

# TROMBOFILIA GENÉTICA E ADQUIRIDA E O POLIMORFISMO DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

GENETIC AND ACQUIRED TROMBOFILIA AND THE POLYMORPHISM OF THE ENZYME METHYLENETETHYROHIDROFOLATE REDUTASE (MTHFR)

JÉSSICA FERNANDA BRUM<sup>1\*</sup>, MARILÚCIA DE LIMA NUNES DE QUEIROZ<sup>1</sup>, NAYARA DE OLIVEIRA DUTRA<sup>1</sup>, EDIERLEM QUINTINO GUIMARÃES<sup>1</sup>, NILTRA BELTRÃO ROSA<sup>2</sup>, FRANCIELI CARNIEL<sup>3</sup>

1. Acadêmica do curso de graduação de Biomedicina do Centro Universitário São Lucas; 2. Biomédica graduada pelo Centro Universitário Luterano de Ji-paraná; 3. Enfermeira e Obstetrícia pela Universidade Federal de Pelotas, Especialista em Pediatria pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestre em Genética e Toxicologia Aplicada pela Universidade Luterana do Brasil, Doutoranda em Biologia Molecular e Celular pela Universidade Luterana do Brasil. Docente do Centro Universitário São Lucas – Ji-paraná – RO.

\* Rua Vitória Régia, 983, São Bernardo, Ji-paraná, Rondônia, Brasil. CEP: 76907-372 [jessicafernanda\\_brum@hotmail.com](mailto:jessicafernanda_brum@hotmail.com)

Recebido em 04/06/2019. Aceito para publicação em 01/07/2019

## RESUMO

As desordens de coagulação caracterizada por uma predisposição de fenômenos trombóticos que ocorrem por alterações hemostáticas são chamadas de trombofilias. As trombofilias ocorrem por mutação de gene ou por síndrome de anticorpos antifosfolípides (SAAF), se caracterizando por trombofilia adquirida e trombofilia hereditária, que podem ocorrer por mutações genéticas ou síndrome de anticorpos antifosfolípides. Neste contexto o presente trabalho tem o objetivo de descrever as trombofilias genéticas e adquiridas e relatar a influência do polimorfismo da enzima MTHFR como marcador trombofílico, através de revisão de literatura. Para a realização da revisão integrativa de literatura, foi feita uma busca nas bases de dados entre março e abril de 2019, com 27 seleções da amostra geral de 235 artigos encontrados. Foi utilizada para esta amostra uma composição de 27 artigos, dos quais 29,63% foram escritos em português, 51,85% em inglês e 18,52% em espanhol.

**PALAVRAS-CHAVE:** Trombofilia, Metilenotetra, diagnóstico.

## ABSTRACT

Clotting disorders characterized by a predisposition of thrombotic phenomena that occur due to hemostatic changes are called thrombophilias. Thrombophilias occur by mutation of gene or by antiphospholipid antibody syndrome (APS), characterized by acquired thrombophilia and hereditary thrombophilia, which can occur by genetic mutations or antiphospholipid antibody syndrome. In this context the present study has the objective of describing the genetic and acquired thrombophilias and to describe the influence of the polymorphism of the MTHFR enzyme as a thrombophilic marker, through literature review. In order to carry out the integrative literature review, a search in databases between March and April of 2019 was carried out, with 27 selections from a general sample of 235 articles found. A composition of 27 articles was used for this sample, of which 29.63% were written in Portuguese, 51.85% in English and 18.52% in Spanish.

**KEYWORDS:** Thrombophilia, Methylenetetra, diagnosis.

## 1. INTRODUÇÃO

Trombofilias são desordens de coagulação caracterizadas por uma predisposição de fenômenos trombóticos que ocorrem por alterações hemostáticas, elevando o risco de tromboembolismo venoso e arterial<sup>1</sup>.

A trombofilia gera um quadro de hipercoagulabilidade, sendo esse um fator de risco de trombose<sup>2</sup>. Outros fatores podem estar relacionados ao tromboembolismo, como estilo de vida do indivíduo, fenótipo e gravidez<sup>3,4</sup>.

Conhecida como trombose, o tromboembolismo venoso (TVP), é caracterizado por formação de trombos na microvasculatura resultando no fechamento dos vasos sanguíneos, o que ocasiona redução do fluxo sanguíneo do tecido podendo ocasionar uma possível lesão no local<sup>5</sup>.

As trombofilias ocorrem por mutação de gene ou por síndrome de anticorpos antifosfolípides (SAAF) e caracterizam-se como adquirida e hereditária<sup>6</sup>.

