

Francieli Joaquim Dassoler

**PREVALÊNCIA DE FATOR V DE LEIDEN EM DOADORES DE  
SANGUE DE FLORIANÓPOLIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Rabello de Moraes

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dassoler, Francieli Joaquim  
Prevalência de Fator V de Leiden em doadores de  
sangue de Florianópolis / Francieli Joaquim Dassoler  
; orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes,  
2019.  
124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Fator V de Leiden. 3.  
Prevalência. 4. Trombofilia. 5. Padronização. I.  
Moraes, Ana Carolina Rabello de . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia. III. Título.

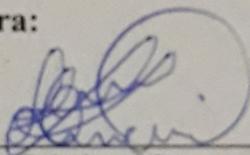
# “Prevalência de Fator V de Leiden em doadores de sangue de Florianópolis”

POR

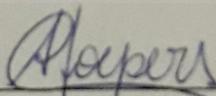
Francieli Joaquim Dassoler

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

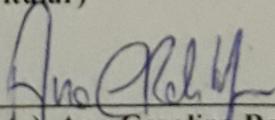
Banca Examinadora:



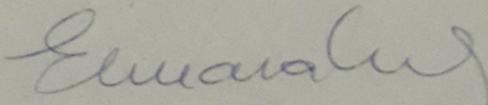
Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Andrea Thives de Carvalho Hoepers (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ana Carolina Rabello de Moraes (UFSC – Coorientador(a))



Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2019.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho. Em especial gostaria de agradecer:

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Rabello de Moraes, pela confiança e apoio oferecidos durante todo o processo e pela disponibilidade de recursos para a realização desse trabalho.

À Divisão de Análises Clínicas do HU-UFSC, pelo apoio para realização dos experimentos.

Ao HEMOSC de Florianópolis, pela parceria para obtenção das amostras, em especial ao Everaldo José Schörner e à Letícia de Oliveira Souza Bratti.

Aos meus colegas de trabalho do setor de hematologia, Marlene, Jéssica, Adriana, Angela, Vera e Terezinha, pela compreensão e apoio durante minhas aulas e experimentos.

Às minhas amigas do HU-UFSC, Iris, Chandra, Camila e Malu, pelo incentivo e auxílio.

À minha família, meus pais, irmãos e tia, pelo apoio incondicional e incentivo oferecido durante todo o processo.

Ao meu marido, pelo incentivo desde o início e pela paciência e compreensão durante minhas ausências. Obrigada pelo carinho e suporte em todos os momentos.



## RESUMO

**Introdução:** O tromboembolismo venoso (TEV) é um importante problema de saúde pública que afeta aproximadamente uma a cada 1.000 pessoas por ano, sendo o Fator V de Leiden (FVL) o fator de risco genético mais comum para desenvolvimento da doença. O presente estudo objetivou padronizar a técnica para detecção da mutação FV R506Q, determinar a prevalência de FVL em doadores de sangue de Florianópolis e verificar se existe associação entre a presença da mutação e a origem ou o perfil dos participantes. **Casuística e métodos:** Para a detecção da mutação FV R506Q foi utilizada a técnica de PCR seguida por digestão enzimática com MnlI. Para a padronização da técnica, foram testadas diferentes concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cloreto de magnésio, temperaturas de pareamento e tipos de TaqDNA polimerase. Para determinar a prevalência de FVL, foram incluídos no estudo 400 doadores de sangue. **Resultados e discussão:** Foram encontrados 2,5% heterozigotos para FVL e nenhum homozigoto, sendo 2,6% dos participantes brancos afetados pela mutação. Tais resultados corroboram com outros estudos brasileiros, que encontraram a mutação em 2,0% da população em geral e em 2,6% dos caucasianos. Não foi encontrada associação entre a presença do FVL e a origem ou o perfil dos indivíduos. A expressão clínica do FVL comumente é resultado da presença da mutação associada a outros fatores de risco circunstanciais para TEV, tendo tal combinação um efeito supra-aditivo sobre o risco trombótico. Dentre os heterozigotos encontrados nesse trabalho, nove apresentavam pelo menos um fator de risco adicional para desenvolvimento de TEV além da presença da mutação. Diante da potencialização do risco para desenvolvimento de TEV em alguns indivíduos, a pesquisa da mutação naqueles que apresentam mais de um fator de risco para desenvolvimento de TEV pode ser uma boa estratégia para prevenir o primeiro episódio trombótico. **Conclusões:** A mutação FVL foi encontrada em heterozigose em 2,5% da população de doadores de sangue de Florianópolis e a maioria dos portadores da mutação incluídos na pesquisa apresentavam fatores de risco adicionais para desenvolvimento de TEV.

**Palavras-chaves:** Fator V de Leiden. Prevalência. Doador de sangue. Trombofilia. Padronização. Validação.

## PREVALENCE OF FACTOR V LEIDEN IN BLOOD DONORS OF FLORIANÓPOLIS

**Introduction:** Venous thromboembolism (VTE) is an important public health problem that affects approximately one in 1,000 people per year, with Factor V Leiden (FVL) being the most common genetic risk factor for developing the disease. The present study aims to standardize the technique for detecting the FV R506Q mutation, to determine the prevalence of FVL in blood donors in Florianópolis and to verify if there is association between the presence of the mutation and the origin or profile of the participants. **Casuistry and methods:** For the detection of the FV R506Q mutation the PCR technique followed by enzymatic digestion with MnlI was used. For the standardization of the technique, different concentrations of primers and magnesium chloride, annealing temperatures and types of TaqDNA polymerase were tested. To determine the prevalence of FVL, 400 blood donors were included in the study. **Results and Discussion:** 2.5% heterozygotes were found for FVL and no homozygotes, with 2.6% of white participants affected by the mutation. These results corroborate with other Brazilian studies that found the mutation in 2.0% of the general population and in 2.6% of Caucasians. No association was found between the presence of FVL and the origin or profile of the individuals. The clinical expression of FVL is commonly a result of the presence of the mutation associated with other circumstantial risk factors for VTE, such combination having a supra-additive effect on thrombotic risk. Among the heterozygotes found in this study, nine had at least one additional risk factor for the development of VTE besides the presence of the mutation. In view of the potential for risk of developing VTE in some individuals, mutation screening in those who present more than one risk factor for developing VTE may be a good strategy to prevent the first thrombotic episode. **Conclusions:** The FVL mutation was found in heterozygosis in 2.5% of the population of blood donors in Florianópolis and most of the mutation carriers included in the study had additional risk factors for VTE development.

**Keywords:** Factor V Leiden. Prevalence. Blood donor. Thrombophilia. Standardization. Validation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases da hemostasia primária.....	22
Figura 2 - Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação.....	24
Figura 3 - Inibição da via de ativação da coagulação dependente do fator tecidual pelo TFPI.....	27
Figura 4 - Ação da proteína C na coagulação sanguínea humana.....	28
Figura 5 - Potencialização do efeito anticoagulante da antitrombina pelo heparan sulfato e pela heparina.....	29
Figura 6 - Formação e embolização do trombo venoso.....	31
Figura 7 - Ação do Fator V normal e do Fator V de Leiden (FVL).....	37
Figura 8 - Esquema ilustrando a perda do sítio de restrição da enzima MnlI em consequência da mutação de ponto do Fator V de Leiden.....	55
Figura 9 - Ilustração esquemática do resultado gerado da digestão pela enzima de restrição MnlI do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de Fator V de Leiden.....	55
Figura 10 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 1.....	60
Figura 11 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 2.....	61
Figura 12 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 3.....	62

Figura 13 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 4.....	64
Figura 14 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 5.....	65
Figura 15 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 6.....	66
Figura 16 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI.....	68
Figura 17 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI utilizando-se amostras com baixas contagens de leucócitos.....	69
Figura 18 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI após diluição do DNA.....	70
Figura 19 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI após resfriamento das amostras.....	71
Figura 20 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI após congelamento das amostras.....	72

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Solução mix utilizada para padronização da PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q).....	53
--	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solução mix do primeiro protocolo de PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q).....	59
Tabela 2 - Solução mix do Protocolo 4 de PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q).....	63
Tabela 3 - Solução mix de PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q) após fim da padronização.....	67
Tabela 4 - Custo médio dos reagentes utilizados na detecção de FV R506Q por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática.....	73
Tabela 5 - Perfil da população estudada (N = 400).....	75
Tabela 6 - Associação entre a presença de Fator V de Leiden (FVL) e as características dos participantes (N = 400).....	78
Tabela 7 - Associação entre a presença de Fator V de Leiden (FVL) e de outros fatores de risco para eventos trombóticos (N = 400).....	81
Tabela 8 - Característica de cada doador heterozigoto para Fator V de Leiden.....	82



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AT - antitrombina  
AVC - acidente vascular cerebral  
CEPSH-UFSC - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina  
CN - controle negativo para a mutação FV R506Q  
COC - contraceptivos orais combinados  
CPhomo - controle positivo homozigoto para a mutação FV R506Q  
CPhetero - controle positivo heterozigoto para a mutação FV R506Q  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
EUA - Estados Unidos da América  
EP - embolia pulmonar  
FT - fator tecidual  
FVL - fator V de Leiden  
FV - fator V  
FVa - fator V ativado  
FVIIa - fator VII ativado  
FVII - fator VII  
FVIII - fator VIII  
FVIIIa - fator VIII ativado  
FvW - fator de von Willebrand  
FIX - fator IX  
FIXa - fator IX ativado  
FX - fator X  
FXa - fator X ativado  
FXI - fator XI  
FXIa - fator XI ativado  
FXII - fator XII  
HBPM - heparina de baixo peso molecular  
HEMOSC - Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina  
HNF - heparina não fracionada  
HU-UFSC - Hospital Universitário vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IMC - índice de massa corporal  
MTHFR - metilenotetrahidrofolato redutase

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio  
pb - pares de base  
PC - proteína C  
PCa - proteína C ativada  
PCR - reação em cadeia da polimerase  
PCR-AS - reação em cadeia da polimerase alelo-específica  
PCR-RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição  
PS - proteína S  
RC - razão de chance  
RNI - razão normalizada internacional  
SERMs - moduladores seletivos do receptor de estrogênio  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TEV - tromboembolismo venoso  
TFPI - inibidor da via do fator tecidual  
TM - trombomodulina  
TRH - terapia de reposição hormonal  
TTPa - tempo de tromboplastina parcialmente ativada  
TVP - trombose venosa profunda  
UV - ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 FISILOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	21
1.2 DISTÚRBIOS TROMBOEMBÓLICOS .....	29
<b>1.2.1 Tromboembolismo arterial.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2 Tromboembolismo venoso (TEV) .....</b>	<b>30</b>
1.2.2.1 Epidemiologia .....	32
1.2.2.2 Fatores predisponentes ao TEV.....	33
1.3 FATOR V DE LEIDEN (FVL).....	36
<b>1.3.1 Detecção do Fator V de Leiden (FVL).....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.2 Manifestações clínicas.....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.3 Tratamento e aconselhamento genético.....</b>	<b>44</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	51
4.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	51
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	51
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	52
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	52
4.6 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PCR E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q).....	52
4.7 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q) NOS DOADORES DE SANGUE.....	56
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q) .....	59
<b>5.1.1 Padronização da PCR.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1.2 Padronização da digestão enzimática .....</b>	<b>67</b>

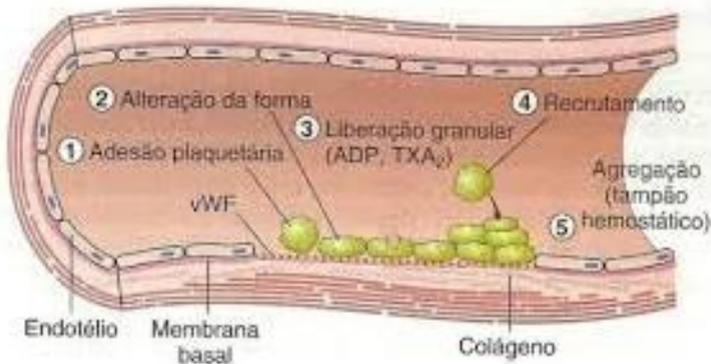
5.2 VALIDAÇÃO DA PCR E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q) .....	68
5.3 CUSTO DIRETO DA TÉCNICA PADRONIZADA PARA DETECÇÃO DE FV R506Q .....	72
5.4 PREVALÊNCIA DE FVL EM DOADORES DE SANGUE DE FLORIANÓPOLIS .....	74
5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE FVL E OUTROS FATORES DE RISCO PARA TROMBOSE .....	80
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE A – Questionário autoaplicado anexo ao TCLE .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC).....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO B – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A hemostasia é um conjunto de fenômenos biológicos que tem como objetivo manter a fluidez do sangue, evitando o seu extravasamento pelos vasos ou a obstrução do fluxo sanguíneo pela presença de trombos. Didaticamente, os processos responsáveis pela manutenção da hemostasia podem ser divididos em três fases: hemostasia primária, hemostasia secundária e hemostasia terciária (SANTOS *et al.*, 2015). Quando há o rompimento da camada de células endoteliais que recobre a parede vascular, seja fisiologicamente ou em consequência de uma lesão tissular, se inicia a hemostasia primária (Figura 1). Esta possui a vasoconstrição como evento inicial, responsável por limitar o aporte de sangue para o sítio da lesão, sendo sucedida pela atração das plaquetas circulantes para o local. A exposição do colágeno da região subendotelial promove a adesão das plaquetas ao vaso lesado via ligação ao Fator de von Willebrand (FvW), desencadeando uma mudança do formato discoide das plaquetas para uma forma mais esférica por meio da emissão de inúmeros pseudópodes. Com o processo de adesão, as plaquetas tornam-se ativadas e iniciam a secreção de organelas plaquetárias de estoque, como difosfato de adenosina, tromboxano A2 e serotonina, que são responsáveis pela ativação e recrutamento de mais plaquetas circulantes para o local da lesão. Além disso, tais plaquetas ativadas agregam-se e promovem a formação de um tampão hemostático inicial instável, que é responsável por inibir momentaneamente o sangramento e fornecer uma superfície pró-coagulante para o início da hemostasia secundária (ANDREWS; BERNDT, 2004; BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995; MACKIE, 1985).

Figura 1 - Fases da hemostasia primária.

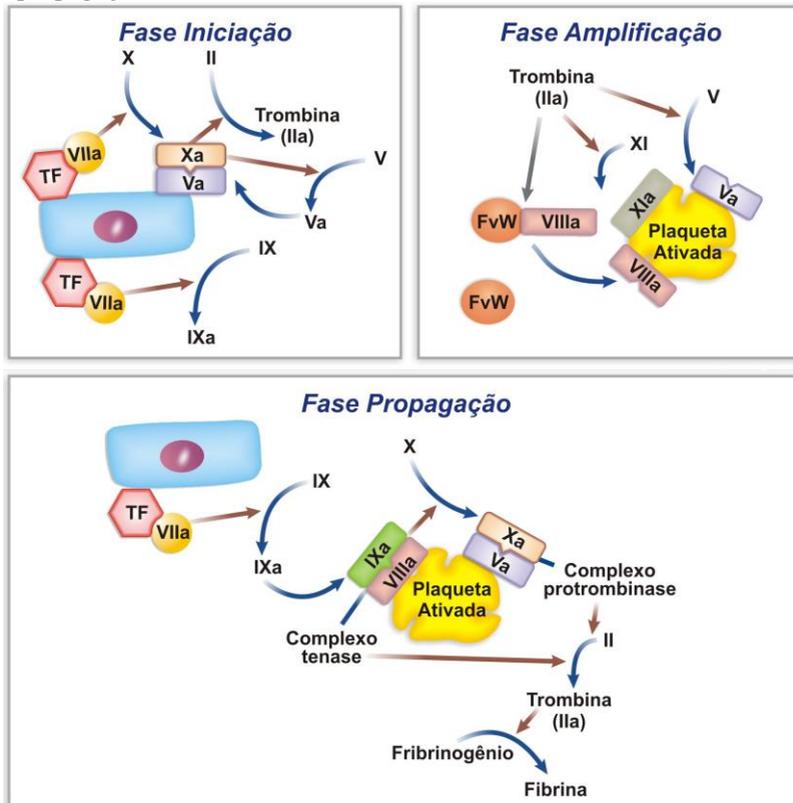


ADP – difosfato de adenosina; TXA<sub>2</sub> – tromboxano A<sub>2</sub>. Fonte: GUERRA-SHINOHARA, 2018.

Paralelamente à agregação plaquetária, se inicia a coagulação sanguínea, também chamada de hemostasia secundária. Essa fase consiste em um processo de ativação e conversão de proteínas específicas, objetivando a formação de um polímero insolúvel, a fibrina, que forma uma rede de fibras elásticas responsável por consolidar o tampão plaquetário inicial (BAKER; BRASSARD, 2011; KRIZ *et al.*, 2009). As reações enzimáticas que levam à formação de fibrina são sequenciais e, por isso, didaticamente agrupadas na forma de “cascata” segundo o modelo tradicional de coagulação sanguínea proposto por Macfarlane e Davie e Ratnoff em 1964 (DAVIE; RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Nesse modelo, a coagulação é dividida em uma via extrínseca e uma via intrínseca, que convergem para uma via final comum. O início da via extrínseca ocorre quando o fator tecidual (FT), também chamado de tromboplastina, se liga ao fator VII ativado (FVIIa) plasmático, promovendo a ativação direta do fator X (FX). Já a via intrínseca inicia-se pelo contato do sangue com superfícies de carga negativa, onde o cininogênio de alto peso molecular promove a ativação do fator XII (FXII), que por sua vez ativa o fator XI (FXI), que, ainda, ativa o fator IX (FIX), gerando FIX ativado (FIXa). Este, na presença de fator VIII (FVIII), promove a ativação do FX da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina pela chamada “via comum” (LOTSPEICH-STEININGER, 1992; ZAGO *et al.*, 2005).

Apesar de o modelo de “cascata” ter sido aceito por quase cinquenta anos, observações clínicas e experimentais recentes evidenciaram que esse modelo não é capaz de explicar completamente todos os eventos que ocorrem *in vivo*. Dessa forma, uma nova percepção sobre o funcionamento da hemostasia *in vivo* foi proposta, sendo esse um modelo de coagulação baseado em superfícies celulares, onde é estabelecida uma visão fisiológica, integrada e funcional dos eventos bioquímicos que ocorrem durante a hemostasia secundária, ao invés de cascatas distintas que operam em sistemas estáticos. Tal modelo propõe a ativação do processo de coagulação sobre diferentes superfícies celulares em quatro fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação, propagação e finalização (Figura 2) (FERREIRA *et al.*, 2010).

Figura 2 - Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação.



TF - fator tecidual; II – fator II; X – fator X; VIIa – fator VII ativado; Xa – fator X ativado; Va – fator V ativado; V – fator V; IX – fator IX; IXa – fator IX ativado; IIa – fator II ativado; XI – fator XI; VIIIa – fator VIII ativado; FvW – Fator von Willebrand; XIa – fator XI ativado. Fonte: RODRIGUES, 2012

A fase de iniciação do processo da coagulação ocorre quando células que expressam o FT em sua superfície, como células do músculo liso e fibroblastos, são expostas aos componentes do sangue (FERREIRA *et al.*, 2010; HANDIN; LUX; STOSSEL, 2003; VINE, 2009). Em indivíduos normais, o fator VII plasmático (FVII) encontra-se majoritariamente na forma inativa, entretanto cerca de 1% da quantidade plasmática total de FVII já se apresenta na forma ativada na

circulação. A exposição do FT ao plasma resulta na sua ligação ao FVII e FVIIa, sendo que apenas o complexo FT-FVIIa possui função enzimática ativa. O complexo FT-FVIIa, também conhecido como complexo tenase intrínseco, é capaz de ativar o FVII circulante em um processo denominado “auto-ativação”, o que amplifica o sinal pró-coagulante (FRANCO, 2001), contudo, a principal função do complexo FT-FVIIa é ativar os fatores IX e X (FERREIRA *et al.*, 2010; MONROE; HOFFMAN, 2009; PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007). O fator X ativado (FXa) promove a conversão do fator V (FV) em FV ativado (FVa) e, em seguida, associa-se a ele, formando o complexo protrombinase (FXa-FVa) na superfície da célula carreadora de FT. O FV também pode ser ativado por proteases não coagulantes, de forma a tornar possível a produção de FVa em concentração suficiente para uma formação significativa de complexo protrombinase. O complexo FXa-FVa é responsável por produzir uma pequena quantidade de trombina, que possui papel relevante para a etapa de amplificação da hemostasia secundária (FERREIRA *et al.*, 2010; HOFFMAN, 2003; VINE, 2009).

O complexo FT-FVIIa produzido durante a fase de iniciação é rapidamente inativado pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Assim, esse complexo só é capaz de gerar pequenas quantidades de trombina, o que é insuficiente para iniciar significativamente a formação de fibrina. Dessa forma, para que a formação do coágulo ocorra adequadamente, há necessidade de aumentar a concentração de trombina produzida, sendo necessárias as fases de amplificação e propagação da coagulação (FRANCO, 2001).

Interessantemente, se nota que, mesmo na ausência de lesão, uma baixa atividade da via do FT ocorre de forma contínua no espaço extravascular, já que algumas proteínas da coagulação de baixa massa molecular são capazes de transpor a camada endotelial dos vasos. Dessa forma, o FVII pode ser encontrado ligado ao FT, e os fatores IX e X podem ser encontrados na sua forma ativa quando passam pelos tecidos, caracterizando o fenômeno chamado coagulação basal. Em situações fisiológicas, esse fenômeno não é capaz de induzir a formação de coágulos estáveis devido à ausência de componentes de alta massa molecular do processo de coagulação, como plaquetas e o complexo FVIII e FvW (FVIII-FvW). O processo de coagulação somente avança para a fase de amplificação na ocorrência lesão vascular, permitindo que plaquetas e FVIII-FvW extravasem para o compartimento extravascular e interajam com a trombina produzida durante a fase de iniciação (HOFFMAN, 2003).

A fase de amplificação ocorre basicamente na superfície de plaquetas que foram ativadas e encontram-se no local da lesão devido aos processos de adesão. Além disso, as plaquetas também são ativadas pela trombina que foi gerada na fase de iniciação da coagulação. Com a ativação, as plaquetas passam a externar receptores de ligação a fatores da coagulação ativados e, por uma alteração de permeabilidade de membrana, permitem a entrada de íons cálcio e passam a liberar FV parcialmente ativado (FERREIRA *et al.*, 2010; HANDIN; LUX; STOSSEL, 2003; PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007). Nesse momento, o complexo FVIII-FvW presente no plasma liga-se aos receptores plaquetários e é clivado pela trombina, proporcionando a ativação do FVIII e liberação de maiores quantidades de FvW, o que facilita a adesão e agregação plaquetária. Neste ponto, a trombina também é responsável por gerar maiores concentrações de FVa e fator XI ativado (FXIa) na superfície das plaquetas ativadas (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN; MONROE, 2001).

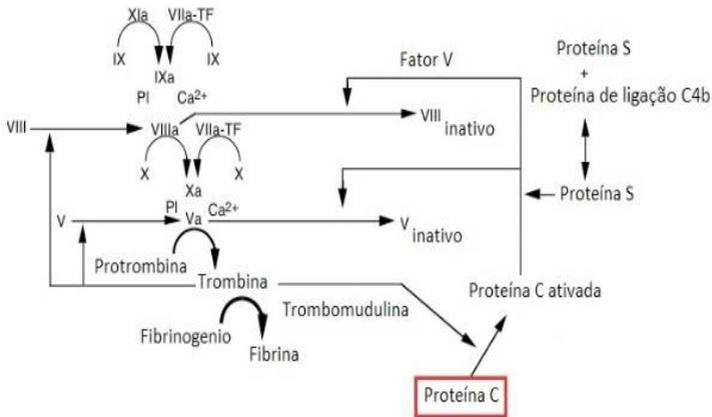
Simultaneamente à fase de amplificação, se inicia a fase de propagação, que compreende a reunião de um grande número de plaquetas no sítio da lesão e a produção de elevadas concentrações dos complexos tenase intrínseco e protrombinase. Primeiramente, o FIX, que foi ativado pelo complexo FT-FVIIa ou pelo FXIa, se une ao FVIII ativado (FVIIIa) na superfície das plaquetas para formação do complexo tenase extrínseco (FIXa-FVIIIa). Este possui a função de produzir uma quantidade adicional de FXa na superfície das plaquetas, já que o FXa não pode se “mover” das células carreadores de FT (HOFFMAN, 2003). O aumento da ativação de FX permite a geração de grandes quantidades de complexo protrombinase (FXa-FVa), o que, conseqüentemente, aumenta a conversão de protrombina em trombina. A trombina, por sua vez, é responsável pela segmentação do fibrinogênio em monômeros de fibrina, proporcionando a formação de um coágulo de fibrina insolúvel, que estabiliza e consolida o tampão plaquetário inicial (FERREIRA *et al.*, 2010; RIDDEL *et al.*, 2007).

