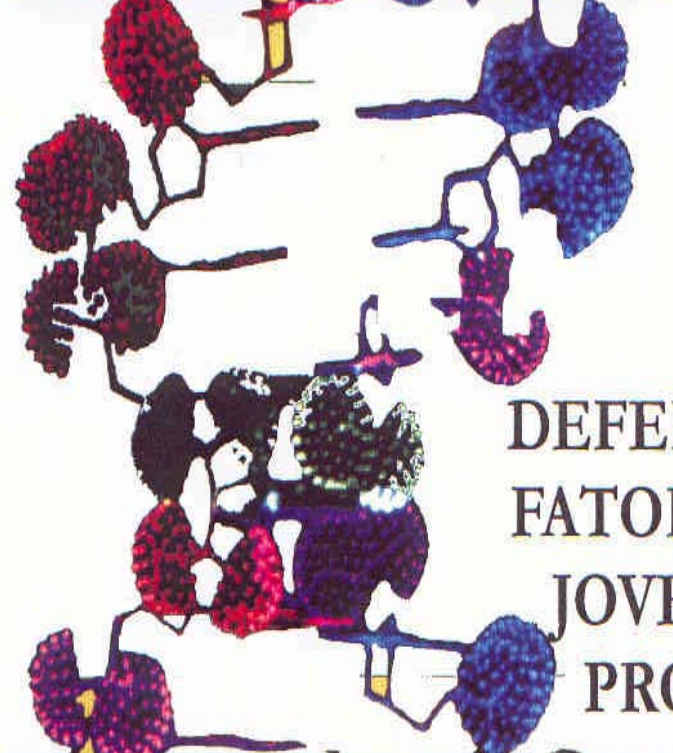




MARIA EMILIA DOS SANTOS



DEFEITO BIOQUÍMICO EM FATOR V,
FATOR V DE LEIDEN, EM PACIENTE
JOVEM COM TROMBOSE VENOSA
PROFUNDA - ESTUDO DE CASO



UFPE
2001

MARIA EMÍLIA DOS SANTOS

**DEFEITO BIOQUÍMICO EM FATOR V, FATOR V DE
LEIDEN, EM PACIENTE JOVEM COM TROMBOSE
VENOSA PROFUNDA – ESTUDO DE CASO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO MESTRADO EM
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE. ORIENTADORA: PROFA. LUANA
CASSANDRA B. B. COELHO, M.C., PHD.
COORIENTADORA: PROFA. MARIA DA CONCEIÇÃO
BARROS CORREIA, M. D.

RECIFE

2001

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**DEFEITO BIOQUÍMICO EM FATOR V, FATOR V DE
LEIDEN, EM PACIENTE JOVEM COM TROMBOSE
VENOSA PROFUNDA – ESTUDO DE CASO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO MESTRADO EM
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE. ORIENTADORA: PROFA. LUANA
CASSANDRA B. B. COELHO, M.C., PHD.
COORIENTADORA: PROFA. MARIA DA CONCEIÇÃO
BARROS CORREIA, M. D.

Aprovado por:

- **Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, doutorado em Bioquímica, United Kingdom, UK, Inglaterra**
- **Profa. Maria da Conceição Barros Correia, hematologista, mestre pela Universidade Federal de Pernambuco**
- **Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel, Doutorado de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco**
- **Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP**
- **Profa. Dra. Vera Lúcia Menezes Lima, University of London, UL, London, Inglaterra**

RECIFE

2001

*Dedico este trabalho à
família estudada, por
permitir que
atribulações de suas
vidas contribuíssem
para a produção de
conhecimento.*

*Dedico especialmente
às minhas filhas, meu
motivo de viver, e aos
meus pais pela chance
de chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria da Conceição Correia, pela maneira afável com que me recebeu. Obrigada pelas palavras de estímulo, amizade e confiança, pela sua prática da medicina e do ensino tão humana, ética e desinteressada.

À Profa. Dra. Luana Coelho, por acreditar no trabalho.

À Dra. Wedna Galindo, amiga, anjo bom. Este trabalho não sairia sem as suas assertivas multidisciplinares.

À Fundação HEMOPE, nas pessoas de:

Dr. Aderson Araújo;

Dra. Farida Melo;

Dra. Fátima Araújo;

Dr. Raul Melo;

Dra. Thelma Bueno;

Emília Borges e equipe.

À Assessoria de Ensino e Pesquisa da Fundação HEMOPE com sua equipe.

Ao Laboratório Paulo Loureiro, nas pessoas de:

Dra. Paula Loureiro;

Dra. Eveline Ramos de Moraes

Werika Herculano Costa

Ao Hospital das Clínicas, nas pessoas de:

Sra. Josefa Bezerra de Melo Costa.

Estagiários da coleta de sangue do Laboratório de Análises Clínicas.

À ALBALAB Comércio pela doação de reagentes para coagulação especialmente na pessoa de:

Dr. Miguel Grasa

Ao Dr. Glênio Viana dos Santos, com sua experiência de médico me ajudou no contato direto com o paciente.

Aos graduandos em Biomedicina:

Marcos André Cavalcanti Bezerra;

Antonio Roberto Lucena de Araújo.

Às equipes das Bibliotecas do Centro de Ciências Biológicas, Centro de Ciências da Saúde, Biblioteca Central e da Fundação HEMOPE.

À Nossa Senhora que atendeu ao meu pedido: viabilização econômica e operacional deste projeto, na figura de todos aqueles citados acima e mais.

À mãe do céu que nas horas difíceis sempre me amparou de imediato, ilumine a todos que contribuíram para este trabalho, pois foram muitas pessoas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	CASUÍSTICA.....	21
5	MATERIAIS.....	22
5.1	DETERMINAÇÃO TEMPO DE PROTROMBINA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FIBRINOGENIO.....	22
5.2	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA.....	22
5.3	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE PROTEÍNA C.....	22
5.4	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE PROTEÍNA S.....	22
5.5	DETERMINAÇÃO DE ANTTTROMBINA.....	22
5.6	PESQUISA DE RESISTÊNCIA À PROTEÍNA C ATIVADA.....	22
5.7	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA.....	23
5.8	PESQUISA DO FVL E DA MUTAÇÃO G20210A DA PROTROMBINA.....	23
6	MÉTODOS.....	23
6.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	23
6.2	FUNCIONAMENTO DO ACL 7 000.....	25
6.3	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE PROTEÍNA C.....	25
6.4	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE PROTEÍNA S.....	25
6.5	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ANTTTROMBINA.....	26
6.6	PESQUISA DE RESISTÊNCIA À PROTEÍNA C ATIVADA.....	26
6.7	DETERMINAÇÃO DO FIBRINOGENIO.....	26
6.8	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA.....	26
6.9	PESQUISA DO FVL E DA MUTAÇÃO G20210A DA PROTROMBINA.....	27
7	RESULTADOS.....	28
8	DISCUSSÃO.....	33
9	CONCLUSÕES.....	38
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
	ANEXOS	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACO – Anticoncepcional oral

APCR – Activated Protein C Resistance – Resistência à Proteína C Ativada

AT III - Antitrombina III

AVC – Acidente vascular cerebral

AVK - Antivitamina K

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EP – Embolia Pulmonar

F II G20210A – Mutação G20210A do gene da protrombina

FVL – Fator V de Leiden, FVL, FVR506Q, FV1691(G→A) – Mutação G→A 1691 do gene do Fator V

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IAM – Infarto agudo do miocárdio

PC – Proteína C

PCA – Proteína C Ativada

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

PS – Proteína S

PTCR – Região de controle da Protrombina

RPCA – Resistência à Proteína C Ativada

TA – Trombose arterial

TEV – Tromboembolismo venoso

TPAE – Tempo de protrombina com atividade enzimática

TRH – Terapia de reposição hormonal

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TV – Trombose Venosa

TVP – Trombose Venosa Profunda

RESUMO

Defeito bioquímico hereditário em Fator V – Fator V de Leiden – em paciente jovem com trombose venosa profunda – estudo de caso

Defeitos bioquímicos hereditários da coagulação e fibrinólise têm sido associados com trombofilia. Um fator precipitante como o trauma pode desencadear a trombose venosa profunda (TVP) em pacientes jovens portadores da mutação FVR506Q ou Fator V de Leiden, a causa mais comum de trombofilia hereditária. Foi estudado um paciente de 15 anos, SBV, sexo masculino, que aos 13 apresentou TVP após trauma e seus pais assintomáticos. A família refere que os avós paternos do paciente morreram por consequência de trombose. Foram utilizados kits reagentes para atividade de Proteína C (PC), Proteína S (PS), Antitrombina III (AT III), determinação do fibrinogênio, Resistência à Proteína C Ativada (RPCA), Tempo de Protrombina com Atividade Enzimática e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (IL); e kits comerciais para purificação do DNA (GENTRA), e pesquisa do FVL e do FII G20210A por PCR. O paciente e seu pai apresentaram RPCA e a mutação FVR506Q em heterozigose. Os demais testes foram normais. Não foi identificada a mutação da protrombina G20210A na família. A mãe de teve todos os resultados normais. O FVL representa menor risco para trombose que outros defeitos como deficiência de PC, PS, ou AT III. No entanto, quando associado com outro distúrbio congênito ou adquirido, o risco para TV aumenta significativamente. S.B.V. teve pelo menos três fatores: o FVL, o exercício forçado e o trauma, que parecem ter tido papel desencadeador da TVP neste caso. Seu pai tem a mutação do FVL e forte história familiar, é recomendável que receba profilaxia em situações de risco, e o acompanhamento prospectivo. O trabalho indicou a necessidade de mais pesquisas em bioquímica da Hemostasia, do conteúdo gênico brasileiro pela sua grande diversidade étnica, das interações genéticas entre si e com o meio ambiente e suas manifestações fenotípicas.

1 INTRODUÇÃO

A homeostase vascular é mantida pela relação harmoniosa dos fatores reológicos, ou seja, a velocidade da corrente sanguínea, a viscosidade do sangue, as plaquetas, as proteínas plasmáticas da coagulação e anticoagulação e fatores vasculares, além de variáveis extravasculares – como contrações musculares e pressão arterial. O desequilíbrio em apenas um destes componentes pode comprometer todo o organismo, podendo até inviabilizar a vida (Lee et al., 1998).

Atualmente, os fenômenos tromboembólicos venosos e arteriais representam uma das primeiras causas de morbimortalidade no mundo ocidental, mais significativas que as causas hemorrágicas (Pantink-Kemp *et al.*, 2000; van der Sande *et al.*, 2001). Por conta disso e também dos avanços bioquímicos e moleculares da ciência, a hemostasia e a trombogênese têm sido cada vez mais estudadas (Cui *et al.*, 2000; Amitrano *et al.*, 2001). Constata-se a existência de estados pró-trombóticos, transtornos adquiridos ou hereditários que conferem hipercoagulabilidade ou estado trombofílico. Os indivíduos afetados têm mais propensão a tromboembolismo (TE) que a população em geral (Bick *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 2000; Amitrano *et al.*, 2001). O primeiro relato de hipercoagulabilidade parece ter sido em 1965, quando foi descrito um caso de uma família com tendência à trombose venosa (TV) e deficiência de antitrombina III (AT III) (Bick *et al.*, 1998).

A patogenia da TV é multifatorial, resulta da interação de variáveis ambientais e genéticas, tais como idade, obesidade, trauma, imobilização prolongada, cirurgia, trombose prévia, cirurgia ortopédica, gravidez, puerpério, uso de anticoncepcional oral, neoplasia, sepsis, cardiopatias, diabetes, câncer, trombofilia congênita ou adquirida e outras situações (Lens *et al.*, 2000; Voetsch *et al.*, 2000).

A trombose e a tromboembolia foram descritas pela primeira vez em 1856 por Virchow, que propôs a conhecida tríade de Virchow com alterações: a) na parede do vaso; b) na coagulação; c) no fluxo sanguíneo. A participação das plaquetas se estabeleceu no final do século XIX, e nas últimas décadas foram acumulados conhecimentos de grande importância a respeito dos mecanismos moleculares da hemostasia e trombose (Voet & Voet, 1995; Cui et al., 2000; Lens et al., 2000).

Quando o vaso sanguíneo sofre injúria por forças mecânicas ou devido a placas ateroscleróticas, as plaquetas são ativadas e aderem a estes sítios danificados. A ativação das plaquetas mais a exposição dos tecidos subendoteliais resultam na ativação da cascata da

coagulação, levando à conversão do fibrinogênio em fibrina. Forma-se um coágulo sangüíneo constituído de plaquetas, células do sangue, e fibrina obstruindo o lúmen do vaso. Este processo é conhecido como trombose. Caso o trombo se desprenda da parede do vaso e seja arrastado pela circulação constitui-se o êmbolo. Quando isto ocorre, pode-se desenvolver embolia pulmonar (EP), a complicação mais freqüente da TV e importante causa de morte hospitalar (Lee et al., 1998; Panting-Kemp et al., 2000).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre os mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes naturais para impedir que um coágulo se estenda além das necessidades fisiológicas. Deve ser autolimitado, localizado e transitório. Para isto, existem pelo menos quatro sistemas de regulação antitrombótica. O primeiro é o sistema da AT III, que inibe os fatores da coagulação ativados: IIa, Xa, IXa, XIa e XIIa. O segundo consiste no sistema da proteína C (PC), trombomodulina e proteína S (PS) (Clouse & Comp, 1986; Gewitz et al., 1986; Gale et al., 2000; Lourenço, 2000), que inibe os fatores Va e VIIIa, estes fazem parte da ativação de X e II. Os dois primeiros sistemas limitam a geração de trombina e fibrina. O terceiro é o da prostaciclina, que limita o depósito de plaquetas ao coágulo em formação, e o quarto é o sistema fibrinolítico, que causa dissolução do coágulo formado, através da digestão enzimática da fibrina.