Na trombofilia adquirida ocorre à presença de anticorpos antifosfolípides, estando o anticoagulante lúpico, anticorpo anti- $\beta_2$ -glicoproteína I (B2GPI) e anticardiolipina entre os principais. É uma enfermidade autoimune, sistêmica de caráter arterial, venoso e obstétrico<sup>1, 3,7</sup>.

Já nas trombofilias hereditárias ou genéticas ocorrem às deficiências de fatores anticoagulantes, como Proteína S, Proteína C e Anti-trombina, ou seja; por perda de mutação de funções. Ocorrem também mutações em fatores codificadores de genes pró-coagulantes, como; Fator V de Leiden, gene G20210A da protrombina e mutação do gene C677T da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que caracteriza ganho de mutação de funções (MTHFR)<sup>7,8</sup>.

A combinação de fatores de trombofilias geram os casos chamados de trombofilias mistas, que derivam da combinação de fatores genéticos hereditários e fatores

adquiridos, exemplo disso é a reação entre hiperhomocisteína e Proteína C. A homocisteína acarreta grande risco de doenças arterial coronarianas, vasculares periféricas profundas e perdas fetais. Níveis aumentados de homocisteína podem estar diretamente ligados a fatores nutricionais ou por defeitos genéticos na enzima metilenoetetrahidrofolato redutase (MTHFR)<sup>9,10</sup>.

A enzima MTHFR participa de processos biológicos importantes, atuando na conversão da homocisteína em metionina. Mutações que ocorram nessa enzima reduzem a sua atividade levando a uma hiperhomocisteinemia<sup>11</sup>. A elevação dos níveis de homocisteína é um fator de risco para tromboembolismo, possivelmente por possuir ação lesiva ao endotélio. A hiperhomocisteinemia é encontrada geralmente em pacientes com deficiência de vitamina B6, vitamina B12, vitamina B9 ou adquirida por maus hábitos de vida como excessivo uso de café, chá, vegetarianismo e tabagismo<sup>9</sup>.

No rastreamento de trombofilias é necessário a solicitação de dosagens de alguns marcadores trombofílicos, e a interpretação desses devem ser feitos de forma minuciosa. Métodos de PCR em Tempo Real com amplificação através de enzimas restrição são muito usados para identificar possíveis mutações, porém são métodos de alto custo. Espectrofotometria de massa é por sua vez mais barata e se tornou uma plataforma padrão em laboratórios clínicos. Na indústria farmacêutica existem também testes rápidos moleculares para confirmação do gene de trombofilias que podem ser fielmente usados em unidades de emergência<sup>12,13</sup>. As dosagens de alguns marcadores são por métodos imunológicos por imunoenaios enzimáticos, quimiluminescência, nefelometria, Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), dentre outros<sup>14</sup>.

Diante do exposto, o objetivo do estudo é descrever as trombofilias genéticas e adquiridas e relatar a influência do polimorfismo da enzima MTHFR como marcador trombofílico, através de revisão de literatura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma Revisão Integrativa de Literatura, sendo um método de pesquisa que permite a síntese de múltiplos estudos possibilitando ajuntamento, discussão e conclusão de um tema a uma área específica.

Na elaboração de uma revisão integrativa devem ser abordadas seis etapas metodológicas. A primeira etapa consiste na elaboração do tema e da pergunta norteadora da pesquisa. Na segunda etapa são estabelecidos os critérios de inclusão e exclusão dos estudos e da busca de literatura. Na terceira etapa consiste na coleta de dados de acordo com os critérios estabelecidos. A quarta etapa é definida pela avaliação e seleção dos estudos. Na quinta etapa se discute os resultados obtidos e estes, são apresentados de forma clara e completa na sexta etapa de elaboração do texto da revisão<sup>15</sup>.

A fase de coleta de dados se deu entre março e abril de 2019 e foi direcionada por um instrumento de coleta que permitiu a sistematização prática dos estudos. Fizeram parte das fontes de coleta de estudos as bases de dados, Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) através da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO).

A busca foi orientada pelos descritores “Trombofilia”, “Metilenoetra” e “Diagnóstico” validados nos Descritores em Ciências da Saúde - DeSC BVS. Os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos foram estudos publicados na íntegra que retratem a temática sobre trombofilias genéticas e adquiridas e a relação do polimorfismo da enzima metilenoetetrahidrofolato redutase, completos para acesso em português, espanhol ou inglês, encontrados a partir dos descritores que norteiam a pesquisa e indexados nos referidos bancos de dados nos últimos dez anos.

Com descritor trombofilia foram encontrados 186 artigos no período estipulado. Ao realizar o cruzamento dos descritores obteve-se um total de 49 estudos, que após filtragem obteve-se uma amostra de 235 artigos, desses foram lidos título e resumos para identificar aqueles que se relacionavam com a temática do estudo, totalizando ao final o total de 27 artigos, sendo 16 estudos da base MEDLAINE através da pesquisa BVS, 09 estudos da BVS e LILACS e 02 artigos do Scielo.

