

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**ALTERAÇÃO BIOQUÍMICA EM FATOR DE COAGULAÇÃO COMO CAUSA DE
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA – RELATO DE CASO CLÍNICO.**

BRAZ JOSÉ DO NASCIMENTO JÚNIOR

PROF^a. DR^a. LUANA CASSANDRA B. B. COELHO (ORIENTADORA).
PROF^a. DR^a. VERA LÚCIA DE MENEZES LIMA (CO-ORIENTADORA).
PROF^a MARIA EMÍLIA DOS SANTOS, M.C (CO-ORIENTADORA).

RECIFE, 2006

BRAZ JOSÉ DO NASCIMENTO JÚNIOR

ALTERAÇÃO BIOQUÍMICA EM FATOR DE COAGULAÇÃO COMO CAUSA DE
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA – RELATO DE CASO CLÍNICO.

Dissertação apresentada como
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal
de Pernambuco.

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

Nascimento Júnior, Braz José do

**Alteração bioquímica em fator de coagulação
como causa de trombose venosa profunda – relato de
caso clínico / Braz José do Nascimento Júnior. –
Recife : O Autor, 2006.**

28 : il.fig., tab.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Mestrado em Bioquímica, 2006.**

Inclui bibliografia e anexo.

**1. Bioquímica. 2. Fator V de Leiden (FVL). 3.
Trombose Venosa Profunda (TVP). 4. Resistência a
proteína C ativada. I. Título.**

577.1

CDU (2.ed.)

UFPE

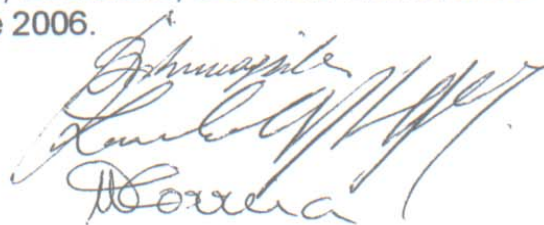
572.1

CDD (22.ed.)

BC2006-069

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Braz José do Nascimento Júnior**, realizada em 16 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:15 horas, do dia 16 de fevereiro de 2006, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Barros Lins, Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação do mestrando Braz José do Nascimento Júnior, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, em substituição a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação do aluno, de sua orientadora Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, de suas Co-orientadoras, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima e Profa. Maria Emília Santos, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, Patrícia Maria Guedes Paiva, ambas do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, Pesquisadora do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE. Após as apresentações, A Profa. Patrícia passou a palavra para a Presidente da Banca que convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Alteração Bioquímica em Fator de Coagulação como Causa de Trombose Venosa Profunda – Relato de Caso Clínico"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação do trabalho, foi concedido um intervalo de 15 minutos. Reiniciando, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, que após agradecer e fazer alguns comentários iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar o candidato e suas co-orientadoras. Finalmente, a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovado com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 16 de fevereiro de 2006.



Adriana Carla C. M. Argôlo.

Patrícia M. Guedes Paiva

ÍNDICE ANALÍTICO

INTRODUÇÃO.....	8
JUSTIFICATIVA.....	13
OBJETIVOS.....	14
GERAL.....	14
ESPECÍFICOS.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
TRABALHO SUBMETIDO AO PERIÓDICO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUCTION.....	18
DESIGN AND METHODS.....	20
BLOOD SAMPLE COLLECTION.....	20
ASSAYS FOR	
GENOTYPING.....	20
PLASMA-BASED ASSAYS.....	20
CLASSIFICATION OF DEFICIENCY STATES.....	20
THE ELETROPHORETIC	
PATTERNS.....	20
RESULTS AND INTERPRETATION.....	20
CONCLUSIONS.....	23
BIBLIOGRAPHY.....	23
CONCLUSÃO.....	26
ANEXO.....	27

AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a Deus o autor da vida, o criador, sem Ele nada seria possível. Agradeço também aos meus pais por toda a minha formação, pelo apoio que sempre me deram. À minha amada esposa pela sua contribuição e carinho. Aos meus filhos (Rafael e Nínive) minhas heranças valiosas. Aos meus outros familiares que direta ou indiretamente contribuíram. À professora Luana Cassandra minha orientadora, que tão pacientemente ajudou. As professoras Vera Menezes e Maria Emília pelas suas tranqüilas co-orientações. Aos colegas de turma do Mestrado pelo companheirismo e união. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE (Djalma, Miron, Yolanda, Neide, Flávio, etc) sempre prontos a cooperar. A todos os profissionais de saúde que contribuíram e que fazem parte os seguintes serviços: Fundação HEMOPE, Laboratório Paulo Loureiro, Hospital das Clínicas e ALBALAB (comercio de reagentes para laboratório) que gentilmente doou os reativos.

EPIGRAFE

Os céus declaram a glória de Deus e o firmamento anuncia a obra das suas mãos. Um dia faz declaração ao outro dia, e uma noite mostra sabedoria à outra noite. Não há linguagem nem fala onde não se ouça a sua voz. A sua linha se estende por toda a terra, e as suas palavras até ao fim do mundo. Neles pôs uma tenda para o sol, O qual é como um noivo que sai do seu tálamo, e se alegra como um herói, a correr o seu caminho. A sua saída é desde uma extremidade dos céus, e o seu curso até à outra extremidade, e nada se esconde ao seu calor. A lei do Senhor é perfeita, e refrigera a alma; o testemunho do Senhor é fiel, e dá sabedoria aos simples. Os preceitos do Senhor são retos e alegram o coração; o mandamento do Senhor é puro, e ilumina os olhos. O temor do Senhor é limpo, e permanece eternamente; os juízos do Senhor são verdadeiros e justos juntamente, mais desejáveis são do que o ouro, sim, do que muito ouro fino; e mais doces do que o mel e o licor dos favos. Também por eles é admoestado o teu servo; e em os guardar há grande recompensa. Quem pode entender os seus erros? Expurga-me tu dos que me são ocultos. Também da soberba guarda o teu servo, para que se não assenhoreie de mim. Então serei sincero, e ficarei limpo de grande transgressão (Salmo 18).

