

Artigo / Article

## Rastreamento familiar do fator V de Leiden: A importância da detecção de portadores heterozigotos

*Familiar tracking of factor V Leiden: The importance of detection in heterozygous carriers*

Eunice B. Carvalho<sup>1</sup>

Maria I.M.C. Pardini<sup>3</sup>

Rosângela A.R.R. Holanda<sup>1</sup>

Gentil C. Galiza-Neto<sup>1</sup>

Sílvia M.M. Magalhães<sup>1</sup>

Maria H.S. Pitombeira<sup>1</sup>

Milena V. Holanda<sup>2</sup>

Ailton T. Fontenele-Filho<sup>2</sup>

Silvia H. B. Rabenhorst<sup>2</sup>

O fator de Leiden é uma mutação genética que predispõe seus portadores ao tromboembolismo venoso. O objetivo do estudo foi investigar a distribuição dos alelos em 21 membros da família de três pacientes portadores de trombose com a presença da mutação do fator V de Leiden. A detecção da mutação no gene do fator V foi realizada entre portadores da mutação no estado heterozigoto. Este estudo foi realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce. Observou-se a presença da mutação no estado heterozigoto na família 1 (83,3%), na família 2 (40%) e na família 3 (50%). No total de 24 membros (pacientes e familiares) analisados, 50% (12/24) apresentaram a mutação, todos no estado heterozigoto, 66,7% (8/12) não apresentaram trombose. A detecção do fator V de Leiden em pacientes portadores de eventos trombóticos é recomendado para esclarecimento das causas e para efetuar o rastreamento em membros de sua família, ainda sem o aparecimento de eventos trombóticos, de forma a avaliar os riscos associados e assim determinar um acompanhamento médico preventivo. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(2):83-86.

**Palavras-chave:** Fator V de Leiden; trombofilia familiar; tromboembolismo venoso.

### Introdução

O tromboembolismo venoso se deve a uma desordem multifatorial englobando a interação de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos que afetam as proteínas do sistema anticoagulante. Entre estes fatores genéticos, as mutações nos genes do fator V e da protrombina são as duas causas que prevalecem para a trombose hereditária.<sup>1,2</sup> O fator V é uma proteína plasmática formada por 2.196 aminoácidos, precursor do fator Va (fator V ativado) essencial para a síntese da trombina, responsável pela ativação da coagulação.<sup>3</sup> O processo de desativação baseia-se na ligação da trombina e da proteína C à trombomodulina (presente no endotélio) convertendo a proteína C à proteína C ativada (PCA). Esta ativação ocorre na presença da proteína S (PS). O complexo PCA/

PS causa a inativação através da clivagem enzimática dos cofatores Va e VIIIa que inibem a atividade do sistema coagulante.<sup>4</sup>

A resistência à proteína C ativada é um dos principais fatores de risco para o tromboembolismo venoso.<sup>5</sup> A mutação do fator V de Leiden representa uma das causas principais de resistência à proteína C. Cerca de 90% dos casos de resistência a esta proteína se devem à mutação de ponto no gene do fator V, da coagulação. Esta mutação ocorre no exon 10 do gene do fator V ocasionando uma substituição da base G/A (Guanina/Adenina) no nucleotídeo 1691, resultando na troca da Arg (Arginina) pela Gln (Glutamina) na posição 506 da proteína, um dos principais sítios de clivagem para ativação da proteína C.<sup>6</sup> A presença da mutação aumenta o risco de doença trombótica de três a dez vezes para portadores

<sup>1</sup>Serviço de Hematologia, Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce, Universidade Federal do Ceará.

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia e Genética Molecular/LABGEM, Depto. de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará.

<sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica, Universidade de Medicina – Unesp – São Paulo.

**Correspondência para:** Eunice Bobô de Carvalho  
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce  
Av. José Bastos, 3390  
60.436-160 – Fortaleza-CE  
Fone: (85)3101.2294/Fax:(85)3101.2308  
E-mail: eunice@hemoce.ce.gov.br

heterozigotos e de oitenta vezes para portadores homozigotos.<sup>4</sup> Estudos mostram que a prevalência desta mutação dependerá da etnia da população estudada. A taxa da mutação dentro da população européia é de 5%, nos Estados Unidos é de 6% e praticamente ausente entre os africanos e asiáticos. Em afro-americanos é encontrada em cerca de 1%.<sup>7</sup> No Brasil, a mutação está presente em cerca de 2% da população.<sup>8</sup> Em pacientes portadores de doenças trombóticas, o fator V de Leiden foi observado em 20% dos casos.<sup>9</sup>