A análise dos artigos selecionados foi realizada por meio de leitura rigorosa procurando responder o objetivo dessa revisão. Após a leitura, foram coletadas as informações de maior relevância a tal estudo e descrito em um instrumento elaborado pelos autores, contendo título do estudo, ano de publicação e periódico, prosseguindo com a organização dos estudos conciliados em tabelas, possibilitando uma visão mais ampla das principais temáticas abordadas, consequentemente possibilitou a extração das informações necessárias para o estudo.

Considerando todas as estratégias de busca o *corpus* da pesquisa foi constituído por 27 produções científicas que apresentaram evidências para a construção da discussão. Os estudos selecionados foram correlacionados em três categorias baseadas nas ideias centrais encontradas nos artigos: Trombofilia adquirida e hereditária, Complicações da trombofilia e Diagnóstico das trombofilias relacionado ao gene MTHFR. Este estudo não foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que o material empírico foi constituído de documentos de domínio público cujos autores são responsáveis pelo dito e escrito, pelo lugar que ocupam, por atenderem certas exigências e serem qualificados para fazê-la.

## 3. DESENVOLVIMENTO

Após avaliação dos estudos encontrados, onde foram selecionados seguindo critérios de inclusão, garantindo maior refinamento nas amostras

selecionadas, obteve-se um total de 27 artigos conforme exposto na tabela 1 e 2. Observou-se que o maior número de publicações ocorreu no ano de 2011 que apresentou 05 publicações durante o período (18,51%). Através da pesquisa foi obtido um total de 15 artigos selecionados que estavam disponíveis na base de dados BVS e MEDLINE, outros 10 artigos selecionados disponíveis nas bases de dados BVS, MEDLINE e LILACS e mais 02 artigos disponíveis na base de dados SCIELO. Das mesmas a mais utilizada para publicações foi a MEDLINE, que apresentou um total de 16 artigos publicados (53,33%). A tipologia de estudo mais usada foi Caso/Controle com um total de 08 (29,62%).

**Tabela 1.** Distribuição de estudos segundo ano de publicação e base de dados

Ano da Publicação	Nº	%
2009	2	7,4%
2010	2	7,4%
2011	5	18,52%
2012	2	7,4%
2013	3	11,11%
2014	4	14,81%
2015	3	11,11%
2016	2	7,4%
2017	4	14,81%
2018	0	%
<b>Base de Dados</b>		
BVS + MEDLINE	16	59,25 %
BVS + LILACS	9	33,33%
SCIELO	2	7,4 %

Fonte: Da pesquisa, 2019

**Tabela 2.** Cruzamento dos descritores nas Bases de Dados

Cruzamento dos Descritores			
Base de Dados	Descritores	Total	
BVS	Trombofilia	84	
BVS	Trombofilia +Metilenotetra+Diagnóstico	49	
MEDLINE	Trombofilia +Metilenotetra+Diagnóstico	49	
SCIELO	Trombofilia	102	
Base de Dados	Total	Filtro	Amostra
BVS	84	25	10
LILACS	77	20	9
MEDLINE	7	2	1
BVS	49	21	15
MEDLINE	49	21	15
SCIELO	102	17	2

Fonte: Da pesquisa, 2019.

Considerando as características de uma Revisão Bibliográfica que é sintetizar resultados anteriores e inter-relaciona-los de forma crítica para a partir de então produzir um novo estudo. Desenvolve-se a partir de agora as pesquisas selecionadas que contribuíram para essa revisão.

Os artigos foram selecionados a partir da base de

dados da BVS abrangendo estudos do período de 2009 a 2018. Esses constituem a amostra da pesquisa. Onde foram analisados, inseridos e estruturados na categoria de cada tipo de estudo, correspondendo ao objetivo e proporcionando a caracterização dos fatores evidenciados possibilitando a discussão desse trabalho.

## 4. DISCUSSÃO

### Trombofilia Adquirida e Hereditária

Trombofilias são desordens de coagulação caracterizadas por uma predisposição para desenvolver eventos trombóticos<sup>16</sup>. O tromboembolismo venoso (TVP), popularmente conhecido por trombose é caracterizado por formação de coágulos em veias profundas e artérias. É uma doença potencialmente grave que pode ocorrer novamente cerca de 10 anos após o primeiro episódio. Estudos relatam que TVP ocorrem em maior número de casos no sexo masculino e em idades mais avançadas. O tromboembolismo é geralmente influenciado por alterações nos fatores de coagulação, essas alterações são chamadas de trombofilias sendo elas trombofilia adquirida e hereditária<sup>16,17,18</sup>.