LISTA DE ABREVIATURAS

AT – Antitrombina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DVT - Deep venous thrombosis

FVL – Fator V de Leiden

MTHFR - Metileno tetraidrofolato redutase

PC – Proteína C

PS – Proteína S

PCR – Reação de polimerase em cadeia

RPCA – Resistência à proteína C ativada

TEV – Tromboembolismo venoso

TP – Tempo de protrombina

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TVP – Trombose venosa profunda

RESUMO

A incidência de trombose venosa profunda (TVP) na população pediátrica (0-18 anos) tem sido descrita como mais baixa que nos adultos. Em quase a metade das crianças, três ou quatro fatores de risco para trombose estão presentes simultaneamente. Distúrbios tromboembólicos não causam trombose espontaneamente, o defeito hemostático se torna aparente porque a trombose ocorre quando um ou mais fatores de risco adquiridos estão também presentes. O objetivo desse trabalho foi estudar um caso de um jovem rapaz que aos 13 anos apresentou TVP, depois de um trauma jogando futebol.

Atividades de proteína C (PC), proteína S (PS), antitrombina, lúpus anticoagulante, fibrinogênio, resistência à proteína C ativada (RPCA), tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada foram analisados em um coagulômetro ACL 7000 (IL, Spain) depois de consentimento formal. O fator II (G20210A) e o fator V de Leiden (FVL) (G1691A) foram pesquisados com kit comercial para PCR.

O paciente foi heterozigotos para FVL e com RPCA. Seu pai também foi heterozigoto, mas que até o momento não teve trombose. Sua mãe apresentou resultados normais. As outras análises foram normais.

Existe menor probabilidade para desenvolvimento de trombose nos portadores de FVL que nas deficiências de PC, PS, AT. Entretanto, o efeito da presença do FVL associado com outras condições clínicas, tende a ser multiplicativo no risco relativo a trombose, doença multifatorial. Condições circunstanciais, como um trauma, podem agir como um precipitante de TVP em portadores jovens do FVL, a mais comum causa de trombofilia hereditária.

ABSTRACT

Deep venous thrombosis (DVT) in the pediatric population (0-18 year old) has been reported as lower than in adults. In almost half of the children, three or four risk factors for thrombosis are present simultaneously. Even in children with thromboembolic disturbance, thrombosis did not occur spontaneously; the hemostatic defect became apparent because thrombosis occurred when one or more acquired risk factors were also present. The aim of this work was to study a case of a young man, which at age 13 presented leg deep venous thrombosis, after football play and trauma.

Activity of protein C (PC), protein S (PS), antithrombin (AT), lupus anticoagulant, fibrinogen, resistance activated protein C (RAPC), prothrombin time, and activated partial thromboplastin time, in a coagulometer ACL 7000 (IL, Spain) were assayed after informed consent. Factor II (G20210A) and factor V Leiden (FVL) (G1691A) were searched with a commercial kit for PCR. The patient and his father were heterozygotes for FVL and had RAPC; the mother was unaltered. All other assays were normal.

The probability of development of thrombosis is lesser in the FVL carriers than in AT, PC or PS deficiencies. However, the effect of FVL presence associated with another clinical condition tends to increase the relative risk of thrombosis, a multicausal disease. This case report suggests that circumstantial conditions such as football play trauma can act as precipitant of DVT in the young carrier of FVL, the most common polymorphism cause of hereditary thrombophilia.

INTRODUÇÃO

Doenças hereditárias causadas por mutações em fatores da coagulação são causadoras de enfermidades trombofílicas. Dentre elas, tem-se o fator V de Leiden (FVL), considerado principal causa de trombofilia hereditária (De Stefano, 1999). O fator V ou fator Lábil, presente em indivíduos normais, é uma globulina, glicoproteína de 330 KDa, sintetizada em hepatócitos e megacariócitos. Contém 10% a 20% de carboidratos, e é inativada pela remoção da penúltima galactose. Esse fator, no organismo, é ativado pela trombina, formando juntamente com o fator Xa e íons cálcio, o complexo chamado protrombinase. Na superfície fosfolipídica da membrana plaquetária, o complexo transforma a protrombina em trombina (Lourenço, 1997).

Quando um vaso sofre injúrias, as plaquetas são ativadas e aderem a sítios danificados no endotélio, levando à ativação da cascata da coagulação que converte o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo sangüíneo. Em indivíduos normais, esse coágulo é dissolvido pelo sistema fibrinolítico de digestão enzimática. Em portadores de alterações genéticas, a não degradação da fibrina pode levar à formação de trombos e êmbolos que podem levar à morte (Lee et al., 1998; Lourenço, 2000; Olsson, 2005).

A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial representa processo crítico para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos envolvidos nesse processo, constituintes do sistema hemostático, devem ser regulados para, simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina. Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação do sangue, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. O equilíbrio funcional dos diferentes setores da hemostasia é garantido por uma variedade de mecanismos que envolvem interações entre proteínas séricas, respostas celulares complexas (formação de complexos) e regulação do fluxo sangüíneo (Franco, 2001; Devlin, 2002).

Durante a ativação do sistema de coagulação sangüínea, diversas serino-proteases com alta capacidade pró-coagulante são subsequenteemente produzidas, culminando na formação do coágulo estável de fibrina. A atividade dessas proteases é regulada por um conjunto de proteínas genericamente conhecidas como anticoagulantes naturais ou inibidores fisiológicos da coagulação, cujos principais representantes são a antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S (PS) (Franco, 2001).

A patogênese do tromboembolismo venoso (TEV) não está completamente elucidada, mas há evidências claras de que o processo é influenciado pela complexa interação de fatores genéticos e ambientais, que receberam a denominação genérica de fatores de risco. A caracterização de fatores de risco para TEV representa etapa fundamental para compreensão da patogênese dessa entidade clínica. Vale ressaltar que os fatores de risco para o TEV diferem dos fatores de risco para o tromboembolismo arterial (hipertensão arterial, tabagismo, dislipidemias e diabetes, por exemplo, não são associados ao risco aumentado para TEV). Fatores de risco, adquiridos, clássicos para TEV incluem idade avançada, imobilização prolongada, cirurgia, fraturas, uso de contraceptivos orais, gestação, puerpério, neoplasias e a síndrome antifosfolípide (Franco, 2001).

