

PREVALÊNCIA DO FATOR V DE LEIDEN EM PESSOAS QUE BUSCAM ANÁLISES LABORATORIAIS

Mônica de Souza Pimenta

Resumo: O fator V de Leiden é uma mutação genética que predispõe seus portadores ao tromboembolismo venoso, sendo que uma pequena modificação no seu gene aumenta sua ação por não sofrer bloqueio natural da proteína C, o que facilita a formação de trombos. O objetivo do estudo foi investigar a distribuição dos alelos na população de São Paulo que buscam por análises laboratoriais. Este estudo foi realizado no Centro de Genoma do Laboratório Salomão e Zoppi da cidade de São Paulo, abrangendo amostras dos anos de 2006 e 2007. No ano de 2006, de um total de 319 amostras, observou-se que 94,67% dos pacientes eram homozigotos selvagens, 5,33% eram heterozigotos e não houveram pacientes homozigotos mutados. Já no ano de 2007, de um total de 347 amostras, 94,52% dos pacientes eram homozigotos selvagens, 4,9% eram heterozigotos e 0,58% homozigotos mutados. O processo de hemostasia está sujeito a desequilíbrios causados tanto por defeitos genéticos quanto por adquiridos. Sendo assim, a investigação da presença do fator V de Leiden em pessoas que desenvolvem eventos trombóticos se faz necessário para ter um diagnóstico diferencial baseado em causas genéticas, com a avaliação do risco familiar e conseqüente acompanhamento preventivo e profilaxia.

Palavras chaves: Fator V de Leiden, hemostasia, tromboembolismo

Introdução

Atualmente, uma das causas mais comuns de morbimortalidade são as trombooses, que resultam de uma etiopatogênese multifatorial influenciada pela interação de mecanismos fisiopatológicos de natureza hereditária e adquirida, caracterizadas pela formação aguda de trombos em veias e artérias. Fatores de risco adquiridos e clássicos de um tromboembolismo venoso incluem idade avançada, imobilização prolongada, cirurgia, fraturas, uso de contraceptivos orais, gestação, puerpério, neoplasias entre outros.⁴ Entre os fatores genéticos, as mutações nos genes do fator V e da protombina são as duas causas que prevalecem para a trombose hereditária. O risco aumenta na presença de um grande número de condições genéticas e/ou ambientais, porém pode ocorrer mesmo na ausência de fatores de risco conhecidos. O fator V de Leiden, descoberto em 1994, trata-se de um importante fator de risco genético da trombose venosa e caracteriza-se por uma alteração hereditária autossômica dominante que interfere na atuação da proteína C.⁵ A proteína C em sua forma ativada é um fator de regulação do sistema de coagulação e age na inativação proteolítica do fator Va e do fator VIIIa. A resistência a proteína C ativada hereditária é decorrente de uma mutação

no fator V da coagulação, havendo uma transição guanina/adenina no nucleotídeo 1691 do gene resultando na substituição de Arginina por Glutamina na posição 506 da proteína, um dos principais sítios de clivagem para a ativação da proteína C.¹ Sendo assim a clivagem e inativação do fator Va é feito de forma insatisfatória, levando-o ao acúmulo e conseqüentemente aumentando o risco de trombose. O risco relativo de trombose venosa aumenta de três a oito vezes para os portadores heterozigotos e de cinquenta a oitenta vezes para os homozigotos. A incidência do tromboembolismo é maior nos indivíduos que, além do fator V de Leiden, sofrem de deficiências de proteínas C ou S, ou outro distúrbio genético ou adquirido para trombose.⁷ Atualmente, técnicas de biologia molecular tornam possíveis a investigação das mutações. O teste mais direto para a identificação do Fator V Leiden é a amplificação do fragmento do gene por PCR que contem a mutação seguido de seqüenciamento para detecção da mutação. Em contraste com o estudo funcional a análise do DNA permite identificar indivíduos normais (homozigoto selvagem), heterozigotos e homozigotos mutados. Na clivagem por enzima de restrição, estas enzimas digerem o DNA em sítios específicos do fragmento amplificado pela PCR.