A trombofilia adquirida é caracterizada como desordens autoimunes que favorecem a eventos tromboembólicos arteriais e venosos. A mesma ocorre por consequência da presença de anticorpos antifosfolípides (SAAF). O diagnóstico da trombofilia adquirida é de grande importância, considerando a sua significativa mortalidade e morbidade. É ainda classificada na literatura como moderado risco trombótico<sup>3</sup>.

Os principais anticorpos antifosfolípides relacionados na literatura são; anticorpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico e anticorpo anti- $\beta$ 2-glicoproteína I (B2GPI). Os anticorpos antifosfolípides atuam diretamente na alteração da regulação da hemostasia da cascata de coagulação<sup>4,7</sup>.

Entende-se que os anticorpos antifosfolípides (SAAF) podem atuar por mecanismos de ação diferentes, onde ocorrem os eventos trombóticos, favorecendo desde um aumento na adesão de agregação plaquetária a possíveis interações entre as proteínas da coagulação, afetando assim na hemostasia da cascata de coagulação levando a uma possível trombose, considerando também que essa desordem é de categoria autoimune.

Estudos relatam que o anticorpo anticardiolipina predomina em eventos tromboembólicos que ocorrem no sistema arterial, prevalecendo cinco vezes mais comumente do que os demais antifosfolípides. Chegando a 20 % de casos de pacientes com TVP. Para diagnóstico da síndrome devem ser avaliados critérios clínicos e sorológicos, considerando que alguns fatores podem influenciar nos resultados analíticos, como contraceptivos orais, terapêutica hormonal, gestação etc<sup>9</sup>.

Já nas trombofilias hereditárias destaca-se a associação de deficiência de proteínas inibidoras da coagulação sendo elas; antitrombina, proteína C,

proteína S, mutação das proteínas pró-coagulantes; Fator V de Leiden, gene G20210A da protrombina e mutação do gene C677T, variante termolábil da enzima metilenotetrahidrofolato redutase<sup>19</sup>.

A trombofilia hereditária é comumente associada à trombose venosa, contrário da trombofilia adquirida que se apresenta principalmente em eventos trombóticos arteriais, e está envolvida em cerca de 50% dos casos tromboembólicos<sup>18,20</sup>.

Compreende-se que as trombofilias hereditárias são por sua vez influenciadas por mutações genéticas, enquanto as trombofilias adquiridas ocorrem por desordens autoimunes, onde o organismo cria mecanismos de defesas contra ele mesmo. Ressalta-se ainda, que na trombofilia hereditária os eventos trombóticos ocorrem no sistema arterial, enquanto a trombofilia adquirida tem origem no sistema venoso e acomete comumente os membros inferiores.

Segundo Harteman *et al.* (2011)<sup>14</sup> sabe-se pouco sobre os polimorfismo e mutações que ocorrem nos genes que codificam os fatores da coagulação. Estudos mostram que alguns marcadores são influenciados dependendo se encontrados em homozigose ou/e heterozigose, associando-os ao estado de hipercoagulabilidade do indivíduo, mas destacam que o polimorfismo no gene C677T da MTHFR está associado a níveis elevados de homocisteína e ocorre em sua maioria em homozigotia.

No mesmo pensamento Hotoleanu (2016)<sup>8</sup>, afirma que a metilenotetrahidrofolato redutase atua no metabolismo da homocisteína, reduzindo 5,10 metilenotetrahidrofolato em 5-metilenotetrahidrofolato. Os polimorfismos da enzima ocorrem geralmente em dois sítios, na posição C677T, que caracteriza a substituição da alanina por valina no códon 222. E na posição A1298C que ocorrem devido à substituição de glutamina por alanina no códon 429. Sendo a segunda mutação menos agressiva que a C677T, que em homozigose e em presença de baixos níveis de folato caracteriza uma diminuição da atividade enzimática levando a uma hiperhomocisteinemia. Considerando a hiperhomocisteinemia fator de risco para trombofilia<sup>21,22</sup>.

Estudos Hidalgo e Paula (2010)<sup>17</sup> e Roca e colaboradores (2015)<sup>23</sup> realizados na Espanha evidenciou casos de eventos trombóticos que ocorreram em presença de mutação em heterozigotia, confirmando assim, que trombooses podem ocorrer igualmente, mesmo em mutações de apenas um alelo do gene, porém em proporções diferentes.

Diante do exposto, é necessário considerar que em estado de homozigotia o risco tromboembólico é maior, isso significa que a mutação ocorreu em dois alelos do gene. Assim, o polimorfismo no gene MTHFR é por sua vez maior fator de risco em homozigotia do que em heterozigotia.