A resistência à proteína C ativada (RPCA) é em 95% dos casos, decorrente de uma mutação no fator V da coagulação: uma transição G→A na posição 1691 do gene, resultando na substituição de arginina (R) por glutamina (Q) na posição do aminoácido 506 (que constitui sítio de clivagem da PC ativada na molécula do fator V, servindo de mecanismo anticoagulante). O fator V resultante é resistente à neutralização mediada pela PC ativada, o que resulta no fenótipo de RPCA. O FVL é, portanto, associado a um estado de hipercoagulabilidade e susceptibilidade aumentada para ocorrência de TEV. O FVL aumenta o risco TEV em aproximadamente 3 a 8 vezes em heterozigose e 50-1000 vezes em homozigose. A mutação é altamente prevalente em populações caucasóides (frequência variando de 1 a 15%) e pode ser investigada por ensaio

baseado no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), por plasma deficiente em fator V ou por técnicas de análise gênica, baseadas em ampliação por PCR do exon 10 do fator V (Nojima, 2005; Franco, 2001). A prevalência do FVL é de 2% a 7% em populações europeias (caucasóides) e identificadas em 20% a 50% nos pacientes acometidos de TEV (Svensson et al., 1994).

Uma elevada concentração plasmática do fator VIII da coagulação foi citada como fator de risco independente para TEV (Tripodi, 2003). Existem também relatos da combinação entre a RPCA devido ao FVL e elevação do fator VIII em desordens hemostáticas (Olsson, 2005).

Em indivíduos normais, o fator V é inativado pela PC e pelo seu cofator, a PS, mediante proteólise nas posições Arg 506, Arg 306 e Arg 679 (Lens *et al.*, 2000). A PC é uma glicoproteína plasmática sintetizada no hepatócito que participa da coagulação, circulando como zimogênio de uma serino-protease que inativa os fatores Va e VIIIa. Sua massa molecular de 62 KDa, consiste de duas cadeias polipeptídicas: uma leve, com 155 aminoácidos e outra pesada com 260 aminoácidos, ligadas por pontes dissulfeto. A molécula da proteína é peculiar pela presença de um grande número de semi-cisteínas e de ácido β -OH-aspartico, um aminoácido incomum (Voet & Voet, 1995; Lourenço, 2000).

A PS é outra uma glicoproteína plasmática não enzimática, vitamina K dependente, de aproximadamente 70 KDa, sintetizada, principalmente, nos hepatócitos e secundariamente em células endoteliais, plaquetas e megacariócitos. Possui cadeia única que contém 635 aminoácidos e 10 resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico. Circula no plasma na forma livre ativa, aproximadamente 40%, e ligada, reversivelmente, à proteína do complemento C4b, PS inativa (60%) (González et al., 2003).

O desenvolvimento da TEV está associado a condições multifatoriais, de origem hereditária ou adquirida. As condições hereditárias são: deficiências de AT, de PC, de PS, do FVL, da protrombina e hiperhomocisteinemia (Mannucci, 2002).

Os fatores de risco para eventos TEV em crianças são: Doença tromboembólica venosa sistêmica, trombose venosa central, doença tromboembólica arterial sistêmica, derrame isquêmico, derrame isquêmico arterial, trombofilia congênita (RPCA / FVL, VF-R506Q) (Revel-Vilk, 2003).

A incidência da trombose é idade-dependente, aumentando aproximadamente 1% por ano na idade do adulto, como um gradiente de risco de 1.000 vezes entre faixas muito nova e muito envelhecida. Nos pacientes após 90 anos de idade a incidência da doença é 800 / 100.000 por habitantes. O sistema hemostático é afetado profundamente pela idade. Durante o nascimento, os níveis de proteína pró-coagulantes são reduzidos, e os anticoagulantes naturais (PC, PS, AT, co-fator II da heparina) são reduzidos também, aumentando durante a infância, mas sempre com valores abaixo daqueles dos adultos. A PC permanece reduzida até a segunda década de vida, enquanto isso a alfa2macroglobulina, uma inibidora da trombina, aumenta desde o nascimento e permanece elevada durante a infância, contribuindo para risco baixo de eventos trombóticos na infância (Andrew, 1997).

Os eventos tromboembólicos são incomuns em crianças, com incidência de 0.6-1:100000/ ano, enquanto que no adulto é a principal causa da morbimortalidade na população do mundo ocidental, com incidência de 1:1000/ano. A epidemiologia da TVP em pacientes pediátricos difere daquela em pacientes adultos. A manifestação mais freqüente é a trombose venosa profunda (TVP) de membro inferior e embolismo pulmonar, relacionada à mortalidade elevada (Chalmers, 2001; Andrew et al., 1997).

O fator de risco ambiental mais importante para o desenvolvimento de trombose nos neonatos e em crianças mais velhas é a presença de um cateter em veia central (Revel-Vilk, 2005), e principalmente nos vasos mais freqüentemente usados na cateterização. Até 60% de TVP ocorre na presença de vaso venoso central em crianças de 1-18 anos. Nos neonatos, excluindo o trauma, os eventos trombóticos relacionados com cateter são relativamente

incomuns e envolvem freqüentemente a trombose veia renal; a maioria dos casos ocorre no período neonatal e não é associada com a síndrome nefrótica. Fora do período neonatal, a trombose da veia renal ocorre mais freqüentemente em adolescentes com sintomas agudos ou crônicos (Eichinger, 2004). A TVP nos membros inferiores é a complicação trombótica não relacionada com cateter mais freqüente nas crianças. Outros fatores de risco observados são câncer, quimioterapia, cirurgia, infecção, talassemia, doença cardíaca congênita e trauma. Trombofilia (condições herdadas e adquiridas de coagulação e fibrinólise têm sido associadas com a trombose), na infância envolve deficiências de AT, PC, PS, FVL, de FIIG20210A e de metileno tetraidrofolato redutase C677T (participa do metabolismo intracelular da homocisteína), hiper-homocisteinemia (elevação anormal das concentrações plasmáticas do aminoácido homocisteína), anticorpo lúpus, anticorpo anticardiolipina e níveis elevados de lipoproteína. Em contraste com os adultos, em que 40% das TVP são idiopáticas, nas crianças apenas 5% das TVP são idiopáticas (Chalmers, 2001; Revel-Vilk, 2003).