Os distúrbios congênitos conhecidos atualmente incluem as deficiências de AT III, PC, PS, a resistência à proteína C ativada (RPCA), a protrombina mutante, recentemente descrita, disfibrinogenemias, a deficiência do plasminogênio e a hiperhomocisteinemia (Lazzari, 1998; Voetsch *et al.*, 2000; Amitrano *et al.*, 2001; Seligsohn & Lubetsky, 2001). Por outro lado, doenças adquiridas também podem interferir com o sistema da hemostasia, aumentando o risco trombótico, como por exemplo, a síndrome do anticorpo antifosfolípideo, estados infecciosos e o câncer (Castillo & Martinez-Villa, 1995; Bick, 2000).

A AT III foi primeiro descrita em 1939 por Brinkhous e colaboradores, e a sua deficiência, como referido anteriormente, foi associada à trombose em 1965 por Egeberg. A AT III é uma α -2-globulina, composta de 432 aminoácidos e massa molecular de 58 kDa, possui uma única cadeia polipeptídica sem pontes dissulfeto, com 15% de carboidratos. O gene para síntese de AT III localiza-se no cromossomo 1. A seqüência de aminoácidos revela muitas homologias com outras anti-serino-proteases. Acredita-se que as moléculas envolvidas na coagulação e fibrinólise evoluíram de um ancestral protease similar à tripsina. A síntese da AT III ocorre no fígado e em células endoteliais, e não requer vitamina K. É um inibidor de proteases de largo espectro. Inativa os fatores IIa, Xa,

IXa, XIa, XIIa e a calicreína, é, portanto, um poderoso inibidor da atividade pró-coagulante, através de sítio localizado próximo à porção carboxiterminal da molécula, que se liga à serina do sítio ativo destas proteases. A ação anticoagulante da AT III é intensificada pela heparina e mucopolissacarídeos, que se ligam a um resíduo ϵ -lisina na AT III, na sua porção aminoterminal, acelerando a velocidade de formação dos complexos inibidores da enzima, sem alterar a estequiometria da reação. Em presença de heparina, o alvo preferencial da AT III é a trombina, seguido pelo fator Xa. Normalmente, a AT III inativa 80% da trombina em indivíduos adultos (Stryer, 1995; Lee et al., 1998).

A diminuição em sua concentração plasmática e ou função resultam em estado pró-trombótico. Ao nascer e até os seis primeiros meses de vida encontra-se diminuída à metade, e em prematuros é ainda mais reduzida (González et al., 1996; Bick et al., 1998).

A deficiência congênita de AT III é uma doença autossômica dominante, sendo a maioria heterozigota, com AT III plasmática normal e anormal. Existem relatos de homozigotos, estado que parece ser incompatível com a vida (Castillo & Martinez-Villa, 1995; González et al., 1996; Bick et al., 1998; Lee et al., 1998). Clinicamente é caracterizada pela ocorrência de TV, e raramente arterial, precocemente na vida do indivíduo afetado, com grande prevalência familiar (Newman et al., 1998). São descritos dois tipos de deficiência de AT III. O tipo I, com redução da síntese da molécula e conseqüente redução em sua atividade funcional. Decorre, na maioria dos casos, de pequenas deleções no gene que codifica a AT III. Os testes antigênicos e funcionais encontram-se diminuídos. O tipo II consiste em uma deficiência funcional, devido a alterações na seqüência dos aminoácidos da molécula de AT III. Nestes casos a concentração antigênica da AT III se encontra normal, e a atividade funcional diminuída (González et al., 1996). O tipo II se divide em IIa (alteração no sítio ativo e no de ligação com a heparina) e IIb, afeta somente o sítio de ligação à heparina (Castillo & Martinez-Villa, 1995). Dada a grande variedade de defeitos genéticos que clinicamente se manifestam como deficiência de AT III, os testes funcionais são de escolha (Lourenço et al., 1995).

Os dados sobre prevalência existentes são controversos, variando entre 1 caso para 350 habitantes e 1 para 2000 a 5000 habitantes. Usualmente, a prevalência aproximada de deficiência hereditária de AT III em pacientes com tromboembolismo venoso varia de 3 a 8%. Segundo González (1996), mais da metade dos indivíduos que têm deficiência hereditária de AT III sofrem TV (os eventos arteriais são raros), sendo a maioria antes dos 40 anos de idade, e, não raro, na infância. Trombose espontânea ocorre em 40% dos casos, ou senão por algum fator desencadeante, como gravidez, puerpério, uso de

anticoncepcional oral, cirurgia ou traumatismos. O risco aumenta mais ainda com a idade avançada (González et al., 1996; Bick et al., 1998).

A AT III pode estar diminuída também por deficiência adquirida. Neste caso, ocorre em sepsis, coagulação intravascular disseminada, trombose venosa, embolia pulmonar, e eventos trombo-oclusivos difusos venosos ou arteriais, por consumo; na insuficiência hepática e neonatos, por baixa produção; uso de estrógenos e anticoncepcional oral, L-asparaginase, heparina; na pré-eclâmpsia e eclâmpsia; na síndrome nefrótica, e na doença inflamatória intestinal, por perda protéica. A terapia de reposição hormonal parece diminuir os níveis de AT III, mas não há dados concretos ainda (Lourenço et al., 1995; González et al., 1996; Bick et al., 1998).

A proteína C foi primeiro relatada em 1960. É uma glicoproteína plasmática da coagulação de massa molecular de 62 kDa. Circula como zimogênio de uma serino-protease que inativa os fatores Va e VIIIa. Sintetizada no hepatócito, consiste de duas cadeias polipeptídicas: uma leve com 155 aminoácidos, e outra pesada com 260 aminoácidos, ligadas por ponte dissulfeto. O gene para proteína C está no cromossomo 2 e já foi seqüenciado, sendo nove exons com 11 kb. A serina do sítio ativo e o sítio de clivagem da trombina estão presentes na cadeia pesada, enquanto que na cadeia leve encontram-se dez resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (chamados Gla). Este aminoácido provém da conversão vitamina-K-dependente de resíduos de ácido glutâmico, etapa crucial para a formação dos domínios Gla, que conferem atividade funcional a esta proteína, por ligação deste aminoácido aos íons cálcio, o qual faz a ponte entre as proteínas e a superfície fosfolipídica das plaquetas ou das células endoteliais. A molécula é peculiar pela presença de um grande número de semi-cisteínas e de ácido β -OH-aspártico, um aminoácido incomum de função desconhecida (Clouse & Comp, 1986; Gewitz et al., 1986; Voet & Voet, 1995; Stryer, 1996; Lee et al., 1998; Bick et al., 1998; Yang et al., 1998; Lourenço, 2000).

Uma vez ativada pelo complexo trombina-trombomodulina na superfície da célula endotelial, a proteína C passa a atuar como potente anticoagulante natural e degrada proteoliticamente as formas ativas dos fatores Va e VIIIa, em presença de íons cálcio, fosfolipídeos e de seu cofator, a proteína S. Deste modo, limita a geração dos fatores Xa e IIa (Figura 1).

Recentemente relatou-se um receptor endotelial da proteína C, que se expressa nas superfícies das células endoteliais. Esta proteína se liga com alta afinidade à proteína C e à proteína C ativada, incrementando a geração de proteína C ativada pelo complexo

trombina-trombomodulina na superfície da célula endotelial. Sua função parece ser aumentar a ativação da proteína onde a concentração de trombomodulina é baixa, nos vasos medianos e nos grandes vasos venosos e arteriais. No entanto, faltam ainda maiores esclarecimentos a respeito da função e do mecanismo de ação do receptor endotelial da proteína C no sistema da proteína C (Hermida et al., 1999; Taylor et al., 2001

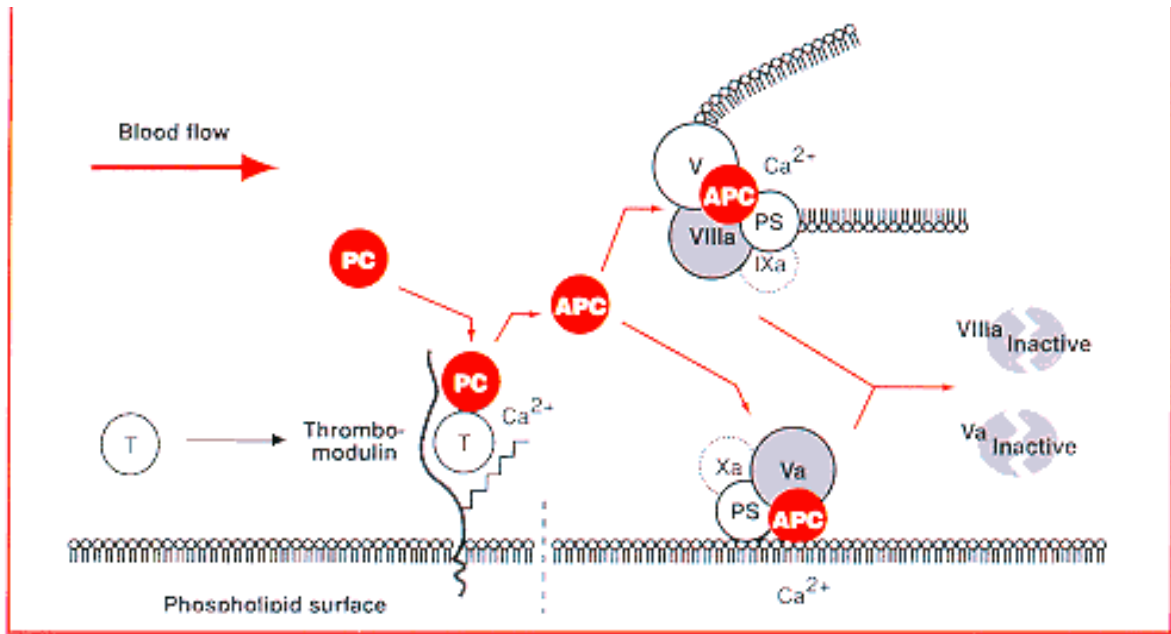


Figura 1 . Ativação e ação anticoagulante da proteína C.

A proteína C ativada também inibe a atividade pró-coagulante das plaquetas. É inibida no plasma pelo inibidor de proteína C ativada, inibidor do ativador do plasminogênio-3, e estimula a fibrinólise. Tem sido demonstrada também atividade anti-inflamatória e proteção contra endotoxemia por inibir a produção de citocinas macrófago-dependentes (Lourenço, 2000).

Os recém-nascidos têm uma concentração de proteína C 40% menor que os adultos e está ainda mais baixa em prematuros.

A deficiência hereditária da proteína C foi primeiro descrita em 1981 por Griffin. É uma doença autossômica dominante de dois tipos distintos: tipo I, no qual ocorre redução na síntese da proteína, com atividade funcional proporcionalmente diminuída. É a forma mais freqüente, e decorre de alterações genéticas, como mutações, deleções ou inserções. No tipo II, o teste antigênico é normal, porém a proteína C tem estrutura molecular defeituosa e, portanto, função comprometida (Bick et al., 1998; Lee et al., 1998). Existem descritas mais de vinte alterações na seqüência de aminoácidos, que resultam na perda de

atividade de serino-protease (González et al., 1996). Sua prevalência está entre 5 a 8% dos pacientes com trombose. A maioria dos pacientes é heterozigota. Quando em homozigose ou em dupla heterozigose, condição rara (1/200000 a 1/400000), a deficiência de proteína C está associada à púrpura fulminante ao nascimento, geralmente ocasionando a morte, se não diagnosticada e tratada com plasma fresco ou concentrado (Dahlbäck, 1995; Lourenço, 2000). Dos indivíduos heterozigotos para deficiência de proteína C, 75% apresentam trombose venosa profunda e ou embolia pulmonar, as manifestações mais comuns, antes dos 45 anos e ainda, mais da metade têm episódios recorrentes. Destes, aproximadamente 70% apresenta trombose espontânea e 30% associada com algum fator de risco, como ingestão de anticoncepcional oral, gravidez, traumatismos, puerpério ou cirurgia. A trombose arterial é rara na deficiência de proteína C (González et al., 1996; Bick et al., 1998; Lee et al., 1998; Mira et al., 2000).

Os anticoagulantes orais reduzem a proteína C mais rapidamente que os fatores pró-coagulantes, portanto, as primeiras horas de anticoagulação com cumarínicos são de grande risco trombótico principalmente para aqueles portadores de deficiência de proteína C. Recomenda-se a determinação dos valores funcionais durante o tratamento (Lee et al., 1998).

A proteína C diminui na insuficiência hepática, infecções graves, choque séptico, CID, uso de anticoagulantes orais, trombose aguda extensa ou quimioterapia, caracterizando a deficiência adquirida (Lee et al., 1998).