Para impedir a oclusão do vaso sanguíneo, o processo de coagulação deve restringir-se ao local da lesão. Assim, após formado o coágulo de fibrina na área lesionada, se inicia a fase de finalização. Nesta fase, atuam principalmente quatro anticoagulantes naturais: o TFPI, a proteína C (PC), a proteína S (PS) e a antitrombina (AT) (COLMAN *et al.*, 2001).

Conforme mencionado, o complexo FT-FVIIa atua ativando dois substratos principais: os fatores IX e X da coagulação. A ativação desses



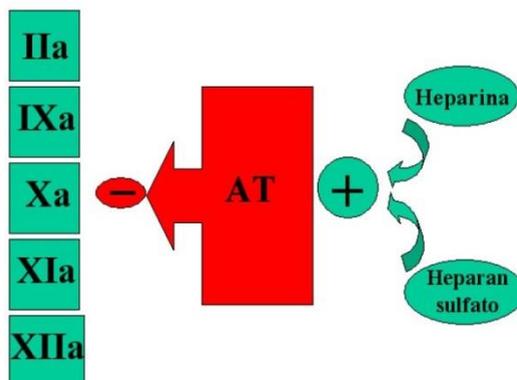
Figura 4 - Ação da proteína C na coagulação sanguínea humana.



TF – fator tecidual; Ca<sup>2+</sup> - Cálcio; X – fator X; VIIa – fator VII ativado; Xa – fator X ativado; Va – fator V ativado; V – fator V; IX – fator IX; IXa – fator IX ativado; VIIIa – fator VIII ativado; VIII – fator VIII; XIa – fator XI ativado.  
 Fonte: MIGUEL JUNIOR, 2016.

Por sua vez, a AT é o inibidor primário da trombina e também exerce ação inibitória sobre diversas outras enzimas da coagulação, incluindo os fatores IXa, Xa, e XIa (Figura 5). Adicionalmente, a AT acelera a dissociação do complexo FT-FVIIa e impede sua reassociação. Assim, a AT elimina qualquer atividade enzimática pró-coagulante excessiva ou indesejável. A atividade inibitória da AT sobre a coagulação é também potencializada pela heparina, um polissacarídeo estruturalmente similar ao heparan sulfato (FRANCO, 2001).

Figura 5 - Potencialização do efeito anticoagulante da antitrombina pelo heparan sulfato e pela heparina.



AT – antitrombina; IIa – fator II ativado; IXa – fator IX ativado; Xa – fator X ativado; XIa – fator XI ativado; XIIa – fator XII ativado. Fonte: FRANCO, 2001

## 1.2 DISTÚRBIOS TROMBOEMBÓLICOS

Na ausência de lesão vascular, os mecanismos anticoagulantes são predominantes sobre os pró-coagulantes, mantendo, assim, a fluidez do sangue. Alterações na hemostasia podem levar à formação de trombos no interior de artérias ou veias, proporcionando a oclusão destes vasos e o desenvolvimento de tromboembolismo, também conhecido como trombose (WEITZ, 2015).

### 1.2.1 Tromboembolismo arterial

A maioria dos trombos arteriais ocorre na superfície de placas ateroscleróticas rompidas, quando há exposição do material trombogênico do centro da placa ao sangue. Esse material desencadeia agregação plaquetária e produção de fibrina, que resulta na formação de um trombo rico em plaquetas que, temporária ou permanentemente, obstrui o fluxo sanguíneo. A oclusão temporária do fluxo nas artérias coronárias pode desencadear angina instável, enquanto a obstrução permanente leva ao infarto do miocárdio. Os mesmos processos podem ocorrer na circulação cerebral, onde uma oclusão arterial temporária

pode manifestar-se como ataque isquêmico transitório, enquanto a oclusão permanente pode levar ao acidente vascular cerebral (AVC) (WEITZ, 2015).

Por ser majoritariamente constituído por plaquetas e fibrina, o trombo arterial também é denominado trombo branco. Dessa forma, a inibição plaquetária tem sido o alvo para o tratamento da síndrome coronariana aguda causada por este tipo de trombo (ROSS, 1993; SCHAFER; EIGENTHALER; BAUERSACHS, 2004), sendo o ácido acetilsalicílico o agente antiplaquetário ainda mais comumente empregado, embora outros fármacos também possam ser utilizados, como ticlopidina, clopidogrel, dipiridamol, abciximab ou eptifibatibe (CURTIN; COX; FITZGERALD, 2002; EISERT, 2002; FARRÉ; CAMELO; CASADO, 1995; GEIGER, 2001). Cada medicamento afeta as plaquetas de modo diferenciado, contudo, todos promovem redução nos processos de agregação plaquetária e formação do trombo (GREGG; GLODSCHIMIDT-CLERMONT, 2003; LIND, 2002).

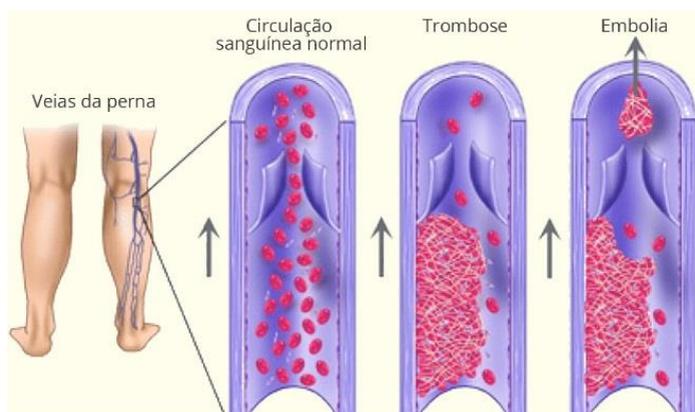
### **1.2.2 Tromboembolismo venoso (TEV)**

Em contraste ao trombo arterial, o trombo venoso raramente se forma em sítios óbvios de ruptura vascular. Apesar de poder ocorrer após trauma cirúrgico em veias ou ser secundário a cateteres venosos, ele comumente origina-se nas cúspides valvares das veias profundas da panturrilha ou em sinusoides musculares, onde existe estase (WEITZ, 2015). A teoria original sobre a patogênese da trombose venosa foi formulada pelo médico alemão Rudolf Virchow em 1856 (VIRCHOW, 1856) e atualmente ainda é considerada relevante. Nesta teoria, há a descrição de três fatores que contribuem para o desenvolvimento de TEV: estase sanguínea, dano vascular e estado de hipercoagulabilidade. Em uma revisão publicada em 1992, Mammen concluiu que pelo menos dois desses três fatores em combinação são importantes para o desenvolvimento da trombose venosa, embora a estase sanguínea pareça ser o componente dominante (MAMMEN, 1992). Assim, a reinterpretação da tríade de Virchow fornecida por Mammen naquela época permanece indiscutível até os dias atuais: a imobilidade reduz o fluxo sanguíneo como resultado da diminuição da contração muscular, ocorrendo acúmulo subsequente de sangue nos sinusoides intramusculares, especialmente na panturrilha, e desencadeando hipercoagulabilidade pelo (i) acúmulo local de fatores de coagulação ativados e produtos de ativação da coagulação e (ii) consumo

simultâneo de inibidores da coagulação sanguínea. Ambos os mecanismos iniciam um processo autocatalítico, onde a ativação da coagulação sustenta ou possivelmente aumenta a hipercoagulabilidade (LIPPI; FRANCHINI, 2008; MAMMEN, 1992). Além da ação de obstrução do fluxo sanguíneo local, os trombos formados nos sinusoides da panturrilha podem se estender para as veias proximais da perna e sofrer deslocamento até os pulmões, obstruindo a vasculatura e provocando, então, a embolia pulmonar (EP) (Figura 6) (WEITZ, 2015).

O trombo venoso contém relativamente poucas plaquetas e consiste principalmente em fibrina e eritrócitos retidos, sendo denominado trombo vermelho. Os anticoagulantes são a base para prevenção e tratamento de TEV, já que a fibrina é o componente predominante na trombose venosa. Em determinadas circunstâncias – por exemplo, em pacientes com EP maciça ou submaciça – também pode ser utilizado o tratamento fibrinolítico sistêmico ou por cateter direcionado, a fim de facilitar a restauração do fluxo sanguíneo pulmonar. Além disso, alguns pacientes com trombose venosa profunda (TVP) extensa nas veias ilíacas ou femorais também podem apresentar melhor prognóstico com o tratamento fibrinolítico via cateter e/ou extração do trombo associado à anticoagulação (WEITZ, 2015).

Figura 6 - Formação e embolização do trombo venoso.



Fonte: TROMBOSE, 2018.

### 1.2.2.1 Epidemiologia

O TEV, que engloba a TVP e a EP, é um importante problema de saúde pública que afeta aproximadamente uma a cada 1.000 pessoas por ano e aparece como o terceiro motivo mais comum de morte por causa vascular, precedido de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (ROSENDAAL; RASKOB, 2014). Contudo, é difícil estimar a incidência real do TEV, pois este apresenta sinais e sintomas inespecíficos e geralmente transcorre de forma silenciosa, sendo, em muitos casos, a EP súbita o primeiro sinal da doença (COHEN *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que o TEV acometa anualmente cerca de 100 pessoas para cada 100.000 habitantes (WHITE, 2003). Um estudo realizado com 94.194 participantes estimou que a incidência do primeiro evento de TEV ocorre em 1,43 indivíduos a cada 1.000 pessoas/ano, sendo a TVP responsável por 0,93 casos a cada 1.000 pessoas/ano e a EP por 0,50 casos a cada 1.000 pessoas/ano. Esse mesmo trabalho ainda evidenciou que as taxas de incidência de TEV aumentam exponencialmente com a idade, sendo a incidência em indivíduos com 70 anos ou mais três vezes maior do que aquela em indivíduos com idade entre 45 e 69 anos, que, por sua vez, apresentam taxa três vezes maior do que a de indivíduos com idade entre 20 e 44 anos. A taxa de letalidade encontrada nos primeiros 30 dias após o TEV é duas vezes maior em pacientes com EP (9,7%) do que em pacientes com TVP (4,6%) (NAESS *et al.*, 2007).

Uma compilação de estudos abrangendo seis países até então pertencentes à União Europeia (França, Alemanha, Itália, Espanha, Suécia e Reino Unido) estimou uma ocorrência de 761.697 eventos não-fatais de TEV (465.715 casos de TVP e 295.982 casos de EP) e 399.808 complicações associadas no ano de 2004, sendo a taxa estimada de TVP de 148 a cada 100.000 pessoas/ano e a taxa estimada de EP de 95 a cada 100.000 pessoas/ano. O número total estimado de mortes relacionadas ao TEV foi de 370.012, em que 7% (26.473) foram resultantes de TEV diagnosticado, 34% (126.145) de EP súbita e 59% (217.394) de EP após TEV não diagnosticado (COHEN *et al.*, 2007).

Poucos são os trabalhos publicados sobre a epidemiologia do TEV no Brasil. Um dos principais estudos feitos no país evidenciou a ocorrência de 0,6 caso a cada 1.000 habitantes por ano (MAFFEI, 1998). Uma pesquisa realizada em 2017 demonstrou a ocorrência de 2,86 casos

a cada 100.000 habitantes na região sul do país e 0,70 casos a cada 100.000 habitantes na região nordeste. O mesmo trabalho apontou associação entre baixas temperaturas e maior incidência de TEV nos estados do sul do Brasil, sendo que a média do número de casos de TEV reportado em Santa Catarina foi de 2,57 para cada 100.000 habitantes nos 48 meses analisados (OHKI; VAN BELLEN, 2017). Entre janeiro e setembro de 2018, dados do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram 31.589 internações no país por TEV, com taxa de mortalidade de 2,57%. O impacto econômico da doença também é significativo. Nesse mesmo período, R\$22.368.416,39 foram gastos com internações decorrentes de TEV no país (BRASIL, 2018).

### 1.2.2.2 Fatores predisponentes ao TEV

O TEV caracteriza-se como uma desordem multifatorial, resultante de múltiplas interações entre fatores de risco genéticos e ambientais (KUJOVICH, 2011). Os fatores de risco ambientais podem ser classificados em provocados, como câncer, cirurgia, trauma, imobilização, gravidez e período pós-parto, viagens de longa distância, hospitalização, cateterismo e infecção aguda, e não provocados, como idade, raça/etnia, grupo sanguíneo não-O, obesidade, uso de contraceptivos orais ou terapia hormonal, uso de corticosteroides, uso de estatina, dieta, atividade física e sedentarismo, e poluição do ar (CROUS-BOU; HARRINGTON; KABRHEL, 2016).

Idade, raça/etnia e grupo sanguíneo não-O são características não modificáveis, contudo, o risco para desenvolvimento de TEV é variável e esta compreensão é fundamental para otimizar o diagnóstico e tratamento da doença. Embora o TEV possa ocorrer em qualquer idade, a incidência é maior em indivíduos mais velhos. Entre a vida adulta e a meia idade, o TEV ocorre em uma taxa de 0,5-1,0 evento por 1.000 pessoas/ano. Já da meia idade até os 80 anos, essa taxa eleva-se substancialmente para 5-7 eventos a cada 1.000 pessoas/ano (BELL *et al.*, 2016; SILVERSTEIN *et al.*, 1998). A incidência de TEV também difere por raça, havendo risco mais elevado entre indivíduos negros, seguidos por brancos, asiáticos e hispânicos (BUCKNER; KEY, 2012). Além disso, alguns estudos mostram que o fenótipo ABO correlaciona-se com as concentrações plasmáticas de FVIII e FvW, de forma que os indivíduos com grupo sanguíneo tipo O possuem menores quantidades desses fatores pró-coagulantes (OHIRA *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2010) e, portanto, menor risco para desenvolvimento de TEV. Vale

salientar, no entanto, que o tipo sanguíneo não-O também tem sido relacionado ao aumento no risco de TEV independentemente da concentração de FVIII, podendo haver, portanto, outros meios envolvidos além do previamente relatado (OHIRA *et al.*, 2007).

Outros fatores de risco para TEV podem ser modificáveis, e são, portanto, relevantes não apenas para o diagnóstico, mas para a prevenção da doença. Dentre eles, destaca-se a obesidade, a hipertensão e a diabetes mellitus (AGENO *et al.*, 2008). Além disso, a utilização de alguns medicamentos também pode modificar a chance de desenvolvimento de TEV, como, por exemplo, o uso de hormônios exógenos (contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal), que tem sido associado a uma elevação no risco para TEV (ANDERSON *et al.*, 2004; VESSEY *et al.*, 1986). Uma meta análise de 20 artigos realizada em 2014 evidenciou a existência de diferença no aumento do risco para desenvolvimento de TEV de acordo com a composição do contraceptivo utilizado, sendo que usuárias de contraceptivos de primeira, segunda e terceira geração possuem um aumento de 3,5, 3,0 e 4,3 vezes no risco de desenvolvimento da doença, respectivamente, quando comparadas a não usuárias (BARATLOO *et al.*, 2014). Além disso, estudos também relatam associação entre o uso de corticosteroides e TEV (HUERTA *et al.*, 2007; JOHANNESDOTTIR *et al.*, 2013) e evidenciam que o uso de estatinas está associado a um menor risco de TEV (GLYNN *et al.*, 2009). Já o papel da dieta, da atividade física e da poluição do ar no desenvolvimento de TEV ainda permanece controverso e não totalmente esclarecido. Enquanto um estudo evidenciou que uma alimentação baseada na alta ingestão de grãos refinados, carnes vermelhas, sobremesas, doces, frituras e produtos lácteos com alto teor de gordura está associada a um maior risco de TEV do que um padrão dietético definido pelo alto consumo de frutas, legumes, peixe, aves, produtos integrais e produtos lácteos com baixo teor de gordura (STEFFEN *et al.*, 2007), outros trabalhos não demonstraram associação significativa entre os padrões alimentares e o risco de TEV (LUTSEY *et al.*, 2009; VARRASO *et al.*, 2012). Em relação à prática de atividade física, um estudo de caso-controle (N = 3.608) associou a prática regular de esportes à redução do risco de TEV (VAN STRALEN *et al.*, 2007), entretanto outras análises não relataram nenhuma evidência estatisticamente significativa de uma associação entre atividade física e risco de TEV (BORCH *et al.*, 2010; KABRHEL *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2002). A poluição do ar também foi associada

positivamente ao risco de TEV por um autor (BACCARELLI *et al.*, 2008), enquanto outro não encontrou tal associação (SHIH *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, foi introduzido o conceito de que alterações genéticas, que resultam em hipercoagulabilidade, estão presentes em um grande número de pacientes com doença trombotica venosa. Distúrbios trombofílicos podem ser encontrados em metade dos pacientes que apresentam TEV (KUJOVICH, 2011). Dentre eles, os polimorfismos nos genes do FV, da protrombina e da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) são os mais frequentes na população afetada por TEV (CROUS-BOU; HARRINGTON; KABRHEL, 2016), sendo encontrados, respectivamente, em 20-25% (RIDKER *et al.*, 1995; ROSENDAAL *et al.*, 1995), 6-18% e 10% desta população (FRANCO, REITSMA, 2001). Já as deficiências hereditárias de AT, PC e PS são relativamente raras, e estão presentes em apenas 1-5% dos pacientes com trombose venosa (FRANCO, REITSMA, 2001).

O C677T e o A1298C são dois polimorfismos genéticos comuns do gene MTHFR. Ambos estão associados à diminuição na atividade da enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase, com menor grau para o polimorfismo A1298C em comparação com o C677T (DE MATTIA; TOFFOLI, 2009). Essa enzima está envolvida na metilação de homocisteína em metionina (SPYRIDOPOULOU *et al.*, 2012) e a diminuição de sua atividade resulta em concentrações elevadas de homocisteína, o que é um fator de risco para trombose venosa, já que a hiper-homocisteinemia está associada a um aumento de 2-3 vezes no risco de desenvolvimento da doença (DEN HEIJER *et al.*, 1995; LANGMAN *et al.*, 2000).

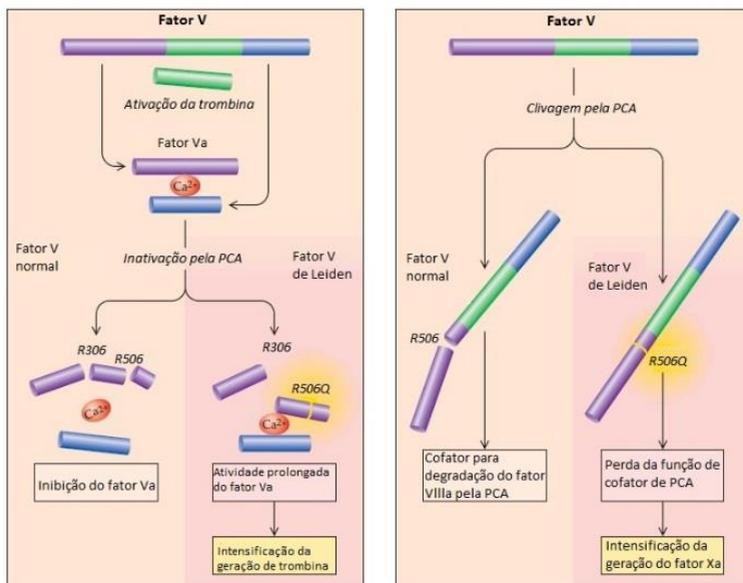
Já o polimorfismo do gene da protrombina caracteriza-se pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 20210 na região 3' não traduzida do gene da protrombina, aumentando a estabilidade do RNA mensageiro e elevando em 30% as concentrações plasmáticas de protrombina (hiperprotrombinemia). Dessa forma, ocorre exacerbação no risco para desenvolvimento de trombose venosa devido ao aumento na geração de trombina e formação de coágulos de fibrina (DUQUE; MELLO, 2003; FRITSMA; MARQUES, 2007; MARTINELLI *et al.*, 2007). Essa mutação é a segunda causa mais comum de trombofilia hereditária, presente em 2-4% da população em geral e associada a um risco 2-3 vezes maior para desenvolvimento de TEV em heterozigotos e 5-10 vezes em homozigotos (DE STEFANO *et al.*, 1998; HERRINGTON *et al.*, 2002; ROSENDAAL *et al.*, 1998).

Contudo, o fator de risco genético mais comum para TEV é o Fator V de Leiden (FVL), encontrado em 20-25% dos pacientes com TEV e em 50% dos pacientes com trombofilia familiar (RIDKER *et al.*, 1995; ROSENDAAL *et al.*, 1995).

### 1.3 FATOR V DE LEIDEN (FVL)

Em 1993, Dahlback, Carlsson e Svensson relataram que uma fraca resposta aos efeitos anticoagulantes da PCa estava associada ao risco de TEV (DAHLBACK; CARLSSON; SVENSSON, 1993). Subsequentemente, verificou-se que a chamada resistência à PCa é causada, em mais de 90% dos casos, por uma mutação no FV da coagulação, denominada FVL. Essa mutação ocorre devido à substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1691 no exon 10 do gene do FV, resultando na troca da Arginina pela Glutamina na posição 506 da proteína (FV R506Q) (NICOLAES; DAHLBACK, 2002). Como já mencionado, a PC é uma glicoproteína plasmática ativada pela trombina, cuja síntese promove a proteólise dos cofatores Va e VIIIa (SHEARER, 1995). A clivagem do FVa na posição 506 pela PCa está associada à perda da atividade pró-coagulante do FVa, embora também sejam necessárias clivagens nas posições 306 e 679 para uma completa inativação do FVa. Dessa forma, a molécula de FV mutada é inativada 10 vezes mais lentamente que uma molécula de FV normal, o que leva ao aumento na geração de trombina e a um estado prolongado de hipergoagulabilidade (CAMPELLO; SPIEZIA; SIMIONI, 2016; FRANCHINI, 2012; NICOLAES; DAHLBACK, 2002; VOORBERG *et al.*, 1994). Além disso, o FV junto à PS atua como cofator da PCa na inibição do complexo FIXa-FVIIIa, que é responsável pela geração de FXa. O FVL exerce essa função de forma precária, o que intensifica a geração de FXa (Figura 7) (THORELLI; KAUFMAN; DAHLBÄCK, 1999).

Figura 7 – Ação do Fator V normal e do Fator V de Leiden.



PCA – Proteína C ativada. Fonte: LEUNG, 2010.

### 1.3.1 Detecção do Fator V de Leiden (FVL)

A presença do FVL em um indivíduo não é evidenciada por manifestações específicas e a suspeita clínica ocorre no advento do TEV, como TVP ou EP. A pesquisa da mutação FV R506Q pode ser efetuada mediante o teste da resistência à PCa, que é considerado um teste de triagem, ou pela análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) para identificação específica da mutação (CAMPELLO *et al.*, 2016). O ensaio de resistência à PCa envolve a execução de um tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) no plasma do indivíduo na presença e ausência de uma quantidade padronizada de PCa, sendo os dois resultados expressos como uma razão ( $TTPa + PCa / TTPa - PCa$ ). Este ensaio baseia-se no princípio de que, quando adicionado ao plasma normal, a PCa inativa os fatores Va e VIIIa, o que retarda a coagulação e prolonga o TTPa. O fenótipo resistente à PCa é caracterizado por um prolongamento mínimo do TTPa em resposta à PCa e uma relação

correspondente baixa. Ainda existem os ensaios modificados de resistência à PCa, chamados de “segunda geração”, que incluem pré-diluição com plasma deficiente em FV para normalizar fatores que possam afetar a resistência à PCa, como PS e outros fatores da coagulação dependentes de vitamina K diminuídos por anticoagulação oral. Dessa forma, o ensaio modificado pode ser utilizado em pacientes recebendo terapia de anticoagulação (KAPIOTIS *et al.*, 1996).

Indivíduos com o teste de triagem positivo devem, obrigatoriamente, ser submetidos à análise de DNA para confirmação e diferenciação entre genótipo homozigoto e heterozigoto para FVL (GRODY *et al.*, 2001). A pesquisa da mutação é realizada por uma variedade de métodos através da utilização do DNA genômico extraído de leucócitos do sangue periférico (GRODY *et al.*, 2001; SPECTOR *et al.*, 2005), sendo considerado "padrão-ouro" o sequenciamento bidirecional da região genética específica do gene de interesse. Os métodos comumente utilizados envolvem reação em cadeia da polimerase seguida de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP) ou reação em cadeia da polimerase alelo-específica (PCR-AS) (EMADI *et al.*, 2010; KADAUKE; KHOR; VAN COTT, 2014; PRESS *et al.*, 2002). Alguns indivíduos podem apresentar-se heterozigotos para FVL e ainda terem deficiência hereditária de FV, sendo chamados de pseudo-homozigotos. Nesta condição, uma carência coexistente de FV promove um fenótipo mais severo de resistência à PCa, indistinguível clinicamente da mutação homozigótica. O diagnóstico de pseudo-homozigoto baseia-se na combinação de genótipo heterozigótico para FVL, baixa atividade do FV no plasma (aproximadamente 50% do normal) e uma baixa razão no teste de resistência à PCa, típica de uma mutação homozigótica (BRUGGE *et al.*, 2005; SIMIONI *et al.*, 2005).