A trombose é uma doença multicausal, na qual um ou mais fatores de risco predisponentes podem geralmente ser identificados. As condições clínicas protrombóticas são comuns nestes pacientes. Além disso, um fator desencadeador como cateter, cirurgia ou trauma está geralmente presente. As anormalidades genéticas e adquiridas da coagulação são identificadas nas crianças com trombose venosa e são estudadas apropriadamente. Uma cuidadosa história familiar e pesquisa das mutações em AT, PC, PS e FVL devem ser parte da avaliação das crianças com TVP (Manco-Johnson, 1997).

JUSTIFICATIVAS

A morbidade e a mortalidade ligadas à trombose são muito altas (Rosendaal, 1995; Hull et al., 1998), portanto, é de grande importância o conhecimento de sua etiologia, patogenia e prevenção.

As grandes descobertas científicas na área clínica e molecular, a automação de testes para sua avaliação e o custo sócio-econômico da prevenção da trombose são significativamente menores que seu tratamento.

O motivo dos fatores de riscos adquiridos promoverem recorrência TEV em algumas crianças e em outras não, é desconhecido; podem existir fatores de risco desconhecidos adicionais (Nowak-Göttl, 1997; Nowak-Göttl, 2001).

OBJETIVOS

GERAL

Pesquisar a predisposição genética e bioquímica para trombose venosa profunda em uma família (paciente, pai e mãe).

ESPECÍFICOS

Pesquisar o fator V de Leiden;

Pesquisar a resistência periférica à proteína C ativada;

Pesquisar a mutação G20210A da protrombina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, M.; MICHELSON A. D.; BOVILL, T. The prevention and treatment of thromboembolic in children: a need for thrombophilia programs. **Journal Pediatric Hematology/Oncology**, v. 19, p. 7-22, 1997.
- CHALMERS, E. A. Heritable thrombophilia and childhood thrombosis. **Blood Reviews**, v. 15, p. 181-189, 2001.
- DE STEFANO, V.; MARTINELLI, I.; MANNUCCI, P. M.; PACIARONE, K.; CHIUSOLO, P.; CASORELLI, I.; ROSSI, E.; LEONE, G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 11, p. 801-805, 1999.
- DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 5ª ed. New York: John Wiley & Sons, ins., 2002, p. 913-932.
- EICHINGER, S.; SCHÖNAUER, V.; WELTERMANN, A.; MINAR, E.; BIALONCZYK, C.; HIRSCHL, M. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3773-3776, 2004.
- FRANCO, R. F. Trombofilias hereditárias. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 34, n. 3/4, p. 248-257, jul/dez. 2001.
- GONZÁLEZ COCAÑO, M. C.; DÍAZ-GOLPE, V.; MARTÍN, S.; SÁNCHEZ DEL REAL, J.; REDONDO, M. C. Combination of congenital coagulation disorders: Factor II gene mutation G20210A, Factor V Leiden gene mutation G1691A and Protein S deficiency. A family study. **Haematologica**, v. 88, n. 06, 2003.
- HULL, R. D.; PINEO, G. F. 1997 ICATH Meeting prophylaxis of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: current recommendation. **Clinical Applied Thrombosis**, v. 4, n. 2, p. 96-104, 1998.
- LEE, R. G.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J. *Winthobe*. **Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v. 02, p. 564-567, 1998.
- LENS, D.; OTERO, A. M.; COTIC, G. Diagnóstico molecular de fatores protrombóticos: Primeiros casos de fator V Leiden y protrombina G20210a em Uruguay. **Revista Medica del Uruguay**, v. 16, n. 01, p. 39-44, may. 2000.
- LOURENÇO, D. M. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. **Revista da sociedade de cardiologia Estado de São Paulo**, v. 3, 1997.
- LOURENÇO, D. M. Proteína C. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22 (suplemento 2), p. 335-337, 2000.
- MANCO-JOHNSON, M. J. Disorders of hemostasis in childhood: risk factors for venous thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 1, p. 710-714, Jul. 1997.

MANNUCCI, P. M. The Measurement of Multifactorial Thrombophilia. **Thromb Haemostasis**, v. 88, p. 1-2, 2002.

NOJIMA, J.; KURATSUNE, H.; SUEHISA, E.; IWATANI, Y.; KANAKURA, Y. Acquired activated protein C resistance associated with IgG antibodies against β 2-gly I and prothrombin as a strong risk factor for venous thromboembolism. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 545-52, 2005.

NOWAK-GÖTTL, U.; JUNKER, R.; KREUZ, W.; VON ECKARDSTEIN, A.; KOSCH, A.; NOHE, N.; SCHOBESS, R.; EHRENFORTH, S. Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors. **Blood**, v. 4, p. 858-862, Feb.1997.

NOWAK-GÖTTI, U.; JUNKER, R.; KREUZ, W.; ECKARDSTEIN, A.V.; KOSCH, A.; NOHE, N. Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors. **Blood**, v. 97, n. 4, p. 858-862, 2001.

OLSSON, E.; HÖRJER, P. Activated protein C resistance due to factor V Leiden elevated coagulation factor VIII and postoperative deep vein thrombosis in late breast reconstruction with a free THAM flap: a report of two cases • Short Communication. **British Journal Plastic Surgery**. April. 2005.

REVEL-VILK, S.; MASSICOTTE, P. Thromboembolic diseases of childhood. **Blood**, v. 17, p. 1-6, 2003.

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

SVENSSON, P. J.; DAHLBÄCK, B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 517-22, 1994.

TRIPODI, A. Level of coagulation factors and venous thromboembolism, **Haematologica**. 2003; 88: 705-711, Abstract- EMBASE/ Abstract – MEDLINE.

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

**Trabalho submetido ao periódico:
Haematologica Journal**

Factor V Leiden Mutation is associated with football play trauma in a young patient with DVT.

Maria Emília dos Santos¹, Braz José do Nascimento Júnior³, Maria da Conceição Barros Correia², Farida Coeli Melo¹, Raul Antônio Melo¹, Vera Lúcia de Menezes Lima³, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho³.

From the ¹Fundação Hemocentro de Pernambuco (Recife, PE), Brasil, ²Hospital das Clínicas de Pernambuco (Recife, PE), Brasil, and ³Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE), Brasil.

Correspondence

Dr^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Av José Augusto Moreira 294, Casa Caiada, Olinda, Pernambuco, Brasil, postcode: 53130-410, Telephone: (03181) 99455897. e-mail: luanacassandra@terra.com.br.

Key Words: factor V Leiden; deep venous thrombosis; resistance to activated protein C.