É possível observar que o polimorfismo na enzima metilenotetrahidrofolato redutase afeta o mecanismo de remetilização da homocisteína em metionina, sendo a

homocisteína um aminoácido não essencial que não está presente na dieta humana, nem no organismo, por isso a necessidade de suplementação com vitaminas do complexo B, que são utilizadas no processo de conversão da enzima, principalmente o folato e vitamina B12. Logo, a mutação da MTHFR é um risco evidente para um evento tromboembólico em presença de hiperhomocisteína, especialmente com baixos níveis de folato.

Em um estudo realizado no Chile por Guzma e Salazar (2010)<sup>21</sup> relata que todos os indivíduos portadores de genótipo homozigótico do gene C677T da MTHFR apresentaram níveis aumentados de homocisteína plasmática.

Alguns autores correlacionam à mutação do gene C677T da MTHFR a população caucasiana, grupo em que ocorre cerca de 1 a 15% da mutação<sup>3,24</sup>. Conforme estudos realizados o polimorfismo da enzima MTHFR é maior em pacientes com câncer do que em um indivíduo com saúde normal<sup>24</sup>.

Turki e colaboradores (2015)<sup>25</sup> evidenciaram em suas pesquisas que o gene mutado da metilenotetrahidrofolato está associado a abortos recorrentes, e que entre outros fatores genéticos a trombofilia mostrou-se como causa principal desses abortos. Entre 20 a 50 % de pacientes que apresentaram algum evento tromboembólico na gestação possuíam alguma anormalidade dos fatores de trombofilia.

### Complicações da Trombofilia

As trombofilias podem ser de causa genética ou adquirida sendo que a adquirida pode ser desencadeada por diversos fatores externos, provocando assim uma série de complicações como; trombose venosa profunda (TVP), acidente vascular cerebral, vários problemas gestacionais e embolia pulmonar que pode ser fatal.

Em um estudo associou-se o polimorfismo do gene MTHFR a dados clínicos, como; defeitos cardíacos, mutação fetal, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em caucasianos, acidente vascular cerebral em recém-nascidos e crianças, trombose venosa, nefropatia diabética, Alzheimer em asiáticos. Afirmando que na maioria de doenças relacionados à mutação do gene MTHFR, por sua vez são de caráter vascular<sup>11</sup>.

As complicações das trombofilias estão associadas a eventos tromboembólicos. Na gravidez, há um aumento significativo destas complicações, elevando assim os riscos maternos e fetais, que inclui aborto precoce e tardio, restrição de crescimento fetal, descolamento prematuro da placenta e pré-eclâmpsia<sup>20</sup>.

De acordo com Roca *et al.* (2015)<sup>23</sup> a gravidez e o puerpério estão associadas a um maior risco de acidente vascular cerebral e pré eclâmpsia e a sua principal causa é influenciada pelo estado pró-trombótico, diminuição dos fatores antitrombóticos, estase venosa ou redução súbita no volume de sangue após o parto. As mudanças fisiológicas durante a gravidez podem levar a uma, trombose arterial ou

venosa.

Estudos<sup>4,20,10</sup> corroboram que as trombofilias hereditárias ocorrem em 50% dos eventos tromboembólicos, e constituem cerca de 75% das causas de morbidade e mortalidade neonatal sendo assim um fator de risco para ocorrência de complicações gestacionais, deixando em risco mães e filhos.

Evidencia-se que a condição do paciente ser trombofílico não implica necessariamente que irá ocorrer um evento trombótico, pois para tal depende de vários fatores, tanto externos como genéticos. Porém na gravidez esse risco aumenta em até seis vezes mais do que na população em geral, isso devido ao fato que na gestação há um aumento de hipercoagulabilidade e hipofibrinolise para proteger a grávida de hemorragias relacionadas ao parto. Com isso pode haver um aumento de doenças tromboembólicas e disfunção na vascularização placentária.

Estudos realizados por Ozkan (2012)<sup>24</sup> mostram que é comum pacientes com cânceres malignos desenvolverem quadros de trombose, devido às células neoplásicas ativar diretamente o sistema de coagulação, e indiretamente estimular um fenótipo pró-coagulante nas células hospedeiras como monócitos, plaquetas e células endoteliais. Eventos estes que fazem com que pacientes oncológicos tenham de quatro a sete vezes mais riscos de desenvolver tromboembolismo do que pacientes sem câncer.

Entretanto Reni *et al.* (2017)<sup>26</sup> diz que algumas situações como o tipo do tumor, a localização anatômica, grau de agressividade e o quadro clínico do paciente possibilitam ou não o aparecimento de trombose em um determinado estágio evolutivo da doença, e que devido a esses fatores determinantes o risco de desenvolver TEV não é igual para todos os pacientes com câncer.