Atualmente, há um consenso geral de que a pesquisa para detecção do FVL é muito útil em determinadas circunstâncias (BAGLIN *et al.*, 2010; GRODY *et al.*, 2001). Entretanto, as diretrizes diferem quanto às indicações específicas para a triagem. Cabe ao clínico tomar a decisão baseado na probabilidade do resultado influenciar positivamente no tratamento (BAGLIN *et al.*, 2010). De maneira geral, o teste é recomendado para indivíduos com: i) primeiro episódio de TEV não provocado em qualquer idade, ii) histórico de TEV recorrente, iii) trombose venosa em locais incomuns (cerebral, mesentérica e hepática, por exemplo), iv) TEV durante a gravidez ou puerpério, v) TEV associado ao uso de contracepção com estrogênio ou terapia de

reposição hormonal e vi) primeiro episódio de TEV em um membro da família de primeiro grau com menos de 50 anos de idade (BAGLIN *et al.*, 2010; KUJOVICH, 2011). Além disso, o teste também pode ser apropriado em algumas outras circunstâncias clínicas, como: i) mulheres com perdas gestacionais recorrentes e inexplicadas durante o primeiro trimestre ou perda fetal inexplicada após 10 semanas de gestação ou natimorto, ii) mulheres com pré-eclâmpsia grave e inexplicada, descolamento prematuro da placenta ou feto com restrição grave de crescimento intra-uterino, iii) primeiro episódio de TEV relacionado ao uso de tamoxifeno ou outros moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), iv) indivíduos com menos de 50 anos de idade com primeiro TEV provocado na ausência de malignidade ou dispositivo intravascular, v) familiares adultos assintomáticos de portadores de FVL, especialmente aqueles com forte histórico familiar de TEV em idade jovem ou mulheres do sexo feminino que estejam grávidas ou que pretendam utilizar contraceptivos orais ou engravidar, vi) mulheres fumantes com menos de 50 anos com infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral e vii) recém-nascidos e crianças com TEV idiopático ou AVC idiopático não relacionado ao uso de cateter. A pesquisa não é rotineiramente recomendada durante a gravidez ou previamente ao uso de contraceptivos com estrogênio ou reposição hormonal, assim como a triagem pré-natal e de recém-nascidos assintomáticos, neonatos e crianças também não é indicada. Da mesma forma, o teste não é sugerido para pacientes com histórico pessoal ou familiar de trombose arterial (síndrome coronariana aguda ou AVC), contudo pode ser considerado em indivíduos com menos de 50 anos de idade com trombose arterial inexplicada (KUJOVICH, 2011).

### **1.3.2 Manifestações clínicas**

A principal manifestação clínica ocasionada pela presença do FVL é o TEV, sendo a mutação encontrada em 25% dos pacientes com primeiro TEV idiopático e em até 40-50% daqueles com TEV recorrente ou trombose relacionada ao estrogênio (DE SANCHO; DORFF; RAND, 2010; ROLDAN *et al.*, 2009;). Embora a maioria dos indivíduos afetados não apresente o primeiro evento trombótico até a idade adulta, alguns apresentam TEV recorrente antes dos 30 anos de idade. Um rastreamento familiar em indivíduos portadores de resistência à PCA constatou que 40% dos homocigotos para FVL já haviam apresentado TEV aos 33 anos de idade, em comparação com 20% dos heterocigotos

e 8% dos indivíduos sem a mutação (ZOLLER *et al.*, 1994). Estudos populacionais sugerem que o risco relativo para o desenvolvimento do primeiro episódio de TEV aumenta de 3-8 vezes em indivíduos heterozigotos (JUUL *et al.*, 2004; KOSTER *et al.*, 1993; KUJOVICH, 2011; ROSENDAAL; REITSMA, 2009) e de 10-80 vezes em homozigotos para FVL (GOHIL; PECK; SHARMA, 2009; JUUL *et al.*, 2004; KUJOVICH, 2011; ROSENDAAL; REITSMA, 2009). Um grande estudo de coorte (N = 9.253) evidenciou que a chance de desenvolvimento de TVP é aumentada em 2,5 vezes em heterozigotos e 17 vezes em homozigotos para FVL. Já para EP, esta chance é elevada em 2,9 vezes em heterozigotos e 12 vezes em homozigotos (JUUL *et al.*, 2004). Pesquisas também relatam que aproximadamente 10% dos heterozigotos para FVL desenvolvem TEV ao longo da vida (HEIT *et al.*, 2005), sendo o risco para desenvolvimento de TEV superior (25-40%) naqueles pertencentes a famílias trombofílicas (LENSEN *et al.*, 2000a; LENSEN *et al.*, 2000b). O risco para ocorrência de trombose venosa cerebral também aumenta cerca de 3 vezes nos heterozigotos para a mutação (DENTALI; CROWTHER; AGENO, 2006). A ocorrência de TVP é mais comum do que a EP em portadores de FVL e geralmente se desenvolve nas pernas, podendo, com menor frequência, acometer membros superiores (SCHULMAN, 2007; VAN STRALEN; ROSENDAAL; DOGGEN, 2008). Uma compilação de estudos constatou que a prevalência de FVL em indivíduos com EP isolada foi de aproximadamente 50% da prevalência em indivíduos com TVP (DE MOERLOOSE *et al.*, 2000).

A recorrência após um primeiro episódio de TEV também pode ser influenciada pelo FVL. Uma meta-análise incluindo 3.104 indivíduos com TEV inicial concluiu que o FVL em heterozigose está associado ao aumento de 1,4 vezes no risco de TEV recorrente (HO *et al.*, 2006). Já este risco em homozigotos para FVL ainda não está bem definido, mas uma revisão sistemática apontou um aumento de 2-3 vezes no risco de TEV recorrente nestes indivíduos (SEGAL *et al.*, 2009).

A expressão clínica do FVL é significativamente influenciada pela coexistência de distúrbios trombofílicos genéticos e adquiridos, e também de outros fatores de risco para TEV. O FVL interage com esses fatores, podendo aumentar a chance de desenvolvimento de TEV, sendo que pelo menos 50% dos episódios trombóticos em indivíduos portadores da mutação estão associados à presença concomitante de fatores de risco adicionais para TEV (LENSEN *et al.*, 2000a).

A combinação de heterozigiosidade da mutação e a maioria dos distúrbios trombofílicos tem um efeito supra-aditivo sobre o risco trombótico global (KUJOVICK, 2011). Uma análise combinada de oito estudos caso-controle demonstrou que indivíduos unicamente portadores de FVL ou mutação no gene da protrombina possuem um aumento de cinco e quatro vezes no risco trombótico, respectivamente. Em contraste, aqueles duplamente heterozigotos para ambas as mutações apresentam um aumento de 20 vezes no risco relativo para TEV, evidenciando o efeito multiplicativo dessas mutações no risco trombótico total (EMMERICH *et al.*, 2001). Além disso, um estudo constatou que indivíduos portadores de FVL que possuem um parente de primeiro grau com histórico de trombose possuem um risco três vezes maior para TEV quando comparados com aqueles que possuem histórico familiar de TEV sem a mutação associada, evidenciando que a associação de FVL e histórico familiar de trombose possui valor preditivo adicional no risco trombótico (LENSEN *et al.*, 2000b). Uma pesquisa também mostrou que heterozigotos para FVL com altas concentrações de FVIII (150% do normal) possuem uma incidência 2-3 vezes maior de TEV do que aqueles com a mutação isolada (LENSEN *et al.* 2001). O risco de trombose também está aumentado em pacientes com FVL e hiperhomocisteinemia. No *Physicians Health Study*, indivíduos com FVL ou hiperhomocisteinemia apresentaram um risco 3-4 vezes maior para TEV idiopático em comparação com aqueles sem anormalidades, já o risco relativo trombótico foi aumentado em 22 vezes nos indivíduos com ambos os distúrbios (RIDKER *et al.*, 1997c).

Quando associada à gestação, a presença de FVL tem sido relacionada a falhas de implantação do embrião e abortos, bem como à perda gestacional tardia (LIATSIKOS *et al.*, 2016). Uma revisão sobre a relação entre trombofilia hereditária e perdas gestacionais recorrentes realizada por Rodger *et al.* (2010) relatou um risco de aborto espontâneo aumentado em 1,52 vezes para mulheres com FVL. A heterozigiosidade do FVL ainda foi associada a um risco quatro vezes maior de natimorto inexplicado e 11 vezes maior de natimorto associado ao infarto placentário (HILTUNEN *et al.*, 2010). Um estudo constatou que mulheres homozigotas para FVL apresentam risco cinco vezes maior de perda fetal tardia (após 12 semanas de gestação) do que mulheres heterozigotas, e 11 vezes maior do que mulheres sem a mutação. Em contraste, a frequência de perda precoce (primeiro trimestre) foi semelhante nos três grupos, sugerindo que a mutação possui maior associação com a interrupção tardia da gravidez (BIRON-ANDRÉANI

*et al.*, 2009). Mulheres com múltiplas mutações trombofílicas ou homozigotas para FVL possuem o maior risco trombótico associado à gravidez. O risco aumenta de 20-40 vezes em homozigotas para FVL (GERHARDT *et al.*, 2003; MARTINELLI *et al.*, 2001; ROBERTSON *et al.*, 2006), nove vezes nas heterozigotas e mais de 100 vezes nas duplamente heterozigotas para FVL e mutação da protrombina, ilustrando o aumento acentuado no risco global quando mutações trombofílicas são combinadas (GERHARDT *et al.*, 2000).

O uso de contraceptivos orais também aumenta substancialmente o risco para TEV em portadoras de FVL. Um estudo evidenciou que mulheres homozigotas usuárias de contraceptivos orais podem ter o risco para TEV aumentado em mais de 100 vezes (VANDENBROUCKE *et al.*, 1994). Além disso, pesquisadores relatam que a heterozigose para FVL é encontrada em 20-60% das mulheres com histórico de TEV durante o uso de contraceptivos orais (DE SANCHO; DORFF; RAND, 2010; HIRSCH *et al.*, 1996; LACZKOVICS *et al.*, 2007). Um estudo de caso-controle que incluiu 948 pacientes com TEV (23% com FVL) e 902 controles (8% com FVL) demonstrou que, em usuárias de contraceptivos orais combinados (COC) portadoras da mutação, a chance para desenvolvimento de TEV aumentou 20 vezes em comparação com as não usuárias e não portadoras de FVL, e três vezes em comparação com as não portadoras de FVL usuárias de COC. Ao excluir mulheres com fatores de risco concomitantes (cirurgia, gesso ou ambos) e mulheres obesas, o risco para TEV quase dobrou (37,5 vezes) (BERGENDAL *et al.*, 2014). Contraceptivos orais de terceira geração estão associados a um risco maior de TEV do que os de segunda geração, sendo o risco especialmente alto nas mulheres heterozigotas para FVL. Estudos mostram um aumento de cerca de 50 vezes no risco de TEV em heterozigotas para a mutação que utilizam COC de terceira geração quando comparadas com mulheres sem a mutação que não utilizam contraceptivos orais (BLOEMENKAMP *et al.*, 1995; HUGON-RODIN *et al.*, 2018). A terapia de reposição hormonal (TRH) associada ao FVL também eleva o risco de desenvolvimento de TEV. Estudos evidenciam que portadoras de FVL em uso de TRH possuem um aumento de 7-15 vezes no risco para TEV em comparação com as não usuárias de TRH sem a mutação (CUSHMAN *et al.*, 2004; HERRINGTON *et al.*, 2002; ROSENDAAL *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2005).

A obesidade também aumenta o risco para TEV em indivíduos com FVL (POMP *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2016). Em um estudo, a

obesidade ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ) foi associada a um risco 2,5 vezes maior de TEV, sendo esse risco aumentado para oito vezes em obesos portadores da mutação e aproximadamente seis vezes em indivíduos com excesso de peso ( $IMC = 25 \text{ a } 30 \text{ kg/m}^2$ ) também com a mutação (POMP *et al.*, 2007).

A combinação de viagens aéreas prolongadas e FVL também está associada a um aumento de oito vezes no risco para TEV segundo Cannegieter *et al.* (2006). Já um trabalho de 2016 demonstrou que a chance para desenvolvimento de TEV em indivíduos submetidos a viagens de longa distância é aumentada em 13,9 vezes em portadores de FVL quando comparados a indivíduos sem a mutação (RIBEIRO *et al.*, 2016)

Ainda não está claro até que ponto o FVL eleva o risco trombótico associado à cirurgia ou trauma. Diversos estudos sugerem que a mutação está associada a um risco até cinco vezes maior de TEV sintomático após cirurgias (BABA-AHMED *et al.*, 2007; LINDAHL *et al.*, 1999), sendo a homozigose para FVL reponsável por um aumento de até 20 vezes no risco de TEV após cirurgias, principalmente urológicas e ortopédicas (EHRENFORTH *et al.* 2004). Também não está claro até que ponto o FVL aumenta o risco trombótico associado à malignidade. Um grande estudo populacional de caso-controle (N = 2.578) evidenciou que os heterozigotos para FVL com malignidade apresentam um risco duas vezes maior de TEV do que pacientes com câncer sem a mutação e um risco 12 vezes maior do que os pacientes controle (sem malignidade e FVL). Além disso, indivíduos com câncer e heterozigotos para FVL ou mutação da protrombina apresentaram um risco 20 vezes maior de desenvolver trombose de extremidade superior do que pacientes com câncer sem mutação protrombótica (BLOM *et al.*, 2005).

No ano de 2016, Ribeiro *et al.* avaliaram a associação do FVL a vários outros fatores de risco para desenvolvimento de TEV. Os resultados evidenciaram que pacientes portadores de FVL e pertencentes ao grupo sanguíneo não-O apresentavam 9,1 vezes mais chance de desenvolvimento de trombose venosa quando comparados a indivíduos sem FVL e outros fatores de risco para TEV. Somando-se a presença de obesidade, o risco aumentou para 12,5 vezes. Além disso, o estudo relatou que os indivíduos expostos à somatória dos fatores de risco (FVL, grupo sanguíneo não-O, obesidade e uso de contraceptivo oral) apresentavam 21,4 vezes mais chance de desenvolvimento de TEV. Já para aqueles portadores de FVL, pertencentes ao grupo sanguíneo não-

O, obesos e submetidos à viagem de longa distância, a chance de desenvolvimento da doença aumentava 44,7 vezes (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Dessa forma, fica evidente que interações do FVL com outros fatores de risco genéticos e ambientais são decisivas para a avaliação do risco global para desenvolvimento de TEV (CAMPELLO *et al.*, 2016).

### 1.3.3 Tratamento e aconselhamento genético

O manejo de indivíduos com FVL depende das circunstâncias clínicas. O primeiro TEV agudo deve ser tratado com heparina de baixo peso molecular (HBPM) ou heparina não fracionada (HNF) intravenosa. A varfarina é iniciada concomitantemente com a HBPM (exceto durante a gravidez) e monitorada com a razão normalizada internacional (RNI) (KEARON *et al.*, 2008). A RNI alvo de 2,5 (intervalo terapêutico: 2,0 a 3,0) fornece anticoagulação, mesmo em indivíduos homocigotos para FVL (BAGLIN *et al.*, 1998). A HBPM e a varfarina devem ser sobrepostas por pelo menos cinco dias, e até que a RNI atinja a faixa terapêutica em duas medições consecutivas durante dois dias. A duração da anticoagulação deve basear-se numa avaliação dos riscos de recorrência de TEV e hemorragias relacionadas ao uso de anticoagulantes. Aproximadamente 30% dos pacientes com um evento de TEV desenvolvem trombose recorrente nos 10 anos subsequentes (PRANDONI; SIMIONI; GIROLAMI, 1996). Indivíduos com TEV espontâneo e nenhum fator provocativo identificável requerem um curso mais longo de anticoagulação. Recomenda-se anticoagulação durante pelo menos três meses para indivíduos com TEV associado a um fator de risco transitório. A duração ótima da anticoagulação para os heterocigotos para FVL é debatida. Tal heterocigosidade geralmente não é uma indicação de anticoagulação de longo prazo e esta somente é recomendada para indivíduos com TEV não provocado inicial ou recorrente e sem fatores de risco para sangramento com boa monitoração de anticoagulação. A anticoagulação também deve ser considerada em indivíduos homocigotos para FVL ou com múltiplos distúrbios trombofílicos (KEARON *et al.*, 2008).

Como o TEV inicial em heterocigotos para FVL ocorre em associação a outros fatores de risco circunstanciais em 50% dos casos, a anticoagulação profilática durante situações clínicas de alto risco, como cirurgia, gravidez ou imobilização prolongada, pode prevenir alguns desses episódios. No entanto, não há evidências que confirmem o

benefício da profilaxia primária para heterozigotos assintomáticos e as decisões relativas à anticoagulação profilática devem avaliar o risco/benefício para cada paciente (GEERTS *et al.*, 2008).

Muitas revisões e diretrizes foram publicadas abordando o manejo do FVL na gravidez (com relação à profilaxia antitrombótica pré-natal e pós-natal) (BAGLIN *et al.*, 2010; LOCKWOOD; WENDEL, 2011; LUSSANA *et al.*, 2009). A anticoagulação profilática é sugerida no pré- e no pós-parto somente em portadoras homozigotas de FVL. Nas heterozigotas, é sugerida a vigilância clínica pré- e pós-parto, ou a vigilância clínica pré-parto e a profilaxia pós-parto na presença de histórico familiar (BATES *et al.*, 2012; BLEKER; COPPENS; MIDDELDORP, 2014). Ainda, a anticoagulação profilática deve ser considerada para gestantes heterozigotas com trombose prévia relacionada ao estrogênio (associada ao uso de contraceptivos orais ou gravidez) (BATES *et al.*, 2008; DE STEFANO *et al.*, 2006; PABINGER *et al.*, 2005) e também pode ser apropriada para mulheres duplamente heterozigotas para FVL e mutações da protrombina ou com outros defeitos trombofílicos combinados (BATES *et al.*, 2008; DUHL *et al.*, 2007). Além disso, é importante mencionar que as mulheres que se submetem a uma cesariana correm maior risco de desenvolver TEV (KANE *et al.*, 2013). A tromboprofilaxia não é recomendada neste tipo de parto na ausência de fatores de risco adicionais, contudo, em portadoras de FVL em homozigose ou heterozigose, a profilaxia é aconselhada, pois tais mulheres apresentam um risco absoluto de TEV superior a 3% (BATES *et al.*, 2012). Esta tromboprofilaxia deve ser preferencialmente continuada até seis semanas a partir da alta hospitalar (BLEKER; COPPENS; MIDDELDORP, 2014).

Devido à elevada prevalência do FVL em certas populações, a pesquisa da mutação nos pais e/ou no parceiro reprodutivo do indivíduo afetado pode ser efetuada a fim de fornecer informações sobre riscos potenciais para irmãos e/ou descendentes. Contudo, as indicações para a triagem em familiares não estão bem estabelecidas e a pesquisa rotineira da mutação em membros da família geralmente não é recomendada, sendo uma decisão avaliada de forma individual (KUJOVICK, 2011). A pesquisa da mutação em familiares assintomáticos pode ser útil para reduzir a ocorrência de TEV provocado nesses indivíduos, uma vez que a prevenção antitrombótica primária pode ser administrada em circunstâncias que poderiam potencialmente conduzir ao TEV, como por exemplo, viagem de longa distância, gravidez e puerpério. Além disso, essa informação também pode ajudar no aconselhamento de

mulheres portadoras de FVL sobre o uso de contraceptivos orais ou TRH (DE STEFANO; ROSSI, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

A prevalência de FVL varia de acordo com a população e apresenta distribuição geográfica desigual. Nos EUA, a mutação é mais presente em americanos brancos e hispânicos, e mais rara em afro-americanos, asiáticos americanos e nativos americanos (RIDKER *et al.*, 1997a). Na Europa, as prevalências nos diferentes países podem variar e serem inferiores a 1% ou atingirem valores próximos de 15%. Já em países asiáticos, africanos e populações indígenas australianas, geralmente a mutação é extremamente rara (REES; COX; CLEGG, 1995). Em Marrocos, um estudo não detectou a mutação em nenhum dos indivíduos pesquisados, em oposição ao encontrado na Palestina, Jordânia e em árabes israelenses, cuja frequência encontrada variou de 7,0-13,6% (GIUDICELLI, 2002). Entre os Libaneses, a prevalência detectada oscilou de 2-15% (ALMAWI, 2002).

No Brasil, país de origem étnica heterogênea, existem poucos estudos sobre a prevalência de FVL. Um trabalho realizado em Ribeirão Preto/SP (N = 440) avaliou a prevalência da mutação em indivíduos assintomáticos de quatro diferentes grupos étnicos e verificou que a mutação foi relativamente frequente em caucasianos (2,6%) e inexistente em negros africanos e em asiáticos (FRANCO *et al.*, 1999).

O estado de Santa Catarina possui um histórico de colonização por diferentes povos europeus, como portugueses, italianos e alemães (CORRÊA, 1999). Na capital, Florianópolis, habitam indivíduos provenientes de todo o estado, principalmente em decorrência da presença da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Além disso, a cidade, por estar localizada na região sul do país e possuir clima subtropical, apresenta uma temperatura média anual de 17,5 °C, chegando a média de 11,0-15,0 °C entre os meses de maio e setembro, valores inferiores às regiões do Brasil com clima tropical, que registram temperaturas médias anuais de 20,5-24,0 °C (ALMEIDA; ZANLORENSSI, 2017). Conforme mencionado anteriormente, a literatura relata associação entre baixas temperaturas e maior incidência de TEV nos estados do sul do Brasil (OHKI; VAN BELLEN, 2017). Dessa forma, a determinação da frequência de portadores de FVL será importante para fornecer informações relativas à heterogeneidade da prevalência desse fator de risco importante para TEV e poderá ajudar a compreender as diferenças étnicas ou geográficas na incidência de doenças trombóticas.

Além disso, o exame para detecção da mutação FV R506Q é oferecido por um custo médio de R\$510,00 em laboratórios particulares na cidade de Florianópolis. Atualmente, o Hospital Universitário vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) terceiriza a realização do exame pelo SUS, sob um custo que varia de R\$320,00 a R\$400,00 por teste para a instituição. Assim, fica evidente a necessidade da padronização de uma metodologia eficaz e menos onerosa à instituição para que um maior número de pacientes possa ser contemplado com a realização do exame.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Padronizar a técnica para detecção da mutação FV R506Q e determinar a prevalência de Fator V de Leiden em doadores de sangue de Florianópolis.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Padronizar a metodologia para a detecção de FVL (FV R506Q);
- Validar a metodologia para a detecção de FVL (FV R506Q);
- Avaliar a prevalência de FVL (FV R506Q) nos doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) de Florianópolis;
  - Determinar a frequência de FVL segundo a mesorregião do estado de Santa Catarina de origem do doador;
  - Determinar a frequência de FVL segundo a cor/raça do doador;
  - Estudar a associação da presença de FVL com as características dos doadores de sangue;
  - Verificar a associação da presença de FVL com outros fatores de risco para TEV.



## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), sob número 2.064.384 (Anexo A), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), sob número FLN.01.03.13-R01 (Anexo B). Foram obedecidos os critérios éticos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, garantindo, dessa forma, o sigilo da identidade dos participantes da pesquisa. Todos os doadores que apresentaram a mutação FV R506Q foram encaminhados para consulta com médico hematologista.

### 4.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo quantitativo, transversal e prospectivo.

### 4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A população de estudo foi obtida a partir de doadores de sangue do HEMOSC de Florianópolis, com idades entre 18 e 69 anos. Para o cálculo amostral, adotou-se um nível de confiança de 95% e um erro absoluto de 1,5%. Considerou-se uma prevalência esperada de FVL no período do estudo de 2,0% (ARRUDA *et al.*, 1995; FRANCO, 1999). Com o objetivo de repor qualquer perda devido aos critérios de exclusão, o tamanho da amostra sugerida pelo cálculo amostral foi aumentado em 10%. Dessa forma, o tamanho amostral calculado foi de 400 doadores voluntários de sangue.

Para a realização dos experimentos, foi utilizada uma alíquota de 400 µL de sangue obtida a partir do tubo de sangue total anticoagulado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que é coletado no momento da doação da bolsa de sangue e que é utilizado para a realização dos exames de rotina do setor de imunohematologia. Dessa forma, não foi necessária a coleta de um tubo de sangue adicional ou a realização de uma segunda punção venosa. As alíquotas foram separadas antes da amostra ser processada pelo setor de imunohematologia.

A partir do questionário autoaplicado (Apêndice A) pelo participante/doador, obteve-se os seguintes dados: procedência, sexo, idade, cor/raça, tipo sanguíneo (ABO e RhD), altura, peso, uso de contraceptivo oral e histórico familiar de TEV. A partir dos dados altura e peso, foi calculado o índice de massa corporal (IMC) dos participantes e estes foram classificados em: abaixo do peso ( $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ ), peso normal ( $IMC = 18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$ ), excesso de peso ( $IMC = 25,0\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$ ) e obesidade ( $IMC > 30,0 \text{ kg/m}^2$ ) (BRASIL, 2018).

#### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

No presente estudo, foram incluídas amostras de doadores de sangue do HEMOSC de Florianópolis que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), responderam ao questionário autoaplicado anexo ao TCLE e que doaram sangue entre 01 de março de 2017 e 01 de junho de 2018.

#### 4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A presença de inibidores de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi considerada um fator de exclusão.