Abstract

Background and Objective Deep venous thrombosis (DVT) in the pediatric population has been reported as lower than in adults. In almost half of the children, three or four risk factors for thrombosis are present simultaneously. Even in children with thromboembolic disturbance, thrombosis did not occur spontaneously; the hemostatic defect became apparent because thrombosis occurred when one or more acquired risk factors were also present. The aim of this work was to study a case of a young man, which at age 13 presented leg deep venous thrombosis, after football play and trauma.

Design and Methods Activity of protein C (PC), protein S (PS), antithrombin (AT), lupus anticoagulant, fibrinogen, resistance activated protein C (RAPC), prothrombin time, and activated partial thromboplastin time, in a coagulometer ACL 7000 (IL, Spain) were assayed after informed consent. Factor II (G20210A) and factor V Leiden (FVL) (G1691A) were searched with a commercial kit for PCR.

Results The patient and his father were heterozygotes for FVL and had RAPC; the mother was unaltered. All other assays were normal.

Interpretation and Conclusions The probability of development of thrombosis is lesser in the FVL carriers than in AT, PC or PS deficiencies. However, the effect of FVL presence associated with another clinical condition tends to increase the relative risk of thrombosis, a multicausal disease. This case report suggests that circumstantial conditions such as football play trauma can act as precipitant of DVT in the young carrier of FVL, the most common polymorphism cause of hereditary thrombophilia.

Introduction

The incidence of thrombosis is age-dependent, increasing about 1% per year in adult age, with a risk gradient of 1,000 times between very young bands and very aged bands, for morbidity reduction and muscular tonus, increase of morbidity, acquisition of other risk factors, as well as the proper consuming of veins wear-and-tear on the veins themselves. In patients after 90 years of age the disease incidence is 800/100,000 inhabitants. However, thrombosis is not an exception of rule, since the majority of illnesses is age-dependent, or diminishing or increasing

the risk with age. The hemostatic system is deeply affected by the age. During birth the pro-coagulant protein levels are reduced, and natural anticoagulants (protein C (PC), protein S (PS), antithrombin (AT), cofactor II of heparin) are also reduced, increasing during infancy, but always with values below those of the adult. PC remains reduced until the second decade of life, while that of alfa2macroglobulin, an inhibitor of thrombin, is raised to the birth and remains high during infancy¹, contributing in part for the low risk of thrombotic events in infancy.

Thromboembolic events are uncommon in children, with incidence of 0.6-1:100,000/year, while that in adult is the first cause of morbimortality in the occidental world person, with incidence of 1:1,000/year. The most frequent manifestation is deep venous thrombosis (DVT) of inferior member and pulmonary embolism, related to high mortality^{1,2}. The epidemiology of DVT in pediatric patients differs from that in adult patients.

The most important risk factor for the development of thrombosis in neonates and older children is the presence of an indwelling³ central line, and consequently the vessels involved tend to be those most frequently used for catheterization. Up to 60% of DVT occurs in the presence of central venous line in children (1-18 years old). In neonates, excluding stroke, non-catheter related thrombotic events are relatively uncommon and most frequently involve renal vein thrombosis; the majority of cases occur in the neonatal period and are not associated with nephritic syndrome. Outside the neonatal period, renal vein thrombosis occurs most frequently in adolescents with either acute or chronic symptoms⁴. DVT in the lower extremities is the most frequent non-catheter-related thrombotic complication in children; other risk factors frequently observed are cancer, chemotherapy, surgery, infection, thalassemia, congenital heart disease and trauma. Thrombophilia (inherited and acquired conditions of the clot and fibrinolysis had been associated with thrombosis) in childhood thrombosis involve deficiencies of AT, PC, PS, factor V Leiden (FVL), FIIG20210A and C677T MTHFR mutations, hyperhomocysteinemia, lupus antibodies, anticardiolipin antibodies and elevated levels of lipoprotein. In contrast to adults, in whom 40% of DVT are idiopathic, in children only 5% of DVT are idiopathic^{2,3}.

Thrombosis is a multicausal disease and one or more predisposing risk factors can generally be identified. Underlying prothrombotic clinical conditions are common in these patients. Furthermore, a trigger factor such as catheter, surgery or trauma is usually present. However, genetic and acquired coagulation abnormalities are also identified in children with venous thrombosis who are appropriately studied. A careful family history and assays for AT, PC, PS and FVL mutation should be part of the evaluation of infants and children with DVT⁶. Why similar acquired risk factors promote recurrent venous thromboembolism (VTE) in some children and not in others is not yet known; still unknown risk factors could have a contribution⁷.

The hereditary APCR is induced by missense mutation of a guanine residue by adenine in the nucleotide 1691 (G→A) in exon 10 of FV gene, causing the change of an arginine residue in position 506 for a glutamine in the molecule of FV (R506Q), one of the sites of connection from activated protein. The resultant FV is called FVL, FVR506Q⁸.

The prevalence of FVL is from 2% to 7% in European populations (caucasian) and identified in 20% to 50% in patients of VTE⁸. Incidence of DVT in general population is estimated in 0.05 – 0.07 events per 100,000 children and 5.3 events per 10,000 hospital admissions, with greater risk in infants with less than 1 year of age and teenagers¹.

This paper has the aims to report a clinical case of DVT in a child, related to FVL, and to describe the main biochemical characteristics found in this genetic pathology.

Design and Methods

Blood sample collection

With informed parental consent, blood samples were collected after withdrawal of anticoagulation by peripheral venipuncture into plastic tubes containing 1/10 by volume of 3.8% trisodium citrate (IL, Spain) and placed immediately on melting ice. Platelet poor plasma was prepared by centrifugation at 3000g for 20 min at 4°C, aliquoted in polystyrene tubes, stored at –70°C, and thawed immediately before the assay procedure. The laboratory staff was unaware of whether the blood sample came from a patient with a first episode of venous thromboembolism or with recurrent VTE. The buffy coat layer was then removed and stored at –70°C, pending DNA extraction by a spin column procedure (GENTRA).

Assays for genotyping

The FV G1691A and PT G20210A genotypes were determined by polymerase chain reaction and analysis of restriction fragments was performed as previously reported⁸.

Plasma-based assays

Amidolytic PC and AT activities were measured on an ACL 7000 (IL), using chromogenic substrates (IL, Spain). free PS antigen, total PS, and PC antigen were measured, using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (GENTRA).