Compreende-se que o câncer por si só e seus diversos tratamentos são reconhecidos como fatores de risco para desenvolver um tromboembolismo venoso. Tendo em vista que há séculos a associação clínica entre neoplasias e hipercoagulabilidade já é conhecida. Na presença de neoplasias a trombose pode apresentar-se de várias formas clínica como embolia pulmonar, trombose venosa profunda e superficial, tornando assim a segunda maior causa de mortes em pacientes neoplásicos.

### **Diagnóstico das Trombofilias Relacionadas ao Gene MTHFR**

Através do rastreamento de trombofilia hereditária pode-se elaborar uma estratégia para obter uma prevenção, contribuindo para reduzir a incidência nas famílias com casos e na população em geral. O diagnóstico de rotina pode ser baseado através de Tempo de tromboplastina parcialmente ativada - TTPa como triagem e o uso de técnicas moleculares baseadas na amplificação de PCR, Espectrofotometria de massa, Cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) e outros<sup>24</sup>.

Conforme Zavala-Hernandez *et al.* (2015)<sup>27</sup> e Kaur *et al.* (2012)<sup>10</sup> devem ser avaliados os fatores de risco adquiridos tais como; histórico familiar, diabetes mellitus, cirurgias, tabagismo, obesidade, trauma, hipertensão, alcoolismo, vegetarianismo e associa-los a fatores trombofílicos.

Segundo Hoteit *et al.* (2014)<sup>12</sup> e Yang *et al.* (2010)<sup>13</sup> é de grande importância que no manejo clínico laboratorial sejam avaliados os Fatores V e II e o gene MTHFR que estão entre os mais importantes fatores envolvidos em eventos tromboembólicos.

A detecção de mutação no gene MTHFR pode ser realizada por hibridização reversa em reação em cadeia da polimerase. Considerando também a necessidade da dosagem de homocisteína, já que a MTHFR é considerada fator de risco em presença de hiperhomocisteinemia. Por isso na triagem laboratorial é muito importante avaliar não apenas o gene, mas também o nível de homocisteína plasmático presente<sup>5,14</sup>.

Demonstra-se, que a PCR em tempo real ou Reação em cadeia de polimerase através de enzimas de restrição são muito utilizadas para identificação de polimorfismo na enzima MTHFR, mas para um diagnóstico preciso é necessário à dosagem de homocisteína e possivelmente de vitaminas do complexo B, principalmente folato. Pois, a presença da mutação torna-se maior fator risco quando em altos níveis de homocisteína e baixo nível de folato.

Em um estudo realizado Ozkan *et al.* (2012)<sup>24</sup> com a extração do DNA genômico, utilizando a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) e fragmentos de restrição para identificar os campos com polimorfismo no gene foi possível a obtenção de resultados significativos em relação a técnica empregada, avaliando a presença de mutações genéticas no gene MTHFR, em pacientes com câncer e correlacionando-os com pacientes controle. O estudo comprovou que a mutação do gene MTHFR predominou em câncer gastrointestinal.

No mesmo pensamento Turki e colaboradores (2015)<sup>25</sup>, utilizaram enzimas de restrição específicas para chegar ao Polimorfismo Nucleotídeo Único (SNPs) de interesse, no mesmo estudo realizou-se eletroforese em gel de agarose avaliando assim o tamanho dos pares de bases investigados. O autor destaca a importância de incluir a análise de citogenética e testes de trombofilia como investigação em casos de tratamento em clínicas de fertilização *in vitro*.

Concordando com o método, autores<sup>21,27</sup> utilizaram a amplificação de DNA genômico, através de primers e a PCR. Após os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. Os genótipos alcançados no estudo foram obtidos meio de sítios de restrição. Para avaliar a presença de coagulante lúpico e TTPa geralmente usa-se a coagulometria. A dosagem de homocisteína é realizada através de imunoenaios enzimático por fluorescência. O que comprovou no estudo que as técnicas aplicadas atingiram o objetivo

de chegar a possíveis desordens genéticas.

Técnicas que envolvam a identificação de Polimorfismo Nucleotídeo Único - SNPs individualmente são bastante utilizadas. Geralmente o método mais aplicado é a reação em cadeia de polimerase, que amplifica a região que contém o SNP, o fragmento amplificado pode ser identificado por outro método, mas, geralmente é através de enzimas de restrição específica ou por eletroforese em gel. A técnica de espectrofotometria de massa é também bastante empregada, pois a metodologia permite a obtenção do resultado com cerca de 5 horas<sup>13</sup>.

Sendo assim, a metodologia de amplificação de DNA através da PCR é de grande importância em nível de precisão. A mesma possibilita selecionar o SNPs, que são os polimorfismos na sequência do DNA. Com o produto da PCR selecionado é possível avaliar os tamanhos dos pares de bases através da eletroforese em gel de agarose.