Casuística

Trata-se de um estudo com a finalidade de detectar a mutação do fator V de Leiden em pessoas que buscam por análises laboratoriais. Foram analisadas um total de 666 amostras colhidas nos anos de 2006 e 2007, sendo 319 no ano de 2006 e 347 em 2007, sem distinção de idade, sexo ou raça. Foi realizado no Centro de Genoma do Laboratório Salomão e Zoppi da cidade de São Paulo. As amostras foram colhidas em tubo estéril, tipo *vacutainer*, contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e encaminhadas para análises.

Métodos Laboratoriais

Extração de DNA

A técnica consiste em digestão enzimática da membrana e das proteínas presentes nas células, resultando na obtenção do DNA puro. Para a extração de DNA genômico utilizou-se o Kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences), da seguinte maneira: adiciona-se 150µL de sangue, 400µL de Solução de Lise e 20µL de proteinase K e incuba-se no shaker por 15 minutos. Centrifuga-se esse material a 14.000 rpm por 2 minutos e todo sobrenadante é transferido para a coluna. Realiza-se outra centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos e descarta-se o líquido que passou pela coluna. Adiciona-se 500µL de Solução de Lise e centrifuga-se a 14.000 rpm por 2 minutos. O líquido que passou pela coluna é descartado e acrescenta-se 500µL de *wash solution*. Centrifuga-se esse material a 14.000 rpm por 2 minutos e transfere a coluna para um tubo novo. Adiciona-se 60µL de *elution buffer* a 70°C, incuba-se a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifuga-se a 14.000 rpm por 2 minutos. O DNA purificado será armazenado a -20°C até sua utilização.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

A grande maioria dos ensaios com o objetivo de detecção de mutações envolve a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica, uma reação enzimática feita *in vitro*, tem a capacidade de amplificar seqüências gênicas específicas a partir de uma pequena quantidade de DNA.⁸ A detecção do polimorfismo foi realizada através do método molecular RE/PCR (Enzima de Restrição/Reação em Cadeia da Polimerase), com a utilização de *primers* e enzima de restrição específicos. Nas reações foram usados 200ng do DNA genômico em um volume final de 25µL de reação contendo: 5pmol/µL de cada *primer forward* e *reverse*, 12µL de *mix* Promega (50N/mL de Taq DNA polymerase com *buffer* de reação – pH 8,5, 400µM de dATP, 400µM de dCTP, 400µM de dGTP, 400µM de dT e 3Mm de MgCl₂; Promega Cooperation, Madison, WI, USA) e 10µL de H₂O de *nuclease-free* Promega. Para a amplificação do fator V utilizou-se o *primer* senso FV1: 5' CTTGAAGGAAATGCCCATTA 3' e *primer* anti-senso FV2: 5' TGCCAGTGCTTAACAAGACC 3'. A reação envolveu 40 ciclos de incubação com temperaturas de 94°C-1', 55°C-1', 72°C-1'. A desnaturação inicial deu-se a 94°C por 4 minutos e a extensão final ocorreu a 72°C por 7 minutos.

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

Para reconhecer os sítios onde ocorreram as mutações, usa-se a técnica de RFLP (“Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição”), utilizando-se enzimas de restrição que cortam o DNA apenas onde existem certas seqüências específicas de nucleotídeos. Para a digestão, os produtos de PCR foram incubados em um volume final de 10µL a 37°C por 1 hora e 15 minutos, contendo: 3UN de enzima de restrição (MnII), 1µL do *buffer* e 8µL do produto da PCR. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 3%brometo de etídio, onde observou-se os padrões de digestões enzimáticas. Todas as reações foram processadas contendo um controle interno negativo com a substituição do volume de DNA por H₂O de *nuclease-free* Promega. A digestão originou fragmentos de 116, 67 e 37 pares de base quando a adenina está presente na posição 1691 (alelo normal), enquanto que a substituição pela guanina (alelo mutado) resultou em fragmentos de 153 e 67 pares de base para portadores e fragmentos de 153, 116, 67 e 37 pares de base para portadores heterozigotos. (Figura 1)

Resultados

De acordo com as análises, observou-se que no ano de 2006, das 319 amostras, 302 (94,67%) foram de pacientes homozigotos selvagens, 17 (5,33%) de pacientes heterozigotos e nenhuma de paciente homozigoto mutado. No ano de 2007, observou-se que de um total de 347 amostras, 328 (94,52%) eram de pacientes homozigotos selvagens, 17 (4,9%) de pacientes heterozigotos e 2 (0,58%) de homozigotos mutados.