Classification of deficiency states

A type I deficiency (AT, PC) state was diagnosed when functional plasma activity and immunological antigen concentration of a protein were below 50% of the lower age-related limit. A type II deficiency (AT, PC) was diagnosed with repeatedly low functional activity levels along with normal antigen concentrations. The diagnosis of PS deficiency was based on reduced free PS antigen levels combined with decreased or normal total PS antigen concentrations, respectively.

The electrophoretic patterns for Factor V Leiden:

- Normals: 120 and 42 base pairs (bp)
- Heterozygous: 162, 120 and 42 bp.
- Homozygous: 162 bp.

Results and Interpretation

Vigorous exercises can promote physiologic thrombocytosis that may persist for one or two weeks, resulting from the mobilization of collections of extravascular platelets, without having necessarily increase of their production. That episode is usually normalized and thromboembolic episodes are rare in normal individuals^{9,10}. The studied patient played soccer before the trauma. FV is a central regulator of hemostasis. It is activated from a proteolytic form to factor Va for thrombin, and interacts with factor Xa and calcium, in phospholipidic surface of platelet membrane to form the prothrombinase complex, which convert the prothrombin in thrombin^{11,12}. Factor Va is a proteolytic target to activate PC, that inactivates factor Va as much of platelet as plasmatic origin, serving as pre-requirement for inactivation of factor VIIIa. Olsson *et al.*¹³ showed two cases of APCR due to FVL and elevated coagulation factor VIII.

Human biochemical disturbances have been related to defects in the coagulation. Among them FVL has been considered a main cause of hereditary thrombophilia¹⁴. FV or labile factor, present in normal individuals, is a globulin, glycoprotein of 330 KDa, synthesized in hepatocytes and megakaryocytes. It contains 10% to 20% of carbohydrates, being inactivated with the removal of the carbohydrate residue neighbor to the last galactose. The factor, in the organism, is activated by forming thrombin, together with factor Xa and calcium ions; the complex is called prothrombinase. In the phospholipid surface of the platelet membrane, the complex transforms prothrombin in thrombin¹¹.

In the present paper plasma activities of PC (65-121-137), PS (71-125-141), AT III (FII20210A) (93-100-108) and fibrinogen (2.08-2.66-2.99) in the young patient with DVT and his parents (father and mother, respectively) revealed normal results.

The patient and his father had presented similar patterns of migration in agarose gel electrophoresis for FVL: 162, 120 and 42 base pairs (bp). The migration of maternal DNA presented two bands: 120 and 42 bp. The search of FVL in patient and parents evidenced compatible results with the presence of the allele FVR506Q in heterozygous for the patient and his father and absence of FVL in his mother (figure 1). The patient, carrier of FVL in heterozygous presented episode of DVT after trauma in tender age. However, his father, equally carrier of the allele of FVL to the current age did not reveal symptoms of thrombosis. The family analysis evidenced the variability of phenotypic manifestations of FVL^{14,15}. A carrier of FVR506Q in heterozygous has an increase from seven to eight times in the risk for venous thrombosis, while in homozygous the risk increases eighty times¹⁶.

For the search of mutation G20210A of the prothrombin gene, the three members of the family presented migration patterns with 322 and 23 bp. It was not identified mutation G20210A of prothrombin gene. Barreirinho *et al.*¹⁷ studied the identified hereditary and acquired risk-factors as they are related to the occurrence of stroke in children. Prothrombin G20210A mutation was not identified in patient or his parents.

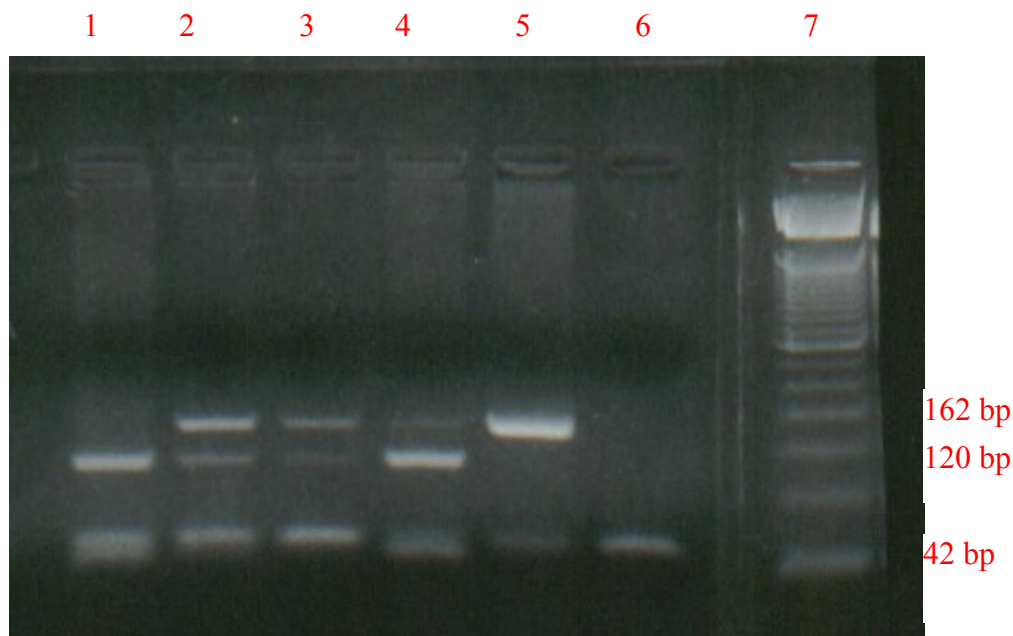


Figure 1. FVL in young patient with DVT and his parents. Line 1: mother. Line 2: father. Line 3: patient. Line 4: control heterozygous. Line 5: not undergone digestion. Line 6: Milli Q Water. Line 7: molecular weight markers.

Table 1 shows the values of APC resistance in the family; father and patient had, respectively, a percentage of reduction of 21% and 27% in relation to the lower limit of normal range. Whilst in the mother (normal) APCR ratio was increased by 29%. This result is compatible with the one of Greengard *et al*¹⁸.

Table 1. Clinical and laboratory features of a family with resistance to activated protein C due to the Arg→Gln mutation.