A propriedade anticoagulante da proteína C é intensificada pela presença de seu cofator proteína S (Figura 1), glicoproteína plasmática não enzimática, vitamina K-dependente, de aproximadamente 70 kDa, sintetizada no fígado principalmente, e secundariamente em células endoteliais, plaquetas e megacariócitos. É um polipeptídeo de cadeia única que contém 635 aminoácidos e 10 resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico. Os genes que a codificam estão no cromossomo 3. Descoberta em 1977 por DiScipio e colaboradores, a proteína S está no plasma na forma livre ativa (aproximadamente 40%) e ligada reversivelmente à proteína do complemento C4b, proteína S inativa (60%) (González et al., 1996; Lee et al., 1998; Garcia de Frutos, 1999).

A deficiência congênita da proteína S foi primeiro reportada em 1984, é autossômica dominante, sendo os homozigotos severamente afetados ao nascimento com púrpura fulminante. Em heterozigose, está associada com um alto risco trombótico, especialmente em pacientes jovens. O curso clínico da doença é similar à deficiência de proteína C, com maior probabilidade de trombose venosa, porém trombose arterial pode

acontecer. Cerca de metade das trombozes são espontâneas, e o restante está associada a fatores de risco tais como anticoagulantes orais, câncer, anticoncepcional oral, tabagismo, coagulação intravascular disseminada, insuficiência hepática ou tratamento com L-asparaginase, situações clínicas associadas com a deficiência adquirida de proteína S (Garcia de Frutos, 1999).

São descritos três tipos de deficiência hereditária de proteína S: tipo I, caracterizada por decréscimo total antigênico e proteína S livre; tipo II, deficiência qualitativa, com níveis de antígeno normais, devido a defeito funcional na proteína. O tipo III apresenta concentração de proteína S livre baixa, com níveis totais normais (Dahlbäck, 1995; Garcia de Frutos, 1999).

A incidência de deficiência de PS congênita é de 2 a 6% dos pacientes com trombose (Dahlbäck, 1995; Garcia de Frutos, 1999).

A partir do relato de Dahlbäck e colaboradores, (1993), descobriu-se um novo fator de risco para trombose: a RPCA. Trata-se da substituição de uma guanina por uma adenina (G1691A) no gene do fator V, ocasionando uma substituição de um resíduo de arginina no códon 506 por uma glicina na molécula do fator V, um dos sítios de ligação com a proteína C ativada. O fator resultante é chamado Fator V de Leiden (FVL) (Bertina *et al.*, 1994).

O fator V, proacelerina ou fator lábil é uma globulina de 330 kDa, sintetizada no fígado e megacariócitos. Deteriora-se rapidamente em sangue estocado com quelantes de cálcio. Contém de 10 a 20% de carboidratos e é inativado quando a penúltima galactose é removida. O fator V é ativado *in vivo* pela trombina, forma complexo chamado protrombinase com o fator Xa e íons cálcio, e, em superfície fosfolipídica de membrana plaquetária, o complexo transforma a protrombina em trombina (Lourenço, 1997; Lee *et al.*, 1998).

O fator Va é inativado pela proteína C e seu cofator a proteína S mediante proteólise, nas posições Arg 506, Arg 306 e Arg 679. A significância desta última clivagem não é conhecida. A clivagem na posição Arg 506 não inativa completamente o fator Va, é na segunda clivagem (Arg 306) que ocorre total inativação. No caso do FVL não ocorre a clivagem na Arg 506, então a clivagem na posição Arg 306 é pelo menos dez vezes mais lenta, causando uma resistência parcial à inativação (Lens *et al.*, 2000).

A mutação FVR506Q não só confere resistência parcial do fator Va à proteína C ativada, prejudicando a inativação do FVa, como também reduz a degradação do fator VIIIa porque esta requer a função sinérgica de cofator da proteína S e do fator V proteoliticamente modificados pela proteína C ativada (Dahlbäck, 1999). No entanto, o

fator V defeituoso conserva sua atividade pró-coagulante (Cui *et al.*, 2000). Os indivíduos afetados têm uma clara tendência trombótica, e essa enfermidade atualmente é o mais comum fator genético de risco para TV (Rosendaal *et al.*, 1995; Dahlbäck, 1997; Bick & Kaplan, 1998; Dahlbäck, 1999; Meyer *et al.*, 2001; Seligsohn & Lubetsky, 2001), mais que a deficiência de proteína C, proteína S ou AT III. Entretanto, cerca de 5% a 10% dos casos de RPCA não apresentam o FVL, caracterizando a resistência adquirida à PCA (Marcucci *et al.*, 1999). Os mecanismos para a RPCA adquirida ainda não são claros, entretanto pode se manifestar em condições fisiológicas como gravidez, pós-menopausa, terapia com anticoncepcional oral; ou patológicas como doenças inflamatórias (Glueck *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2001).

Descreveu-se recentemente duas mutações afetando outro sítio de clivagem de proteína C ativada na molécula do fator Va, (A306T e A306G). Porém, seu papel na trombofilia ainda não está claro. Alguns autores não encontraram relação destas mutações com trombose, enquanto que outros relataram que a concomitância da mutação R506Q com outra na posição Arg 306, aumentaria o risco trombótico (Castoldi *et al.*, 2000; Gale *et al.*, 2000).

A resistência à proteína C ativada devido ao FVL é uma doença autossômica dominante, com prevalência entre 2 a 7% na população em geral, mais comum em caucásios europeus e norte-americanos, variando no mundo ocidental, a Suécia com 15%, Alemanha com 10%, a Holanda, o Reino Unido e Estados Unidos com 3 a 5%. Na América do Sul, o Chile apresentou na população 3,8%, a Argentina, 5,1% (Buenos Aires), e o Brasil (São Paulo), 2%. Entre indivíduos de raça negra, asiáticos e indígenas americanos o FVL é praticamente inexistente (Rees *et al.*, 1995; Pereira Garcés *et al.*, 1996; Gregg *et al.*, 1997; Altman, *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999; Zago *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000; Lucotte & Mercier, 2001). Não se dispõe de dados acerca da prevalência do FVL no Nordeste.

O Fator V de Leiden surgiu há cerca de 30000 anos na região do Cáucaso depois das migrações do homem africano para a Europa (Zivelin *et al.*, 1997). Em ratos transgênicos com a mutação homóloga R504Q, Cui *et al.* (2000) relatam uma significativa variabilidade no fenótipo trombofílico dependendo da raça, porém bem mais marcantes que em humanos. Os autores lançam a hipótese de uma possível interação do FVL com algum outro recente fator evolutivo que explique a aparente tolerância desta mutação em humanos. Esta hipótese pode ser aventada, quando se observa que os fenômenos trombóticos têm gravidade e prevalência variadas por regiões e raças do mundo.

Recentemente se descreveu (Poort *et al.*, 1996) a variante alélica protrombina, Fator II G20210A, uma mutação na região 3' não codificante do gene da protrombina. Consiste na substituição de uma guanina por uma adenina na posição 20210. Não ocorre síntese de protrombina mutante, e sim maior estabilidade de seu RNA mensageiro, e um aumento da concentração plasmática de protrombina, o que parece ser o mecanismo pelo qual predispõe à ocorrência de trombose (Meyer *et al.*, 2001). O FVL e o Fator II G20210A contribuem para aumentar a trombose por estimular a formação do complexo protrombinase por diferentes vias (Howard *et al.*, 1997; Castoldi *et al.*, 2000).

A protrombina é o precursor da serino-protease trombina, o efetor final da cascata da coagulação, que resulta na formação da fibrina. Tem papel fundamental na retroalimentação da cascata, além de promover a agregação plaquetária, ativa direta ou indiretamente vários fatores de coagulação, e, ademais, participa da sua regulação porque ativa, ao se ligar à trombomodulina, o sistema da proteína C. Tem atividade pró-coagulante, anticoagulante e anti-fibrinolítica (Poort *et al.*, 1996; Lens *et al.*, 2000).

O gene do fator II tem 21 kb, está localizado no cromossomo 11. É organizado em 14 exons, separados por 13 introns, com uma região não transcrita que parece ter papel na regulação de sua expressão (Poort *et al.*, 1996; De Stefano *et al.*, 1999).

O papel da mutação da protrombina na TA ainda não é esclarecido, porém está claramente associada à TV. (Nguyen, 2000).

O gene do F II G20210A está presente em cerca de 1 a 3% da população caucasóide, e, assim como descrito para o FVL, não parece estar presente nas populações negras e asiáticas (Zago *et al.*, 1999). Em pacientes com história de trombose há relatos de uma prevalência em torno de 16 a 18%, sendo a segunda mais comum causa de trombofilia genética (Gerhardt *et al.*, 2000; Seligsohn & Lubetsky, 2001).

Portadores do alelo G20210A do Fator II têm risco aumentado para trombose, variando entre 2,7 a 3,8 vezes. A presença simultânea do FVL e da mutação G20210A do Fator II aumenta o risco para TV quando comparado com o risco entre portadores heterozigotos para FVL. Não está claro como isso acontece, se há interação entre as duas mutações, ou simplesmente pela sua presença concomitante (Poort *et al.*, 1996; De Stefano *et al.*, 1999).

A concentração plasmática do fibrinogênio é considerada fator de risco independente para trombose coronariana futura (Lourenço, 1997; Annichino-Bizzacchi, 1998; Lazzari, 1998).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática de 340 kDa, sintetizada no fígado, que é convertido à fibrina na via comum. Fator da coagulação que apresenta a maior concentração plasmática, é responsável juntamente com o hematócrito, pela viscosidade do sangue, e tem papel central na formação do trombo. É um reagente de fase aguda, está aumentado em várias situações clínicas, como tabagismo, obesidade, vida sedentária, trauma, hipertensão arterial, uso de ACO, infecções, e diabetes mellitus. Ainda não está claro o(s) mecanismo(s) de ação trombogênica de níveis de fibrinogênio, porém existem várias hipóteses: poderiam interferir com a aterotrombose por aumento na formação de fibrina, aumento na viscosidade sangüínea, redução na atividade fibrinolítica ou por promover a agregação plaquetária (Lourenço, 1977; Giannini, 1998; Lazzari, 1998).

As afibrinogenemias e as disfibrinogenemias, distúrbios hereditários na molécula do fibrinogênio, podem cursar com alterações quantitativas ou qualitativas na molécula, geralmente são manifestações hemorrágicas. Entretanto, raramente manifestam trombose (Remijn *et al.*, 2001).

Em situações raras, geralmente de intensa gravidade, o episódio trombótico tem relação direta com algum defeito bioquímico molecular na hemostasia, mas geralmente é de causa multifatorial. Entretanto, sua relação com os defeitos moleculares da hemostasia é cada vez mais investigada. Em breve revisão da literatura periódica recente, pode-se observar que há uma profusão de relatos de defeitos bioquímicos, geralmente hereditários, que poderiam predispor ou promover uma certa proteção à TVP. Descreve-se, dentre outros, a mutação na trombomodulina, defeitos moleculares na metileno-tetra-hidrofolato redutase e cistationa β -sintase, defeitos no inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), mutações no próprio fator V em outros resíduos, distúrbios hereditários na molécula do fibrinogênio, aumento de taxas plasmáticas de fatores da coagulação, papel dos EPCR – receptores endoteliais da Proteína C e polimorfismo no gene do fator XIII (FXIII Val34Leu), (Faioni *et al.*, 1999; Zago *et al.*, 1999; Aso *et al.*, 2000; Balogh *et al.*, 2000; Catto *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2000; Eitzman *et al.*, 2000; Bijmens *et al.*, 2001; Corral *et al.*, 2001; Remijn *et al.*, 2001; Seligsohn & Lubetsky, 2001; Taylor *et al.*, 2001). Têm-se ainda os fatores adquiridos, como anticorpos anticardiolipina, anticorpo lúpico, e outras situações que promovam estado de hipercoagulabilidade (Seligsohn & Lubetsky, 2001; Taylor *et al.*, 2001).

Os esforços conjuntos da biologia e da medicina para o seqüenciamento e compreensão do genoma humano, e elucidação dos mecanismos moleculares da Hemostasia se fazem necessários para que esta morbidade causadora de grandes perdas

sócio-econômicas venha a ser mais compreendida, tratada e, melhor, prevenida (Sykes *et al.*, 2000; Jimenez-Sanchez *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação de caso de um paciente trombofílico com TVP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação bioquímica laboratorial investigativa em amostras de sangue periférico de paciente (SBV) com história de TVP, de seus pais a fim de:

- 2.2.1 determinar o tempo de protrombina com atividade enzimática e tempo de tromboplastina parcial ativado;
- 2.2.2 determinar a atividade de PC, PS e AT III;
- 2.2.3 dosar o fibrinogênio;
- 2.2.4 pesquisar a RPCA;
- 2.2.5 pesquisar o Fator V de Leiden;
- 2.2.6 pesquisar a Mutação G20210A da Protrombina.

3 JUSTIFICATIVA

O custo social de morbimortalidade ligada à trombose é muito alto (Rosendaal, 1997; Hull *et al.*, 1998; Newman *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Birolini, 2001), torna-se, portanto, de grande relevância conhecermos a sua etiopatogenia.