O tromboembolismo venoso representa um sério problema de saúde mundial. Nos Estados Unidos, de 250 mil pessoas hospitalizadas por ano, cerca de 50 mil morrem devido a embolia pulmonar.<sup>10</sup>

As técnicas de biologia molecular tornam possível a detecção de mutações, que podem ser realizadas, atualmente, como rotina laboratorial. A aplicação de teste de rastreamento destas mutações em pessoas com antecedentes clínicos e/ou familiar são de grande importância, pois permitem uma abordagem clínica antitrombótica, de modo a diminuir os riscos destas doenças. Os pacientes com doenças trombóticas (trombose venosa profunda, embolia pulmonar, trombose arterial e trombose cerebral vascular), portadores do fator V de Leiden, foram analisados juntamente com sua família para detecção da distribuição dos alelos mutados a fim de correlacionar a presença da mutação e a sintomatologia, levando-se em consideração seus antecedentes de fatores de risco familiar.

## Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo de detecção da mutação do fator V Leiden em 21 membros da família de três pacientes portadores heterozigotos da mutação com doença trombótica. Foi realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce.

Os dados epidemiológicos dos membros de três gerações foram coletados e cada indivíduo assinou um termo de consentimento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará.

### Família 1

A paciente com idade de 21 anos foi analisada após o aparecimento de um quadro de trombose venosa profunda em um dos membros inferiores, durante a utilização do uso de contraceptivo oral. A análise foi realizada em seus avós de 71 e 75 anos, em seus pais de 43 e 46 anos e na sua irmã de 18 anos de idade.

### Família 2

Paciente com idade de 30 anos, tabagista, apresentou trombose arterial (artérias coronárias) – infarto do miocárdio. A análise foi realizada em sua mãe de 61 anos, seus cinco irmãos de 34, 35, 37, 38 e 39 anos e em seus filhos de 8 e 10 anos de idade. O pai recusou-se a fazer o teste e um dos

irmãos era portador de trombose venosa profunda em um dos membros inferiores.

### Família 3

Paciente com trombose venosa profunda, idade de 12 anos. Seus pais, de 34 e 36 anos de idade, seus avós paternos, de 66 e 71 anos, sua avó materna, de 55 anos, bem como suas duas irmãs, de 3 e 5 anos, foram analisados.

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico. A extração de DNA seguida da reação de PCR foi realizada utilizando-se os *primers* específicos, FV1 (5'CTTAAGGAAATGCCCCATTA3') e FV2 (5'CCATGCTTAACAAGACCA3'), para a região do exon 10 do gene do fator V, produzindo os fragmentos de 220pb (200 pares de base). Após a amplificação, os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

A restrição dos produtos amplificados foi feita utilizando-se a enzima MnlI durante 18 horas a 37°C. Esta enzima fraciona os produtos de PCR em dois sítios de restrição, produzindo três fragmentos. A presença da mutação foi detectada pela perda de um dos sítios de restrição. Há produção de dois fragmentos (153pb, 67pb) em indivíduos homozigotos. Os heterozigotos apresentam quatro fragmentos (37pb, 67pb, 116pb, 153pb) gerados pela perda de restrição de um dos alelos. A visualização dos fragmentos de restrição é feita em um gel de poliácridamida à 7% (Figura 1).

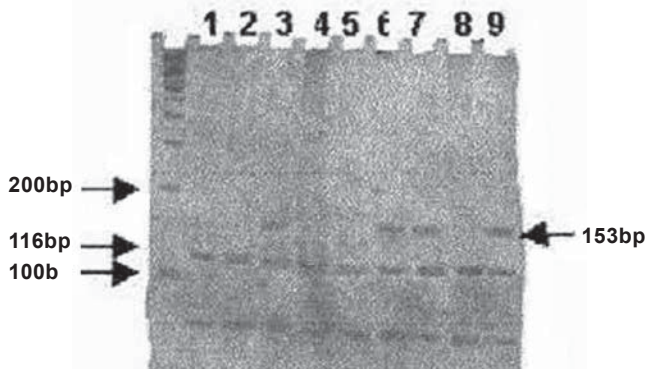


Figura 1. Representação da Família 3. Visualização dos fragmentos de restrição num gel de poliácridamida a 7%. Presença do fragmento de 153 bp (pares de base) em quatro membros (3, 6, 7 e 9)

## Resultados

### Família 1

Exceto o avô paterno da paciente, a detecção em estado heterozigótico foi observada em todos os membros da família. Apenas a paciente apresentou doença trombótica, representando 20% (1/5) dos portadores heterozigotos com trombose venosa profunda (Figura 2).