#### 4.6 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PCR E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q)

Para a detecção da mutação Fator V de Leiden (FV R506Q) foi utilizada a técnica de PCR seguida por digestão enzimática com MnlI (ARRUDA *et al.*, 1995).

Para a padronização, foram utilizadas amostras de sangue periférico coletadas de indivíduos que conhecidamente possuíam ou não a mutação FV R506Q. A amostra controle de homozigose de FV R506Q foi adquirida do laboratório Centro de Genomas/São Paulo. A amostra controle de heterozigose de FV R506Q e a amostra controle de ausência de mutação foram obtidas de indivíduos referenciados ao HU-UFSC que já haviam realizado a investigação da presença da mutação em laboratório externo.

O DNA genômico foi extraído de 200  $\mu\text{L}$  de sangue periférico utilizando-se o kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega/EUA), conforme instruções do fabricante. A

quantidade de DNA extraído foi estipulada pelo NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences/Reino Unido) e a qualidade do mesmo foi avaliada pela relação das absorbâncias 260/280 nm.

Após a extração do DNA, a região alvo foi amplificada por PCR utilizando-se os iniciadores específicos, 5'-CTTGAAGGAAATGCCCCATTA-3' (senso) e 5'-TGCCAGTGCTTAACAAGACCA-3' (antissenso) para a região do exon 10 do gene do FV (ARRUDA *et al.*, 1995).

As reações foram preparadas com um volume final de 50 µL. Para a etapa de padronização, foram testadas diferentes concentrações de iniciadores e de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), assim como diferentes fabricantes de Taq DNA polimerase. Dessa forma, de modo geral, a solução mix da PCR foi preparada conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Solução mix utilizada para padronização da PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q).

<b>Solução mix para uso da Taq DNA polimerase Invitrogen/EUA</b>	<b>Solução mix para uso da Taq DNA polimerase PROMEGA/EUA</b>
Água ultra-pura: q.s.p. 50 µL	Água ultra-pura: q.s.p. 50 µL
Tampão 10 X Invitrogen: 5,0 µL	Tampão 5 X PROMEGA: 10 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM): 1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> (25 mM): 0,5 – 3 mM
Iniciador senso (10 µM): 0,12 – 0,2 µM	Iniciador senso (10 µM): 0,12 µM
Iniciador antissenso (10 µM): 0,12 – 0,2 µM	Iniciador antissenso (10 µM): 0,12 µM
dNTP <i>mix</i> (100 mM): 0,8 mM	dNTP <i>mix</i> (100 mM): 0,8 mM
Taq DNA polimerase (5 U/µL): 1,5 U	Taq DNA polimerase (5 U/µL): 1,5 U
DNA genômico: ≈ 200 ng	DNA genômico: ≈ 200 ng

q.s.p.- quantidade suficiente para; MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio; dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados. Fonte: autora.

A amplificação foi realizada em termociclador Applied Biosystems/EUA, modelo 2720 Thermal Cycler. Durante a padronização, foi realizada uma adaptação do protocolo de Yap *et al.* (1999), em que foram testadas diferentes temperaturas de pareamento, sendo que as condições de reação foram: 30 ciclos de 40 segundos a 94

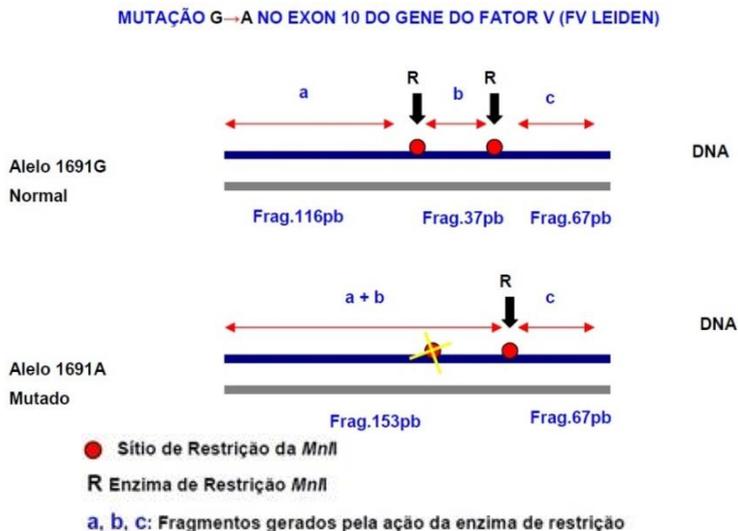
°C para a desnaturação da fita de DNA, 40 segundos a 56-62 °C para pareamento dos iniciadores, e 2 minutos a 72 °C para extensão da fita.

Antes da digestão enzimática, o sucesso da amplificação foi verificado realizando-se uma eletroforese em gel de agarose 2,5% a 130 V por 20 minutos, protocolo já utilizado pelo laboratório de biologia molecular do HU-UFSC. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz ultravioleta (UV) de 320 nm (ImageQuantLAS500, GE Healthcare Life Sciences/Reino Unido). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de tamanho molecular de 50 pares de base (pb). As amostras que apresentavam uma única banda com 220 pb foram submetidas à digestão com MnlI.

A digestão enzimática foi preparada com um volume final de 20 µL e foi realizada na seguinte condição: 10 µL de produto de PCR, 2 µL de tampão CutSmart (New England BioLabs/EUA), 0,2 µL de MnlI (5 U/µL; New England BioLabs/EUA) e água ultra-pura q.s.p 20 µL. A reação foi incubada por 12 horas a 37 °C, e os produtos da digestão foram observados em gel de poliacrilamida 12%, conforme protocolo já utilizado pelo laboratório de biologia molecular do HU/UFSC (8 minutos sob 50 V mais 35 minutos sob 200 V). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de tamanho molecular de 50 pb.

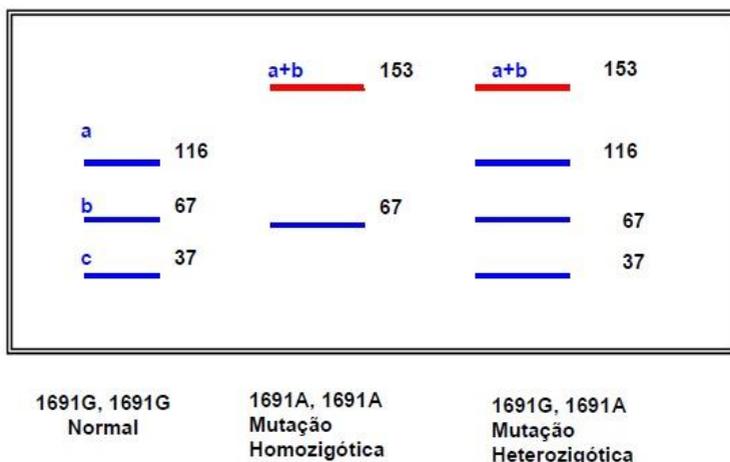
A presença da mutação foi detectada pela perda de um dos sítios de restrição (Figura 8). Em indivíduos homocigotos deve haver produção de dois fragmentos (67 pb e 153 pb), enquanto os heterocigotos apresentam quatro fragmentos (37 pb, 67 pb, 116 pb e 153 pb) gerados pela perda do sítio de restrição em dois e em um dos alelos, respectivamente (Figura 9). Já os indivíduos que não possuíam a mutação apresentam três fragmentos (37 pb, 67 pb e 116 pb) (ARRUDA *et al.*, 1995).

Figura 8 - Esquema ilustrando a perda do sítio de restrição da enzima *MnlI* em consequência da mutação de ponto do Fator V de Leiden.



Fonte: CARVALHO, 2004

Figura 9 - Ilustração esquemática do resultado gerado da digestão pela enzima de restrição *MnlI* do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de Fator V de Leiden.



Fonte: CARVALHO, 2004

Para a validação da PCR para detecção de FV R506Q, foi avaliada a robustez da técnica frente às condições de armazenamento da amostra de sangue total. Para tanto, amostras de sangue total com resultados conhecidos foram acondicionadas em geladeira por 15 e 30 dias, e à temperatura de -20 °C por 30 e 90 dias. Posteriormente ao tempo de armazenamento, as amostras foram submetidas à extração de DNA, seguida de PCR e digestão enzimática.

Para avaliar os limites de detecção da PCR, foram realizados dois testes. Inicialmente, foi analisada a influência da leucopenia na detecção da mutação e, para tanto, a extração de DNA foi efetuada a partir de amostras de sangue total com leucometria igual ou menor ao limite inferior de referência ( $3.800 \text{ leucóцитos/mm}^3$ ) (BAIN, 2008). Para o segundo ensaio, foram executadas diluições seriadas de DNA genômico de concentração conhecida. Nos dois testes, o DNA foi submetido à PCR seguida de digestão enzimática e determinou-se a menor quantidade de leucócitos ou de DNA necessária para se obter bandas visíveis e de qualidade no gel de poliacrilamida.

Adicionalmente, foi avaliada a reprodutibilidade do método. Para tal, foram realizadas 35 ampliações de amostras conhecidamente positivas ou negativas para a mutação, contemplando todas as formas de apresentação do gene (homozigoto para mutação, heterozigoto para mutação ou sem mutação). A concordância entre os resultados obtidos nesse trabalho e os resultados de laboratórios de referência foi avaliada pelo teste de Kappa.

#### 4.7 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q) NOS DOADORES DE SANGUE

Após a padronização da PCR seguida de digestão enzimática para detecção de FV R506Q, a presença da mutação nos doadores de sangue foi avaliada da forma descrita abaixo. O método de extração de DNA genômico e os iniciadores utilizados foram os mesmo já citados no item 4.6 do presente trabalho.

As reações de PCR foram executadas com um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . A solução mix da PCR foi preparada da seguinte forma:  $\approx 200 \text{ ng}$  de DNA genômico, 10  $\mu\text{L}$  de tampão 5X concentrado para Taq DNA polimerase (pH 8,5, Promega/EUA), 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM; Promega/ EUA), 0,8 mM de dNTP mix (100 mM de cada; QIAGEN/Alemanha), 0,12  $\mu\text{M}$  de iniciador senso e antisenso (10  $\mu\text{M}$

cada), 1,5 U de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L; Promega/EUA) e água ultra-pura q.s.p 50  $\mu$ L.

A amplificação foi realizada em termociclador Applied Biosystems/EUA, modelo 2720 Thermal Cycler. As condições de reação foram: 30 ciclos de 40 segundos a 94 °C para a desnaturação da fita de DNA, 40 segundos a 57 °C para pareamento dos primers e 2 minutos a 72 °C para extensão da fita.

O sucesso da amplificação foi verificado conforme já descrito no item 4.6 do presente trabalho. As amostras que apresentavam uma única banda com 220 pb foram submetidas à digestão com MnlI. A digestão enzimática foi preparada com um volume final de 20  $\mu$ L e realizada na seguinte condição: 10  $\mu$ L de produto de PCR, 2  $\mu$ L de tampão CutSmart (New England BioLabs/EUA), 1 U de MnlI (5 U/ $\mu$ L; New England BioLabs/EUA) e água ultra-pura q.s.p 20  $\mu$ L. A reação foi incubada por 12 horas a 37 °C e os produtos da digestão foram observados em gel de poliácridamida 12% a 50 V por 8 minutos, acrescido de 200 V por 35 minutos. A identificação dos fragmentos foi realizada conforme descrito no item 4.6 do presente trabalho.

Em todos os experimentos de PCR, foi incluído um tubo de reação sem amostra (água no lugar do DNA) como controle negativo da reação (O). Em todos os ensaios de digestão enzimática e corridas eletroforéticas foram incluídas três amostras controle para mutação: uma conhecidamente homozigota para FVL (CPhomo), uma conhecidamente heterozigota para FVL (CPhetero) e outra conhecidamente sem a mutação (CN).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção do banco de dados e a análise estatística foram realizadas com o auxílio do software MedCalc® v18.2.1. Para a validação, foi determinada a concordância entre os resultados dos exames através do teste Kappa. A concordância foi definida segundo os seguintes valores de Kappa: i) 0 – 0,2: pobre; ii) 0,21 – 0,4: razoável; iii) 0,41 – 0,6: moderada; iv) 0,61 – 0,8: boa; v) 0,81 – 1,0: excelente (ALTMAN, 1991). Para a análise descritiva dos dados, foram estimadas as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas. As frequências obtidas foram comparadas entre os grupos pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q)

#### 5.1.1 Padronização da PCR

A quantidade de DNA extraído em 200 $\mu$ L de amostra foi, em média, de 100  $\pm$  3,5 ng/ $\mu$ L. A relação 260/280 nm obtida foi sempre superior a 1,8, sendo, dessa forma, o DNA considerado de boa qualidade.

A solução mix do primeiro protocolo experimental de PCR testado está apresentada na Tabela 1. A programação utilizada no termociclador foi: 30 ciclos de 40 segundos a 94 °C para desnaturação da fita de DNA, 40 segundos a 57 °C para pareamento dos iniciadores e 2 minutos a 72 °C para extensão da fita.

Tabela 1 - Solução mix do primeiro protocolo de PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q).

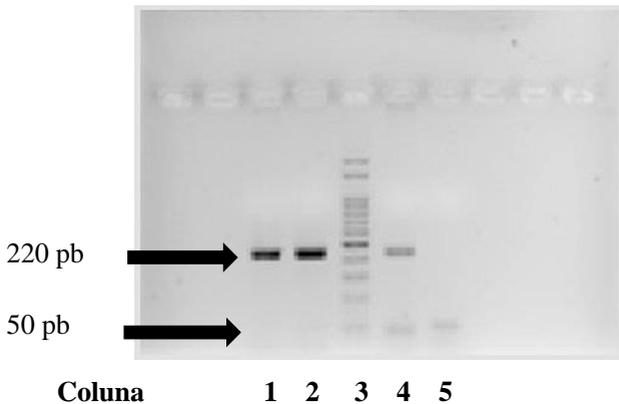
Reagentes	Concentração	Volume ( $\mu$ L)
Água ultra-pura	-	q.s.p. 50 $\mu$ L
Tampão 10 X	-	5,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM	1,5
Iniciador senso (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M	1,0
Iniciador antisenso (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M	1,0
dNTP mix (100 mM)	0,8 mM	0,4
Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L; Invitrogen/USA)	1,5 U	0,3
DNA	$\approx$ 200 ng	2,0

q.s.p.- quantidade suficiente para; MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio; dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados. Fonte: autora.

Após a amplificação, os produtos da reação foram observados em gel de agarose 2,5% (Figura 10), onde foi possível detectar a presença de uma banda inespecífica com tamanho aproximado de 50 pb. Uma banda tão pequena não prejudica a visualização da banda referente ao produto de 220 pb da PCR. Contudo, como os produtos da digestão enzimática podem ter tamanhos tão pequenos quanto 37 pb, tal banda

inespecífica pode prejudicar sua observação e interpretação, sendo necessário, então, aprimorar a reação para impedir a formação dessa banda.

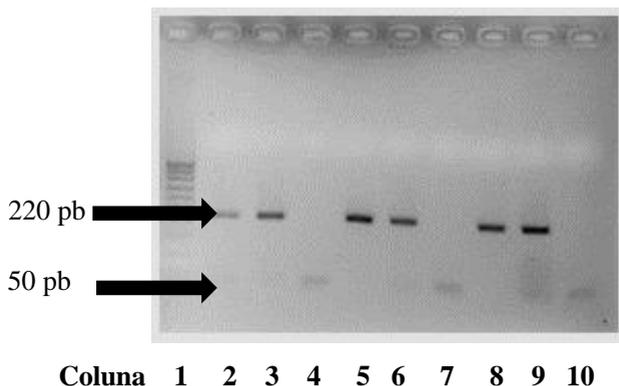
Figura 10 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 1.



Coluna 1 – Controle positivo para homocigose; Coluna 2 – Controle positivo para heterocigose; Coluna 3 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 4 – Controle negativo para a mutação; Coluna 5 – Controle negativo com água.  
Fonte: autora.

Bandas de tamanho tão pequeno quanto 50 pb estão geralmente relacionadas com a formação de dímeros de iniciadores. Neste caso, deve-se verificar a concentração de cada iniciador e, se necessário, otimizar essas concentrações (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Assim, foi realizado um segundo protocolo experimental em que foram testadas diferentes concentrações de iniciadores (0,2  $\mu\text{M}$ , 0,16  $\mu\text{M}$  e 0,12  $\mu\text{M}$  cada). Os demais reagentes da PCR foram utilizados nas mesmas concentrações do Protocolo 1. Os produtos da PCR do Protocolo 2 podem ser visualizados na Figura 11. As três concentrações de iniciadores utilizadas evidenciaram as mesmas bandas inespecíficas presentes no Protocolo 1. Entretanto, a modificação da concentração para 0,12  $\mu\text{M}$  foi incorporada aos protocolos subsequentes, pois o produto desejado de 220 pb ainda foi facilmente visualizado com essa concentração de iniciador.

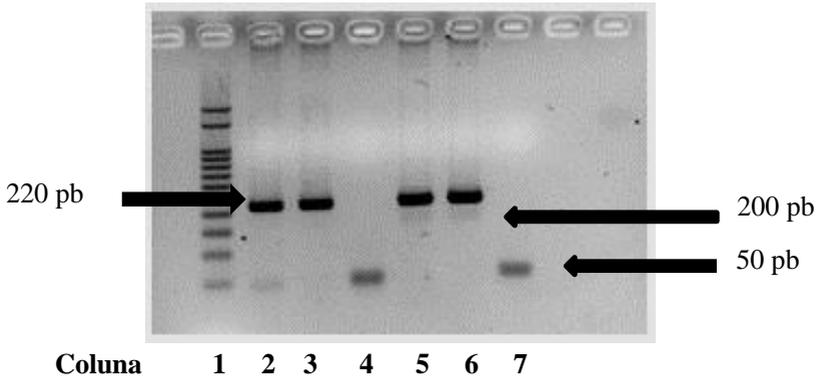
Figura 11 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 2.



Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Controle positivo para mutação (CP) com 0,2  $\mu$ M de iniciador; Coluna 3 – Controle negativo para a mutação (CN) com 0,2  $\mu$ M de iniciador; Coluna 4 – Controle negativo com água (O) com 0,2  $\mu$ M de iniciador; Coluna 5 – CP com 0,16  $\mu$ M de iniciador; Coluna 6 – CN com 0,16  $\mu$ M de iniciador; Coluna 7 – O com 0,16  $\mu$ M de iniciador; Coluna 8 – CP com 0,12  $\mu$ M de iniciador; Coluna 9 – CN com 0,12  $\mu$ M de iniciador; Coluna 10 – O com 0,12  $\mu$ M de iniciador. Fonte: autora.

Em uma nova tentativa de eliminar a formação dos dímeros de iniciadores, foi elaborado um terceiro protocolo experimental, em que foi adicionado à solução mix dimetilsulfóxido (DMSO). O DMSO atua como co-solvente, facilitando a desnaturação total das fitas do DNA, principalmente em sequências ricas em guanina e citosina (OLIVEIRA, 2007; SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Dessa forma, no Protocolo 3, foram utilizadas as mesmas condições do Protocolo 2, com o acréscimo de DMSO 5% e 10%. Como pode ser observado na Figura 12, quando foi utilizado DMSO 5%, ainda houve a formação de dímeros de iniciadores. Quando o DMSO foi utilizado na concentração de 10%, houve a formação de tais dímeros somente no controle sem DNA, contudo ocorreu o aparecimento de uma banda inespecífica de tamanho aproximado de 200 pb. Dessa forma, o DMSO não foi incorporado ao protocolo de PCR.

Figura 12 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 3.



Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Controle positivo para mutação (CP) com DMSO 5%; Coluna 3 – Controle negativo para a mutação (CN) com DMSO 5%; Coluna 4 – Controle negativo com água (O) com DMSO 5%; Coluna 5 – CP com DMSO 10%; Coluna 6 – CN com DMSO 10%; Coluna 7 – O com DMSO 10%. Fonte: autora.

Mais uma vez objetivando eliminar os dímeros de iniciadores, a enzima Taq DNA polimerase da Invitrogen/EUA foi substituída pela Taq DNA polimerase da Promega/EUA. Esta última possui um tampão projetado para aumentar e otimizar a amplificação de DNA e já demonstrou, em outros testes realizados pelo laboratório de biologia molecular do HU-UFSC, a capacidade de reduzir expressivamente o aparecimento de bandas inespecíficas. Dessa forma, foi criado o Protocolo 4 para testar a possibilidade de diferença entre as duas marcas de Taq DNA polimerase (Tabela 2).

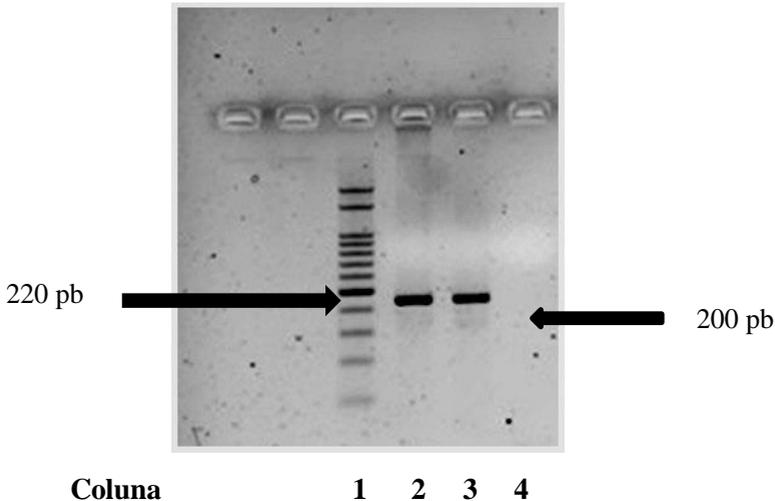
Tabela 2 - Solução mix do Protocolo 4 de PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q).

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume (µL)</b>
Água ultra-pura	-	q.s.p. 50 µL
Tampão 5 X	-	10
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 mM	3,0
Iniciador senso (10 µM)	0,12 µM	0,6
Iniciador antisenso (10 µM)	0,12 µM	0,6
dNTP mix (100 mM)	0,8 mM	0,4
Taq DNA polimerase (5 U/µL, Promega)	1,5 U	0,3
DNA	≈ 200 ng	2,0

q.s.p.- quantidade suficiente para; MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio; dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados. Fonte: autora.

A utilização da Taq DNA polimerase da Promega/EUA não proporcionou a formação de dímeros de iniciadores, contudo também houve o aparecimento de uma banda inespecífica de tamanho aproximado de 200 pb (Figura 13). Entretanto, como a banda inespecífica era fraca, essa modificação foi incorporada ao protocolo.

Figura 13 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 4.

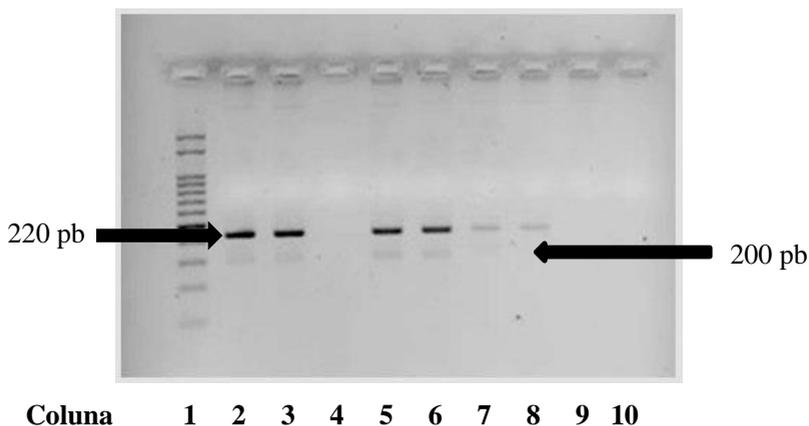


Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Controle positivo para mutação; Coluna 3 – Controle negativo para a mutação; Coluna 4 – Controle negativo com água. Fonte: autora.

Posteriormente, visando eliminar a formação do produto inespecífico de tamanho aproximado de 200 pb, foi proposto o Protocolo 5, em que foi realizada uma curva de gradiente de temperatura de pareamento. Tal protocolo foi elaborado baseado no fato de que uma temperatura de pareamento muito alta pode gerar um fraco anelamento dos iniciadores, causando baixa amplificação de DNA. Já uma temperatura muito baixa pode proporcionar um anelamento não específico dos iniciadores, resultando em amplificações de segmentos de DNA desconhecidos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A solução mix utilizada nesse ensaio foi a mesma descrita para o Protocolo 4. As temperaturas de pareamento testadas foram 56 °C, 58 °C, 60 °C e 62 °C. As temperaturas de abertura da fita (94 °C) e de extensão da fita (72 °C) foram iguais para todas as reações. Na Figura 14 estão representados os produtos de PCR do Protocolo 5. Como pode ser observado, os produtos inespecíficos de tamanho molecular aproximado de 200 pb foram observados até a temperatura de 60 °C. A temperatura de 62 °C não

proporcionou o aparecimento de tal produto, entretanto a amplificação do produto desejado de 220 pb foi prejudicada. Dessa forma, foi mantida a temperatura de pareamento de 57 °C, utilizada já no primeiro protocolo.

Figura 14 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 5.

