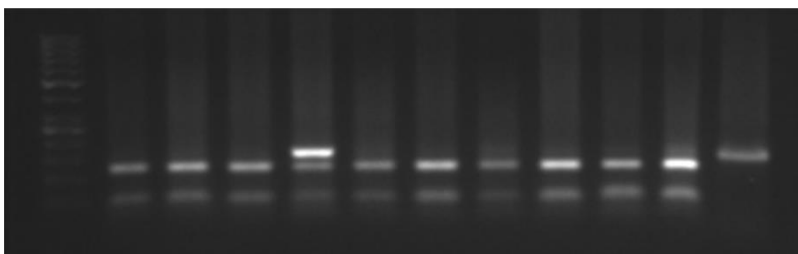
**Figura 1** Fragmentos de DNA após a digestão enzimática com *Hind* III em gel de agarose 2%. Todas as amostras representam o genótipo normal para a mutação no gene do PTCR.

Fonte: Imagem adquirida por fotodocumentação realizada no programa GeneSys.

Em relação à genotipagem da mutação G1691A no gene do FVL, foi possível analisar apenas 49 amostras em função da falta de material referente à enzima de digestão *Mnl*I. Em razão de seu alto custo, foi liberada, para este estudo, a compra de somente uma fração, que correspondia a 50 digestões de DNA. A partir das análises,

verificou-se que a mutação G1691A estava presente em heterozigose em 10,2% dos indivíduos analisados (5/49), o que representa 5,1% dos alelos com mutação (5/98) (Figura 2).

Entre as cinco pessoas que apresentaram a mutação para o gene do FVL, três eram homens (60%) e duas eram mulheres (40%).



**Figura 2** Eletroforese em gel de agarose 2% indicando os fragmentos de DNA de 162 e 120 pb (seta) gerados após digestão enzimática com *Mnl* I de um indivíduo heterozigoto para a mutação do fator V de Leiden.

Fonte: Imagem adquirida por fotodocumentação realizada no programa GeneSys.



## DISCUSSÃO

A partir da realização do presente estudo, foi encontrada prevalência de 10,2 % para a mutação no gene do FVL na população estudada. Já no estudo de RAMOS et.al. (2006), obteve-se prevalência de 13,3% na população estudada. Apesar de o estudo de Ramos et. al. (2006) apresentar porcentagem de prevalência maior, o resultado obtido no presente estudo ainda está dentro da média apresentada no estudo de DONAHUE (2004), que varia entre 5 a 10% na população caucasiana.

Com relação aos resultados obtidos no estudo da mutação do gene da PTCR, não foi encontrada prevalência na população estudada. Ramos et.al. (2008), no entanto, encontraram em seu estudo uma prevalência de 6% na população; isso se deve ao fato de que o número de amostras utilizadas é bem maior do que o utilizado para este estudo.

Nos estudos de Guimarães et.al. (2009) e Herkenhoff et.al. (2012), indica-se que essas mutações, FVL e PTCR, são extremamente raras em populações não caucasianas, tais como africanas, chinesas, japonesas etc. Além disso, é sabido que em decorrência da grande miscigenação do povo brasileiro, alguns genes podem ser mais “diluídos”, assim, sua prevalência diminuir consideravelmente na população.

Entre os indivíduos que possuem o perfil polimórfico para a mutação no gene do FVL, nenhum fazia uso de medicamentos anticoagulantes e somente um fazia uso de terapia hormonal. O uso de anticoncepcionais pode oferecer um risco considerável para a ocorrência de um evento trombótico e, somando-se o fator genético, esse risco pode aumentar ainda mais. No estudo realizado por Moreira et.al. (2009), 88 mulheres (61,5%) que tinham doença trombótica faziam uso de anticoncepcionais orais.

Em comparação com o estudo de Ramos et.al. (2008), a taxa de homens que apresentaram a mutação para o gene do FVL foi menor do que o resultado obtido no presente estudo. No estudo de Ramos et.al. (2008), apenas 1 homem apresentou a mutação para o FVL, enquanto, neste estudo, o total foi de 3 homens. Pode-se afirmar que os homens sofrem menos com a interferência ambiental do que as mulheres, uma vez que estas podem fazer uso, por exemplo, de terapia hormonal. No entanto, homens que fazem uso de cigarro ou álcool não ficam livres do risco de um evento trombótico acontecer. No estudo de Moreira et.al. (2009), o uso do tabaco foi

associado ao aumento de aproximadamente 16 vezes das chances de desenvolver a trombose; já o álcool, de 5 vezes.

## CONCLUSÃO

O diagnóstico molecular é um fator muito importante para se complementar a parte clínica de uma doença, principalmente no caso da trombose, visto que a junção de vários fatores, tanto ambientais quanto genéticos, pode influenciar a vida do paciente que está predisposto a um evento trombótico.

A prevalência da mutação no gene do fator V de Leiden encontrada neste estudo se mostrou equivalente a resultados encontrados em outros estudos.

Já a prevalência da mutação no gene do PTCR não foi encontrada neste estudo, uma vez que é maior em populações caucasianas e europeias e extremamente rara em africanos, japoneses, chineses etc. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, e essa miscigenação faz com que alguns genes sejam “diluídos”, o que dificulta muito a tarefa de encontrá-los.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DONAHUE, B. S. Factor V Leiden and perioperative risk. **Anesthesia and Analgesia**. Estados Unidos, v. 98, n. 6, p. 1623–34, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155315>>. Acesso em: 1 fev. 2014.
- GODOY, J. M. P. Fator V de Leiden. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 27, n. 2, p. 79-82, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v27n2/v27n2a01.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014
- GUIMARÃES, S. P. et.al. Mutações predisponentes à trombofilia em indivíduos de Minas Gerais – Brasil com suspeita clínica de trombose. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 31, p. 19-24, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n1/aop0409.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

HERKENHOFF, M. E. et.al. Análise da mutação G20210A no gene da protrombina (fator II) em pacientes com suspeita de trombofilia no sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 85-89, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v48n2/a03v48n2.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

KONOPKA, C. L. et.al. Agenesia de veia cava inferior associada à trombose venosa profunda. **Jornal Vascular Brasileiro**. Porto Alegre, v. 9, n. 3, p. 196-199, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jvb/v9n3/a19v9n3.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

MOREIRA, A. M. et.al. Fatores de risco associados a trombose em pacientes do estado do Ceará. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 31, n. 3, p. 132-136, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n3/aop4409.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson: genética médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PEREZ-PUJOL, S.; ARAS, O. ESCOLAR, G. Factor V Leiden and Inflammation. Review Article. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2012, Article ID 594986, p. 1-10, 2012. Thrombosis. Disponível em: <[file:///C:/Users/f2217/Downloads/594986%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/f2217/Downloads/594986%20(1).pdf)>. Acesso em: 1 fev. 2014.

RAMOS, C. P. S. et.al. Frequência do Fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 28, n. 2, p. 131-134, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v28n2/v28n2a13.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

RAMOS, C. P. S. et.al. Protrombina mutante em indivíduos sob investigação de trombofilia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 79-82, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v44n2/a03v44n2.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2014.