O paciente SBV apresentou quadro de trombofilia, com trombose venosa profunda em idade precoce, fato incomum em sua faixa etária na população geral (Incidência..., 1999) e está geralmente relacionado com estado de hipercoagulabilidade. Este estado, chamado trombofilia, é determinado por distúrbios hereditários ou adquiridos da hemostasia passíveis de identificação laboratorial. A investigação laboratorial de familiares assintomáticos de pacientes atingidos com diagnóstico identificado se faz atualmente de grande relevância na profilaxia dos fenômenos tromboembólicos (Lourenço, 1997).

Com o grande avanço dos conhecimentos clínicos e moleculares nesta área, e automatização dos testes para sua avaliação, o custo sócio-econômico da prevenção da trombose é significativamente menor que o do tratamento.

4 CASUÍSTICA

O trabalho foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (2001). Os pacientes consentiram de forma livre e esclarecida, assinando o termo de consentimento, sendo que o menor de 16 anos (SBV) foi acompanhado pelos responsáveis, que assinaram seu consentimento. Este procedimento foi realizado segundo orientação recebida do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.

Estudou-se o caso de um paciente do Hospital das Clínicas, 15 anos, SBV, do sexo masculino, cor morena, filho único, residente com os pais na cidade do Recife, bairro da Imbiribeira. Aos 13 anos apresentou TVP de membro inferior esquerdo, em setembro de 1998. O episódio ocorreu durante jogo de futebol, após contusão no membro atingido.

O pai de SBV, 43 anos, cor morena, sem história de trombose, refere nunca ter se submetido a situação de risco trombótico, como cirurgia, tabagismo ou imobilização prolongada. Relata que seus pais (não estudados), avós de SBV, morreram de enfarto, a avó aos 58 anos, e o avô aos 78 anos; e uma tia paterna de SBV faleceu de causa desconhecida. SBV tem ainda vários tios paternos que não foram estudados por serem de difícil acesso. A mãe de SBV, 35 anos, não fumante, cor morena, não tem história de trombose. Nega uso de anticoncepcional oral em qualquer época de sua vida, episódio de aborto ou perda fetal. Só refere uma gravidez (a de SBV), e relata única cirurgia cesariana e ligadura de trompas aos 20 anos, sem intercorrências hemorrágicas ou trombóticas. Nega história familiar de trombose, com pais e irmãos vivos (não estudados), residentes no interior do Estado de Pernambuco. Além da gravidez e cirurgia cesareana bem como ligadura, nega exposição a quaisquer outro fator de risco para TV.

Os pais de SBV não faziam uso de medicação anticoagulante, ou antiagregante. O paciente SBV e os seus pais não tinham história conhecida de distúrbios neoplásicos, doença autoimune, terapia de reposição hormonal, tabagismo, diabetes, neoplasia, hepatopatia, etilismo, uso de anticoncepcional oral, obesidade, hiperlipidemia ou dislipidemia. Os dados foram obtidos em entrevista através de formulário anexo.

O exame clínico foi conduzido pela Hematologista que acompanha o caso de SBV, dra. Maria da Conceição Barros Correia, coorientadora neste trabalho.

5 MATERIAIS

5.1 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE PROTROMBINA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA, RAZÃO NORMALIZADA INTERNACIONAL - RNI, E FIBRINOGENIO DERIVADO

Kit reagente comercial da Instrumentation Laboratory (IL, Espanha), que continha tromboplastina cálcica.

5.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

Kit comercial reagente (IL) contendo tromboplastina parcial ativada.

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNA C

Kit comercial reagente (IL) que continha:

Ativador de PC, veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*

Substrato cromogênico

Plasma controle normal e anormal para proteína C.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNA S

Kit comercial reagente (IL) que continha:

Ativador de PC, veneno de *A. contortrix contortrix*

Plasmas deficiente e controle de proteína S

Tromboplastina bovina cálcica.

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ANTITROMBINA

Kit comercial reagente (IL) que continha:

Fator Xa bovino.

Substrato cromogênico e plasma calibrador para AT III.

5.6 PESQUISA DE RESISTÊNCIA À PROTEÍNA C ATIVADA

Kit reagente comercial (IL) que continha:

Plasma humano deficiente em fator V

Reativo para tempo de tromboplastina parcial ativada - TTPA

Proteína C Ativada humana em cloreto de cálcio

Cloreto de cálcio

Plasmas controle liofilizados com e sem RPCA.

5 7 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO - DNA

Kit comercial obtido da GENTRA.

5 . 8 PESQUISA DO FATOR V DE LEIDEN E DA PROTROMBINA MUTANTE G20210A

Tampões (Pharmacia)

Primers para FVL e PTCR. (GIBCO-BRL)

Enzima Taq Polimerase.(GIBCO-BRL)

Enzimas Recombinantes *Mnl*I (*Moraxella nonliquefaciens*), (Biolabs, Beverly), e *Hind*

III (*Haemophilus influenzae* R₃), (Life Technologies, Rockville)

Água Milli Q

Marcadores de peso molecular (GIBCO-BRL).

6 MÉTODOS

6 . 1 COLETA DAS AMOSTRAS

Conforme citado acima, foi respeitado o Código de Helsinque (2001), e a entrevista e coleta só ocorriam após o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis, se era menor.

No Laboratório de Hemostasia a etapa pré-analítica reflete no resultado da análise tanto quanto as variáveis do processo analítico em si, devido à natureza altamente reativa das plaquetas, à labilidade das proteínas plasmáticas da coagulação (Lee et al., 1998) e a complexidade das reações envolvidas nos testes. Além disso, a sensibilidade dos sistemas de reativos e equipamentos tem aumentado muito nos últimos anos (Leppänen & Dugué, 1998; Nelson, 1999).

As coletas de sangue foram realizadas no setor de flebotomia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas. No momento do contato com o paciente a abordagem inicial era um esclarecimento de que se tratava o trabalho. O paciente foi atendido em ambiente amigável, com privacidade para a entrevista, por cerca de meia hora até o momento da coleta. O estado geral era observado, para que a coleta de sangue ocorresse com o paciente tranquilo, devidamente motivado para participar do estudo e cuidar da própria saúde (Garrafa, 1999; Oselka & Troster, 2000).

O paciente SBV fazia uso de Marevan, medicamento antivitamina K (AVK) (Stryer, 1996). Tendo em vista que as proteína C e proteína S são vitamina K-dependentes, a coleta para AT III foi feita no curso do AVK, e o paciente foi orientado pelo seu médico a suspender a medicação oral por 21 dias (Mateo et al., 1998), sendo substituída, a critério médico, por heparina subcutânea. Este procedimento era orientado e supervisionado pela médica responsável pelo paciente, Dra. Maria da Conceição Barros Correia.

Uma amostra de cerca de 9 ml de sangue venoso foi extraída de veia periférica, usando uma seringa de plástico nova descartável, distribuiu-se a amostra num primeiro tubo estéril e descartável, onde eram colocados 4 ml para estudos em Biologia Molecular, e somente depois, era colocada a amostra em tubo estéril e descartável para 4,5 ml de vidro siliconizado para os ensaios da hemostasia. Os tubos (Becton & Dickinson, França) para hemostasia continham anticoagulante citrato trissódico a 3,8% (0.129 M), e, para a Reação em Cadeia da Polimerase, PCR, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), conservando a relação sangue/anticoagulante em 9:1 (NCCLS, 1998).

Após a coleta o sangue era centrifugado a 1500g por 15 min. Após a primeira centrifugação, o plasma citratado era separado cuidadosamente, para evitar a camada plaquetária, colocado em tubo de polietileno e centrifugado novamente nas mesmas condições. Após a segunda centrifugação, retirava-se o plasma evitando-se o fundo do tubo e colocava-se em microtubo plástico com tampa, para o congelamento, depois de devidamente rotulado com nome, data, e se era em uso de Marevan ou heparina, quando era o caso. As plaquetas deste plasma eram contadas em contador eletrônico de células (Coulter T 890, Beckman Coulter Inc., EUA). A dupla centrifugação foi realizada para se obter um plasma pobre em plaquetas. Quando presentes, as plaquetas interferem nos testes envolvendo fosfolipídeos (Lee et al., 1998). A contagem de plaquetas do plasma para provas em trombofilia deve ficar em, no máximo, 10000/mm³. Porém, o ideal é que fiquem abaixo de 5000/mm³ (Triplett, 1998; Nelson, 1999).

As proteínas em estudo podem ser conservadas a -20°C por um mês, e a -80°C por 6 meses (Greengard et al., 1994). Uma vez obtido o plasma pobre em plaquetas, este era congelado a -20°C até a realização dos testes. Neste momento, eram descongelados por 5 min em banho-maria a 37°C.

6.2 FUNCIONAMENTO DO ANALISADOR ACL 7000

Os testes foram realizados em coagulômetro modelo ACL 7 000 (IL), do Setor de Hemostasia do Laboratório Paulo Loureiro (Recife), que muito gentilmente cedeu suas

instalações e o coagulômetro para que fossem procedidas as análises. Este aparelho tem sistema totalmente automatizado de pipetagem de plasmas e reativos, diluições, realização das curvas de calibração, leitura das reações e impressão de resultados. Os testes coagulométricos eram lidos por nefelometria e ensaios de atividade por técnica cromogênica. As curvas de calibração eram realizadas com plasma calibrador comercial liofilizado (IL), assim como todos os reagentes utilizados, inclusive os plasmas de controle normal e anormal, que eram testados juntamente com os plasmas-teste, nas mesmas condições. Inicialmente, um TPAE e TTPA eram feitos para todas as amostras, para excluir anormalidades da Hemostasia ou eventual presença de anticoagulantes (Mateo, 1998). Desse modo, também já se determinava a taxa do fibrinogênio.

6.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA PROTEÍNA C

No equipamento, a proteína C do plasma-teste é ativada *in vitro* pela fração protéica derivada do veneno de serpente *A. contortrix contortrix*, e quantificada posteriormente utilizando um substrato cromogênico sintético. Valores normais: 69 a 134%. O teste é insensível a concentrações de heparina até 2 UI/ml.

6.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE PROTEÍNA S

No equipamento ACL 7000, proteína C ativada complexa, em presença de fosfolipídeos e cálcio, com seu cofator, a proteína S do plasma-teste, e degrada o fator Va. Esta degradação é monitorada usando o tempo de protrombina (TP). O grau de prolongação do tempo de protrombina fornece a medida da atividade funcional da proteína S. A partir de um plasma normal 100%, de um 50% e de um deficiente 0%, o equipamento realiza uma curva de calibração, calculando daí os valores das atividades das amostras. A faixa de linearidade da curva está entre 10% e 150%. O teste é insensível a concentrações de heparina até 2 UI/ml. Os valores normais estão entre 60% a 140%.

6.5 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ANTITROMBINA

O princípio do teste automatizado para AT III IL baseia-se na formação de um complexo entre a antitrombina presente na amostra de plasma e um excesso de heparina contida no reagente Fator Xa. Este complexo heparina-antitrombina reage por seu turno com um excesso de trombina formando um complexo inativo. O Fator Xa ativado residual cliva substrato cromogênico sintético. A paranitroanilina liberada é monitorada a 405 nm e é inversamente proporcional à taxa de AT III da amostra teste.

Os valores de atividade esperados são de 76% a 122%.

6.6 PESQUISA DE RESISTÊNCIA À PROTEÍNA C ATIVADA

No ACL 7000, amostras de plasma são pré-diluídas com plasma reagente deficiente em fator V e incubadas com a cefalina. A coagulação é disparada pela adição do cloreto de cálcio na ausência e presença de PCA e o tempo de formação do coágulo é registrado. A relação entre os tempos obtidos neste tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) especial com proteína C ativada (PCA) e sem PCA permite observar a prolongação normal do TTPA pela PCA. Na RPCA, a inativação do fator Va é ineficaz, de maneira que o TTPA com PCA é curto, e a relação é menor. Nos equipamentos modelo ACL, valores de relação entre 2 e 3,5 são considerados normais. No entanto, cada laboratório deve estabelecer seu ponto de corte, ou seja, resultados iguais ou abaixo dele são considerados positivos, acima dele são considerados sem a RPCA. Foi obtida a média de trinta pessoas normais de acordo com a orientação do fabricante, então esta média foi multiplicada por um fator fornecido por ele: 0,8. Assim, o ponto de corte ficou em 2,04. Admitiu-se que qualquer valor igual ou abaixo de 2,04 era tido como positivo, e acima disso, como negativo.

6.7 DETERMINAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO

O fibrinogênio foi derivado da reação do tempo de protrombina (II). Concentrações de 1 U/ml de heparina não interferem com o teste. Os valores normais estão entre 2,0 g/l a 4,5 g/l.

6.8 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração e purificação do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico total anticoagulado com EDTA, utilizando kit comercial obtido da GENTRA. O DNA purificado foi conservado a -80° C até o momento do PCR.

6.9 PESQUISA DO FATOR V DE LEIDEN E DA MUTAÇÃO G20210A DA PROTROMBINA

O FVL e a mutação G20210A da região de controle da protrombina (PTCR) foram detectados por PCR.

