



# AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTROMBINA E DO GENE FATOR V POR PCR PARA INVESTIGAÇÃO DE INFERTILIDADE

*Victoria Caroline Sampaio Chamarelli<sup>1</sup>, Ana Paula de Sá Ferreira Martins<sup>2</sup>, Mariane Castardo Araujo<sup>3</sup>, Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Pesquisadora, PVIC-UniCesumar. [victoriachamarelli@gmail.com](mailto:victoriachamarelli@gmail.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Pesquisadora, PVIC-UniCesumar. [ferreira.ana.paula.sa.martins@gmail.com](mailto:ferreira.ana.paula.sa.martins@gmail.com)

<sup>3</sup>Coorientadora, Mestre, Docente no Curso de Ciências Biológicas, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. [mariane.castardo@unicesumar.edu.br](mailto:mariane.castardo@unicesumar.edu.br)

<sup>4</sup>Orientadora, Doutora, Docente no Curso de Medicina, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. [maria.baldez@docentes.unicesumar.edu.br](mailto:maria.baldez@docentes.unicesumar.edu.br)

## RESUMO

A trombofilia é um distúrbio hemostático que pode interferir na implantação embrionária e na vascularização placentária, sendo uma das causas de infertilidade feminina. Em sua forma hereditária, destacam-se as mutações do Fator V de Leiden (FV G1691A) e Protrombina (G20210A), mais comuns na população caucasiana. Durante a gestação, estado de predisposição à hipercoagulabilidade, sua associação eleva o risco de complicações, como óbito fetal intrauterino e morte materna. O diagnóstico dessas mutações é realizado através de técnicas de biologia molecular, como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), eletroforese e digestão enzimática. Considerando que o Laboratório de Genética Humana da UniCesumar possui vínculo com o NIS Aclimação e já realiza PCR para outras mutações, pretende-se padronizar essa técnica para detecção das mutações do Fator V de Leiden e da Protrombina. Essa pesquisa é experimental, qualitativa e segue os critérios do Comitê de Ética em Pesquisa. Coletaram-se amostras de swab de mucosa bucal, as quais foram submetidas à extração de DNA, PCR e digestão com enzimas de restrição; a visualização ocorreu por eletroforese em gel de agarose. Até o momento, a amplificação por PCR foi padronizada com sucesso para os dois genes, obtendo-se bandas visíveis na eletroforese. No entanto, os testes com enzimas de restrição ainda estão em fase de ajuste. Dessa forma, espera-se validar um protocolo eficaz para o diagnóstico molecular dessas mutações em mulheres em investigação de infertilidade, contribuindo com o acesso da população a exames diagnósticos de alta relevância clínica no contexto da saúde reprodutiva.

**PALAVRAS-CHAVE:** Coagulopatias; Esterilidade; Genética Molecular; Trombofilia.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a infertilidade afeta cerca de uma em cada seis pessoas no Brasil, sendo que aproximadamente 8 milhões de pessoas podem ser inférteis (Who, 2023). Entre as condições que podem aumentar o risco de infertilidade e comprometer o curso gestacional está a trombofilia, um distúrbio hemostático que leva a um estado de hipercoagulabilidade e promove alterações no sítio de implantação embrionária, prejudicando eventos críticos como a invasão trofoblástica e a vasculatura placentária (Fabregues et al., 2023).

A trombofilia é um fator de risco para abortos espontâneos recorrentes, especialmente no primeiro trimestre, e devido à gestação ser um período de hipercoagulabilidade, sua coexistência com trombofilia aumenta o risco de complicações, como óbito fetal intrauterino, restrição de crescimento intrauterino, descolamento prematuro de placenta e morte materna, com tromboembolismo como a principal causa (Mierla et al., 2012; Nikolaeva et al., 2021; Frabegues et al., 2023).

Essa patologia na forma hereditária ocorre devido a alterações na sequência do DNA em genes envolvidos em diversos processos biológicos, como por exemplo os que codificam fatores da via de coagulação. Nesse contexto, a alteração do Fator V de Leiden (FV G1691A) é a mutação mais comum causadora de trombofilia na população caucasiana, seguida pela Protrombina (G20210A) (D'amico et al., 2003; Abukhiran; Jasser; Bhagavat,



2020; Shibeeb et al., 2024). A mutação de ambos os genes deve-se pela troca de duas bases nitrogenadas, mais precisamente pela substituição de uma guanina por uma adenina, na posição G20210A na região 3' para a Protrombina, e na posição 1691 do gene no *éxon* 10 para o Fator V (Poort et al., 1996; Herkenhoff et al., 2022; Shibeeb et al., 2024).