Teste de polimorfismo vem sendo solicitado por médicos para avaliação clínica. E garantindo um diagnóstico eficaz é solicitada a dosagem de vitaminas do complexo B e homocisteína<sup>22</sup>.

Hickey *et al.* (2013)<sup>22</sup> relata que em alguns estados do EUA, por orientação do governo foi adicionado vitaminas do complexo B aos grãos resguardando a população que em sua maioria eram caucasianos, podendo assim ter a mutação do MTHFR e outros fatores trombofílicos.

Outro teste ainda não muito conhecido é o teste genético molecular que possibilita avaliar se a mutação do gene está em homozigose ou heterozigose. Sendo ele um teste rápido pode ser fielmente usado na urgência e emergência. Dentro do projeto Genoma Humano o teste que identifica uma possível pré-disposição para a doença é avaliado como um potencial benéfico para diagnóstico<sup>12</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

Demonstram-se através do estudo que as trombofilias são desordens graves de alto grau de morbidade e mortalidade. As mesmas podem estar relacionadas a diversos fatores, que se identificados e tratados, garantem ao indivíduo uma vida normal.

É necessário observar que as trombofilias podem ocorrer por caráter diferentes. As ocasionadas por anticorpos antifosfolípides (SAAF) são as mais comuns em termos de trombofilias adquiridas e podem estar envolvidas a outros fatores que levam o organismo a criar um mecanismo de defesa sendo prejudicial ao mesmo. Assim, ela se torna uma das mais graves caso ocorra, considerando o fator autoimune da mesma.

Contudo, a trombofilia hereditária ocorre mediante alguma mutação genética, levando a uma disfunção do gene de origem. As mutações dos genes ou fatores de coagulação podem ser influenciadas por razões fenotípicas de cada população, exemplo disso é a relação da mutação do MTHFR em caucasianos.

O estudo permite entender que a mutação que ocorre na variante termolábil C677T da enzima

metilenotetrahidrofolato redutase – MTHFR possui grau de risco mediante a presença de hiperhomocisteinemia. E que o aumento dos níveis de homocisteína plasmática está relacionado aos níveis de vitamina B, considerando a necessidade principalmente de folato (vitamina B9) para que ocorra a remetilação de homocisteína em metionina. Correlacionando então, os níveis de homocisteína a fatores dietéticos do paciente.

Assim, entende-se que a MTHFR participa do metabolismo da homocisteína, favorecendo que os níveis estejam adequados, garantindo a homeostase do sistema. Contudo, em caso do polimorfismo da enzima é necessária uma mudança da dieta básica desse paciente para diminuir chances de eventos trombóticos. Isso se confirma mediante a necessidade de gestantes introduzirem ácido fólico durante a gestação, o que pode inibir o aparecimento de eventos tromboembólicos no período gestacional.

O estudo confirma ainda que existem técnicas laboratoriais eficazes e confiáveis para detecção da mutação do polimorfismo enzimático da MTHFR. É avaliável que dentre essas técnicas, já existem hoje testes rápidos que identificam a presença da mutação polimórfica em menos de 1 hora, e que as técnicas mais avançadas como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Eletroforese em Gel de Agarose, Espectrofotometria de Massa e outros. Podem ser fielmente usadas para diagnóstico da doença.

## REFERÊNCIAS

- [1] Gutiérrez-Castañeda MR and Font-López KC. Trombofilias y embarazo: incidencia, factores de riesgo y resultados perinatales. *Ginecol Obstet Mex.* 2017; 85(10):676-684.
- [2] Hernandez-Cuervo H, Uesme S and Yunis JJ. Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias. *Biomédica.* 2014; 34:132-42.
- [3] Figueiró-Filho EA, Oliveira VM, Coelho LR e Breda I. Marcadores séricos de trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em gestantes com antecedentes de pré-eclâmpsia grave. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012; 34(1):40-6.
- [4] Barros VIPVL, Igai AMK, Andres MP *et al.* Resultados gestacionais e trombofilias em mulheres com história de óbito fetal de repetição. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014; 36(2):50-55.
- [5] Trisolini SM, Capria S, Cafolla A *et al.* Thrombosis Research. *Thrombosis Research.* 2009; 124:512–513.
- [6] Calvachi CND. Trombofilias hereditarias. *Rev Cient Cienc Méd Volumen.* 2015; 18(1).
- [7] Mota F, Gonçalves LR e Mansilha A. Rastreo de trombofilia hereditária no contexto de trombose venosa profunda. *Angiologia e Cirurgia Vascular.* 2011; 7(3).
- [8] Hotoleanu C. Genetic Risk Factors in Venous Thromboembolism. *Adv Exp Med Biol - Advances in Internal Medicine* (2016) DOI 10.1007/5584\_2016\_120 # Springer International Publishing Switzerland 2016.
- [9] Marques MA, Silveira PRM, Ristow AV, Gress M, *et al.* Pesquisa de marcadores de trombofilia em eventos trombóticos arteriais e venosos: registro de 6 anos de