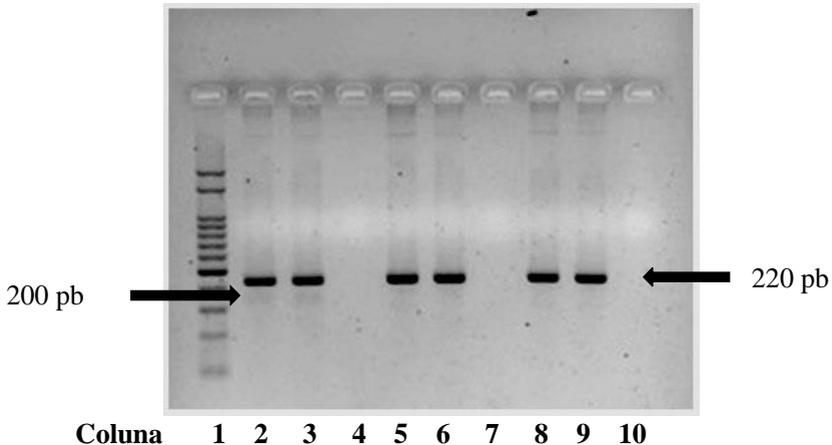


Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Controle positivo para mutação (CP) 56 °C; Coluna 3 – Controle negativo para mutação (CN) 56 °C; Coluna 4 – Controle negativo com água (O) 56 °C; Coluna 5 – CP 58 °C; Coluna 6 – CN 58 °C; Coluna 7 – CP 60 °C; Coluna 8 – CN 60 °C; Coluna 9 – CP 62 °C; Coluna 10 – CN 62 °C. Fonte: autora.

Novamente com a intenção de eliminar a formação do produto inespecífico de tamanho aproximado de 200 pb, foi delineado o Protocolo 6. Nesse protocolo, foram utilizadas concentrações de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) que variaram de 0,5 mM a 3,0 mM. Apesar de a concentração de 1,5 mM de  $MgCl_2$  ser rotineiramente utilizada em reações de PCR, uma concentração elevada de magnésio pode ser responsável por aumentar ou diminuir amplificações inespecíficas. Dessa forma, a concentração ótima de magnésio deve ser determinada empiricamente para cada combinação de iniciadores e DNA molde (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Como resultado, quando o  $MgCl_2$  foi utilizado em concentração igual ou superior a 2,5 mM, a banda de

produto inespecífico de tamanho aproximado de 200 pb não foi mais visualizada (Figura 15).

Figura 15 - Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as condições descritas para o Protocolo 6.



Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Controle positivo para mutação (CP) com 2 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 3 – Controle negativo para mutação (CN) com 2 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 4 – Controle negativo com água (O) com 2 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 5 – CP com 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 6 – CN com 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 7 – O com 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 8 – CP com 3 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 9 – CN com 3 mM de  $MgCl_2$ ; Coluna 10 – O com 3 mM de  $MgCl_2$ . Fonte: autora.

O Protocolo 6 foi repetido por três vezes e em todas as ocasiões obteve-se o mesmo resultado. Dessa forma, a técnica de PCR para detecção de FV R506Q foi considerada padronizada. Na Tabela 3 encontra-se descrita a solução mix de PCR após a padronização.

Tabela 3 - Solução mix de PCR para detecção de Fator V de Leiden (FV R506Q) após fim da padronização.

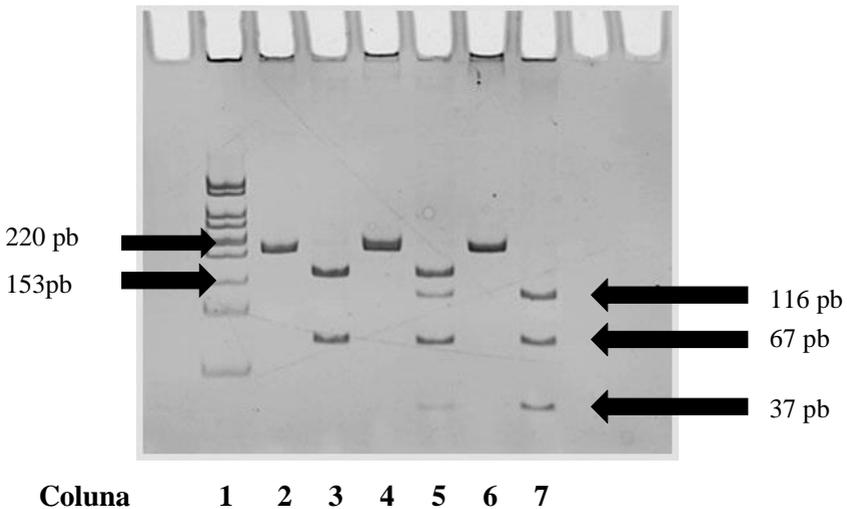
Reagentes	Concentração	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água ultra-pura	-	q.s.p. 50 $\mu\text{L}$
Tampão 5 X	-	10
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	2,5 mM	5,0
Iniciador senso (10 $\mu\text{M}$ )	0,12 $\mu\text{M}$	0,6
Iniciador antisenso (10 $\mu\text{M}$ )	0,12 $\mu\text{M}$	0,6
dNTP mix (100 mM)	0,8 mM	0,4
Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ , Promega)	1,5 U	0,3
DNA	$\approx$ 200 ng	2,0

q.s.p.- quantidade suficiente para;  $\text{MgCl}_2$  - cloreto de magnésio; dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados. Fonte: autora.

### 5.1.2 Padronização da digestão enzimática

Após a amplificação da sequência alvo, 10  $\mu\text{L}$  do produto da PCR foram digeridos com 1 U da enzima MnlI à 37 °C por 12 horas. Depois da digestão foi efetuada uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12% por 8 minutos sob 50 V mais 35 minutos sob 200 V, havendo nítida separação dos produtos da digestão enzimática (Figura 16).

Figura 16: Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI.



Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Produto da PCR do controle positivo homocigoto para mutação; Coluna 3 – Produto da digestão do controle positivo homocigoto para mutação; Coluna 4 – Produto da PCR do controle positivo heterocigoto para mutação; Coluna 5 – Produto da digestão do controle positivo heterocigoto para mutação; Coluna 6 – Produto da PCR do controle sem a mutação; Coluna 7 – Produto da digestão do controle sem a mutação. Fonte: autora.

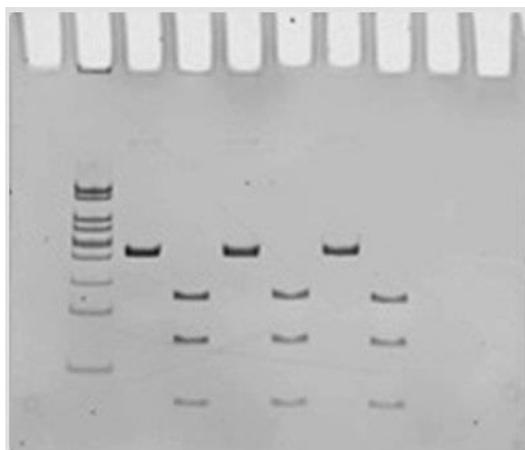
## 5.2 VALIDAÇÃO DA PCR E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE FATOR V DE LEIDEN (FV R506Q)

Considerando que o DNA molde utilizado nas reações de amplificação (PCR) é obtido a partir dos leucócitos presentes nas amostras coletadas de sangue periférico, um possível fator limitante para a detecção de FV R506Q é uma baixa contagem de leucócitos. Por serem doadores clinicamente saudáveis, se esperava que o número de leucócitos dos participantes incluídos nesse estudo estivesse dentro dos parâmetros de referência. Entretanto, a contagem de leucócitos nas amostras obtidas não foi efetuada e, para garantia de que nenhuma amostra tenha apresentado resultados errôneos em virtude de uma leucopenia, foram testados os limites de detecção do método. Para isso,

foi selecionada uma amostra de sangue total com 3.800 leucócitos/mm<sup>3</sup> (limite inferior do valor de referência para adultos). A amostra foi diluída 1:2 (1.900 leucócitos/mm<sup>3</sup>) e 1:4 (950 leucócitos/mm<sup>3</sup>) com solução fisiológica, e o DNA genômico da amostra pura e das diluições foi extraído, amplificado, e os produtos de PCR foram digeridos conforme protocolos padronizados anteriormente.

Como pode ser visualizado na Figura 17, todas as concentrações de leucócitos testadas apresentaram bandas de fácil visualização, mostrando que a leucopenia não interfere na detecção de FV R506Q.

Figura 17 – Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI utilizando-se amostras com baixas contagens de leucócitos.



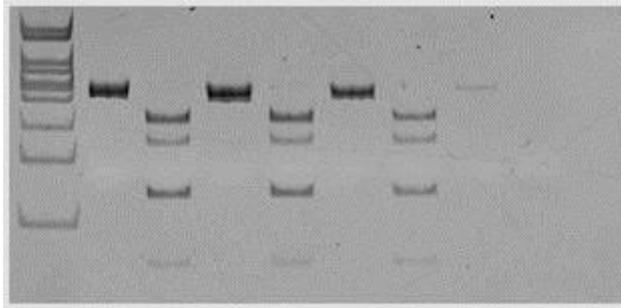
**Coluna**            1   2   3   4   5   6   7

Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Produto da PCR a partir de amostra com 3.800 leucócios/mm<sup>3</sup>; Coluna 3 – Produto da digestão a partir de amostra com 3.800 leucócios/mm<sup>3</sup>; Coluna 4 – Produto da PCR a partir de amostra com 1.900 leucócios/mm<sup>3</sup>; Coluna 5 – Produto da digestão a partir de amostra com 1.900 leucócios/mm<sup>3</sup>; Coluna 6 – Produto da PCR a partir de amostra com 950 leucócios/mm<sup>3</sup>; Coluna 7 – Produto da digestão a partir de amostra com 950 leucócios/mm<sup>3</sup>. Fonte: autora.

Também com o intuito de avaliar o limite de detecção da técnica, foi realizada uma diluição seriada de amostra de DNA de concentração conhecida, sendo que as concentrações testadas foram: 200 ng, 20 ng, 2

ng e 0,2 ng de DNA. Conforme pode ser observado na Figura 18, os produtos da digestão enzimática da PCR podem ser facilmente observados no gel de poliacrilamida 12% quando se utiliza até 2 ng de DNA molde na PCR.

Figura 18 – Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI após diluição do DNA.



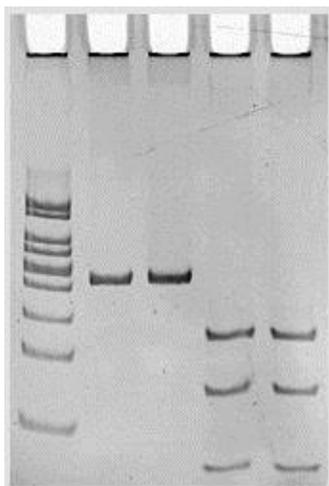
**Coluna**    1    2    3    4    5    6    7    8    9

Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Produto da PCR a partir de 200 ng de DNA; Coluna 3 – Produto da digestão a partir de 200 ng de DNA; Coluna 4 – Produto da PCR a partir de 20 ng de DNA; Coluna 5 – Produto da digestão a partir de 20 ng de DNA; Coluna 6 – Produto da PCR a partir de 2 ng de DNA; Coluna 7 – Produto da digestão a partir de 2 ng de DNA; Coluna 8 - Produto da PCR a partir de 0,2 ng de DNA; Coluna 9 - Produto da digestão a partir de 0,2 ng de DNA. Fonte: autora.

Além disso, para otimizar o fluxo desse trabalho, as amostras de sangue total necessitaram de armazenamento em geladeira ou congelador para que pudessem ser processadas em conjunto. Da mesma forma, considerando o custo da realização de uma PCR, também é vantajoso para a instituição que emprega a técnica que o acondicionamento das amostras seja possível. Assim, visando assegurar que tal armazenamento não causaria impacto nos resultados finais, foi avaliada a robustez da técnica frente ao resfriamento ou congelamento da amostra de sangue total por longos intervalos de tempo. Para tanto, as amostras foram resfriadas por 15 e 30 dias, ou congeladas à -20 °C por 30 e 90 dias. Após esses períodos, o DNA genômico foi extraído e as sequências alvo foram amplificadas e digeridas conforme o protocolo padronizado.

Como pode ser observado nas Figuras 19 e 20, mesmo após o resfriamento por 30 dias e o congelamento da amostra por 90 dias, foi possível identificar bandas de fácil visualização, mostrando que o resfriamento e o congelamento não interferem na detecção de FV R506Q.

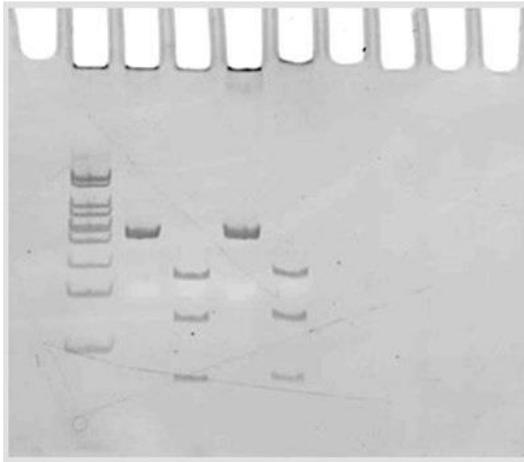
Figura 19 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI após resfriamento das amostras.



**Coluna**    **1**    **2**    **3**    **4**    **5**

Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Produto da PCR após resfriamento da amostra por 15 dias ; Coluna 3 – Produto da PCR após resfriamento da amostra por 30 dias; Coluna 4 – Produto da digestão após resfriamento da amostra por 15 dias; Coluna 5 – Produto da digestão após resfriamento da amostra por 30 dias. Fonte: autora.

Figura 20 - Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da PCR e da digestão enzimática com MnlI após congelamento das amostras.



**Coluna      1      2      3      4      5**

Coluna 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Coluna 2 – Produto da PCR após congelamento da amostra por 30 dias ; Coluna 3 – Produto da digestão após congelamento da amostra por 30 dias; Coluna 4 – Produto da PCR após congelamento da amostra por 90 dias; Coluna 5 – Produto da digestão após congelamento da amostra por 90 dias. Fonte: autora.

Para finalizar a validação da técnica para detecção de FV R506Q, o protocolo padronizado de PCR seguida de digestão enzimática foi realizado 35 vezes, utilizando amostras cujos resultados foram validados por laboratórios externos que já possuíam a técnica padronizada e validada. Dentre as 35 análises, dezoito foram de amostras negativas para a mutação, nove de heterozigotas para a mutação e oito de homozigotas para a mutação.

Todos os 35 resultados encontrados foram idênticos aos achados nos laboratórios externos. O coeficiente Kappa calculado foi de um ( $p < 0,001$ ), ou seja, houve 100% de concordância entre os resultados.

### 5.3 CUSTO DA TÉCNICA PADRONIZADA PARA DETECÇÃO DE FV R506Q

O custo médio direto da técnica padronizada para detecção de FV R506Q foi de R\$20,24. Na Tabela 4 encontra-se o detalhamento do custo de cada reagente.

Tabela 4 - Custo médio direto dos reagentes utilizados na detecção de FV R506Q por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática.

Reagentes	Valor por teste (R\$)*
Kit para extração	11,00
Taq DNA polimerase Promega/EUA	1,00
Iniciador <i>sense</i> IDT/EUA	0,01
Iniciador <i>antisense</i> IDT/EUA	0,01
dNTP Qiagen/Alemanha	0,53
Enzima MnLI New England Biolabs/EUA	0,81
Gel de poliacrilamida	1,77
Tampão TBE	1,80
Padrão de tamanho molecular 50pb	3,30
Brometo de etídio	0,01
<b>TOTAL</b>	<b>20,24</b>

\*Valores estimados a partir de orçamentos obtidos em setembro de 2018. Fonte: autora.

A descoberta da mutação FV R506Q, causando resistência do FV à PCa, foi um marco e mudou a compreensão do fenótipo hereditário da trombose. O conhecimento sobre a base molecular do TEV relacionado ao FVL e a interação entre a mutação e outros fatores de risco genéticos ou adquiridos expandiu-se nos últimos 20 anos. A detecção laboratorial do FVL é comumente realizada pela análise de DNA, permitindo a diferenciação entre genótipo homozigoto e heterozigoto (CAMPELLO *et al.*, 2016). Exames como esse, que detectam alterações genéticas, têm sido cada vez mais utilizados na medicina preventiva, permitindo ao paciente conhecer seu risco potencial de desenvolver determinadas doenças e, com isso, possibilitando a mudança de hábitos para evitá-las. Um levantamento realizado pelo SalomãoZoppi Diagnósticos (2015) aponta que a demanda pelos três principais exames genéticos que detectam trombofilia – FVL, MTHFR e Mutação da Protrombina – cresceu 72% no primeiro semestre de 2015 em relação ao mesmo período do ano anterior.

Desde 21 de dezembro de 2016, vigora em São Paulo a lei nº 16.599, que garante a toda mulher do município o direito de realizar o

rastreamento genético para trombofilia pelo SUS em casos de histórico familiar de trombose ou trombofilia (SÃO PAULO, 2016). Já em Florianópolis, o exame para detecção de FVL não é oferecido pelo SUS. O laboratório de análises clínicas do HU-UFSC terceiriza a realização do exame mediante autorização da direção do hospital em situações específicas, sendo a despesa custeada pela instituição. Assim, fica evidente a relevância da técnica para detecção de FV R506Q ter sido padronizada nesse trabalho por um custo médio de R\$20,24, valor expressivamente mais baixo do que o atualmente pago para terceirização do exame (R\$320 a R\$400). Dessa forma, a disponibilização da técnica para utilização pelo laboratório de análises clínicas do HU-UFSC poderá contribuir para a redução de custos da instituição e ampliação da oferta do exame para os pacientes.

#### 5.4 PREVALÊNCIA DE FVL EM DOADORES DE SANGUE DE FLORIANÓPOLIS

Uma vez que nenhuma amostra foi excluída do estudo por presença de inibidores de PCR, foram incluídos no presente trabalho 400 doadores de sangue. O perfil da população estudada pode ser observado na Tabela 5. A mediana de idade dos participantes foi de 33 anos (amplitude 18 – 65 anos), havendo uma distribuição semelhante em ambos os sexos (56,5% do sexo masculino e 43,5% do sexo feminino). A grande maioria dos doadores era originária da Grande Florianópolis (74,7%) e se declarou da cor/raça branca (87,7%). Em relação ao grupo sanguíneo, houve um predomínio do grupo O (48,7%), seguido do A (37,8%), sendo a maioria RhD positivo (82,5%).

Tabela 5 - Perfil da população estudada (N = 400).

<b>Características</b>		<b>Frequência relativa (%)</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	56,5
	Feminino	43,5
<b>Mesorregião de origem</b>	Grande Florianópolis	74,7
	Vale do Itajaí	6,0
	Serrana	5,7
	Sul	5,5
	Oeste	5,6
	Norte	2,5
<b>Cor/Raça</b>	Branca	87,7
	Preta	4,8
	Parda	6,7
	Amarela	0,3
	Indígena	0,5
<b>Tipo sanguíneo ABO</b>	Tipo A	37,8
	Tipo B	10,5
	Tipo AB	3,0
	Tipo O	48,7
<b>Tipo sanguíneo RhD</b>	Negativo	17,5
	Positivo	82,5

Fonte: autora.

Dentre os participantes do estudo, dez (2,5%) eram heterozigotos para FVL e nenhum homozigoto foi encontrado. A prevalência de FVL é bastante variável em diferentes populações e estudos reportam frequências que variam de 0-15% em indivíduos saudáveis (HIRA *et al.*, 2002; REES; COX; CLEGG, 1995; TAMIN; FINAN; ALMAWI, 2002). Estudos epidemiológicos evidenciam que a prevalência de FVL varia segundo critérios geográficos e étnicos, sendo a mutação extremamente rara ou ausente em países asiáticos (NASIRUDDIN *et al.*, 2005) e sul-africanos (HIRA *et al.*, 2002). A maior prevalência de FVL é encontrada em países do Mediterrâneo Oriental, o que sugere que a origem da mutação tenha ocorrido nesta região (HOTOLEANU, 2016; LUCOTTE; MERCIER, 2001). Na Europa, prevalências mais elevadas são encontradas em Portugal (5,0%) (SERRANO *et al.*, 2011), Alemanha (7,4-12,0%) (ASCHKA *et al.*, 1996; EHRENFORTH *et al.*, 1999; LICHY *et al.*, 2006; SCHAMBECK *et al.*, 1997; TOTH *et al.*, 2008), Itália (6,6-9,5%) (DE STEFANO *et al.*, 1999; SOTTILOTTA *et*

*et al.*, 2009), Polônia (3,5%) (SEREMAK-MROZIKIEWICZ *et al.*, 2010), República Tcheca (10,8%) (PROCHÁZKA *et al.*, 2003), Rússia (3,6%) (AVDONIN *et al.*, 2006) e Bulgária (6,3%) (IVANOV *et al.*, 2009). Já prevalências mais baixas são relatadas na Espanha (1,0-3,3%) (AZNAR *et al.*, 2000; FRANCES *et al.*, 2006; GARCIA-GALA *et al.*, 1997), Finlândia (2,2%) (HILTUNEN *et al.*, 2007) e Croácia (2,9%) (ALFIREVIC *et al.*, 2010). Na Palestina (SELIGSOHN; ZIVELIN, 1997), Jordânia (AWIDI *et al.*, 1999) e em árabes israelenses (ROSEN *et al.*, 1999), a frequência da mutação varia de 7,0% a 13,6%. Já entre os libaneses, foi relatada uma prevalência de 15% (TAMIN; FINAN; ALMAWI, 2002).

Na América Latina, estudos realizados no Chile e na Argentina mostraram que o FVL está presente em heterozigose em 1,25% (PALOMO *et al.*, 2009) e 2,9% (GENOUD *et al.*, 2000) dos doadores de sangue, respectivamente.

No Brasil, existem poucos estudos que avaliaram a prevalência de FVL em indivíduos saudáveis e não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que relatassem a frequência de FVL no estado de Santa Catarina. Um estudo evidenciou uma prevalência da mutação de 2,0% no país (ARRUDA *et al.*, 1995), semelhante ao encontrado no presente trabalho, demonstrando que essa mutação apresenta, na população brasileira, frequência semelhante à relatada em países da Europa. Tal fato pode estar relacionado ao histórico de colonização de Santa Catarina (CORRÊA, 1999).

A ocupação do estado foi iniciada no século XVII, quando Portugal passou a elaborar uma política de povoamento e colonização para o sul do país. Inicialmente, os três principais núcleos fundados pelos portugueses/açorianos foram São Francisco em 1645, Desterro (Florianópolis) em 1651 e Laguna em 1676. Já em meados do século XIX, sob a influência das mudanças econômicas e materiais decorrentes do desenvolvimento da cafeicultura no sudoeste do Brasil, iniciou-se uma nova fase da formação territorial e econômica de Santa Catarina. A necessidade de ampliar a produção de alimentos para suprimento dos centros urbanos levou os fazendeiros de café a pressionar o governo imperial para conceder terras a imigrantes (CORRÊA, 1999).

Os primeiros imigrantes a chegar ao estado foram os alemães, que, por volta de 1850, fundaram a colônia Blumenau, sendo esta procedida pelas colônias Dona Francisca, Brusque e outras. Após 1870, uma grande massa de imigrantes Italianos chegou a Santa Catarina, e estes se estabeleceram principalmente nas regiões de Tubarão,

Urussanga, Criciúma, Turvo, Concórdia, Chapecó e Caçador (CORREIA, 1999). Entretanto, no ano de 1836, através do porto de Desterro, imigrantes da mesma origem já haviam fundado a primeira colônia de italianos no Brasil, a Colônia Nova Itália, localizada no atual município de São João Batista (KONS, 2018).

Atualmente, não existem dados concretos sobre o número de descendentes de portugueses, alemães e italianos em Santa Catarina, visto que o censo nacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) não questiona a ancestralidade da população. Entretanto, estima-se que aproximadamente 35% da população catarinense seja descendente de alemães e 45% de italianos. Os açorianos também deixaram sua herança genética, principalmente em cidades litorâneas como Florianópolis, Imbituba, Itajaí e São Francisco do Sul, contudo, não há estimativas sobre o número de descendentes de portugueses no estado (SANTA CATARINA, 2018).

Dessa forma, Portugal, Alemanha e Itália, países que apresentam elevadas taxas da mutação FVL (ASCHKA *et al.*, 1996; DE STEFANO *et al.*, 1999; EHRENFORTH *et al.*, 1999; LICHY *et al.*, 2006; SCHAMBECK *et al.*, 1997; SERRANO *et al.*, 2011; SOTTILOTTA *et al.*, 2009; TOTH *et al.* 2008) provavelmente contribuíram para a disseminação da mutação no estado.

Na Tabela 6 estão apresentadas as características dos participantes do estudo segundo a presença de FVL. Como pode ser observado, não foi encontrada associação entre a presença de FVL e o perfil geral dos participantes.

Tabela 6 - Associação entre a presença de Fator V de Leiden (FVL) e as características dos participantes (N = 400).