No caso do Fator V há a troca do aminoácido arginina (Arg) por glutamina (Gln) na posição 506 da proteína, em um dos seus sítios de clivagem, o que leva a uma resistência à ação das proteínas anticoagulantes as quais o Fator V age como cofator, favorecendo a hipercoagulabilidade por problemas nos mecanismos antitrombóticos (Ong & Bennet, 2022). Em relação a Protrombina, a presença do alelo mutado é responsável pelo aumento da produção de mRNA, gerando a elevação dos níveis de Protrombina sérica, consequentemente elevando o risco de formação indevida de coágulos, e predispondo os portadores à trombose (Poort et al., 1996; McGlennen et al., 2002).

O diagnóstico dessas mutações é realizado por meio de procedimentos de biologia molecular, sendo eles a extração do DNA, PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para amplificar a região da mutação, e digestão por enzimas de restrição, a qual gera fragmentos de DNA de tamanhos diferentes em amostras portadoras e não portadoras da mutação, e eletroforese em gel para visualização dos fragmentos gerados (McGlennen et al., 2002; Herkenhoff et al., 2012; Ong & Bennet, 2022).

A Universidade Cesumar possui um laboratório de Genética Humana que tem parceria com o NIS Aclimação, e realiza exames dos pacientes para diagnóstico de infertilidade. Desse modo, é de extrema importância a padronização deste protocolo para o exame de detecção de mutação do Fator V de Leiden e da Protrombina, os quais causam trombofilia, o que pode gerar infertilidade feminina, e desta forma fornecer um melhor diagnóstico aos pacientes.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta é uma pesquisa experimental qualitativa, a qual segue os aspectos éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Foram selecionadas como participantes voluntárias, mulheres do sexo feminino, sem restrição de idade, que concordaram em fazer parte deste estudo, por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta das amostras de DNA foi feita no Laboratório de Genética Humana - LaGenHum - da Unicesumar, Maringá, PR. Neste mesmo local as amostras estão sendo processadas para identificação de mutação do Fator V de Leiden e da Protrombina.

A metodologia utilizada para a extração do DNA das amostras seguiu o protocolo para extração e purificação de células de mucosa epitelial padronizado por Araujo et al. (2021), consistindo na coleta de células da mucosa bucal por fricção, seguido das etapas de lise celular e purificação do DNA obtido. As amostras obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (Kanbe et al., 2002), utilizando marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen) para uma comparação semiquantitativa da concentração.

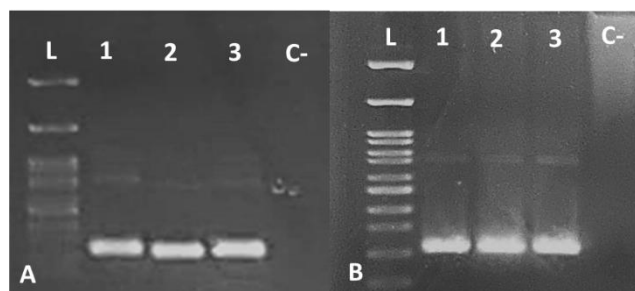
A PCR está sendo padronizada utilizando primers e critérios específicos a cada mutação, seguindo o proposto por Rocha (2009). Os ciclos de PCR realizados pelo termociclador são aplicados igualmente para as amostras de ambas as mutações, sendo eles a desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 1 minuto de anelamento a 53°C, e 2 minutos de extensão a 72°C, com 35 repetições de ciclo.