- investigação. Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascul. J Vasc Bras. 2009; 8(3):225-231.
- [10] Kaur L, Puri M, Kaushik S *et al.* Genetic thrombophilia in pregnancy: a case-control study among North Indian women. J Thromb Thrombolysis 2013; 35:250-256.
- [11] Simoni RZ, Couto C, Barnir R *et al.* Malformações do sistema nervoso central e a presença da mutação C677T-MTHFR no sangue fetal. Rev Bras Ginecol Obstet. 2013; 35(10):436-41.
- [12] Hotei R, Hassanieh S, Mahfouz RA. Comparison of the Performance of the Cepheid Xpert HemosIL Factor II and Factor V and the ViennaLab FV-PTH-MTHFR StripAssay Kits for Molecular Thrombophilia Profiling. Department of Pathology and Laboratory Medicine, American University of Beirut Medical Center, Beirut, Lebanon. Genetic Testing And Molecular Biomarkers. 2014; 18(3):183-186.
- [13] Yang S, Xu L and Wu HM. Rapid Multiplexed Genotyping for Hereditary Thrombophilia by SELDI-TOF Mass Spectrometry. Diagn Mol Pathol Volume 19, Number 1, March. 2010
- [14] Harteman JC, Groenendaal F, Haastert ICV *et al.* Atypical timing and presentation of periventricular haemorrhagic infarction in preterm infants: the role of thrombophilia. Role of Thrombophilia in Atypical PVHI in Preterm Infants. Developmental Medicine & Child Neurology. 2012, 54:140-147.
- [15] Souza MT, Silva MD e Carvalho R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. Einstein. São Paulo, 2010; 8(1):102-6.
- [16] Asim M, Al-Thani H and El-Menyar A. Recurrent Deep Vein Thrombosis After the First Venous Thromboembolism Event: A Single Institution Experience. Recurrent deep vein thrombosis. Med Sci Monit, 2017; 23:2391-2399.
- [17] Hidalgo SF e Paula JMP. Trombosis venosa portal y mesenterica asociadas a hiperhomocisteinemia y anemia perniciosa en un paciente heterocigoto para la mutación C677T del gen de la MTHFR. Med Clin (Barc). 2011; 136(5):222-229.
- [18] Mishra MN, Kalra R and Rohatgi S. Clinical profile, common thrombophilia markers and risk factors in 85 young Indian patients with arterial thrombosis. Sao Paulo Med J. 2013; 131(6):384-8.
- [19] Torres VM e Saddib VA. Systematic review: hereditary thrombophilia associated to pediatric strokes and cerebral palsy. Sociedade Brasileira de Pediatria. J Pediatr (Rio J). 2015; 91:22-9.
- [20] Ferreira CM, Figueiró-Filho EA, Oliveira VM e Pereira EFP. Tromboprofilaxia e desfechos materno-fetais de mulheres com marcadores séricos para trombofilias hereditárias e antecedentes de complicações obstétricas. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife. 2017; 17(4):699-704.
- [21] Guzman N and Salazar LA. Frequency of Prothrombotic Risk Factors in Patients with Deep Venous Thrombosis and Controls: Their Implications for Thrombophilia Screening in Chilean Subjects. Genetic testing and molecular biomarkers. 2010; 14(5):599-602.
- [22] Hickey SE, Curry CJ and Toriello HV. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. Genetics in medicine, volume 15, number 2, February. 2013.
- [23] Roca LMC, Sanchez VEO, Gutierrez-Manchon OH *et al.* Trombosis arterial cerebral en gestante. (Caso clínico). Rev Esp Anestesiol Reanim. 2015; 62(9):528-532.
- [24] Ozkan M, Sivgin S, Kocuyigit I *et al.* Do thrombophilic gene mutations have a role on thromboembolic events in cancer patients? Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology. 2012; 8: e34-e4
- [25] Turki RF, Assidi M, Banni HA *et al.* Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia. The Author(s) BMC Medical Genetics. 2016; 17(Suppl 1):69
- [26] Renni MJP, Cerqueira MH, Trugilho IA *et al.* Mecanismos do tromboembolismo venoso no câncer: uma revisão da literatura. Vasc Bras. 2017; 16(4):308-313.
- [27] Zavala-Hernandez C, Hernandez-Amora E, Martinez-Murillo C *et al.* Risk Factors for Thrombosis Development in Mexican Patients. Annals of Vascular Surgery, May 23, 2015