A amplificação foi realizada utilizando *primers* que flanqueiam a região do fator V codificadora do sítio de clivagem da Proteína C ativada, no caso do FVL, e a PTCR para a

protrombina mutante. A PCR foi realizada em 35 ciclos, consistindo em desnaturação a 94° C, anelamento a 60° C e extensão a 72° C.

Os produtos amplificados foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição: *MnI* para o FVL, e *Hind* III para a PTCR, a 37° C durante 12 h. Os produtos de amplificação e os de restrição foram visualizados em gel de agarose a 3%, após eletroforese a 120 V e coloração com brometo de etídeo. A documentação da corrida eletroforética foi feita através de fotos (Polaroid).

Os padrões eletroforéticos para o FVL esperados após o tratamento com as enzimas de restrição foram:

- ◆ Normais: 120 e 42 pares de bases (pb).
- ◆ Heterozigotos: 162, 120 e 42 pb.
- ◆ Homozigotos: 162 pb.

Os padrões eletroforéticos esperados para a mutação PTCR G20210A foram:

- ◆ Normais: 322 e 23 pb.
- ◆ Heterozigotos: 345, 322 e 23 pb.
- ◆ Homozigotos: 345 pb.

7 RESULTADOS

O estudo de TPAE e TTPA revelou resultados normais.

A avaliação da atividade plasmática de PC, PS, AT III e a dosagem do fibrinogênio apresentou-se dentro da faixa de normalidade (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades plasmáticas de Proteína C, Proteína S, Antitrombina III e dosagem do fibrinogênio em paciente jovem (SBV) com trombose venosa profunda e seus pais.

	Proteína C (%)	Proteína S (%)	Antitrombina III (%)	Fibrinogênio (g/l)
SBV	65	71	100	2,66
Pai	121	141	93	2,08
Mãe	137	125	108	2,99

O paciente SBV e o seu genitor apresentaram RPCA, enquanto que a mãe teve resultado negativo para RPCA (Figura 2).

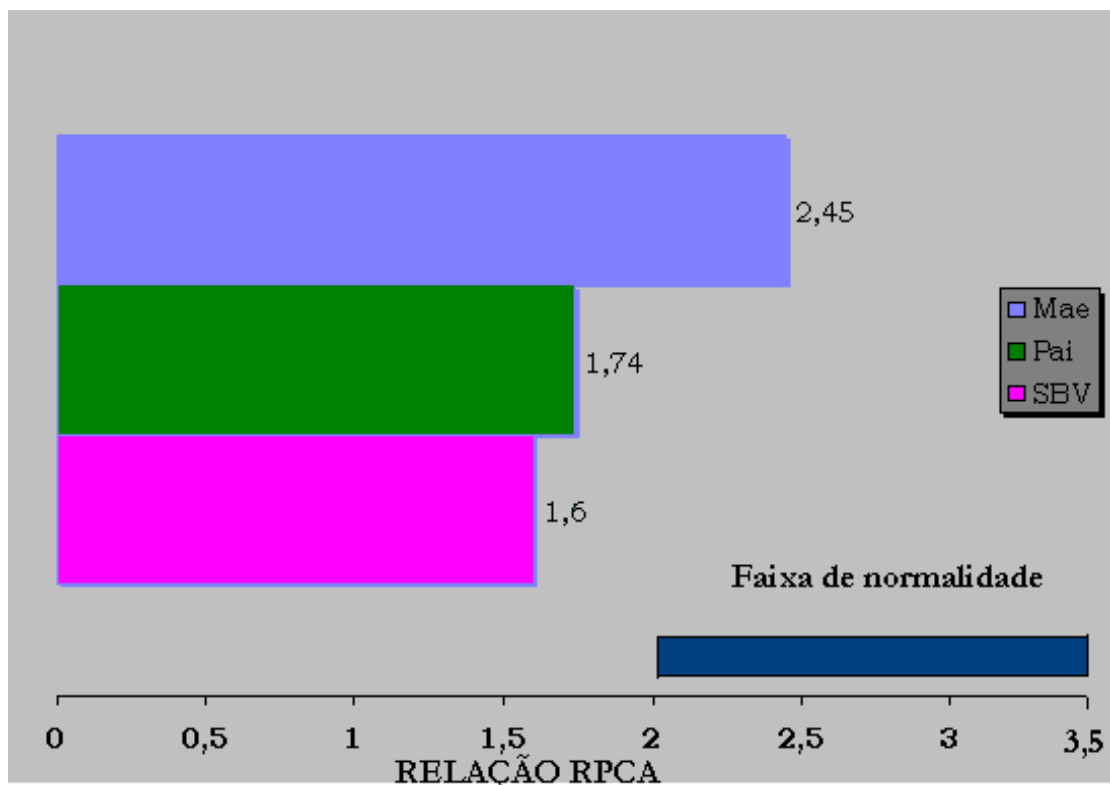


Fig 2. Resultado da Pesquisa de Resistência à Proteína C Ativada em paciente jovem (SBV) com trombose venosa profunda e seus pais.

O paciente SBV e seu genitor apresentaram padrões de migração em eletroforese em gel de agarose na pesquisa do FVL semelhantes: 162, 120 e 42 pb. A migração do DNA materno apresentou duas bandas: 120 e 42 pb (Figura 3).

Para a pesquisa do FII G20210A, os três membros da família apresentaram padrão de migração com 322 e 23 pb (Figura 4).

A pesquisa do FVL em SBV e pais evidenciou resultados compatíveis com a presença do alelo FVR506Q em heterozigose para o paciente atingido e seu pai (Figura 3) e ausência do FVL na sua mãe.

Não foi identificada a mutação G20210A da protrombina em SBV ou seus pais (Figura 4).

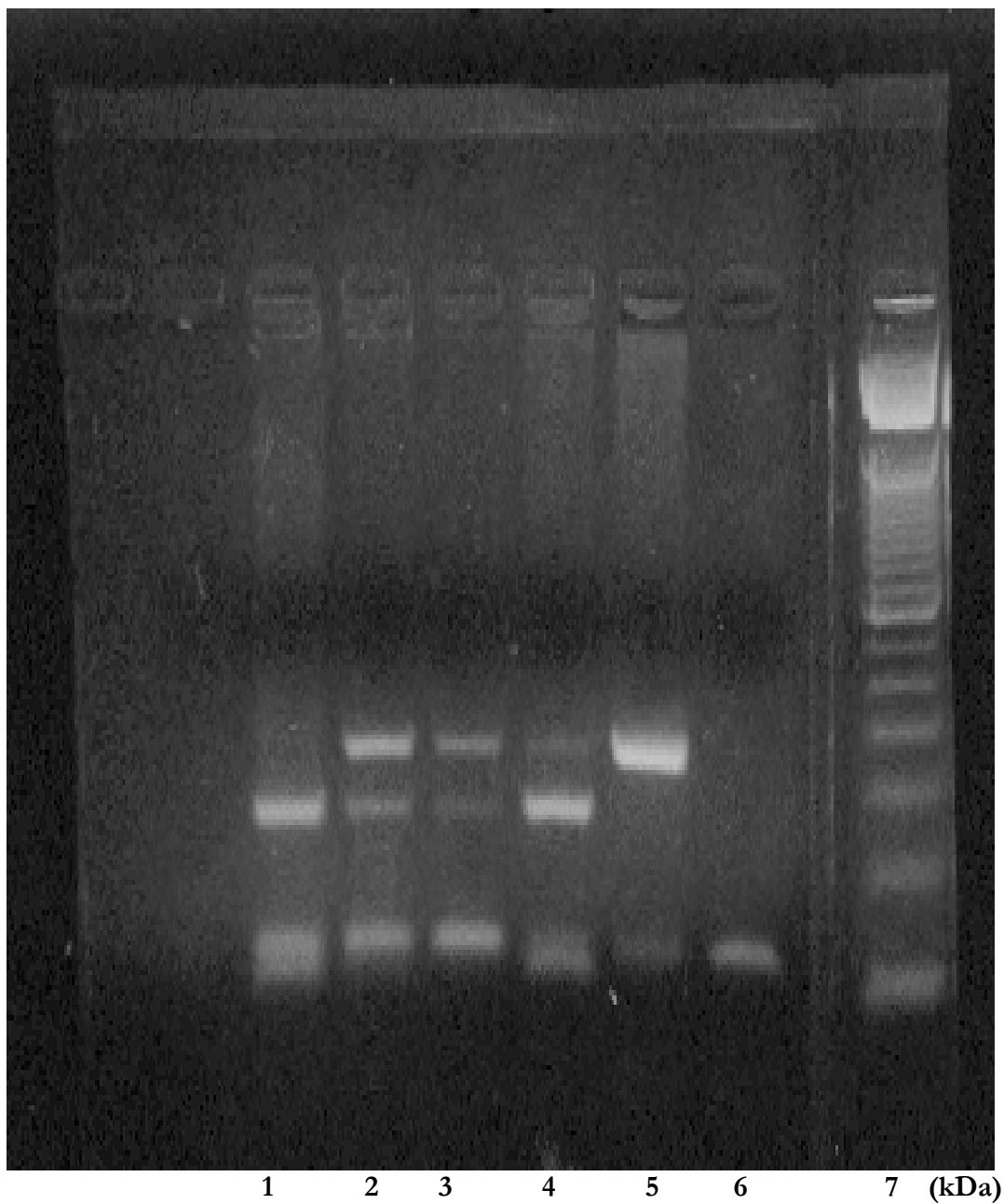


Figura 3. Pesquisa do Fator V de Leiden em paciente jovem com trombose venosa profunda e seus pais. (Raias de 1 a 7). Raia 1: mãe de SBV Raia 2: pai de SBV Raia 3: SBV Raia 4: controle heterozigoto. Raia 5: não digerido. Raia 6: Água Milli Q. Raia 7: Marcador de Peso Molecular.

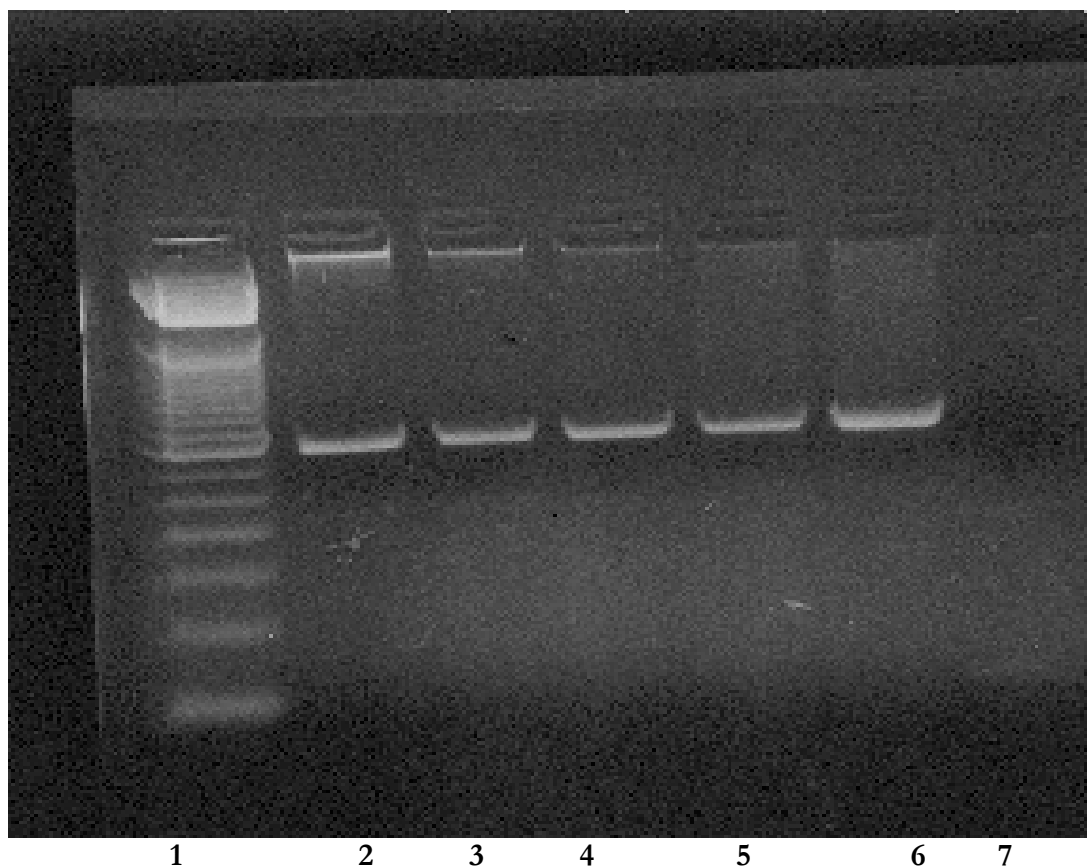


Figura 4. Pesquisa da mutação G20210A da protrombina em paciente jovem com trombose venosa profunda (SBV) e seus pais. Raias de 1 a 7. Raia 1: Marcador de Peso Molecular. Raia 2: Mãe. Raia 3: Pai. Raia 4: SBV. Raia 5: Controle negativo. Raia 6: Não digerido. Raia 7: Água Milli Q.

A Figura 5 sistematiza os resultados obtidos na avaliação laboratorial, clínica e epidemiológica da família de SBV. Os indivíduos estudados estão em algarismos arábicos. Os algarismos romanos indicam três gerações da mesma família. O paciente atingido por TV e FVL é o único caso comprovado de trombose na família, que relata a morte dos avós paternos de SBV por enfarto fatal, inclusive a avó aos 58 anos.