A padronização da clivagem com as enzimas de restrição seguirá as recomendações propostas pelo fabricante (NZYtech). Para a Protrombina, os produtos gerados após a amplificação serão submetidos à digestão enzimática com a endonuclease de restrição HindIII e incubados durante 1 hora a 37°C; e para o Fator V a restrição dos produtos amplificados será realizada utilizando a enzima MnlI por 18 horas a 37°C. Os fragmentos gerados serão visualizados em eletroforese em gel de agarose a 2,5%.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

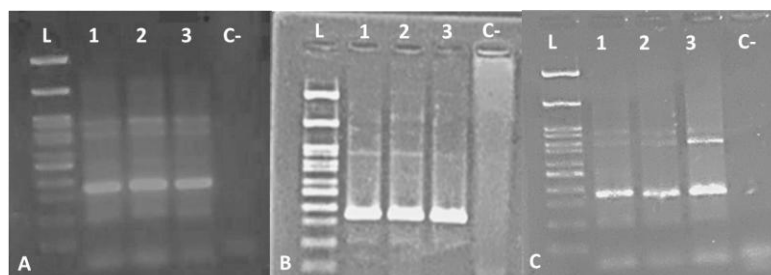
Até o presente momento foi realizada com sucesso a extração de DNA das amostras de três voluntários, seguida de três amplificações teste do gene do Fator V, sendo que duas obtiveram sucesso e apresentaram bandas na eletroforese (Figura 1), e quatro amplificações do gene da Protrombina, com três delas apresentando bandas (Figura 2). Desse modo um protocolo de amplificação por PCR foi padronizado para as duas, diferindo apenas no *primer* utilizado para cada gene.



**Figura 1:** Eletroforeses das PCRs do gene do Fator V.

A e B. Eletroforeses das amostras 1, 2 e 3. L: *Ladder* 100pb; 1-3: amostras com banda; C-: controle negativo.

Fonte: Elaborado pelas autoras.



**Figura 2:** Eletroforeses das PCRs do gene da Protrombina.

A, B e C. Eletroforeses das amostras 1, 2 e 3. L: *Ladder* 100pb; 1-3: amostras com banda; C-: controle negativo.

Fonte: Elaborado pelas autoras.

Os testes com enzimas de restrição foram iniciados, porém ainda não se obteve sucesso, portanto estão sendo realizadas adaptações no protocolo para identificar a etapa de falha no processo utilizado.

No caso de sucesso da digestão enzimática, espera-se visualizar em eletroforese em gel de agarose a 2,5% os seguintes fragmentos: para o Fator V de Leiden quatro fragmentos (37pb, 67pb, 116pb, 153pb) em portadores heterozigotos, e dois fragmentos (153pb, 67pb) em portadores homozigotos; e para a Protrombina três fragmentos (15pb, 58pb e 272pb) em não portadores da mutação, e quatro fragmentos (15pb, 23pb, 58pb e 249pb) quando a mutação G20210A estiver presente.

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O intuito desta padronização de protocolo para PCR é implementar no Laboratório de Genética Humana da UniCesumar o diagnóstico de mutações de trombofilias hereditárias, visando o atendimento de pacientes do SUS vinculados ao NIS Aclimação, especialmente mulheres com suspeita de infertilidade por mutações genéticas associadas



à trombofilia, facilitando o acesso ao diagnóstico, assim permitindo intervenções terapêuticas mais eficazes, melhorando o aconselhamento genético, contribuindo para a qualidade de vida dos casais afetados e apoiando a formulação de políticas públicas voltadas à saúde reprodutiva.

## REFERÊNCIAS

ABUKHIRAN, I.; JASSER, J.; BHAGAVAT, S. Education Case: Hereditary Thrombophilia With Double Heterozygous Factor V Leiden and Factor II c.\*97G>A Mutations.

**Academic Pathology**, v. 8, 2020. DOI: <10.1177/2374289521990788>. Acesso em: 29 de abril, 2025.

ARAUJO, M. C.; VALENTE, A. D.; SOUZA, G. A. F.; AVELAR, A. C. S.; TORRESAN, C.; MORAES, A. M. S. M.; REIS, M. F. Adaptação de um método de extração de DNA a partir de células da mucosa bucal baseado em parâmetros de qualidade. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 34697–34708, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-093>>. Acesso em: 05 de maio, 2025.

Câmara. Comissão aprova obrigação do SUS de ofertar diagnóstico e tratamento para trombofilias em mulheres. **Agência Câmara de Notícias**, 2023. Disponível em:

<<https://www.camara.leg.br/enquetes/2347177>>. Acesso em: 12 de maio, 2025.