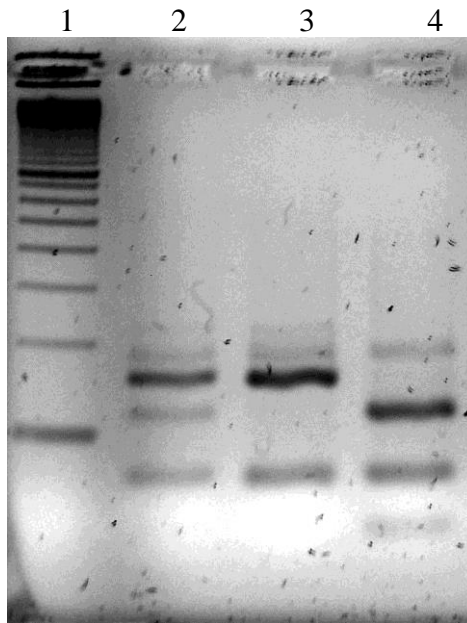


Figura 1: Representação da eletroforese em gel de agarose 3% brometo de etídio

- 1 - Marcador (bandas de 100 pares de base)
- 2 - Heterozigoto (bandas de 153, 116, 67 e 37 pares de base)
- 3 - Homozigoto mutado (bandas de 153 e 67 pares de base)
- 4 - Homozigoto selvagem (bandas de 116, 67 e 37 pares de base)

Conclusão

Como é muito grande a variação no número e no tipo de mutações estáveis do DNA, é possível identificar uma pessoa com base em seus padrões de polimorfismo. Sendo assim, a detecção do fator V de Leiden como anormalidade molecular presente em pessoas que desenvolvem eventos trombóticos é muito importante para o estudo das causas e o rastreamento familiar, mesmo sem manifestação clínica, para que se possa avaliar os riscos e determinar acompanhamento médico preventivo.

Referências

- CARVALHO, Eunice B. et al . Rastreamento familiar do fator V de Leiden: a importância da detecção de portadores heterozigotos. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. , São José do Rio Preto, v. 27, n. 2, 2005.
- DUQUE , Fernando L.V, MELLO, N.A. Trombogênese-Trombofilia. J. Vasc. Br 2003, Vol.2, n.2
- FRANCO, Rendrik F. et al . Heterogeneous ethnic distribution of the factor v leiden mutation. Genet. Mol. Biol. , São Paulo, v. 22, n. 2, 1999 .

FRANCO, Rendrik F. Trombofilias Hereditárias. Simpósio: Hemostasia e Trombose, Ribeirão Preto, 34: 248-257, 2001.

GODOY, José M. P.. Fator V de Leiden. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. , São José do Rio Preto, v. 27, n. 2, 2005 .

PALOMO G, Iván, PEREIRA G, Jaime, ALARCON L, Marcelo *et al.* Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. *Rev. méd. Chile*, dez. 2005, vol.133, no.12, p.1425-1433. ISSN 0034-9887.

RAMOS, Catarina P. S. et al . Freqüência do fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia, Recife, Pernambuco, Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto, v. 28, n. 2, 2006 .

Genética e Biologia Molecular para o cirurgião – Benedito Mauro Rossi, Mauro Pinho. São Paulo: Lemar, 1999.

Artigo de conclusão do curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 a junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua: Bonfá Natale, 1860; CEP: 15020-130, São José do Rio Preto, SP

Email: a.c.t@terra.com.br

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Prevalência do fator V de Leiden em pessoas que buscam análises
laboratoriais

Mônica de Souza Pimenta

**São José do Rio Preto-SP
2008**