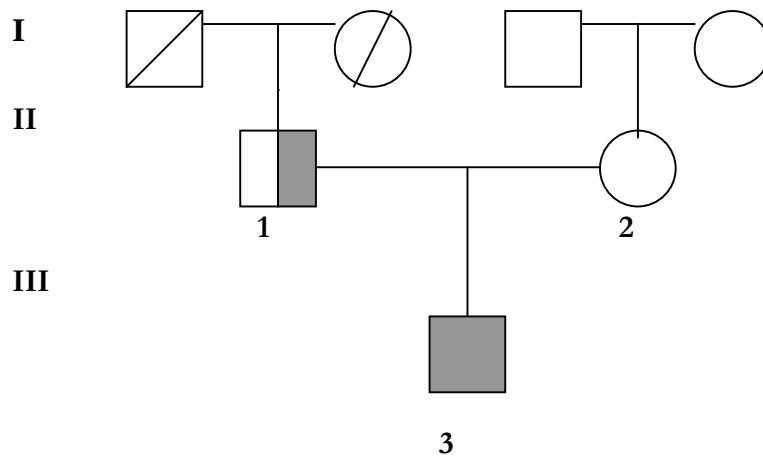


Figura 5. Três gerações da família com FVL. Os quadrados representam o sexo masculino, os círculos o sexo feminino, e a linha em diagonal simboliza ascendentes da família mortos. O símbolo meio-preenchido (1) representa o genitor com a mutação em heterozigose, sem história de trombose. A genitora (2) também sem história de trombose e sem o FVL. O símbolo cheio (3) representa SBV portador do FVL em heterozigose e episódio de TVP. Os indivíduos não-marcados com arábicos são os ascendentes de SBV, não estudados.

8 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada neste trabalho é de uso padronizado em laboratórios de análises clínicas, com kits reagentes comercialmente disponíveis no mercado. De um modo geral, para investigações de deficiências de PC e AT III, o teste que consegue abranger as deficiências do tipo I (deficiência de atividade, com quantidade de proteína normal), e do tipo II (deficiência de atividade e quantidade de proteína), é o ensaio de atividade de proteína, utilizado neste trabalho. A identificação de mutações nas deficiências hereditárias de anticoagulantes não é praticável por apresentarem considerável heterogeneidade genética (Greaves & Baglin, 2000).

Foi utilizada a técnica funcional para a pesquisa de deficiência de PS, embora a literatura relate possíveis interferências da eventual presença de anticorpos anticardiolipina e RPCA, ou ainda alguns ensaios que não fazem boa distinção entre PS livre (fisiologicamente ativa) e ligada com C4b do complemento (Greaves & Baglin, 2000). A metodologia funcional era a única disponível na ocasião do trabalho. Sugere-se o estudo futuro da PS antigênica na família.

A dosagem do fibrinogênio derivado é um ensaio reprodutivo e confiável, e a hiperfibrinogenemia tem valor predictivo para trombose arterial, embora ainda não esteja clara a relação do fibrinogênio com a TV.

A metodologia coagulométrica automatizada para RPCA, e a pesquisa por PCR do FVL e da mutação G20210A da protrombina utilizadas neste trabalho são razoavelmente robustas e reprodutíveis, consistindo nas técnicas atualmente aceitas para diagnóstico das trombofilias.

SBV, portador do FVL em heterozigose apresentou episódio de TVP após contusão em tenra idade. Entretanto, seu pai igualmente portador do alelo FVL até a idade atual não apresentou sintomas comprovados de trombose. A análise desta família evidencia a variabilidade das manifestações fenotípicas do FVL, e a sua baixa penetrância na população em geral (De Stefano *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2000). A propósito, a literatura mundial refere o FVL ora como mutação, ora como polimorfismo. Os conceitos de mutação e polimorfismo *sensu strictu* diferem entre si. Os compêndios de Genética e Bioquímica referem polimorfismo como “... alelo incomum que não causa doença”; ou ainda “... seqüência variável de DNA que pode existir sob várias formas diferentes, embora relacionadas entre si”. Em contrapartida, a definição de mutação é dada desde “modificação na seqüência do DNA”, que não difere muito do conceito dado a

polimorfismo, até “... alelo anormal que causa doença” (Fincham, 1994; Lewin, 1994; Garret & Grishan, 1995; Ross, 1997; Otto, 1998; Brown, 1999).

Apesar da controvérsia de nomenclaturas para referências ao FVL, ambos os termos podem ser utilizados: polimorfismo, pois está presente em mais de 1% da população em geral, e mutação pois é consenso o seu papel na TV (Franco, 2001); embora haja evidências de que portadores deste alelo podem ter diferentes evoluções clínicas (Heijmans *et al.*, 1998; De Stefano *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2000), sugerindo uma possível interação com outras variáveis surgidas ao longo da evolução humana. O FVL talvez não tenha sido sempre deletério. Em épocas pré-históricas, a sua alta prevalência talvez oferecesse alguma vantagem seletiva, pois os riscos de acidentes traumáticos e de hemorragias obstétricas eram grandes. Um leve estado de hipercoagulabilidade poderia conferir alguma proteção naquelas situações (Hajjar, 1994; Dahlbäck, 1995; Soares, 1999). No entanto, na vida contemporânea as doenças cardiovasculares são das primeiras causas de morte. Em relatório de 1997, a SUDENE mostra que a mortalidade por doenças do aparelho circulatório no Nordeste tem aumentado nos últimos anos (SUDENE, 1997). Em artigo recentemente publicado, Birolini (2001), descreveu as doenças cardiovasculares como a primeira causa de morte no mundo ocidental, seguida pelas doenças infecciosas e parasitárias, neoplasias e causas externas.

O FVL tem distribuição mundial geográfica e étnica, com significativa frequência entre caucasianos. Estudos de frequência do FVL nas populações asiáticas, negras e ameríndios não identificaram o alelo R506Q do FV da coagulação (Rees *et al.*, 1995; Zivelin *et al.*, 1997; Zago *et al.*, 1999; Luccote & Mercier, 2001). O Brasil tem origens étnicas bastante heterogêneas com variações entre as regiões do país, conforme foi feito o povoamento da América, a colonização e os movimentos migratórios ao longo dos séculos em que se forjou o povo brasileiro (Resende & Didier, 1996; Callegari-Jacques & Salzano, 1999; Santos *et al.*, 1999; Zago *et al.*, 1999). De maneira que em Pernambuco teríamos origens principalmente portuguesas, africanas, índias e holandesas (Santos & Guerreiro, 1995). Estudos bioquímicos, moleculares ou epidemiológicos locais das trombofilias permitirão melhor compreensão do papel deste alelo na população.

Portadores do FVR506Q em heterozigose têm um aumento de sete a oito vezes no risco para TV, enquanto que em homozigose o risco aumenta para oitenta vezes (Rosendaal *et al.*, 1995; Lens *et al.*, 2000). O risco de recorrência do episódio TE em heterozigotos ainda não está claro, e em homozigotos é aumentado (De Stefano *et al.*, 1999; Seligsohn & Lubetsky, 2001). O paciente SBV apresentou FVL em heterozigose, e sofreu

um episódio de TVP muito jovem, em coadjuvância com o trauma no membro atingido, mas não refere recorrência. De Stefano *et al.* (1999) estudaram 624 pacientes com história de TVP e encontraram que em heterozigotos para FVL o risco de recorrência não difere de pacientes com TVP sem a mutação. É necessário considerar que o paciente SBV tem acompanhamento médico e farmacológico profilático regular.

Como descrito acima, não se dispõe de dados atualmente sobre a penetrância do alelo FVL na região Nordeste. No entanto, a literatura mundial refere o FVL como uma mutação de baixa penetrância, e que parece interagir com fatores raciais e ambientais (Cui *et al.*, 2000). O pai de SBV, portador em heterozigose desta mutação, até o presente momento refere estar assintomático, sem situação de risco conhecida e sem profilaxia. Mais de 50% dos indivíduos heterozigotos para deficiência de PS, PC, AT III desenvolve trombose entre 15 e 40 anos, enquanto que 85% sofre um evento tromboembólico até os 50 anos. Já os portadores do FVL têm risco para trombose menor do que nas deficiências de PC, PS e AT III e podem permanecer assintomáticos, apresentando um primeiro episódio tromboembólico depois dos 60 anos. A avó paterna de SBV sofreu enfarto fatal aos 58 anos e poderia ser portadora do FVL, embora o papel do FVL nas tromboses arteriais ainda não seja totalmente esclarecido (Yang *et al.*, 1998; Celik *et al.*, 2001; Verdu *et al.*, 2001).

É importante recordar que a partir dos 45 anos aumenta o risco para trombose. Entretanto, investigação realizada em 1998 por Heijmans e colaboradores indicou que a heterozigose para FVL não afetou a mortalidade da população estudada. De qualquer modo, o pai de SBV não refere trombose, mas é portador do FVL, tem história familiar positiva, mais de dois parentes em primeiro grau com relato de trombose – seus pais (os avós de SBV) e SBV, tem possivelmente um risco relativo para acidentes tromboembólicos maior que os não portadores da mutação, aliado ao fato de que está alcançando a idade na qual o risco aumenta. A sugestão de terapêutica profilática em situações de risco, com acompanhamento regular deste indivíduo é indicada (Dahlbäck, 1995; Lensen *et al.*, 2000; Seligsohn & Lubetsky, 2001). A identificação de familiares dos pacientes afetados se mostra de importância epidemiológica e profilática, pois a relação custo-benefício da prevenção do TE é consideravelmente melhor que o seu tratamento. Ademais, abre-se a possibilidade de estudos prospectivos da evolução destes pacientes (van der Sande *et al.*, 2001).

Analisando o episódio de TV de SBV, pode-se remeter à conhecida tríade de Virchow:

- ◆ fator parietal - lesão endotelial;
- ◆ fator hemodinâmico – estase sangüínea;

- ◆ fator hemático (alteração da composição do sangue – hipercoagulabilidade).

SBV teve na contusão do membro inferior o trauma, onde há exposição de colágeno subendotelial pela lesão, liberação de ADP pelas células lesadas, o que leva à ativação plaquetária e alterações de carga elétrica da superfície da parede venosa (Brum, 1989).

SBV jogava futebol antes da contusão, ou seja, praticava exercício. Exercícios vigorosos podem promover trombocitose fisiológica reativa que pode persistir por uma ou duas semanas, resultado da mobilização de coleções de plaquetas extravasculares, sem ter necessariamente aumento na sua produção. No entanto, a plaquetometria se normaliza e complicações tromboembólicas ou hemorrágicas relacionadas com trombocitose transitória são raras em pacientes hematologicamente normais (Lee *et al.*, 1998). Entretanto, a mutação FVR506Q confere uma maior estabilidade ao fator Va e ao fator VIIIa. Lee *et al.*, (1998) relatam que plaquetas “em repouso” ligam apenas traços de FV, e plaquetas ativadas ligam quantidades significativas desse fator e o ativam especificamente. Como citado anteriormente, o trauma pode promover lesão endotelial e ativação plaquetária (Gewitz *et al.*, 1986). SBV sofreu uma contusão, onde possivelmente houve mobilização de coleções plaquetárias pós-exercício, e sua ativação por fatores teciduais liberados. Desse modo, as plaquetas em maior quantidade e ativadas, podem ter promovido ativação direta do fator V, que no caso de SBV, é resistente à ação da PCA, o que teria ocasionado uma maior hipercoagulabilidade, e um microambiente favorável para a formação de trombos.

O fator V é um regulador central da hemostasia. É ativado proteoliticamente a fator Va pela trombina, e interage com o fator Xa e cálcio, em superfície fosfolipídica de membrana plaquetária para formar o complexo protrombinase. Este complexo converte a protrombina em trombina (Lee *et al.*, 1998; Lourenço, 1997; Yang *et al.*, 1998). O fator Va é alvo proteolítico da PCA, que inativa fator Va tanto de origem plaquetária como plasmática. A ação inativadora da PCA sobre o FVa é pré-requisito para a inibição do fator VIIIa (Lee *et al.*, 1998; Gale *et al.*, 2000). Como descrito acima, o FVL resiste a essa ação inativadora da PCA, levando a um estado de hipercoagulabilidade (Seligsohn & Lubetsky, 2001).

Cerca de 25% dos portadores do FVL desenvolvem TV e/ou TEV antes dos 40 anos. Fatores ambientais e adquiridos como o trauma, o anticorpo lúpico, a anticardiolipina e outros podem ter papel desencadeante da TV em pacientes jovens com o FVL, sendo a extremidade inferior e pelve os locais mais frequentes da TV (Brum, 1989; González *et al.*,

1996; Tierney *et al.*, 1999). Os coágulos surgidos nas veias profundas de extremidades inferiores podem se desprender e provocar a EP, complicação mais freqüente da TV e importante causa de internação e morte. O paciente SBV sofreu TVP de membro inferior esquerdo, sem embolização (Hull *et al.*, 1998; Tierney *et al.*, 1999; Incidência..., 1999).