Características	Presença de FVL		p
	Não N (%)	Sim N (%)	
<b>Sexo</b>			
Masculino	220 (97,3)	6 (2,7)	0,821
Feminino	170 (97,7)	4 (2,3)	
<b>Mesorregião de origem</b>			
Grande Florianópolis	290 (97,0)	9 (3,0)	0,766
Vale do Itajaí	23 (95,8)	1 (4,2)	
Serrana	23 (100,0)	0 (0,0)	
Sul	22 (100,0)	0 (0,0)	
Oeste	22 (100,0)	0 (0,0)	
Norte	10 (100,0)	0 (0,0)	
<b>Cor/Raça</b>			
Branca	342 (97,4)	9 (2,6)	0,948
Preta	19 (100,0)	0 (0,0)	
Parda	26 (96,3)	1 (3,7)	
Amarela	1 (100,0)	0 (0,0)	
Indígena	2 (100,0)	0 (0,0)	
<b>Tipo sanguíneo ABO</b>			
Tipo A	147 (97,3)	4 (2,7)	0,189
Tipo B	39 (92,9)	3 (7,1)	
Tipo AB	12 (100,0)	0 (0,0)	
Tipo O	192 (98,5)	3 (1,5)	
<b>Fenótipo RhD</b>			
Negativo	66 (94,3)	4 (5,7)	0,058
Positivo	324 (98,2)	6 (1,8)	

Fonte: autora

Assim como no presente estudo, Maalej *et al.* (2011) também relatou não haver associação entre FVL e o sexo. No presente trabalho, não foi encontrada associação entre a presença do FVL e a raça/cor dos participantes, contudo, percebe-se que os únicos grupos que apresentaram a mutação foram os autodeclarados brancos e pardos. Quando analisado segundo cor/raça, um estudo realizado nos EUA também demonstrou que existe heterogeneidade de distribuição de FVL,

sendo que a mutação foi encontrada em 5,2% dos americanos brancos, 2,2% dos hispânicos americanos, 1,2% dos afro-americanos, 0,45% dos asiáticos americanos e 1,25% dos nativos americanos (RIDKER *et al.*, 1997a).

No Brasil, um trabalho realizado por Franco *et al.* (1999) encontrou a mutação em heterozigose em 2,6% dos caucasianos, 0,6% dos ameríndios e ausência da mesma nos negros africanos e nos asiáticos. De forma semelhante, no presente estudo, a frequência de FVL em autodeclarados brancos foi de 2,6%. Em seu estudo, Franco *et al.*, (1999) não incluíram participantes pardos, mas no presente trabalho foi encontrado um (3,7%) indivíduo heterozigoto para FVL entre os autodeclarados pardos. Segundo o IBGE, é integrada nesta categoria a pessoa que se declara mulata, cabocla, cafuza, mameluca ou mestiça de preto com pessoa de outra cor ou raça/grupo (IBGE, 2018). Considerando que na população estudada não foi encontrada a mutação entre os autodeclarados pretos, muito provavelmente a origem do gene mutante nesse indivíduo deve-se à mistura de preto com pessoa de cor/raça branca.

Estudos sugerem que a predominância de FVL em pessoas da raça/cor branca pode ser explicada pelo fato desta mutação provavelmente ter ocorrido, há mais de 10.000 anos, como um evento único em um ancestral caucasiano europeu comum, cujos descendentes são atualmente portadores caucasianos da mutação que vivem na Europa e em outros países. (JADAON, 2011; ZIVELIN *et al.*, 1997).

Interessantemente, apesar de algumas mesorregiões de Santa Catarina apresentarem forte colonização por parte de países europeus com elevada frequência de FVL, não foi verificada associação entre a presença da mutação e a mesorregião de origem do doador. Possivelmente, isso se deve ao fato das migrações europeias para o estado de Santa Catarina terem ocorrido principalmente durante o século XIX e, a partir do século XX, o crescimento populacional ter sido decorrente do crescimento vegetativo do estado e da imigração interna do estado do Rio Grande do Sul, gerando uma população miscigenada, onde os processos migratórios do século XIX já não influenciavam mais as características de prevalência de FVL nas mesorregiões. Contudo, ressalta-se que, neste trabalho, houve uma baixa representatividade de participantes nascidos em mesorregiões diferentes da Grande Florianópolis, o que pode também ter influenciado nos resultados obtidos.

Da mesma forma, a presença de FVL não foi associada ao grupo sanguíneo ABO dos participantes, resultado também encontrado por Mazoyer *et al.* (2009). Em relação ao fenótipo RhD, apesar de não haver associação significativa, houve uma tendência ( $p = 0,058$ ) de que o FVL esteja relacionado ao fenótipo RhD negativo. Não foi encontrada na literatura pesquisada trabalhos que avaliassem a existência de associação entre FVL e fenótipo RhD. Contudo, uma possível explicação para essa tendência é que ambos os genes podem ter sido introduzidos no estado de Santa Catarina a partir da mesma população, uma vez que, assim como FVL, o RhD negativo é mais frequente em países europeus, e relativamente raro na Ásia, em populações indígenas da América e Pacífico, bem como na África (FLORES-BELLO *et al.*, 2018; GARRATTY *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2009; MAKROO *et al.*, 2014). Contudo, mais estudos são necessários para compreender a possível relação entre FVL e RhD negativo.

## 5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE FVL E OUTROS FATORES DE RISCO PARA TROMBOSE

Dentre os participantes incluídos nesse trabalho, 91% apresentaram pelo menos um fator de risco para desenvolvimento de TEV, sendo que 1,5% tinham mais de 60 anos de idade, 51,2% possuíam grupo sanguíneo não-O, 62,8% tinham excesso de peso ou obesidade, 23,0% possuíam histórico familiar de TEV e 44,8% das mulheres utilizavam contraceptivo oral. Na Tabela 7 estão apresentadas as frequências de FVL segundo a presença de fatores de risco para trombose e, como pode ser observado, também não foi encontrada associação entre a presença de FVL e a existência de outros fatores de risco para TEV.

Tabela 7 - Associação entre a presença de Fator V de Leiden (FVL) e de outros fatores de risco para eventos tromboticos (N = 400).

Outros fatores de risco	Presença de FVL		p
	Não N (%)	Sim N (%)	
<b>Idade</b>			
60 anos ou menos	384 (97,7)	9 (2,3)	0,716
Acima de 60 anos	6 (85,7)	1 (14,3)	
<b>Tipo sanguíneo não-O</b>			
Tipo O	192 (98,5)	3 (1,5)	0,230
Tipo não-O	198 (96,6)	7 (3,4)	
<b>Classificação segundo IMC</b>			
Peso normal	146 (98,0)	3 (2,0)	0,841
Excesso de peso	160 (97,0)	5 (3,0)	
Obesidade	84 (97,7)	2 (2,3)	
<b>Uso de contraceptivo oral entre as mulheres (N = 174)</b>			
Não	93 (96,9)	3 (3,1)	0,420
Sim	77 (98,7)	1 (1,3)	
<b>Histórico familiar de TEV</b>			
Não	300 (97,4)	8 (2,6)	0,819
Sim	90 (97,8)	2 (2,2)	

TEV – Tromboembolismo venoso. Fonte: autora

Na Tabela 8 estão demonstradas as características individuais de cada doador de sangue heterozigoto para FVL. Como pode ser visto, seis indivíduos são do sexo masculino e quatro do feminino. A maioria é proveniente da Grande Florianópolis (9) e da cor/raça branca (9). Sete deles possuem grupo sanguíneo não-O e seis RhD positivo. Além disso, um relatou possuir histórico familiar de TEV, e uma das quatro mulheres utilizava contraceptivo oral. Dentre os heterozigotos encontrados, nove apresentam pelo menos um fator de risco adicional para desenvolvimento de TEV além da presença da mutação.

Tabela 8 - Característica de cada doador heterozigoto para Fator V de Leiden.

<b>Participante</b>	108	109	120	121	206	351	354	356	363	375
<b>Idade</b>	33	34	63	30	22	28	48	45	41	39
<b>Sexo</b>	M	F	M	M	F	M	F	F	M	M
<b>Mesor-região</b>	GF	GF	GF	GF	VI	GF	GF	GF	GF	GF
<b>Cor/Raça</b>	Branca	Branca	Branca	Parda	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca
<b>ABO</b>	A	A	O	A	A	B	B	B	O	O
<b>RhD</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Peso</b>	E	N	E	E	E	N	Ob	Ob	N	E
<b>CO</b>	-	Não	-	-	Sim	-	Não	Não	-	-
<b>HF</b>	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não

M – Masculino; F – Feminino; GF - Grande Florianópolis; VI – Vale do Itajaí; ABO – Tipo sanguíneo ABO; RhD – Tipo sanguíneo RhD; E – Excesso de peso; N – Peso normal; Ob – Obesidade; CO – Uso de contraceptivo oral; HF - Histórico familiar de tromboembolismo venoso. Fonte: autora.

Como já mencionado, todos os portadores de FVL encontrados nesse estudo apresentaram genótipo heterozigoto para a mutação. Muitos autores relatam que há associação entre as taxas de incidência e recorrência de TEV e a presença da mutação em homozigose ou heterozigose (GOHIL; PECK; SHARMA, 2009; HO *et al.*, 2006; JUUL *et al.*, 2004; KOSTER *et al.*, 1993; KUJOVICH, 2011; ROSENDAAL; REITSMA, 2009; SEGAL *et al.*, 2009; ZOLLER *et al.*, 1994).

Botero *et al.* (2016) realizaram um estudo de coorte retrospectivo que incluiu um número de portadores homozigotos e heterozigotos para FVL significativamente maior do que estudos prévios (N = 111 e N = 268, respectivamente). Neste trabalho, os autores observaram maior prevalência de TEV e uma pequena redução na sobrevida dos participantes homozigotos (prevalência = 68% e sobrevida = 56,8 anos) em comparação com os heterozigotos (prevalência = 54% e sobrevida = 59,5 anos). No entanto, a idade média dos pacientes no momento do primeiro evento trombótico e as incidências de TEV secundário ou idiopático foram semelhantes em ambos os grupos. Além disso, foi evidenciado que as taxas de recorrência de TEV, o tempo para a primeira recorrência e a prevalência de recorrência não diferiram significativamente entre portadores homozigotos e heterozigotos da mutação. Assim, foi evidenciado que a profilaxia e o manejo no TEV não devem diferir de acordo com o genótipo da mutação FVL (BOTERO *et al.*, 2016). Outros estudos que também estimaram o risco de desenvolvimento de TEV em portadores de FVL relataram que os portadores heterozigotos apresentam um aumento de 3-8 vezes no risco de manifestação do primeiro evento trombótico (GOHIL; PECK; SHARMA, 2009; KOSTER *et al.*, 1993; ROSENDAAL; REITSMA, 2009) e de 3-5 vezes de ocorrência de trombose venosa cerebral (DENTALI; CROWTHER; AGENO, 2006) quando comparados a indivíduos sem a mutação.

A expressão clínica do FVL comumente é resultado da presença da mutação associada a outros fatores de risco circunstanciais para TEV, tendo tal combinação um efeito supra-aditivo sobre o risco trombótico (KUJOVICH, 2010). Dentre os fatores predisponentes para TEV, se destacam: gravidez, contracepção com estrogênio, viagem de longa distância, trauma, idade avançada, obesidade e cirurgia. O FVL interage com esses fatores para aumentar o risco de desenvolvimento de TEV, sendo que pelo menos 50% dos episódios trombóticos em indivíduos com a mutação são provocados por fatores predisponentes adicionais (LENSEN *et al.*, 2000a). Em um estudo de coorte com homozigotos

sintomáticos para FVL (N = 165), o TEV inicial foi associado a fatores de risco circunstanciais em 81% das mulheres e 29% dos homens, sendo os contraceptivos orais e a gravidez os fatores predisponentes mais comuns em mulheres sintomáticas. Além disso, o mesmo estudo relatou que 13% das cirurgias de grande porte foram complicadas pelo TEV em portadores de FVL, sugerindo um risco para TEV aumentado em 20 vezes (EHRENFORTH *et al.*, 2004). Outro grande estudo de coorte (N = 9.253) evidenciou que, em indivíduos homocigotos para FVL, o risco absoluto de desenvolvimento de TEV em 10 anos aumenta de 3% para 51% quando há a associação de obesidade, tabagismo e idade avançada (JUUL *et al.*, 2004).

Dentre as quatro mulheres portadoras de FVL identificadas no presente trabalho, uma fazia uso de contraceptivo oral. Além disso, a mediana de idade encontrada nestas participantes foi de 39 anos, indicando que a maioria ainda estava em idade reprodutiva. O FVL é encontrado em 20-46% das mulheres com TEV associado à gestação (GERHARDT *et al.*, 2000; HILTUNEN *et al.*, 2007), sendo a mutação responsável por um aumento de 8-52 vezes no risco trombótico durante a gravidez e o puerpério (POMP *et al.*, 2008; ROBERTSON *et al.*, 2006). Um estudo evidenciou que gestantes com a mutação FVL apresentam 11,6 vezes mais chance de desenvolver TEV (N = 675) e o risco torna-se ainda maior em mulheres com fatores de risco coexistentes adquiridos ou circunstanciais, como obesidade (75,5 vezes), idade materna avançada (58,1 vezes em mulheres acima de 35 anos) e grupo sanguíneo não-O (16,3 vezes) (HILTUNEN *et al.*, 2007). Dados da literatura reportam uma alta prevalência de FVL em heterozigose (até 30%) em mulheres com perda gestacional inexplicada recorrente, em comparação com 1-10% dos controles, sugerindo um aumento de 2-5 vezes no risco para aborto (BRENNER *et al.*, 1999; GRIS *et al.*, 1999; KUPFERMINC *et al.*, 1999; MARTINELLI *et al.*, 2000). Além disso, o uso de contraceptivos orais também aumenta substancialmente o risco para TEV em mulheres com FVL, sendo o genótipo heterozigoto responsável por um aumento de até 50 vezes neste risco (BLOEMENKAMP *et al.*, 1995; HUGON-RODIN *et al.*, 2018). Em um trabalho, a mutação em heterozigose foi encontrada em 20% das mulheres com história de TEV durante o uso de contraceptivo oral (HIRSCH *et al.*, 1996). Um outro estudo (N = 324) demonstrou que o risco de desenvolvimento de TEV foi quatro vezes maior em usuárias de contraceptivos orais e oito vezes maior em mulheres heterozigotas para FVL. No entanto, quando houve a

associação entre os dois fatores, o risco foi aumentado em 30 vezes, indicando um efeito multiplicativo, em vez de aditivo, sobre o risco trombótico geral (VANDENBROUCKE *et al.*, 1994). Esse efeito supra-aditivo também foi confirmado em outros trabalhos, que apontaram uma chance 11-41 vezes maior para desenvolvimento de TEV na combinação de ambos os fatores de risco (LEGNANI *et al.*, 2002; SIDNEY *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005).

Sete dos dez portadores de FVL identificados nesse trabalho possuíam excesso de peso ou eram obesos. O excesso de peso/obesidade é outro fator de risco para desenvolvimento de TEV, e, quando associado à presença de FVL, pode elevar substancialmente as chances de um episódio trombótico, sendo que o risco eleva-se progressivamente com o aumento do IMC (JUUL *et al.*, 2004; POMP *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2016). Um estudo envolvendo 4.062 indivíduos demonstrou que pessoas sem a mutação FVL com sobrepeso e obesidade apresentavam um risco de desenvolvimento de TEV 1,1 e 1,9 vezes maior, respectivamente, quando comparadas a pessoas com peso normal e sem FVL. Já entre os participantes com a mutação, o risco foi elevado para 3,1 vezes nos detentores de sobrepeso e 5,4 vezes entre os obesos (RIBEIRO *et al.*, 2016). Outro trabalho também encontrou dados semelhantes, indicando um aumento de oito e seis vezes no risco para TEV em portadores da mutação obesos ou com excesso de peso, respectivamente (POMP *et al.*, 2007). Em outro estudo (N = 9.253), Juul *et al.* (2004) demonstraram que o risco absoluto de desenvolvimento de TEV em 10 anos aumenta de 3% em homozigotos para FVL com peso normal para cerca de 8% em homozigotos para FVL obesos (JUUL *et al.*, 2004).

Um dos indivíduos com FVL encontrado nesse trabalho possuía idade superior a 60 anos. Dados mostram que o risco de desenvolvimento de TEV em portadores de FVL eleva-se com a idade. Um estudo de coorte com 23 anos de seguimento (N = 9.253) evidenciou que o risco absoluto de desenvolvimento de TEV em 10 anos é de 3% em indivíduos homozigotos para FVL com menos de 40 anos. Contudo, esse risco eleva-se para mais de 10% na faixa etária de 40-60 anos e para cerca de 20% naqueles com mais de 60 anos de idade (JUUL *et al.*, 2004). Ridker *et al.* (1997) demonstraram que aproximadamente um terço dos homens com mais de 60 anos com um evento trombótico espontâneo inicial apresentava FVL (RIDKER *et al.*, 1997b). Também no estudo de Heit *et al.* (2005), o risco de TEV foi

significativamente aumentado entre heterozigotos para FVL com mais de 60 anos (risco relativo de 3,6) (HEIT *et al.*, 2005).

No presente estudo, sete dentre os dez doadores heterozigotos para FVL possuem grupo sanguíneo não-O. Ribeiro *et al.* (2016) relatou que indivíduos do grupo sanguíneo não-O apresentam duas vezes mais chance de desenvolvimento de TEV do que aqueles do grupo O e a associação entre grupo sanguíneo não-O e FVL eleva em 9,1 vezes a chance de desenvolvimento da doença quando comparados a pessoas do grupo sanguíneo tipo O sem a mutação. De forma semelhante, Morelli *et al.* (2005) demonstraram que a chance de TEV eleva-se de forma mais expressiva (razão de chance - RC = 23) em portadores de FVL do grupo sanguíneo não-O do que naqueles que apresentam isoladamente a mutação FVL (RC = 4,6) ou grupo sanguíneo não-O (RC = 1,7), utilizando como base indivíduos do grupo sanguíneo-O sem a mutação. Minano *et al.* (2008) também apontaram que a presença concomitante do grupo sanguíneo não-O eleva o risco e a severidade do TEV em portadores de FVL.

Dois dentre os dez heterozigotos para FVL desse trabalho relataram possuir histórico familiar de TEV, contudo, ressalta-se que essa frequência pode estar subestimada uma vez que as informações foram obtidas a partir de questionários autoaplicados e alguns participantes podem não ter completa compreensão do que são eventos tromboembólicos ou podem desconhecer o histórico médico completo de seus familiares. Já está bem estabelecida a importância da influência genética no risco de TEV (GOHIL; PECK; SHARMA, 2009; GRANDONE; MARGAGLIONE, 2011; TANG; HU, 2015) e muitos estudos tem associado o histórico familiar de TEV a um maior risco de incidência e recorrência da doença (KELLY *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2015; SUNDQUIST *et al.*, 2015). Um trabalho realizado com 182 indivíduos pertencentes a famílias trombofílicas evidenciou que a incidência de trombose nos participantes que também eram portadores de FVL foi 3,4 vezes maior do que naqueles apenas com histórico familiar de TEV em parente de primeiro ou segundo grau. Além disso, o mesmo trabalho relatou que a recorrência de TEV foi 3,7 vezes maior nos portadores da mutação do que nos não portadores. Ainda, dentre os participantes portadores de FVL, 47% dos que possuíam parente de primeiro grau afetado pelo TEV apresentaram trombose, contra apenas 5% daqueles que possuíam parente de segundo grau afetado pela doença. Os autores também relataram que, até os 50 anos de idade, 25% dos portadores de FVL já havia vivenciado o primeiro evento trombótico, contra 7%

daqueles sem a mutação (LENSEN *et al.*, 2000a). Dessa forma, se ressalta a importância da triagem para os parentes assintomáticos de indivíduos com trombofilia genética, objetivando reduzir a ocorrência de TEV provocado, uma vez que a profilaxia antitrombótica primária pode ser administrada a esses parentes quando expostos a circunstâncias que poderiam potencialmente levar ao desenvolvimento de TEV, como gravidez, puerpério, cirurgia, imobilização e trauma (DE STEFANO, ROSSI, 2013).

Como já mencionado, a associação da presença de FVL a outros fatores de risco exacerba o risco para desenvolvimento de TEV. Como pode ser observado na Tabela 8, oito dentre os dez heterozigotos para FVL apresentam mais de um fator de risco adicional para desenvolvimento de TEV. Dessa forma, considerando os achados de Ribeiro *et al.* (2016), é possível sugerir que os participantes 108, 121, 354 e 356 possuem 9-12 vezes mais chance de desenvolver TEV quando comparados a indivíduos com peso normal e do grupo sanguíneo O. Já o participante 206 pode apresentar uma chance 30 vezes maior para desenvolvimento de TEV quando comparado a indivíduos do grupo sanguíneo O, com peso normal e que não fazem uso de contraceptivo oral (RIBEIRO *et al.*, 2016). Destaca-se ainda que, no decorrer do presente trabalho, um participante heterozigoto para FVL que possuía outros dois fatores de risco para TEV entrou em contato com os coordenadores do projeto e relatou ter apresentado um episódio de internação hospitalar por trombose poucas semanas após a participação na pesquisa.

Dessa forma, diante da potencialização do risco para desenvolvimento de TEV em algumas pessoas, a solicitação do teste para detecção do FVL somente após o primeiro evento trombótico poderia ser repensada para alguns indivíduos. Pesquisar a presença da mutação naqueles que apresentam associação de fatores de risco bem estabelecidos para TEV, como histórico familiar de TEV e uso de contraceptivo oral, pode ser uma boa estratégia para prevenir o primeiro episódio trombótico, uma vez que possibilitará que essas pessoas utilizem tromboprofilaxia em situações de alto risco não evitáveis, como cirurgia e trauma, e que busquem aconselhamento frente a fatores de risco modificáveis ou evitáveis, como uso de contraceptivos orais e sobrepeso. Contudo, deve-se ressaltar que a decisão médica sobre a triagem para FVL deve ocorrer de forma individualizada para cada paciente, considerando quais e quantos fatores de risco para TEV estão associados e o possível impacto dos mesmos no risco trombótico.



## 6 CONCLUSÃO

A compilação dos resultados encontrados no presente estudo permitiu concluir que:

- A prevalência de FVL encontrada na população de doadores de sangue de Florianópolis foi de 2,5%;
- A mutação FVL foi encontrada apenas em heterozigose;
- A prevalência de FVL encontrada foi semelhante à relatada em outros estudos brasileiros e europeus;
- A maioria dos portadores da mutação incluídos na pesquisa apresentavam fatores de risco adicionais para desenvolvimento de TEV.



## REFERÊNCIAS

- AGENO, W.; BECATTINI, C.; BRIGHTON, T.; SELBY, R.; KAMPHUISEN, P.W. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. **Circulation**, [s.l.], v. 117, p. 93-102, 2008.
- ALFIREVIC, Z.; SIMUNDIC, A.M.; NIKOLAC, N.; SOBOCAN, N. *et al.* Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case-control study. **Bioch Med**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 229-235, 2010.
- ALMEIDA, Rodolfo; ZANLORENSSI, Gabriel. Como a temperatura das capitais brasileiras varia ao longo do ano. 2017. Fontes: BDMEP (Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa), com dados do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), Embrapa e Britannica.. Disponível em: <https://www.nexojournal.com.br>. Acesso em: 08 jul. 2018.
- ALTMAN, Douglas G.. Practical Statistics for Medical Research. [s.l.]: Chapman & Hall, 1991. 624 p.
- ANDERSON, G.L.; LIMACHER, M.; ASSAF, A.R., *et al.* Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, [s.l.], v. 291, p. 1701-1712, 2004.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 114, p. 447-453, 2004.
- ARRUDA, Valder R. *et al.* Factor V Leiden (FVQ 506) Is Common in a Brazilian Population. **American Journal Of Hematology**, Campinas, v. 49, p. 242-243, fev. 1995.
- ASCHKA, I.; AUMANN, V.; BERGMANN, F.; BUDDE, U.; EBERT, W.; ECKHOF- DONOVAN, S.; KREY, S.; NOWAK-GOTTL, U.;

SCHOBESS, R.; SUTOR, A.H.; WENDISCH, J.; SCHNEPPENHEIM, R. Prevalence of factor V Leiden in children with thromboembolism. **Eur J Pediatr**, [s.l.], v. 155, n. 12, p.1009-1014, 1996.

AVDONIN, P.V.; KIRIENKO, A.I.; KOZHEVNIKOVA, L.M.; SHOSTAK, N.A. *et al.* C677T variant in methylenetetrahydrofolatereductase gene in patients with venous thromboses from the central region of Russia correlates with a high risk of pulmonary artery thromboembolism [in Russian]. **Ter Arkh**, [s.l.], v. 78, n. 6, p. 70-76, 2006.

AWIDI, A.; SHANNAK, M.; BSEISO, A.; KAILANI, M.A.M.; KAILANI, M. A.; OMAR, N.; ANSHASI, B.; SAKARNEHN. High prevalence of factor V Leiden in healthy Jordanian Arabs. **Thromb Haemost** , [s.l.] v.81, p.582-4, 1999.