Family member	History of thrombosis	APC resistance ratio*	Allelic status for Arg→Gln	APCR of the normal ratio lower limit (%)
Mother	No	2.45	Normal	+29
Father	No	1.74	Heterozygous	-21
Patient	Yes	1.6	Heterozygous	-27

*Normal values range from 2.2 to 4.6 in men and from 1.9 to 4.4 in women. APC denotes activated protein C.

The laboratory evaluation is recommended in all child with thrombosis; the pediatric patient generally has in average two or more pro-thrombotic factors¹⁰, such as trauma, inflammatory conditions or some illness of base¹⁹.

The effect on the relative risk of thrombosis development tends to be multiplicative²⁰. Patients with history of thrombosis until the age of 19 must be tested for a complete panel of genetic and acquired markers; also, the detection of a thrombophilic factor does not exclude the existence of a second or third factor.

The blood samples for prothrombotic studies must be evaluated at least 3 - 6 months after the thrombotic event. Any abnormality must again be searched within 3 to 12 months, for confirmation, leading always in account the relative variations of normality to the age, interference of anticoagulant use or co-morbidity in the interpretation of assay results¹. If confirmed, family studies should be considered⁷.

In this study the patient suffered DVT of left inferior member, without embolization^{21,22} without recurrence of thrombosis at moment, however it presented post-thrombotic syndrome that occurs in children following DVT with an estimated incidence of 7–12%²³. The risk of recurrence is similar among carriers and non carriers of FVL²⁴. Hill *et al*²⁵ concluded that there is no major effect of APCR on life expectancy. This discovery would have relationship with the clinical evolution of patient and his father, up to then assintomatic and patient without recurrence. De Stefano *et al*¹⁴ concluded that the risk of recurrence of venous thrombosis in patient heterozygous for FVL is similar to the non carrier of the mutation. Christiansen *et al*²⁶ had the objective to estimate the recurrence rate of thrombotic events in patients after a first thrombotic event and its determinants, including thrombophilic abnormalities. They observed that prothrombotic abnormalities do not appear to play an important role in the risk of a recurrent thrombotic event. Testing for prothrombotic defects has little consequence with respect to prophylactic strategies. Clinical factors are probably more important than laboratory abnormalities in determining the duration of anticoagulation therapy. De Stefano *et al*¹⁴ studied 624 patients with history of DVT and found that in heterozygous for FVL, the recurrence risk did not differ of patients with DVT without the mutation. The risk of recurrence of the thromboembolic episode is more frequent in homozigous²⁷.

Therefore, long-term anticoagulation in carriers FVL, on the basis of carriers alone, is not indicated. They analyzed overall and cause-specific mortality in 171 parents whose offspring carried this mutation. While Rosendaal *et al.*¹⁶ wrote that most individuals homozygous for FVL will experience at least one thrombotic event in their lifetime.

It is important to consider that the risk for thrombosis increases from 45-year-old. However, investigation accomplished by Heijmans *et al.*²⁸ indicated that the heterozygous for FVL did not affect mortality of studied population. Genetic inheritance of patient to FVL probably comes from the father. The study of his paternal grandparents was not accomplished, but probably one of the members or both could have been a carrier of mutation FVR506Q, since the grandmother died with 58-years-old, and the family referred infarct as the cause. About 25% of carriers from FVL develop venous thrombosis or VTE before 45-year-old. Environmental or acquired factors such as trauma can have function to unlink venous thrombosis in young patients with the FVL, being inferior members and pelvic body areas most frequently affected^{7,10}.

Barnes *et al.*²⁹ provided a brief background of prothrombotic abnormalities in childhood. Overall, prothrombotic abnormalities have been identified in 33-99% of children with cerebral sinus venous thrombosis. There appear to be a number of associations emerging including an increased frequency of FVL mutation, elevated lipoprotein, PC deficiency and antiphospholipid antibodies in children.

Pinto *et al.*³⁰ determined the frequency of thrombophilic disorders in children and adolescents with portal vein thrombosis as well as assessing the hereditary character of this disorder. They concluded that hereditary prothrombotic disorders do not seem to play a vital role in thrombosis in children and adolescents with prothrombotic venous thrombosis.

The patient presented FVL (FVR506Q) in heterozygous with activated PC resistance in episode of DVT. FVL mutation in children is characterized by poor anticoagulant response to APC resistance^{31,32}. In most cases it is caused by the FVL mutation. Inherited APC-resistance has been found in 15-40% of thrombotic patients. They reported the APC-response of a group of thrombotic patients, the prevalence of APCR and its thrombotic risk³².

Conclusions

It was not identified the mutation of prothrombin G20210A gene in the studied patient or his parents.

Patient and his father presented compatible results with mutation FVR506Q in heterozygous; the mutation was not identified in his mother.

It is probable that the concomitance and/or interaction of mutation FVR506Q with environmental factors (bruise and exercises) have played important part in the pathogenesis of the DVT event for the patient.

Bibliography

1. Andrew M, Michelson AD, Bovill T. The prevention and treatment of thromboembolic disease in children: a need for thrombophilia programs. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1997; 19: 7-22.
2. Chalmers, EA. Heritable thrombophilia and childhood thrombosis. *Blood Reviews* 2001 15, 181-189.
3. Revel-Vilk S, Kenet G. Thrombophilia in children with venous thromboembolic disease. *Thrombosis Research*. 2005. 1-7.