A concomitância do FVL com a mutação da protrombina G20210A leva a um estado de alto risco trombótico (De Stefano *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2001). A mutação da região não transcrita do gene da protrombina está associada a taxas elevadas de Fator II plasmático, e representa o segundo mais freqüente fator de risco para TV, precedido pelo FVL (Poort *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2001).

Não foi identificada a mutação da protrombina G20210A em SBV ou seus pais. Este achado teria relação com a evolução clínica de SBV e seu pai, até agora assintomático e SBV sem recorrência. Como citado acima, o risco para recorrência de TV em pacientes heterozigotos para FVL parece ser semelhante aos não-portadores da mutação (De Stefano *et al.*, 1999), embora estudos prospectivos tenham mostrado que a evolução destes pacientes pode ser variável. É importante ressaltar que maiores investigações são necessárias.

9 CONCLUSÕES

- ◆ Não foi identificada a mutação do gene da protrombina G20210A em SBV e seus pais.
- ◆ Não foram identificadas nas amostras estudadas anormalidades de atividade de PC, PS ou ATIII, bem como no TP AE, TTPA e na taxa de fibrinogênio.
- ◆ Paciente SBV e seu genitor apresentaram resultados compatíveis com a mutação FVR506Q em heterozigose, enquanto em sua genitora não foi identificada a mutação.
- ◆ O paciente SBV e seu pai apresentaram fenótipo de RPCA. Sua mãe apresentou fenótipo negativo para RPCA.
- ◆ A herança genética de SBV para o FVL provavelmente vem do lado paterno. O estudo dos seus avós paternos não foi realizado, mas possivelmente um dos membros (ou ambos) poderia ter sido portador da mutação FVR506Q, já que a avó morreu aos 58 anos, e a família relata o enfarto como causa.
- ◆ É provável que a concomitância e/ou interação da mutação FVR506Q (FVL) com os fatores ambientais - contusão e exercício - tenham desempenhado papel importante na etiopatogênese do evento de TVP de SBV.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Fatores de risco relacionados a hemostasia – aterosclerose e infarto do miocárdio. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO GRUPO CLAHT – Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasis y Trombosis, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** p.51-56, 1998.

ALTMAN, R.; SCHÖDER, W.; GRIMM, R.; et al. Molecular risk factors (FV Leiden, C677T, G20210A Pro-Thrombin) in patients with arterial and venous thrombosis from Argentine. In: XVII INTERNATIONAL CONGRESS THROMBOSIS AND HEMOSTASIS. Aug. 1999, Washington. **Resumo**, CD Room, International Society on Thrombosis and Haemostasis - ISTH 1999 Annual Meeting.

AMITRANO, L.; BRANCACCIO, V.; GUARDASCIONE, M. A.; et al. High prevalence of thrombophilic genotypes in patients with acute mesenteric vein thrombosis. **American Journal Gastroenterology**, v. 96, n. 1, p. 146-149, Jan. 2001.

ASO, Y.; FUJIWARA, Y.; TAYAMA, K.; et al. Relationship between soluble thrombomodulin in plasma and coagulation or fibrinolysis in type 2 diabetes. **Clinical Chemical Acta**, v. 301, n. 1-2, p. 135-145, Nov. 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, Ago. 2000.

BALOGH, I.; SZÔKE, G.; KÁRPÁTI, L.; et al Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. **Blood**, v. 96, p. 2479-2486, 2000.

BERTINA, R. M.; KOELEMAN, B. P. C.; KOSTER, T.; et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, v. 369, p. 64-67, May. 1994.

BICK R, L. Antiphospholipid – thrombosis Syndromes. **Biomedical Progress**, v.13, p. 41-45, 2000.

BICK, R. L.; KAPLAN, D. Syndromes of thrombosis and hypercoagulability congenital and acquired thrombophilias. **Clinical Applied Thrombosis/Hemostasis**, Filadélfia, v. 4, n. 1, p. 25-50, 1998.

BIJNENS, A. P.; NGO, T. H.; GILS, A.; et al Elucidation of the binding regions of PAI-1 neutralizing antibodies using chimeric variants of human and rat PAI-1. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, n. 5, p. 866-874, Mar. 2001.

BIROLINI, D. Causas de mortalidade no mundo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 1-23, 2001.

BROWN, T. A. **Genética: um enfoque molecular**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

BRUM, O. **Angiologia Básica**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1989, p. 133-147.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 51, n. ¾, p. 166-171. May/Aug. 1999.

CASTOLDI, E.; SIMIONI, P.; KALAFATIS, M.; et al. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. **Blood**, v. 96, n. 4, p. 1443-1448, Aug. 2000.

CASTILLO, J.; MARTINEZ-VILA, E. **Trombosis, Fármacos Antitrombóticos y Enfermedad cerebrovascular**. Barcelona. J. Uriach & Cia S.A. 1995, p. 21-35, 103-111, 145-165, 43-52, 321-328.

CATTO, A. J.; KOHLER, H. P.; COORE, J.; et al. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. **Blood**, v. 93, n. 3, p. 906-908, Feb. 1999.

CELIK, S.; OVALI, E.; BAYKAN, M.; et al Factor V Leiden and its relation to left ventricular thrombus in acute myocardial infarction. **Acta Cardiologica**, v. 56, n. 1, p. 1-6, Feb. 2001.

CHAN, D. K.; HU, G.; TAO, H.; et al A comparison of polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene between Chinese and Caucasians in Australia. **British Journal Haematology**, v. 111, n. 4, p. 1253-1255, Dec. 2000.

CLOUSE, L. H.; COMP, P. C. The regulation of hemostasis: the Protein C system. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 20, p. 1298-1304, May. 1986.

CORRAL, J.; INIESTA, J. A.; GONZALEZ-CONEJERO, R.; et al Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 2979-2982, May. 2001.

CUI, J.; EITZMAN, D. T.; WESTRICK, R. J.; et al. Spontaneous thrombosis in mice carrying the factor V Leiden mutation. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4222-4226, Dec. 2000.

DAHLBÄCK, B.; CARLSSON, M.; SVENSSON, P. J. 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**, v. 90, n. 3, p. 1004-1008, Feb, 1993.

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

DAHLBÄCK, B. Resistance to Activated Protein C caused by the Factor V R⁵⁰⁶Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 1, p. 483-488, 1997.

DAHLBÄCK, B. Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FV R506Q mutation. **Seminars Thrombosis Hemostasis**, v. 25, n. 3, p. 273-289, 1999.

DECLARATION OF HELSINKI WORLD MEDICAL ASSOCIATION: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. **BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION**. v. 79, n. 4, p. 373-374, Switzerland, 2001.

DE STEFANO, V.; MARTINELLI, I.; MANNUCCI, P. M.; et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 11, p. 801-806, Sep. 1999.

ETZMAN, D. T.; WESTRICK, R. J.; NABEL, E. G.; et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 586-591, Jan. 2000.

FAIONI, E. M.; FRANCHI, F.; BUCCIARELI, M.; et al. Coinheritance of the HR2 haplotype in the Factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (Factor V Leiden). **Blood**, v. 94, n. 9, p. 3062-3066, Nov. 1999.

FINCHAM, J. R. S. **Genetic Analyses Principles, Scope and Objectives**. London: Blackwell Science Ltda, 1994, p. 147.

FRANCO, R. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <maremilia@hotmail.com> em 11 jun. 2001.

GALE, A. J., HEEB, M. J., GRIFFIN, J. H. The autolysis loop of activated protein C interacts with factor Va and differentiates between the Arg 506 and Arg 306 cleavage sites. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 585-593, July. 2000.

GARCIA DE FRUTOS, P. Protein S: from function to pathology. **Revista Iberoamericana de Trombose e Hemostasia**, v. 12(Supl. 1), p. 139-145, 1999.

GARRAFA, V. Reflexões Bioéticas Sobre Ciência, Saúde e Cidadania. **Bioética**, v. 7, p. 13-20, 1999.

GARRET, R. H., GRISHAN, C. M. **Biochemistry**. Orlando: Saunders College Publishing, 1995, p. 928, 1076.

GERHARDT, A.; SCHARF, R. E.; BECKMANN, M. W.; et al. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 6, p. 374-380, Feb. 2000.

GIANNINI, S. D. **Aterosclerose Dislipidemias Clínica e Terapêutica: Fundamentos Práticos**. São Paulo: BG Cultural, 1998, p. 88-90.

GLUECK, C. J.; WANG, P.; FONTAINE, R. N.; et al. Effect of exogenous estrogen on atherothrombotic vascular disease risk related to the presence or absence of the factor V Leiden mutation (Resistance to Activated Protein C). **The American Journal of Cardiology**, v. 84, p. 549-554, Sep. 1999.

GONZÁLEZ, S. Q.; MARTÍNEZ-MURILLO, C. **Manual de Hemostasia y Trombosis**_México: Editorial Prado, 1996.

GREAVES, M.; BAGLIN, T. Laboratory testing for heritable thrombophilia: impact on clinical management of thrombotic disease. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 4, p. 699-703, 2000.

GREENGARD, J. S.; EICHINGER, S.; GRIFFIN, J. H.; et al. Variability of thrombosis among homozygous siblings with Resistance to Activated Protein C due to an Arg→Gln mutation in the gene for Factor V. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 23, p. 1559-1562, Dec. 1994.

GREGG, J. P., YAMANE, A. J., GRODY, W. W. Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. **American Journal Medical Genetic**, v. 73, n. 3, p. 334-336, Dec, 1997.

HAJJAR, K. A. Factor V Leiden – an unselfish gene? **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 23. P. 1585-1587, Dec. 1994.

HEIJMANS, B. T.; WESTENDORP, R. G.; KNOOK, D. L.; et al. The risk of mortality and the factor V Leiden mutation in population-based cohort. **Thrombosis and Hemostasis**, v. 80, n. 4, p. 607-609, Dec. 1998.

HERMIDA, J.; MONTES, R.; ROCHA, E. Fisiopatología del receptor endotelial de la proteína C y su papel en la trombosis arterial y venosa. **Revista Iberoamericana de Trombosis e Hemostasia**, v. 12, supl. 1, p. 147-150, 1999.

HOWARD, T. E.; MARUSA, M.; CHANNEL, C.; et al. A patient homozygous for a mutation in the prothrombin gene 3'-untranslated region associated with massive thrombosis. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 8, n. 5, p. 316-319, July. 1997.

HULL, R. D.; PINEO, G. F. 1997 ICATH Meeting Prophylaxis of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: current recommendations. **Clinical Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 4, n. 2, p. 96-104, 1998.

INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA. **Revista Iberoamericana Trombose e Hemostasia**, v. 12, n. 2, p. 49-55.

JIMENEZ-SANCHEZ, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. *Human disease genes. Nature*, v. 409, p. 853-855, Feb. 2001.

KUNS, G.; IRELAND, H.; STUBBS, P.; et al. Identification and characterization of a thrombomodulin gene mutation coding for an elongated protein with reduced expression in a kindred with myocardial infarction. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 569-576, Jan. 2000.

LAZZARI, M. A. Marcadores Trombóticos: Epidemiología de factores de riesgo pertenecientes al sistema de hemostasia In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO GRUPO CLAHT – Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasis y Trombosis, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, p. 47-56, 1998.

LEE, R. G.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; et al. Wintrobe Hematologia Clínica. São Paulo: Manole, 1998, 2 v., p. 564-567, 615-653, 1526-1527, 1622-1623, 1664-1681.

LENS. D.; OTERO, A. M.; COTIC, G.; et al. Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeiros casos de factor V Leiden y protrombina G20210A en Uruguay.

Revista Medica del Uruguay, v. 16, n. 1, p. 39-44, Mayo 2000.

LENSEN, R. P.; BERTINA, R. M.; DE RONDE, H.; et al. Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with Factor V Leiden. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 6, p. 817-821, Jun. 2000.

LENSEN, R. P. M.; ROSENDAAL, T.; KOSTER, C. F.; et al. Apparent different thrombotic tendency in patients with Factor V Leiden and protein C deficiency due to selection of patients. **Blood**, v. 88, n. 11, p. 4205-4208, Dec. 1996.

LENSEN, R. P. M.; ROSENDAAL, F.; VANDENBROUCKE, J.; et al. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 4, p. 939-945, Sep. 2000.

LEPPÄNEN, E.; DUGUÉ, B. When to collect blood specimens: midmorning vs fasting samples. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 2537-2542, 1998.

LEWIN, B. **Genes V**. New York: Oxford University Press Incorporations, 1994, p. 61 e 135.

LOURENÇO, D. M. Proteína C. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22 (suplemento 2), p. 335-337, 2000.

LOURENÇO, D. M. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. **Revista da Sociedade de Cardiologia Estado de São Paulo**, v. 3, 1997.

LOURENÇO, D. M. Dosagem da antitrombina III usando o substrato cromogênico Tos-Gly-Pro-Arg-NAN, em diversas situações patológicas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 373-378, Nov-Dez. 1995.

LUCCOTE, G.; MERCIER, G. Population genetics of Factor V Leiden in Europe. **Blood Cells Molecular Disorders**, v. 27, n. 2, p. 362-367, Mar, 2001.

MATEO, J.; OLIVER, M.; BORRELL, M.; et al.; and the EMET Group. Increased risk of venous thrombosis in carriers of natural anticoagulant deficiencies. Results of the family studies of the Spanish Multicenter on Thrombophilia (EMET Study). **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 9, n. 1, p. 71-78, 1998.