AZNAR, J.; VAYÁ, A.; ESTELLÉS, A.; MIRA, Y. *et al.* Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and Factor V Leiden and interaction with oral contraceptives. **Haematologica**, [s.l.], v. 85, p. 1271–1276, 2000.

BABA-AHMED, M.; LE GAL, G.; COUTURAUD, F.; LACUT, K.; OGER, E.; LEROYER, C. High frequency of factor V Leiden in surgical patients with symptomatic venous thromboembolism despite prophylaxis. **Thromb Haemost**, [s.l.], v.97, p.171– 175, 2007.

BACCARELLI, A.; MARTINELLI, I.; ZANOBETTI, A. *et al.* Exposure to particulate air pollution and risk of deep vein thrombosis. **Arch Intern Med**, [s.l.], v.168, p. 920–927, 2008.

BAGLIN, C.; BROWN, K.; LUDDINGTON, R.; BAGLIN, T. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with the factor V Leiden (FVR506Q) mutation: effect of warfarin and prediction by precipitating factors. East Anglian Thrombophilia Study Group. **Br J Haematol**, [s.l.], v.100, p.764 –768, 1998.

BAGLIN, T.; GRAY, E.; GREAVES, M. *et al.* Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. **Br J Haematol**, [s.l.], v.149, p.209 – 220, 2010.

BAIN, Barbara J. **Blood Cells: A Practical Guide**. 4. ed. Eua: Wiley-blackwell, 2008. 486 p.

BAKER, D.C.; BRASSARD, J. Review of Continuing Education Course on Hemostasis. **Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 39, p. 281-8, 2011.

BARATLOO, A.; SAFARI, S.; ROUHIPOUR, A. *et al.* The risk of venous thromboembolism with different generation of oral contraceptives; a systematic review and meta-analysis. **Emergency**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-11, 2014.

BATES, S.M.; GREER, I.A.; PABINGER, I.; SOFAER, S.; HIRSH, J. American College of Chest Physicians. Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence- Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). **Chest**, [s.l.], v.133, p.844S–886S, 2008.

BATES, S.M.; GREER, I.A.; MIDDELDORP, S. *et al.* VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, [s.l.], v. 141, p. e691S–736S, 2012.

BELL, E.J.; LUTSEY, P.L.; BASU, S., *et al.* Lifetime Risk of Venous Thromboembolism in Two Cohort Studies. **Am J Med**, [s.l.], v.129, p. 339, 2016.

BERGENDAL, A.; PERSSON, I.; ODEBERG, J. *et al.* Association of venous thromboembolism with hormonal contraception and thrombophilic genotypes. **Obstet Gynecol**, [s.l.], v.124, p. 600–609, 2014.

BEZEMER, I.D.; BARE, L.A.; DOGGEN, C.J. *et al.* Gene variants associated with deep vein thrombosis. **JAMA**, [s.l.], v.299, p.1306 – 1314, 2008.

BIRON-ANDRÉANI, C.; BAUTERS, A.; LE CAM-DUCHEZ, V. *et al.* Factor V Leiden homozygous genotype and pregnancy outcomes. **Obstet Gynecol**, [s.l.], v.114, p.1249–1253, 2009.

BLEKER, S.M.; COPPENS, M.; MIDDELDORP, S. Sex, thrombosis and inherited thrombophilia. **Blood Rev**, [s.l.], v.28, p. 123–133, 2014.

BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet Activation. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 9, p. 143-156, 1995.

BLOEMENKAMP, K.W.; ROSENDAAL, F.R.; HELMERHORST, F.M.; BÜLLER, H.R.; VANDENBROUCKE, J.P. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. **Lancet**, [s.l.], v.346, p.1593–1596, 1995.

BLOM, J.W.; DOGGEN, C.J.; OSANTO, S.; ROSENDAAL, F.R. Old and new risk factors for upper extremity deep venous thrombosis. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v.3, p.2471–2478, 2005.

BORCH, K.H.; HANSEN-KRONE, I.; BRAEKKAN, S.K. *et al.* Physical activity and risk of venous thromboembolism. The Tromso study. **Haematologica**, [s.l.], v.95, p. 2088–2094, 2010.

BOTERO, J. Perez *et al.* Do incident and recurrent venous thromboembolism risks truly differ between heterozygous and homozygous Factor V Leiden carriers? A retrospective cohort study. **European Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 30, p.77-81, mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). **Morbidade Hospitalar do SUS**: por local de internação. Brasil. 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/niuf.def>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. . **IMC em adultos**. Disponível em: <http://portalm.s.saude.gov.br/artigos/804-imc/40509-imc-em-adultos>. Acesso em: 14 dez. 2018.

BRENNER, B.; SARIG, G.; WEINER, Z.; YOUNIS, J.; BLUMENFELD, Z.; LANIR, N. Thrombophilic polymorphisms are

common in women with fetal loss without apparent cause. **Thromb Haemost**, [s.l.], v.82, p. 6–9, 1999.

BROZE, G.J. JR. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. **Annu Rev Med**, [s.l.], v.46, p. 103-1, 1995.

BRUGGE, J.M.; SIMIONI, P.; BERNARDI, F. *et al.* Expression of the normal factor V allele modulates the APC resistance phenotype in heterozygous carriers of the factor V Leiden mutation. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v.3, p. 2695–2702, 2005.

BUCKNER, T.W.; KEY, N.S. Venous thrombosis in blacks. **Circulation**, [s.l.], v. 125, p. 837-839, 2012.

CAMPELLO, Elena; SPIEZIA, Luca; SIMIONI, Paolo. Diagnosis and management of factor V Leiden. **Expert Review Of Hematology**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.1139-1149, 31 out. 2016.

CANNEGIETER, S.C.; DOGGEN, C.J.; VAN HOUWELINGEN, H.C.; ROSENDAAL, F.R. Travel-related venous thrombosis: results from a large population-based case control study (MEGA study). **PLoS Med**, [s.l.], v.3, p.307, 2006.

CARVALHO, Eunice Bobô de. **Detecção de Fator V de Leiden em pacientes trombofílicos no estado do Ceará**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

COHEN, Alexander T. *et al.* Venous thromboembolism in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. **Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], p.756-764, 15 out. 2007.

COLMAN RW; HIRSH J; MARDER VJ & CLOWES AW. Overview of coagulation, fibrinolysis, and their regulation. In: COLMAN RW; HIRSH J; MARDER VJ; CLOWES AW & GEORGE JN, eds. **Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice**, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 17-20, 2001.

CORRÊA, W.K. Considerações sobre a formação territorial e econômica de Santa Catarina. **Geosul**, [s.l.], v.14, n. 27, p. 25-44, jun. 1999.

CROUS-BOU, Marta; HARRINGTON, Laura; KABRHEL, Christopher. Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis*, [s.l.], v. 42, n. 08, p.808-820, 20 out. 2016.

CURTIN, R.; COX, D.; FITZGERALD, D. Clopidogrel and ticlopidine. *In: MICHELSON, A. D. Platelets*. California: Academic Press, 2002.

CUSHMAN, M.; KULLER, L.H.; PRENTICE, R. *et al.* Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. **JAMA**, [s.l.], v.292, p.1573–1580, 2004.

DAHLBACK, B.; CARLSSON, M.; SVENSSON, P.J. 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. **Proc Natl Acad Sci**, [s.l.], v. 90, p. 1004-1008, 1993.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, [s.l.], v. 145, p. 1310-2, 1964.

DE MATTIA, E.; TOFFOLI, G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. **Eur J Cancer**, [s.l.], v.45, n.8, p. 1333–51, 2009.

DE MOERLOOSE, P.; REBER, G.; PERRIER, A.; PERNEGER, T.; BOUNAMEAUX, H. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. **Br J Haematol**, [s.l.], v. 110, p.125–129, 2000.

DEN HEIJER, M.; BLOM, H.J.; GERRITS, W.B. *et al.* Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? **Lancet**, [s.l.], v.346, p.127, 1995.

DENTALI, F.; CROWTHER, M.; AGENO, W. Thrombophilic abnormalities, oral contraceptives, and risk of cerebral vein thrombosis: a meta-analysis. **Blood**, [s.l.], v. 107, p. 2766–2773, 2006.

DE SANCHO, M.T.; DORFF, T.; RAND, J.H. Thrombophilia and the risk of thromboembolic events in women on oral contraceptives and hormone replacement therapy. **Blood Coagul Fibrinolysis**, [s.l.], v. 21, p. 534–538, 2010.

DE STEFANO, V.; CHIUSOLO, P.; PACIARONI, K., *et al.* Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. **Blood**, [s.l.], v. 91, p. 3562-3565, 1998.

DE STEFANO, V.; ZAPPACOSTA, B.; PERSICHILLI, S.; ROSSI, E. *et al.* Prevalence of mild hyperhomocysteinaemia and association with thrombophilic genotypes (factor V Leiden and prothrombin G20210A) in Italian patients with venous thromboembolic disease. **Br J Haematol**, [s.l.], v. 106, p. 564–568, 1999.

DE STEFANO, V.; MARTINELLI, I.; ROSSI, E. *et al.* The risk of recurrent venous thromboembolism in pregnancy and puerperium without antithrombotic prophylaxis. **Br J Haematol**, [s.l.], v.135, p.386–391, 2006.

DE STEFANO, V.; ROSSI, E. Testing for inherited thrombophilia and consequences for antithrombotic prophylaxis in patients with venous thromboembolism and their relatives. A review of the guidelines from scientific societies and working groups. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 110, p. 697–705, 2013.

DUHL, A.J.; PAIDAS, M.J.; URAL, S.H. *et al.* Antithrombotic therapy and pregnancy: consensus report and recommendations for prevention and treatment of venous thromboembolism and adverse pregnancy outcomes. **Am J Obstet Gynecol**, [s.l.], v.197, p. 457, 2007.

DUQUE, F.L.V.; MELLO, N.A. Thrombogenesis – Thrombophilia. **J. Vasc. Br**, [s.l.], v.2, n.2, p. 105-118, 2003.

EISERT, W. G. Dipyridamole. *In*: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

EHRENFORTH, S.; KLINKE, S.; VON DEPKA PRONDZINSKI, M.; KREUZ, W.; GANSER, A.; SCHARRER, I. Activated protein C resistance and venous thrombophilia: molecular genetic prevalence study in the German population. **Dtsch Med Wochenschr**, [s.l.], v. 124, p. 783–787, 1999.

EHRENFORTH, S.; NEMES, L.; MANNHALTER, C. *et al.* Impact of environmental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V:G1691A. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v. 2, p. 430–436, 2004.

EMADI, A.; CRIM, M.T.; BROTMAN, D.J. *et al.* Analytic validity of genetic tests to identify factor V Leiden and prothrombin G20210A. **Am J Hematol**, [s.l.], v.85, p. 264–270, 2010.

EMMERICH, J.; ROSENDAAL, F.R.; CATTANEO, M. *et al.* Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism— pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 86, p. 809–816, 2001.

FARRÉ, A. L.; CARAMELO, C.; CASADO, S. Nuevos mecanismos antiagregantes y vasodilatadores inducidos por la aspirina. **Nefrología**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 315-8, 1995.

FERREIRA, Cláudia Natália *et al.* A cell-based model of coagulation and its implications. **Rev Bras Hematol Hemoter**, [s.l.], v. 5, n. 32, p. 416-421, 2010.

FLORES-BELLO, André *et al.* Sequence diversity of the Rh blood group system in Basques. **European Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.1859-1866, 8 ago. 2018.

FRANCES, F.; PORTOLES, O.; GABRIEL, F.; CORELLA, D.; SORLÍ, J.V.; SABATER, A.; ALFONSO, J.L.; GUILLÉN, M. Factor V

Leiden (G1691A) and prothrombin-G20210A alleles among patients with deep venous thrombosis in the general population from Spain. **Rev Med Chil**, [s.l.], v. 134, p. 13–20, 2006.

FRANCHINI, Massimo. Utility of testing for factor V Leiden. **Blood Transfusion**, [s.l.], p.257-259, 2012.

FRANCO, Rendrik F. *et al.* Heterogeneous ethnic distribution of the Factor v Leiden mutation. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.143-145, 1999.

FRANCO, Rendrik F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, jul./dez. 2001.

FRANCO, Rendrik F.; REITSMA, Pieter H. Genetic risk factors of venous thrombosis. **Human Genetics**, [s.l.], v. 109, n. 4, p.369-384, 1 set. 2001.

FRITSMA, G.A.; MARQUES, M.B. **Hematology: Clinical Principles and Applications**; Saunders; Elsevier: St. Louis, Missouri, 2007, p. 605-629.

GARCIA-GALA, J.M.; ALVAREZ, V.; PINTO, C.R.; SOTO, I.; URGELLÉS, M.F.; MENÉNDEZ, M.J.; CARRACEDO, C.; LÓPEZ-LARREA, C.; COTO, E. Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. *Clin Genet*, [s.l.], v. 52, p. 206–210, 1997.

GARRATTY, George; GLYNN, Simone A.; MCENTIRE, Robin. ABO and Rh(D) phenotype frequencies of different racial/ ethnic groups in the United States. **Transfusion**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.703-706, maio 2004.

GEERTS, W.H.; BERGQVIST, D.; PINEO, G.F. *et al.* Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). **Chest**, [s.l.], v.133, p.381S– 453S, 2008.

GEIGER, J. Inhibitors of platelet signal transduction as antiaggregatory drugs. **Expert Opin Investig Drugs**, [s.l.], v. 10, p. 865-90, 2001.

GENOUD, V. *et al.* Prevalence of three prothrombotic polymorphisms. Factor V G1691A, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. On behalf of the Grupo Cooperativo Argentino de Hemostasia y Trombosis. **Thromb Res.** [*s.l.*], v.100, n.3, p.127-31, 2000.

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. **N Engl J Med**, [*s.l.*], v. 342, p. 374 –380, 2000.

GERHARDT, A.; SCHARF, R.E.; ZOTZ, R.B. Effect of hemostatic risk factors on the individual probability of thrombosis during pregnancy and the puerperium. **Thromb Haemost**, [*s.l.*], v. 90, p. 77– 85, 2003.

GIUDICELLI, Y. Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G20210a mutation prevalence in a healthy moroccan. **Thromb. Haemost**, [*s.l.*], v.88, p.1073-4, 2002.

GLYNN, R.J.; DANIELSON, E.; FONSECA, F.A. *et al.* A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. **N Engl J Med**, [*s.l.*], v. 360, p. 1851-1861, 2009.

GOHIL, Reya; PECK, George; SHARMA, Pankaj. The genetics of venous thromboembolism. **Thrombosis And Haemostasis**, [*s.l.*], v. 102, n. 08, p.360-370, 2009.

GRANDONE, Elvira; MARGAGLIONE, Maurizio. Population genetics of venous thromboembolism. **Thrombosis And Haemostasis**, [*s.l.*], v. 105, n. 02, p.221-231, 2011.

GREGG, D.; GLODSCHIMIDT-CLERMONT, P. Platelets and cardiovascular disease. **Circulation**, [*s.l.*], v. 188, p. 88-90, 2003.

GRIS, J.C.; QUÉRÉ, I.; MONPEYROUX, F. *et al.* Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late fetal loss and no thrombotic antecedent the Nîmes Obstetricians and Haematologists Study5 (NOHA5). **Thromb Haemost**, [*s.l.*], v. 81, p. 891– 899, 1999.

GRODY, W.W.; GRIFFIN, J.H.; TAYLOR, A.K.; KORF, B.R.; HEIT, J.A. ACMG Factor V Leiden Working Group. American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. **Genet Med**, [s.l.], v. 3, p. 139–148, 2001.

GUERRA-SHINOHARA, Elvira. **Hemostasia**. Disponível em: [https://social.stoa.usp.br/articles/0029/2855/aula\\_hemostasia\\_200513.pdf](https://social.stoa.usp.br/articles/0029/2855/aula_hemostasia_200513.pdf). Acesso em: 11 dez. 2018.

HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. **Blood: principles and practice of hematology**. 2a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. 2304p.

HEIT, J.A.; SOBELL, J.L.; LI, H.; SOMMER, S.S. The incidence of venous thromboembolism among Factor V Leiden carriers: a community-based cohort study. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v. 3, p. 305–311, 2005.

HERRINGTON, D.M.; VITTINGHOFF, E.; HOWARD, T.D., *et al.* Factor V Leiden, hormone replacement therapy, and risk of venous thromboembolic events in women with coronary disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, [s.l.], v. 22, p. 1012-1017, 2002.

HILTUNEN, L.; RAUTANEN, A.; RASI, V. *et al.* An unfavorable combination of factor V Leiden with age, weight, and blood group causes high risk of pregnancy-associated venous thrombosis: a population-based nested casecontrol study. **Thromb Res**, [s.l.], v. 119, p. 423–432, 2007.

HILTUNEN, L.M.; LAIVUORI, H.; RAUTANEN, A. *et al.* Factor V Leiden as risk factor for unexplained stillbirth—a population-based nested case-control study. **Thromb Res**, [s.l.], v. 125, p. 505–510, 2010.

HIRA, B.; PEGORARO, R.J.; ROM, L.; GOVENDER, T.; MOODLEY, J. Polymorphisms in various coagulation genes in black South African women with placental abruption. **BJOG**, [s.l.], v.109, p. 574–575, 2002.

HIRSCH, Denise R. *et al.* Pulmonary embolism and deep venous thrombosis during pregnancy or oral contraceptive use: Prevalence of factor V Leiden. **American Heart Journal**, [s.l.], v. 131, n. 6, p.1145-1148, jun. 1996.

HO, W.K.; HANKEY, G.J.; QUINLAN, D.J.; EIKELBOOM, J.W. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. **Arch Intern Med**, [s.l.], v. 166, p. 729 –736, 2006.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis**, [s.l.], v. 85, p. 958-965, 2001.

HOFFMAN, M. A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Rev**, [s.l.], v. 17(Suppl 1), p. S1 – 5, 2003.

HOTOLEANU, Cristina. Genetic Risk Factors in Venous Thromboembolism. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p. 253-272, 2016.

HUERTA, C.; JOHANSSON, S.; WALLANDER, M.A.; GARCIA RODRIGUEZ, L.A. Risk factors and short-term mortality of venous thromboembolism diagnosed in the primary care setting in the United Kingdom. **Arch Intern Med**, [s.l.], v. 167, p. 935-943, 2007.

HUGON-RODIN, Justine *et al.* Type of Combined Contraceptives, Factor V Leiden Mutation and Risk of Venous Thromboembolism. **Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 118, n. 05, p.922-928, 3 abr. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) (Brasil). **Pesquisa Nacional Por Amostra de Domicílios**. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 nov. 2018.

IVANOV, P.; KOMSA-PENKOVA, R.; KONOVA, E.; KOVACHEVA, K. *et al.* Inherited thrombophilic factors in women with unexplained intrauterine fetal deaths [in Bulgarian]. **Akush Ginekol**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 3-7, 2009.

JADAON, Mehrez M. Epidemiology of activated protein C resistance and Factor v Leiden mutation in the Mediterranean region. **Mediterranean Journal Of Hematology And Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-11, 8 set. 2011.

JOHANNESDOTTIR, S.A.; HORVATH-PUHO, E.; DEKKERS, O.M., *et al.* Use of glucocorticoids and risk of venous thromboembolism: a nationwide population-based case-control study. **JAMA Intern Med**, [s.l.], v. 173, p. 743-752, 2013.

JUUL, Klaus *et al.* Factor V Leiden and the Risk for Venous Thromboembolism in the Adult Danish Population. **Ann Intern Med**, [s.l.], v. 40, n. 5, p. 330-337, 2 mar. 2004.

KABRHEL, C.; VARRASO, R.; GOLDBERGER, S.Z.; RIMM, E.; CAMARGO, C.A. Jr. Physical inactivity and idiopathic pulmonary embolism in women: prospective study. **BMJ**, [s.l.], v.343, p. 3867, 2011.

KADAUKE, S.; KHOR, B.; VAN COTT, E.M. Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. **Am J Hematol**, [s.l.], v.89, p. 1147–1150, 2014.

KANE, E.V.; CALDERWOOD, C.; DOBBIE, R. *et al.* A population-based study of venous thrombosis in pregnancy in Scotland 1980-2005. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, [s.l.], n.169, p. 223–229, 2013.

KAPIOTIS, S.; QUEHENBERGER, P.; JILMA, B. *et al.* Improved characteristics of aPC-resistance assay: Coatest aPC resistance by predilution of samples with factor V deficient plasma. **Am J Clin Pathol**, [s.l.], v.106, p.588–593, 1996.

KEARON, C.; KAHN, S.R.; AGNELLI, G.; GOLDBERGER, S.; RASKOB, G.E.; COMEROTA, A.J. American College of Chest Physicians. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence- Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). **Chest**, [s.l.], v.133, p.454S–545S, 2008.

KELLY, Christopher *et al.* Family history of venous thromboembolism predicts the diagnosis of acute pulmonary embolism in the emergency department. **The American Journal Of Emergency Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 9, p.1550-1554, set. 2018.

KONS, Paulo Vendelino. **COLÔNIA NOVA ITÁLIA**: Berço da Imigração Italiana no Brasil. 2018. Disponível em: [www.sjbatista.sc.gov.br](http://www.sjbatista.sc.gov.br). Acesso em: 16 ago. 2018.

KOSTER, T *et al.* Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. **Lancet**, [s.l.], v. 342, p.1503–1506, 1993.

KRIZ N, *et al.* Physiology of Hemostasis: With Relevance to Current and Future Laboratory Testing. **Clin Lab Med**, [s.l.], v. 29, p. 159-74, 2009.

KUJOVICH, Jody Lynn. Factor V Leiden thrombophilia. **Genetics In Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-16, 14 nov. 2011.

KUPFERMINC, M.J.; ELDOR, A.; STEINMAN, N. *et al.* Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. **N Engl J Med**, [s.l.], v. 340, p. 9 –13, 1999.

LACZKOVICS, C. *et al.* Risk of recurrence after a first venous thromboembolic event in young women. **Haematologica**, [s.l.], v. 92, n. 9, p.1201-1207, 1 set. 2007.

LANGMAN, Loralie J. *et al.* Hyperhomocyst(e)inemia and the Increased Risk of Venous Thromboembolism. **Archives Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 160, n. 7, p.961, 10 abr. 2000.

LEGNANI, C. Venous thromboembolism in young women. Role of thrombophilic mutations and oral contraceptive use. **European Heart Journal**, [s.l.], v. 23, n. 12, p.984-990, 15 jun. 2002

LENSEN, R.; ROSENDAAL, F.; VANDENBROUCKE, J.; BERTINA, R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. **Br J Haematol**, [s.l.], v.110, p.939 –945, 2000a.

LENSEN, R.P.; BERTINA, R.M.; DE RONDE, H.; VANDENBROUCKE, J.P.; ROSENDAAL, F.R. Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with factor V Leiden. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 83,n. 6, p. 817– 821, 2000b.

LENSEN, R.P.; BERTINA, R.M.; VANDENBROUCKE, J.P.; ROSENDAAL, F.R. High factor VIII levels contribute to the thrombotic risk in families with factor V Leiden. **Br J Haematol**, [s.l.], v.114, p.380–386, 2001.

LEUNG, L.L.K. Thrombotic disorders. **ACP Medicine**, [s.l.], p.1-21, 2010.

LI, Q. *et al.* Molecular basis of theRHDgene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. **Vox Sanguinis**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.139-146, ago. 2009.

LI, Xinjun *et al.* Family history of venous thromboembolism as a risk factor and genetic research tool. **Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 114, n. 11, p.890-900, 2015.

LIATSIKOS, S.A.; TSIKOURAS, P.; MANA, V. B. *et al.* Inherited thrombophilia and reproductive disorders. **J Turk Ger Gynecol Assoc**, [s.l.], v.17, p.45–50, 2016.

LICHY, C.; DONG-SI, T.; REUNER, K.; GENIUS, J.; RICKMANN, H.; HAMPE, T.; DOLAN, T.; STOLL, F.; GRAU, A. Risk of cerebral venous thrombosis and novel gene polymorphisms of the coagulation and fibrinolytic systems. **J Neurol**, [s.l.], v. 253, p. 316–320, 2006.

LIND, S. E. The bleeding time. *In*: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

LINDAHL, T.L.; LUNDAHL, T.H.; NILSSON, L.; ANDERSSON, C.A. APC-resistance is a risk factor for postoperative thromboembolism in elective replacement of the hip or knee—a prospective study. **Thromb Haemost**, [s.l.], v.81, p.18–21, 1999.

LIPPI, Giuseppe; FRANCHINI, Massimo. Pathogenesis of Venous Thromboembolism: When the Cup Runneth Over. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**, [s.l.], v. 34, n. 08, p.747-761, nov. 2008.

LOCKWOOD, C.; WENDEL, G. Committee on practice bulletins O.Practice bulletin no. 124: inherited thrombophilias in pregnancy. **Obstet Gynecol**, [s.l.], v.118, p.730–740, 2011.

LOTSPEICH-STEININGER, C.A. Introduction to hemostasis. In: Lotspeich-Steininger CA, Stiene-Martin EA, Koepke JA. **Clinical hematology**. New York: J.B. Lippincott; 1992.