D'AMICO, E. A. Trombofilia: Quando e como Investigar? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 1-23, 2003. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/ramb/i/2003.v49n1/>>. Acesso em: 07 de maio, 2025.

FABREGUES, F.; GARCÍA-VELASCO, J. A.; LLÀCER, J.; REQUENA, A.; CHECA, M. A.; BELLVER, J.; ESPINÓS, J. J. The role of thrombophilias in reproduction: A swot analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 280, p. 12–21, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2022.10.024>>.

Acesso em: 05 de maio, 2025.

HERKENHOFF, M. E.; GAULKE, R.; REMUALDO, V. R.; ROSA, C. A. V. L. Análise da mutação G20210A no gene da protrombina (fator II) em pacientes com suspeita de trombofilia no sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 85–89, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000200003>>.

Acesso em: 02 de maio, 2025.

KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic Candida species using primer mixes specific to Candida DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 29, p. 973-989, 2002. DOI: < 10.1002/sim.892>.

Acesso em: 10 de maio, 2025.

MCGLENNEN, R. C. & KEY, N. S. Clinical and laboratory management of the prothrombin G20210A mutation. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 126, n. 11, p. 1319–1325, 2002. DOI: <[10.5858/2002-126-1319-CALMOT](https://doi.org/10.5858/2002-126-1319-CALMOT)>. Acesso em: 09 de maio, 2025.

MIERLA, D.; SZMAL, C.; NEAGOS, D.; CRETU, R.; STOIAN, V.; JARDAN, D. Association of Prothrombin (A20210G) and Factor V Leiden (A506G) with Recurrent Pregnancy Loss. **Maedica, A Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 222–226,



2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23400304>>. Acesso em: 08 de maio, 2025.

NIKOLAEVA, M. G.; MOMOT, A.P.; ZAINULINA, M. S.; YASAFOVA, N. N.; TARANENKO, I. A. Pregnancy complications in G20210A mutation carriers associated with high prothrombin activity. **Thrombosis journal**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12959-021-00289-4>>. Acesso em: 09 de maio, 2025.

ONG, J. & BENNET, A. A review of laboratory considerations in thrombophilia testing. **Pathology**, v. 54, n. 7, p. 835–841, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2022.09.001>>. Acesso em: 05 de maio, 2025.

POORT, S. R.; ROSENDAAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, v. 88, n. 10, p. 3698–3703, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8916933/>>. Acesso em: 02 de maio, 2025.

ROCHA, L. K. A.; GALANTE, N. Z.; ALVAREZ, V. A. C.; ARECO, K. C. N.; NOGUTI, M. A. E.; AMARAL, R. Q.; ANDRADE, L. E. C.; PERES, C. A.; PESTANA, J. O. M.; LOURENÇO, D. M. Mutação G20210A no gene da protrombina, fator V de Leiden e anticorpos anticardiolipina não influenciam a sobrevida do enxerto renal após o transplante. **Jornal brasileiro de nefrologia: Órgão Oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 31, n. 4, p. 277–285, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0101-28002009000400006>>. Acesso em: 08 de maio, 2025.

SHIBEEB, S.; AL-RAYASHI, N.; SHAMS, N.; HADVAN, T.; AGBANI, E. O.; ABDALLAH, A. M. Factor V Leiden (R506Q), Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Variants and Thrombophilia in Qatar Biobank Participants: A Case Control Study. **Pathophysiology**, v. 31, p. 608–620, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathophysiology31040044>>. Acesso em: 08 de maio, 2025.

SILVEIRA, J. A. N.; FURLAN, R. P.; MAHANA, G. D.; MACHADO, D. Análise Fisiopatológica da Trombofilia em Gestantes. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.46675/rbcbm.v4i1.70>>. Acesso em: 05 de maio, 2025.

SOUZA, Ludmilla. SUS pode ser esperança para mulheres que sonham ser mãe. **Agência Brasil**, 2023. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-05/sus-pode-ser-esperanca-para-mulheres-que-sonham-ser-maes#:~:text=Destes%20centros%2C%20somente%20em%20quatro,m%C3%A9dio%20de%20R%24%20mil>>. Acesso em: 13 de maio de 2025.

WHO – World Health Organization. Infertility prevalence estimates, 1990-2021. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/978920068315>>. Acesso em: 09 de maio de 2025.