4. Eichinger S, Schönauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M *et al.* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* 2004; 103 (10): 3773-76.
5. Revel-Vilk S, Massicotte P. Thromboembolic diseases of childhood. *Blood*. 2003; 17: 1-6.
6. Manco-Johnson MJ. Disorders of hemostasis in childhood: risk factors for venous thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis* 1997 Jul 78(1):710-714.
7. Nowak-Götti U, Junker R, Kreuz W, Eckardstein AV, Kosch A, Nohe N, *et al.* Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors. *Blood* 2001; 97 (4): 858-862.
8. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
9. De Veber G, Andrew M. Canadian Pediatric Ischemic Stroke study Group. Cerebral sinovenous thrombosis in children. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 417-23.
10. Grandas OH, Klar M, Goldman MH, Filston HC. Deep venous thrombosis in the pediatric trauma population: an unusual event: report of three cases. *The American Surgeon* 2000; 66 (3): 273-276.
11. Yang TL, Cui J, Rhumtulla A, Yang A, Moussalli M, Ginsburg D. The Structure and Function of Murine Factor V and Its Inactivation by Protein C. *Blood* 1998; 91 (12): 4593-99.
12. Van Cott EM, Laposata M, Prins MH. Laboratory evaluation of hypercoagulability with venous or arterial thrombosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2002; 126: 1281-95.
13. Olsson E, Hörjör P. Activated protein C resistance due to factor V Leiden elevated coagulation factor VIII and postoperative deep vein thrombosis in late breast reconstruction with a free THAM flap: a report of two cases • Short Communication. *British Journal Plastic Surgery*. April 2005
14. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciarone K, Chiusolo P, Casorelli I *et al.* The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation. *New England Journal of Medicine* 1999; 341 (11): 801-805.
15. Cui J, Eitzman DT, Westrick RJ, Christie PD, Xu ZJ, Yang A *et al.* Spontaneous thrombosis in mice carrying the factor V Leiden mutation. *Blood* 2000; 96 (13): 4222-26.
16. Rosendaal FR, Koster T, Vanderbroucke JP. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden Activated Protein C Resistance. *Blood* 1995; 85 (6): 1504-1508.
17. Barreirinho S, Ferro A, Santos M, Costa E, Pinho-Basto J, Sousa A *et al.* Inherited and Acquired Risk Factors and Their Combined Effects in Pediatric Stroke. *Pediatric Neurology* 2003; 28 (2): 134-138.

18. Greengard JS, Eichinger S, Griffin JH, Bauer KA. Brief Report: Variability of thrombosis among homozygous sibling with Resistance to activated protein C due to an Arg→Gln mutation in the gene for Factor V. *England Journal of Medicine*. 1994; 331 (23): 1559-1562.
19. Falanga A. The predictive value of D-dimer measurement for cancer in patients with deep vein thrombosis. *Haematologica*. 2005; 90 (2).
20. Mannucci PM. The Measurement of Multifactorial Thrombophilia. *Thromb Haemostasis* 2002; 88: 1-2.
21. Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: A qualitative overview and proposed classification system. *Annal Internal Medicine* 2003; 138: 128-34.
22. Hull RD, Pineo GF. 1997 ICATH: Meeting prophylaxis of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: current recommendation. *Clinical Applied Thrombosis* 1998; 4 (2): 96-104.
23. Barnes C, Newall F, Monagle P. Post-thrombotic syndrome. *Archives of Disease in Childhood*. 2002; 86: 212-214.
24. Eichinger S, Weltermann A, Mannhalter C, Minar E, Bialonczyk C, *et al*. The risk of recurrent carriers of factor V Leiden and a first spontaneous venous thromboembolism. *Arch Internal Medicine* 2002 Nov 11;162(20):2357-60.
25. Hill ET, Westendorp RG, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Mortality and causes of death in families with the factor V Leiden mutation (resistance to activated protein C). *Blood* 1997 Mar 15;85(6):1504-8.
26. Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *Journal of the American Medical Association* 2005; 293 (19): 2352-61.
27. Mira Y, Alfaro A, Estellés A, Vayá A, Ferrando F, Villa P. Cerebral venous thrombosis associated to homozygous factor V Leiden mutation in a female of syrian origin. *Haematologica* 2002; 87 (01), *Haematologica website-e-Letters*.
28. Heijmans BT, Westendorp RG, Knook DL. The risk of mortality and the factor V of Leiden mutation in population-based cohort. *Thrombosis and Hemostasis* 1998; 80 (4): 607-609.
29. Barnes C, deVeber G. Prothrombotic abnormalities in childhood ischaemic stroke. *Thrombosis Research*. 2005. 1-8.
30. Pinto RB, Silveira TR, Bandinelli E, Röhsig L. Portal Vein Thrombosis in Children and Adolescents: The Low Prevalence of Hereditary Thrombophilic Disorders. *Journal of Pediatric Surgery* 2004; 39 (9): 1356-1361.
31. I-Karakasy H, Al-Shabrawi M, I-Koofy N, I-Hawary M, Mostafa A, Safy M *et al*. factor V Leiden mutation in children with portal vein thrombosis. *Hematology* 2003; 38 (4): 415.

32. Tirado I, Mateo J, Oliver A, Borrell M, Souto JC, Fontcuberta J. Patients with venous thromboembolism have a lower APC response than controls. Should this be regarded as a continuous risk factor for venous thrombosis? *Haematologica* 1999 May; 84(5):470-2.

CONCLUSÃO

- Não foi identificada a mutação do gene da protrombina G20210A no paciente estudado e em seus pais.
- O paciente e seu pai apresentaram resultados compatíveis com a mutação FVR506Q em heterozigose, enquanto sua mãe apresentou genótipo homozigoto normal.
- O paciente apresentou síndrome pós trombótica manifestada clinicamente por úlcera varicosa no membro inferior esquerdo.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: Alteração Bioquímica em Fator da Coagulação como causa de Trombose Venosa Profunda – Relato de caso clínico.

Eu, _____, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sob responsabilidade do pesquisador Braz José do Nascimento Júnior, Mestrando em Bioquímica da UFPE.

Assinando este Termo de Consentimento, estou ciente que:

1)O objetivo da pesquisa é o estudo do caso pelo pesquisador para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica;

2)Durante o estudo realizarei coleta de amostras de sangue (3 ml) para a realização dos testes de laboratório;

3)Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a minha participação na referida pesquisa;

4)Estou livre para interromper a qualquer momento minha participação na pesquisa, se assim o desejar e, por qualquer motivo, e estou ciente de que tal fato não irá alterar a qualidade nem os meus direitos quanto ao meu atendimento;

5)Todas as medidas serão tomadas para assegurar a confidência e a privacidade de meus dados pessoais, e os resultados gerais obtidos através da pesquisa serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho expostos acima (publicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos);

6)Poderei entrar em contato com membros da equipe de pesquisa pelo telefone (81) 3251-4559 e 9252-2098 e com o comitê de ética e pesquisa do HEMOPE para apresentar recursos de reclamações em relação à pesquisa ou ensaio clínico pelo telefone (81) 3416-4660 o que tomará as medidas cabíveis.

Recife, _____ de _____ de 2004.

(assinatura do responsável)

RG

Braz José do Nascimento Júnior-Pesquisador

Testemunhas: _____