LUCOTTE, Gérard; MERCIER, Géraldine. Population Genetics of Factor V Leiden in Europe. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.362-367, mar. 2001.

LUSSANA, F.; DENTALI, F.; ABBATE, R. *et al.* Screening for thrombophilia and antithrombotic prophylaxis in pregnancy: guidelines of the Italian Society for Haemostasis and Thrombosis (SISET). **Thromb Res**, [s.l.], v.124, p.e19–e25, 2009.

LUTSEY, P.L.; STEFFEN, L.M.; VIRNIG, B.A.; FOLSOM, A.R. Diet and incident venous thromboembolism: the Iowa Women's Health Study. **Am Heart J**, [s.l.], v. 157, p. 1081–1087, 2009.

MAALEJ, Lobna *et al.* Prevalence of factor V Leiden in south Tunisian blood donors. **Journal Of Thrombosis And Thrombolysis**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.116-119, 23 mar. 2011.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**, [s.l.], v. 202, p. 498-9, 1964.

MACKIE, I.J. Vascular integrity and platelet function. **International Anesthesiology Clinics**, [s.l.], v.23, n.2, p. 3 – 21, 1985.

MAFFEI, F.H. Epidemiologia da trombose venosa profunda e de suas complicações no Brasil. **Cir Vasc Angiol**, [s.l.], v. 14, p. 5-8, 1998.

MAKROO, Raj; GUPTA, Richa. Rh phenotype, allele and haplotype frequencies among 51,857 blood donors in North India. **Blood Transfusion**, [s.l.], 2014.

MAMMEN, E.F. Pathogenesis of venous thrombosis. **Chest**, [s.l.], v.102, p.640S–644S, 1992.

MARTINELLI, I.; TAIOLI, E.; CETIN, I. *et al.* Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. **N Engl J Med**, [s.l.], v.343, p.1015– 1018, 2000.

MARTINELLI, I.; LEGNANI, C.; BUCCIARELLI, P.; GRANDONE, E.; DE STEFANO, V.; MANNUCCI, P.M. Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. **Thromb Haemost**, [s.l.], v.86, p.800–803, 2001.

MARTINELLI, I.; BATTAGLIOLI, T.; RAZZARI, C.; MANNUCCI, P.M. Type and location of venous thromboembolism in patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and in those with no thrombophilia. **J. Thromb. Haemost**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 98-101, 2007.

MAZOYER, Elisabeth *et al.* Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation in a large French population selected for nonthrombotic history: geographical and age distribution. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.503-510, out. 2009.

MIGUEL JUNIOR, Armando. **Coagulação – Proteína C funcional**. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/coagulacao/>. Acesso em: 18 set. 2016.

MINANO, A. *et al.* ABO blood group and risk of venous or arterial thrombosis in carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A polymorphisms. **Haematologica**, [s.l.], v. 93, n. 5, p.729-734, 1 maio 2008.

MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. The coagulation cascade in cirrhosis. **Clin Liver Dis**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 1-9, 2009.

MORELLI, V.M.; DE VISSER, M.C.H.; VOS, H.L.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v.3, p. 183–5, 2005.

NAESS, I.A.; CHRISTIANSEN, S.C.; ROMUNDSTAD, P.; CANNEGIETER, S.C.; ROSENDAAL, F.R.; HAMMERSTROM, J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v.5, p. 692–9, 2007.

NASIRUDDIN *et al.* Frequency of Factor V Leiden variant. *J Coll Physicians Surg Pak*, [s.l.], v. 15, p. 15–17, 2005.

NICOLAES, G.A.F.; DAHLBACK, B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, [s.l.], v. 22, p.530-538, 2002.

OHIRA, T.; CUSHMAN, M.; TSAI, M.Y., *et al.* ABO blood group, other risk factors and incidence of venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). **Journal of thrombosis and haemostasis**, [s.l.], v. 5, p. 1455–1461, 2007.

OHKI, Alan Vitor; VAN BELLEN, Bonno. A incidência regional do tromboembolismo venoso no Brasil. **Jornal Vascular Brasileiro**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.227-231, set. 2017.

OLIVEIRA, Renato dos Reis. **Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias**. 2007. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PABINGER, I.; GRAFENHOFER, H.; KAIDER, A. *et al.* Risk of pregnancy-associated recurrent venous thromboembolism in women with a history of venous thrombosis. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v.3, p.949 –954, 2005.

PALOMO, I. *et al.* Low prevalence of Factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in a healthy population from the

central-south region of Chile. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** [s.l.], v.31, n.3, p. 143-6. 2009.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. **Rev Esp Cardiol**, [s.l.], v. 60, n. 12, p. 1217-9, 2007.

POMP, E.R.; LE CESSIE, S.; ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J. Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. **Br J Haematol**, [s.l.], v.139, p.289–296, 2007.

POMP, E.R.; LENSELINK, A.M.; ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J. Pregnancy, the postpartum period and prothrombotic defects: risk of venous thrombosis in the MEGA study. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v.6, p.632– 637, 2008.

PRANDONI, P.; SIMIONI, P.; GIROLAMI, A. Antiphospholipid antibodies, recurrent thromboembolism, and intensity of warfarin anticoagulation. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 75, p. 859, 1996.

PRESS, R.D.; BAUER, K.A.; KUJOVICH, J.L. *et al.* Clinical utility of factor V leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. **Arch Pathol Lab Med**, [s.l.], v. 126, p. 1304– 1318, 2002.

PROCHÁZKA, M.; HAPPACH, C.; MARSÁL, K.; DAHLBÄCK, B.; LINDQVIST, P.G. Factor V Leiden in pregnancies complicated by placental abruption. **BJOG**, [s.l.], v. 110, n. 5, p. 462-466, 2003.

REES, D.C.; COX, M.; CLEGG, J.B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, [s.l.], v. 346, p. 1133–1134, 1995.

RIBEIRO, D. D. *et al.* Risk of venous thrombosis in persons with increased body mass index and interactions with other genetic and acquired risk factors. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.1572-1578, 22 jun. 2016.

RIDDEL, J.P.; AOUIZERAT, B.E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D.P. Theories of blood coagulation. **J Pediatr Oncol Nurs**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.123-131, 2007.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; LINDPAINNER, K.; STAMPFER, M.J.; EISENBERG, P.R.; MILETICH, J.P. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. **N Engl J Med**, [s.l.], v. 332, p.912-917, 1995.

RIDKER, P.M.; MILETICH, J.P.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. **JAMA**, [s.l.], v.277, p.1305–1307, 1997a.

RIDKER, P.M.; GLYNN, R.J.; MILETICH, J.P.; GOLDBERGER, S.Z.; STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H. Age-specific incidence rates of venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden mutation. **Ann Intern Med**, [s.l.], v.126, p.528–531, 1997b.

RIDKER, Paul M. *et al.* Interrelation of Hyperhomocyst(e)inemia, Factor V Leiden, and Risk of Future Venous Thromboembolism. **Circulation**, [s.l.], v. 95, n. 7, p.1777-1782, abr. 1997c.

ROBERTSON, L.; WU, O.; LANGHORNE, P. *et al.* Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. **Br J Haematol**, [s.l.], v.132, p.171–196, 2006.

RODGER, M.A.; BETANCOURT, M.T.; CLARK, P. *et al.* The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **PLoS Med**, [s.l.], v.7, p. e1000292, 2010.

RODRIGUES, Evandra. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.218-233, 26 jul. 2012.

ROLDAN, V.; LECUMBERRI, R.; MUÑOZ-TORRERO, J.F. *et al.* Thrombophilia testing in patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE registry. **Thromb Res**, [s.l.], v.124, p. 174 – 177, 2009.

ROSEN, E.; RENBAUM, P.; HEYD, J.; LEVY-LAHAD, E. High frequency of factor V Leiden in a population of Israeli Arabs. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 82, n.6, p.1768, 1999.

ROSENDAAL, F.R. *et al.* High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). **Blood**, [s.l.], v. 85, n. 6, p.1504-1508, mar. 1995.

ROSENDAAL, F.R.; VOS, H.L.; POORT, S.L.; BERTINA, R.M. Prothrombin 20210A variant and age at thrombosis. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 79, p. 444, 1998.

ROSENDAAL, F.R.; VESSEY, M.; RUMLEY, A. *et al.* Hormonal replacement therapy, prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis. **Br J Haematol**, [s.l.], v. 116, p. 851–854, 2002.

ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H. Genetics of venous thrombosis. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v. 7(suppl 1), p. 301–304, 2009.

ROSENDAAL, F.R.; RASKOB, G.E. On world thrombosis day. **Lancet**, [s.l.], v. 384, p. 1653–1654, 2014.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. **Nature**, [s.l.], v. 362, p. 801-9, 1993.

SALOMÃOZOPPI DIAGNÓSTICOS (São Paulo). **Cresce demanda por testes genéticos que detectam a trombofilia em mulheres**. 2015. Disponível em: <http://web.szd.com.br/>. Acesso em: 16 ago. 2018.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTA CATARINA. Santur. Governo de Santa Catarina. **Sobre Santa Catarina**. Disponível em: <http://turismo.sc.gov.br>. Acesso em: 13 dez. 2018.

SANTOS, Alysso Aranha dos *et al.* Blood coagulation and signal models: a literature review. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research**, v. 11, n. 1, p.20-23, ago. 2015.

SÃO PAULO (Município). Constituição (2016). Lei nº 16599, de 20 de dezembro de 2016. **Dispõe Sobre O Direito de Toda Mulher à Investigação, Ao Exame Genético Que Detecta A Trombofilia e Ao Respectivo Tratamento, e Dá Outras Providências**. São Paulo, SP, 22 dez. 2016. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=334037>. Acesso em: 18 ago. 2018.

SCHAFER, A.; EIGENTHALER, M.; BAUERSACHS, J. Platelet activation in heart failure. **Clin Lab**, [s.l.], v. 50, n. 10, p. 559-66, 2004.

SCHAMBECK, C.M.; SCHWENDER, S.; HAUBITZ, I.; GEISEN, U.E.; GROSSMANN, R.E.; KELLER, F. Selective screening for the Factor V Leiden mutation: is it advisable prior to the prescription of oral contraceptives? **Thromb Haemost**. [s.l.], v. 78, p. 1480–1483, 1997.

SCHULMAN, S. Thrombophilia and location of venous thromboembolism. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v. 5, p. 2151–2152, 2007.

SEGAL, J.B.; BROTMAN, D.J.; NECOCHEA, A.J. *et al.* Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation: a systematic review. **JAMA**, [s.l.], v. 301, p.2472–2485, 2009.

SELIGSOHN, U.; ZIVELIN, A. Thrombophilia as a multigenic disorder. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 78, n.1, p.297-301, 1997.

SEREMAK-MROZIKIEWICZ, A.; DREWS, K.; WENDER-OZEGOWSKA, E.; MROZIKIEWICZ, P.M. The significance of genetic polymorphisms of factor V Leiden and prothrombin in the

preeclamptic Polish women. **J Thromb Thrombolysis**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 97-104, 2010.

SERRANO, F.; LIMA, M.L.; LOPES, C.; ALMEIDA, J.P.; BRANCO, J. Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? **Arch Gynecol Obstet**, [s.l.], v. 284, p. 1127–1132, 2011.

SHEARER, M.J. Vitamin K. **Lancet**, [s.l.], v. 345, n. 8944, p.229-234, 1995.

SHIH, R.A.; GRIFFIN, B.A.; SALKOWSKI, N. *et al.* Ambient particulate matter air pollution and venous thromboembolism in the Women's Health Initiative Hormone Therapy trials. **Environ Health Perspect**, [s.l.], v. 119, p. 326–331, 2011.

SIDNEY, Stephen *et al.* Venous thromboembolic disease in users of low-estrogen combined estrogen-progestin oral contraceptives. **Contraception**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.3-10, jul. 2004.

SILVERSTEIN, M.D.; HEIT, J.A.; MOHR, D.N.; PETTERSON, T.M.; O'FALLON, W.M.; MELTON, L.J. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. **Arch Intern Med**, [s.l.], v. 158, p. 585-593, 1998.

SIMIONI, P.; CASTOLDI, E.; LUNGHI, B.; TORMENE, D.; ROSING, J.; BERNARDI, F. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. **Blood**, [s.l.], v. 106, p. 2363–2365, 2005.

SMITH, N.L.; CHEN, M.H.; DEGHAN, A., *et al.* Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. **Circulation**, [s.l.], v. 121, p. 1382-1392, 2010.

SOTTILOTTA, G.; MAMMÌ, C.; FURLÒ, G.; ORIANA, V.; LATELLA, C.; TRAPANI LOMBARDO, V. High incidence of factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy southern Italians. **Clin Appl Thromb Hemost.**, [s.l.], v. 15, p. 356-359, 2009.

SPECTOR, E.B.; GRODY, W.W.; MATTESON, C.J. *et al.* Technical standards and guidelines: venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G\_A testing): a disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. **Genet Med**, [s.l.], v. 7, p. 444–453, 2005.

SPYRIDOPOULOU, K.P.; DIMOU, N.L.; HAMODRAKAS, S.J.; BAGOS, P.G. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. **Pharmacogenet Genomics**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.117–33, 2012.

STEFFEN, L.M.; FOLSOM, A.R.; CUSHMAN, M.; JACOBS, D.R. JR; ROSAMOND, W.D. Greater fish, fruit, and vegetable intakes are related to lower incidence of venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. **Circulation**, [s.l.], v.115, p. 188–195, 2007.

SUNDQUIST, K. *et al.* Role of family history of venous thromboembolism and thrombophilia as predictors of recurrence: a prospective follow-up study. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.2180-2186, 29 out. 2015.

TAMIN, H.; FINAN, R.; ALMAWI, W. Prevalence of two thrombophilia predisposing mutations: factor V G1691A (R506Q; Leiden) and prothrombin G20210A, among health leanese. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 88, n. 10, p. 691-2, 2002.

TANG, Liang; HU, Yu. Ethnic diversity in the genetics of venous thromboembolism. **Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 114, n. 11, p.901-909, 2015.

TATARSKY, P.; KUCHERENKO, A.; LIVSHITS, L. Allelic polymorphism of FII, FV and MTHFR genes in population of Ukraine. **Tsitol Genet**, [s.l.], v.44, n. 3, p. 3-8, 2010.

THORELLI E; KAUFMAN, R.J.; DAHLBÄCK, B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. **Blood**, [s.l.], v. 93, p. 2552-2558, 1999.

TOTH, B.; VOCKE, F.; ROGENHOFER, N.; FRIESE, K.; THALER, C.J.; LOHSE, P. Paternal thrombophilic gene mutations are not associated with recurrent miscarriage. **Am J Reprod Immunol**, [s.l.], v. 60, p. 325–332, 2008.

TROMBOSE. Disponível em: <https://biosom.com.br>. Acesso em: 1 out. 2018.

TSAI, A.W.; CUSHMAN, M.; ROSAMOND, W.D.; HECKBERT, S.R.; POLAK, J.F.; FOLSOM, A.R. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. **Arch Intern Med**, [s.l.], v. 162, p. 1182–1189, 2002.

VANDENBROUCKE, J.P.; KOSTER, T.; BRIËT, E.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet**, [s.l.], v. 344, p.1453–1457, 1994.

VAN STRALEN, K.J.; LE CESSIE, S.; ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J. Regular sports activities decrease the risk of venous thrombosis. **J Thromb Haemost**, [s.l.], v. 5, p. 2186–2192, 2007.

VAN STRALEN, K.J.; ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J. Minor injuries as a risk factor for venous thrombosis. **Arch Intern Med**, [s.l.], v.168, p. 21–26, 2008.

VARRASO, R.; KABRHEL, C.; GOLDBERGER, S.Z.; RIMM, E.B.; CAMARGO, C.A. Jr. Prospective study of diet and venous thromboembolism in US women and men. **Am J Epidemiol**, [s.l.], v.175, p. 114–126, 2012.

VESSEY, M.; MANT, D.; SMITH, A.; YEATES, D. Oral contraceptives and venous thromboembolism: findings in a large prospective study. **Br Med J (Clin Res Ed)**, [s.l.], v. 292, p. 526, 1986.

VINE, A.K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**. [s.l.], v. 29, n.1, p.1-7, 2009.

VIRCHOW, R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem.  
**Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin.**  
 Frankfurt, Germany: Staatsdruckerei; 1856.

VOORBERG, J *et al.* Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg 506 of factor V. **Lancet**, [s.l.], v. 343, p.1535-1536, 1994.

WEITZ, Jeffrey I. Hemostasia, Trombose, Fibrinólise e Doença Cardiovascular. In: ZIPES, Douglas P. *et al.* **Braunwald: Tratado de doenças cardiovasculares.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap. 87.

WHITE, R. H. The Epidemiology of Venous Thromboembolism. **Circulation**, [s.l.], v. 107, n. 90231, p. 4-8, 17 jun. 2003.

WU, O.; ROBERTSON, L.; LANGHORNE, P. *et al.* Oral contraceptives, hormone replacement therapy, thrombophilias and risk of venous thromboembolism: a systematic review. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 94, p.17-25, 2005.

YAP, S. *et al.* Factor V Leiden (Arg506Gln), a Confounding Genetic Risk Factor but not Mandatory for the Occurrence of Venous Thromboembolism in Homozygotes and Obligate Heterozygotes for Cystathionine b-synthase Deficiency. **Thromb Haemost**, [s.l.], v. 81, p.502-505, 1999.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu; 2005. 1081p.

ZIVELIN, A.; GRIFFIN, J.H.; XU, X.; PABINGER, I.; SAMAMA, M.; CONARD, J.; BRENNER, B.; ELDOR, A.; SELIGSOHN, U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. **Blood**, [s.l.], v. 89, n. 2, p. 397-402, 1997.

ZOLLER, B *et al.* Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. **J Clin Invest**, [s.l.], v. 94, p. 2521-2524, 1994.

**APÊNDICE A – Questionário autoaplicado anexo ao TCLE**

Número do  
HEMOSC: \_\_\_\_\_

1- Idade: \_\_\_\_\_

2- Cidade em que  
nasceu: \_\_\_\_\_

3- Cidade em que  
reside: \_\_\_\_\_

4- Sexo:

( ) Masculino

( ) Feminino

5- Cor:

( ) Branca ( ) Preta

( ) Amarela ( ) Parda

( ) Indígena

6- Tipo sanguíneo (ABO e RhD): \_\_\_\_\_

7- Altura: \_\_\_\_\_

8- Peso: \_\_\_\_\_

9- Faz uso de pílula anticoncepcional? (Para mulheres)

( ) Sim ( ) Não

10- Possui histórico de trombose? (Você ou familiar)

( ) Sim. Quem?\_\_\_\_\_

( ) Não

11- Gostaria de receber o resultado da pesquisa da mutação de Fator V de Leiden por email?

( ) Sim

( ) Não

Email para contato:\_\_\_\_\_

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Prevalência de Fator V de Leiden entre doadores de sangue de Florianópolis

**Pesquisador:** Ana Carolina Rabelo de Moraes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 64861016.8.0000.0121

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.064.384

#### Apresentação do Projeto:

O presente projeto é coordenado pela Profa. Ana Carolina Rabelo de Moraes do Depto. de Análises Clínicas da UFSC. O objetivo dessa proposta é determinar a prevalência do Fator V Leiden (FVL) em doadores de sangue de Florianópolis. O FVL é um dos principais fatores genéticos que predis põem ao tromboembolismo venoso (TEV). No estado de Santa Catarina (SC), a prevalência do FVL na população saudável é desconhecida. No entanto, considerando-se que SC possui um histórico de colonização por diferentes povos europeus que possuem elevadas incidências dessa mutação, pode-se esperar que a frequência dessa seja elevada no estado. Assim, as amostras de sangue total anticoagulado com EDTA serão coletadas de doadores de sangue (n = 400) no HEMOGC de Florianópolis, no período de março de 2017 a dezembro de 2018, conforme rotina estabelecida pelo serviço. Uma alíquota da amostra será separada e utilizada para a pesquisa da presença de FVL pela técnica de reação em cadeia da polimerase seguida pela análise de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP). Adicionalmente, serão coletados dados do doador, como procedência, cidade de nascimento, tipo sanguíneo, gênero, data de nascimento e histórico familiar de trombose ou AVC. Esses dados serão coletados através de questionário aplicado pelo pesquisador logo após a aplicação e assinatura do TCLE.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 232, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.064.304

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo geral

Determinar a prevalência de Fator V de Leiden (FVL) em doadores de sangue de Florianópolis.

**Objetivos específicos**

- Implantar a metodologia para a detecção do FVL (FV R506Q) no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC);
- Avaliar a prevalência do FVL (FV R506Q) nos doadores de sangue do HEMOSC de Florianópolis.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Ver parecer consubstanciado n. 1.985.279.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Ver parecer consubstanciado n. 1.985.279. As dívidas quanto às atividades de extensão foram sanadas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

As adequações solicitadas pelo CEP foram integralmente atendidas.

**Recomendações:**

Sem recomendações adicionais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os pesquisadores atenderam a todas as solicitações do CEPGH e, portanto, este projeto está aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_845195.pdf	29/03/2017 16:13:35		Aceito
Outros	fran_carta_de_resposta_ao_CEPGH_29032017.pdf	29/03/2017 15:12:04	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fran_tce_revisado_29032017.pdf	29/03/2017 16:11:05	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.064.384

Folha de Rosto	fran_folha_de_rosto_assinada.pdf	16/12/2016 10:10:29	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Francieli_carta_de_anuencia_assinada_ hemosc_florianopolis.pdf	16/12/2016 10:04:22	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Francieli_projeto_final_florianopolis.pdf	16/12/2016 10:03:27	Ana Carolina Rabelo de Moraes	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Neecessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 15 de Maio de 2017

---

Assinado por:  
Ylmar Correa Neto  
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Pólo Itaipava II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
Bairro: Trindade CEP: 88.045-400  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-6004 E-mail: cnp.propesq@contato.ufsc.br



## ANEXO B – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).

CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA      FLN.01.03.13-R01  
CENTRO DE ESTUDOS MÁRIO ROBERTO KAZNIAKOWSKI – CEMARK      Nº 002  
cep@fms.hemosc.org.br

### ANEXO-II

#### CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

Prezado (a):

Solicitamos autorização institucional para realização da pesquisa intitulada **Prevalência de Fator V de Leiden entre doadores de sangue de Florianópolis**, pela acadêmico (a) **Francieli Joaquim Dassolet** sob orientação do **Ana Carolina Rubello de Moraes** com o seguinte objetivo geral: Determinar a prevalência de Fator V de Leiden (FVL) em doadores de sangue de Florianópolis. Assim, solicita-se acesso aos dados do setor imunoematologia, dessa instituição. Oportunamente, pedimos autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final bem como em futuras publicações na forma de artigo científico. Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata de Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Salientamos ainda que os dados serão utilizados não somente para realização deste estudo. Na certeza de contarmos com a colaboração e empenho desta Diretoria, agradecemos antecipadamente a menção, ficando à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

*Francieli Joaquim Dassolet*  
Nome do pesquisador

*Francieli Dassolet*  
Assinatura do Pesquisador

*Ana Carolina Rubello de Moraes*  
Nome do orientador

*Ana Carolina Rubello de Moraes*  
Assinatura do Orientador

Florianópolis, 07/11 de 2016.

Como representante legal do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC, autorizo a realização do referido estudo para os devidos fins e efeitos legais, sendo esta uma das exigências preconizadas pela Res. 466/12 para obtenção do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. O desenvolvimento deste estudo deverá ocorrer durante o período proposto no referido projeto, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC.

*[Assinatura]*  
Diretor(a) Responsável  
Conselheiro(a) da Instituição

Florianópolis, 30.11. de 2016

### Autorização para Realização de Trabalho/Pesquisa Científica na Hemorrede HEMOSC - Anexo I

#### IDENTIFICAÇÃO DO(S) PESQUISADOR (ES)

Nome (s): Francieli Joaquim Dreyler

Telefones para contato: (48) 9921-7142 e (48) 3721-8134

e-mail: francielidreyler@yahoo.com.br

Formação/ Local: Aluna de mestrado do programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Rabello de Moraes

Telefones para contato: (48) 8403-5992 ou (48) 3721-3475

e-mail: ana.c.morosa@ufsc.br

#### TRABALHO

Título: Prevalência de Fator V de Leiden entre Doadores de Sangue de Florianópolis

*Eu, Francieli Joaquim Dreyler, comprometo-me com o sigilo dos dados, bem como assumo a responsabilidade pelos dados coletados e publicados. Comprometo-me com a entrega de cópia física e eletrônica dos resultados da pesquisa.*

Ass. do solicitante:

*Francieli Dreyler*

Data: 06 / 11 / 2016

#### PARECER DA DIREÇÃO DO HEMOCENTRO REGIONAL (se necessário)

Autorizado  Não autorizado

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura e carimbo: \_\_\_\_\_

#### PARECER DA DIREÇÃO DO HEMOCENTRO COORDENADOR

Autorizado  Não Autorizado

Data: 30 / 11 / 2016

Assinatura e carimbo: \_\_\_\_\_

*Daniela Lúthra Genes*  
 Diretora Gerente

*Daniela Lúthra Genes*  
 Diretora Gerente