MEYER, G.; EMMERICH, J.; HELLEY, D.; et al. Factors V Leiden and II 20210 A in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis. **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1, p. 12-15, Jan. 2001.

MONTELLATO, A., CABRINI, C., CATELLI JÚNIOR, R. **História Temática Tempos e Culturas**. São Paulo: Scipione, 2000, p. 132-133.

MIRA, Y.; AZNAR J.; ESTELLÉS, A.; et al. Congenital and acquired thrombotic risk factors in women using oral contraceptives: clinical aspects. **Clinical Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 6, n. 3, p. 162-168, July. 2000.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Document H21-A1**. Collection Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays, 3^a ed. Approved Guideline, v. 11, n. 23, 1998.

NELSON, D. E. Current considerations in the use of the APTT in monitoring unfractionated heparin. **Clinical Laboratory Science**, v. 12, n. 6, p. 359-363, Nov/Dec. 1999.

NEWMAN, R. S.; SPEAR, G. S.; KIRSCHBAUM, N. Postmortem DNA diagnosis of Factor V Leiden in a neonate with systemic thrombosis and probable antithrombin deficiency. **Obstetrics & Gynecology**, v. 92, n. 4, part 2, p. 702-705, Oct. 1998.

NGUYEN, A. Review and management of patients with the prothrombin G20210A polymorphism. **Clinical Applied Thrombosis Hemostasis**, v. 6, n. 2, p. 94-99, Apr. 2000.

OTTO, P. G.; OTTO, P. A.; FROTA-PESSOA, O. **Genética Humana e Clínica**. São Paulo: Roca, 1998, p. 118.

OSELKA, B.; TROSTER, E. J. Aspectos éticos no atendimento médico do adolescente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 306-307, 2000.

PANTING-KEMP, M. D.; GELLER, S. E.; NGUYEN, T.; et al. Maternal deaths in an urban perinatal network, 1992-1998. **American Journal Obstetrics Gynecology**, v. 183, n. 5, p. 1207-1212, Nov. 2000.

PEREIRA GARCÉS, J.; QUIROGA, G. T.; GOYCOLEA, M. M.; et al. Resistencia a la proteína C activada: estudio de laboratorio y prevalencia del defecto en la población chilena. **Revista Médica Chile**, v. 124, n. 6. P. 663-668, Jun. 1996.

POORT, S. R.; ROSENDAAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. A common genetic variation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, v. 88, n. 10, p.3698-3703, Nov. 1996.

REES, D. C., COX, M., CLEGG, J. B. World distribution of factor V Leiden. **The Lancet** v. 346, p. 1133-1134, Oct, 1995.

REMIJN, J. A.; WU, Y. P.; IJSSELDIJK, M. J.; et al. Absence of fibrinogen in afibrinogenemia results in large but loosely packed thrombi under flow conditions. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, n. 4, p. 736-742, Apr. 2001.

RESENDE, A. P.; DIDIER, M. T. **A construção da modernidade**. São Paulo: Atual, 1996, p. 91.

ROSENDAAL, F. R.; KOSTER, T.; VANDERBROUCKE, J. P.; et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance. **Blood**, v. 85, n. 6, p. 1504-1508, Mar. 1995.

ROSS, D. W. **Introdução à Medicina Molecular**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, p. 96-97.

SALZANO, F. M., Genetics and evolution of Brazilian human populations – Retrospect and prospect. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 51, n. 3/4, p. 149-150, May/Aug. 1999.

SANCHEZ, S. L.; SCHRÖDER, W.; VIZCAINO, G.; et al. The prevalence of three molecular risk factors (G20210) prothrombin, C677T MTHFR, FV Leiden) in various ethnic groups in Costa Rica and Venezuela. In: XVII International Congress Thrombosis and Hemostasis. Aug. 1999, Washington. **Resumo**, CD Room, International Society on Thrombosis and Haemostasis - ISTH 1999 Annual Meeting.

SANTOS, S. E. B.; SANTOS, A. K. C. R.; SANTOS, E. J. M.; et al. The Amazonian microcosm. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 51, n. 3/4, p. 181-182, May/Aug. 1999.

SANTOS, S. E. B.; GUERREIRO, J. F. The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon Region. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, n. 2, p. 311-315, 1995.

SCHWARZ, T.; SIEGERT, G.; MIKULIN, U.; et al. Patients with persistent APC-resistance without factor V Leiden mutation. **Vasa**, v. 30, n. 1, p. 24-27, Feb. 2001.

SELIGSOHN, U.; LUBETSKY, A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 16, p. 1222-1231, April, 2001.

SOARES, R. P. S. Hemofilia A: a importância das inversões do gene do fator VIII na investigação de portadoras e incidência de mutações ligadas à trombofilia. 1999. 153p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina USP, São Paulo. Dat. Def. 2000. **Resumo disponível em:** <http://www.bireme.com.br>. Acesso em 25/10/2000.

SOUTO, J. C.; ALMASY, L.; BORRELL, M., M.; et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. **American Journal Human Genetic**, v. 67, p. 1452-1459, 2000.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 236-241.

SUDENE. Geografia da Mortalidade Proporcional (1979-1990). Recife, 1997. **SÉRIE DIAGNÓSTICO DE SAÚDE NO NORDESTE Nº 1**, p. 99-101.

SYKES, T. C.; FEGAN, C.; MOSQUERA, D. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 6, p. 300-306, Dec. 2000.

TAYLOR, F. B.; PEER, G. T.; LOCKHART, M. S.; et al. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. **Blood**, v. 97, n. 6, p. 1685-1688, Mar. 2001.

TAYLOR, S. M.; REILLY, M. P.; SCHREIBER, A. D.; et al. Thrombosis and shock induced by activating antiplatelet antibodies in human FcγRIIA transgenic mice: the interplay among antibody, spleen, and Fc receptor. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4254-4260, Dec. 2000.

TIERNEY JR., L. M.; McPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A. **CURRENT Medical Diagnosis & Treatment**. 38^a ed. Connecticut: Prentice-Hall International, Inc., 1999, p. 311-317, 471-475, 533-535, 749-750.

TRIPLETT, D. A. Many faces of lupus anticoagulants. **Lupus**, v. 7, supp. 2, p. S18-S22, 1998.

VAN DER SANDE, M. A. B.; WALRAVEN, G. E. L.; MILLIGAN, P. J. M.; et al. Family history: an opportunity for early interventions and improved control of hypertension, obesity and diabetes. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 4, p. 321-328, 2001.

VERDU, A.; CAZORLA, M. R.; GRANADOS, M. A.; et al. Basilar artery thrombosis in a child heterozygous for factor V Leiden mutation. **Pediatrics Neurology**, v. 24, n. 1, Jan. 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995, p. 1196-1207.

VOETSCH, B.; DAMASCENO, B. P.; CAMARGO E. C.; et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 2, p. 229-233, Feb, 2000.

YANG, T. L.; CUI, J.; REHUMTULLA, A.; et al. The structure and function of murine factor V and its inactivation by Protein C. **Blood**, v. 91, p. 4593-4599, 1998.

ZAGO, M. A.; SILVA JR.; W. A.; FRANCO, R. R. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 51, n. 3/4, p. 226-234, May/Aug. 1999.

ZIVELIN, A.; GRIFFIN, J. H.; XU, X.; et al. A single genetic origin for a common caucasian risk factor for venous thrombosis. **Blood**, v. 89, n. 2, p. 397-402, Jan. 1997.

ABSTRACT

Inherited disturbances of the coagulation and fibrinolysis have been associated with thrombophilia. Trauma can be a precipitant of the deep vein thrombosis (DVT) in Factor V Leiden (FVL) carriers, the most common polymorphism cause of hereditary thrombophilia. The objective of this study was to analyze the case of a 15 years old boy, his parents and a control group. The boy at 13 presented DVT of the leg after exercise and trauma. His paternal grandfather died of thrombosis. His mother's pregnancy was a normal, single birth delivery. The study included the following analysis: plasmatic Protein C (PC), Protein S (PS), Antithrombin III (AT III) activities, Activated Protein C Resistance, (APCR) and level of fibrinogen; searched FVL and Prothrombin Mutation FII G20210A. Commercial kits of IL (Spain), were utilized in an automation machine ACL 7000 for phenotype tests, and commercial kit for DNA assays, after their purification with a kit (GENTRA). The patient and his father were heterozygote for FVL and had APCR. His mother was unaltered. The other tests were normal. The prothrombin G20210A mutation did not identify in this family. The odds for developing thrombosis in FVL carriers is less than ATIII, PC or PS deficiency. However, FVL associated with other disturbances like FVR306Q or FII G20210A, acquired causes or environmental influences increase the risk of thrombosis. The patient had, at least, three factors of risk: FVL, forced exercise and trauma. His father has the FVL and strong family history. The recommendation consists of prophylaxis in risk situations and prospective follow up. The work indicated the necessity efforts in researches of hemostasis physiology, of genetics interactions in Brazilian gene pool with environmental variables, by regions of country, and their phenotype manifestations.

ANEXOS

FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO DO PACIENTE

NOME:

HOSPITAL:

ENDEREÇO:

CEP:

FONE:

DATA 1^A COLETA:

NÚMERO PRONTUÁRIO:

DATA 2^A COLETA:

IDADE:

SEXO:

COR:

TVP:_____

TEP:_____

IAM:_____

AVC:_____

TROMBOSE ARTERIAL:_____

DATA DO EPISÓDIO

RECORRÊNCIA:

USO DE MEDICAÇÃO:

PARIDADE: SIM_____ NÃO_____

ABORTO/PERDA FETAL:

QUANTOS:

HISTÓRIA FAMILIAR DE TROMBOSE: SIM_____ NÃO_____

DIABETES:

NEOPLASIA:

TABAGISMO:

ETILISMO:

TRAUMA:

OBESIDADE:

HEPATOPATIA:

HIPERLIPIDEMIA/DISLIPIDEMIA:

GRAVIDEZ:

HCV:

CIRURGIA:

HIV:

DOENÇA AUTOIMUNE:

ACO:

TRH:

MENOPAUSA:

OUTROS:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, identidade número _____, autorizo que seja efetuada em mim a coleta de 1 (uma) amostra de sangue venoso de 9,0 ml, com a finalidade de investigação diagnóstica laboratorial da minha causa de trombose. Tenho conhecimento que a coleta de sangue me trará riscos mínimos, que são: posso ficar tonto(a), o lugar da punção pode ficar roxo, ou prejudicar a irrigação de sangue para minha mão e braço, não havendo expoliação de sangue com a coleta na quantidade adequada para minha idade e condições clínicas. Sei também que os riscos de contaminação são mínimos ou inexistentes, porque serão utilizados materiais descartáveis estéreis para a coleta, apropriados para flebotomia e de uso corriqueiro em laboratório clínico. Estou certo (a) que posso sair da pesquisa a qualquer momento, sem sofrer quaisquer repressão ou danos, e que meu sangue será utilizado exclusivamente para esta pesquisa. Fui informado (a) que não gastarei nada. Fui informado (a) que terei garantia de sigilo e privacidade quanto aos meus dados pessoais fornecidos. Os resultados serão incluídos em pesquisa de Mestrado de autoria de Maria Emília dos Santos, “Defeito Bioquímico em Fator V, Fator V de Leiden, em Paciente Jovem com Trombose Venosa Profunda, estudo de caso”. Tenho em meu benefício, o diagnóstico laboratorial identificado e a possibilidade da profilaxia de recorrência de trombose.

Recife, de de 2000

VOLUNTÁRIO MAIOR DE 21 ANOS

TESTEMUNHA

TESTEMUNHA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, identidade número _____, autorizo que seja efetuada no meu filho(a) a coleta de 2 (duas) amostras de sangue venoso de 9,0 ml cada, com intervalo de 21 dias entre a primeira e a última, com a finalidade de investigação diagnóstica laboratorial da sua causa de trombose. Tenho conhecimento que a coleta de duas amostras de sangue lhe trará riscos mínimos, que são: meu filho (a) pode ficar tonto (a), o lugar da punção pode ficar roxo, ou prejudicar a irrigação de sangue para sua mão e braço, não havendo expoliação de sangue com duas coletas na quantidade adequada para sua idade e condições clínicas. Sei também que os riscos de contaminação são mínimos ou inexistentes, porque serão utilizados materiais descartáveis estéreis para as coletas, apropriados para flebotomia e de uso corriqueiro em laboratório clínico. Estou certo que meu filho (a) pode sair da pesquisa a qualquer momento, sem sofrer quaisquer repressão ou danos, e que seu sangue será utilizado exclusivamente para esta pesquisa. Fui informado (a) que não gastarei nada. Fui informado (a) que terei garantia de sigilo e privacidade quanto aos dados pessoais fornecidos do meu filho . Os resultados serão incluídos em pesquisa de Mestrado de autoria de Maria Emília dos Santos, “Defeito Bioquímico em Fator V, Fator V de Leiden, em Paciente Jovem com Trombose Venosa Profunda, estudo de caso”.

O meu (minha) filho (a) tem em seu benefício, o diagnóstico laboratorial identificado e a possibilidade da profilaxia de recorrência de trombose.

Recife, de de 2000

RESPONSÁVEL

TESTEMUNHA

TESTEMUNHA