### Família 2

A mutação foi observada em dois irmãos de 37 e 38

anos. Um destes, apresentava trombose venosa profunda. Sabendo-se que a mãe não era portadora da mutação e que dois dos filhos eram heterozigotos, a mutação teve origem paterna. Nesta família, foi observado que 50% (2/4) dos portadores apresentaram episódios trombóticos (Figura 3).

#### Família 3

A mutação no estado heterozigoto foi observada na avó paterna, no pai, ambos sem doença trombótica, e na irmã com 3 anos de idade, até o presente momento sem sintomatologia e encontra-se sob acompanhamento médico. Nesta família, 25% (1/4) dos portadores apresentavam trombose venosa profunda (Figura 4).

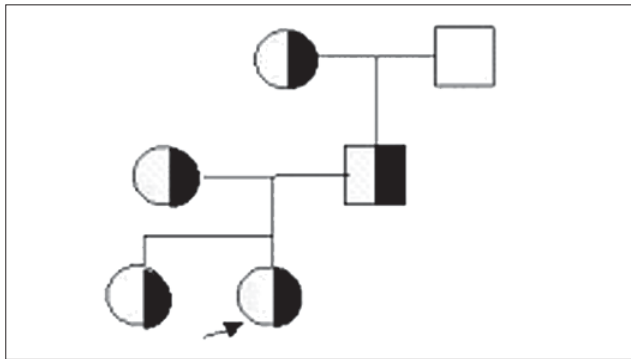


Figura 2. Família 1

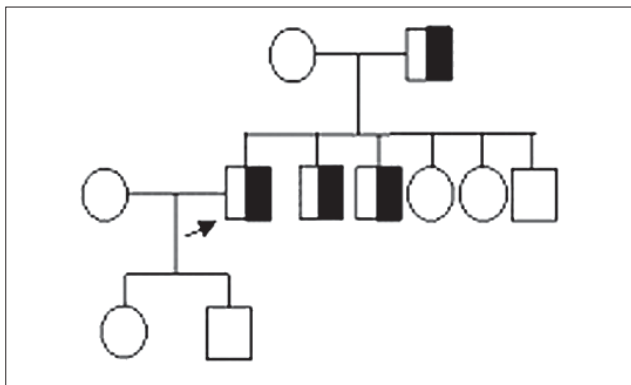


Figura 3. Família 2

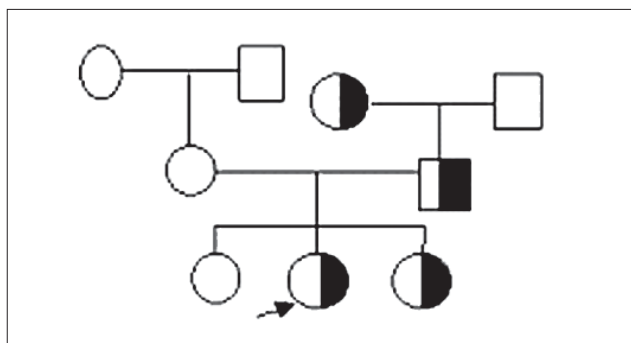


Figura 4. Família 3

Nos 24 membros das três famílias diferentes, o fator V de Leiden no estado heterozigoto foi encontrado em 50% (12/24), e do total de portadores da mutação, 66,7% (8/12) não apresentavam doença trombótica.

#### Discussão

O tromboembolismo venoso é uma das causas principais de morbidade e mortalidade, com incidência de 1-2 pessoas por 1.000/ano.<sup>9</sup> O fator V de Leiden predispõe ao tromboembolismo venoso. O risco aumenta quando associado a outros fatores de risco (utilização de contraceptivos orais, gravidez, imobilização após cirurgias, traumatismo ou doenças malignas).<sup>11,12,13</sup>

Neste estudo, foi observada a presença da mutação no estado heterozigoto na família 1– 83,3% (5/6); 2–40% (4/10) e 3–50% (4/8). Do total estudado, 50% (12/24) eram portadores da mutação de Leiden. O fator V de Leiden foi encontrado em 50% dos indivíduos com antecedente familiar de trombose em estudo similar.<sup>14</sup> Na família 1, a prevalência de 83,3% foi devido à presença da mutação tanto no pai como na mãe, o que aumenta a probabilidade de se encontrar a mutação.

Dos portadores heterozigotos do fator V de Leiden, 33,3% (4/12) foram vítimas de episódios trombóticos, resultado próximo ao estudo de Lensen,<sup>15</sup> no qual 25% dos portadores apresentavam episódios trombóticos. Este resultado difere de outros estudos, onde 19% e 13% dos portadores foram vítimas de trombose.<sup>16,17</sup> Estes autores mostram que o fator V de Leiden associado à deficiência de proteína S aumenta de 19% a 72% (Zoller<sup>16</sup>), e de 13% a 73% quando associado à mutação no gene da proteína C (Boven<sup>17</sup>).

Seria de grande valor que estes 24 membros familiares fossem analisados para outras associações do fator V de Leiden, seja relacionado às deficiências da proteína C, proteína S, antitrombina III e/ou a outras mutações. Observou-se que a idade dos portadores heterozigotos com doença trombótica está situada entre 12 e 37 anos de idade. Dados encontrados em outros estudos nos quais os portadores da mutação apresentavam o evento trombótico até a idade de 40 anos.<sup>11,15,17</sup>

Pela grande variedade de doenças ou de complicações compreendendo o fator V de Leiden, a detecção de portadores sintomáticos se faz importante para esclarecimento da etiologia dos casos e para o rastreamento dos membros assintomáticos das famílias, na intenção de conhecer os fatores de riscos associados e os benefícios de uma terapia preventiva.

#### Conclusão

A detecção do fator V de Leiden em pacientes portadores de eventos trombóticos é recomendada para esclarecimento das causas e para efetuar o rastreamento em membros de sua família, ainda sem o aparecimento de eventos

trombóticos, de forma a avaliar os riscos associados e assim determinar um acompanhamento médico preventivo.

### Abstract

*Factor V Leiden is a mutation that can cause venous thrombosis. When associated to other risk factors such as the use of contraceptives, important surgical intervention, pregnancy and malignant diseases, the risk for heterozygous carriers increases by three-fold to 10 times or even 80 times for two mutated alleles. The factor V Leiden is found in about 20% of the population with a history of venous thromboembolism. It is present in about 4 to 6% of general population but this percentage changes depending on the ethnicity. This study shows the distribution of alleles in family members of three carriers of factor V Leiden diagnosed with deep venous thrombosis. The mutation investigation of the factor V Leiden gene was performed in 21 family members of 3 heterozygous carriers. The study was performed in the Hematology and Hemotherapy Center from Ceará – Hemoce, Brazil. In this study the V Leiden mutation in its heterozygous form was observed in 83.3% of family 1, 40% of family 2 and 50% of family 3. From the total of 24 members analyzed 50% (12/24) showed the mutation and 66.7% (8/12) did not present the thrombotic disease. An investigation of the factor V Leiden in patients suffering thrombotic events is recommended to explain the etiology and effect of the disease as well as screening of family members so that preventative actions can be adopted. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(2):83-86.*

**Key words:** Factor V Leiden; familial thrombophilias; venous thromboembolism.

### Referências Bibliográficas

- Mathonnet F, Nadifi S, Serazin-Leroy V, et al. Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G20210A mutation prevalence in a healthy Moroccan population. *Thromb Haemost* 2002;88:1.073-4.
- Souza SS, Ferriani RA, Pontes AG, et al. Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent abortion. *Human Reproduction* 1999;14(10):2.448-50.
- 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* 1995; 74(1): 139-148.
- Van Cott EM, Soderberg BL, Laposata M. Activated protein C resistance, the factor V Leiden mutation, and a laboratory testing algorithm. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:577-582.
- Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson P. 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. *Medical Sciences* 1993;90:1.004-1.008.
- Norström E, Thorelli E, Dalbäck B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Bood* 2002;100: 524-530.
- De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: Clinical implications. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1998;24(4):367-379.
- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *American Journal of Hematology* 1995;49:242-243.
- Robetorye RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *American Journal of Hematology* 2001;68: 256-268.
- Rezende SM. Mini-review: genes, thrombosis and thrombophilia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 1999;21(2):73-81.
- Kroegel C, Reissig A. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: Epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Respiration* 2003;70:7-30.
- Curvers J, Thomassen MCLGD, Rimmer J, et al. Effects of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test. *Thromb Haemost* 2002;88:5-11.
- Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *The N Engl J Med* 1999;340:9-13.
- Lesen R, Rosendaal F, Van den Broucke J, Bertina R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. *Br J Haematol* 2000;110(4):939-45.
- Lesen RP, Bertina RM, De Ronde H, et al. Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2000;83(6):817-21.
- Van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR, et al. Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. *Thrombosis and Haemostasis* 1996;75(3):417-21.
- 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. *Ann Ver Med* 1997;48:45-58.

Avaliação: Editor e dois revisores externos.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 03/06/2005

Aceito após modificações: 16/06/2005