



Deficiências adquiridas de proteína C têm sido observadas em doenças hepáticas, terapia com anticoagulantes orais, deficiência de vitamina K, pós-operatório, coagulação intravascular disseminada, recém-nascidos e presença de níveis aumentados de L-asparaginase.<sup>7</sup>

As deficiências hereditárias de proteína S foram classificadas por Comp<sup>10</sup> em tipos I, IIa e IIb de acordo com os níveis plasmáticos de proteína S (livre e total) e atividade. O tipo I tem herança autossômica dominante e apresenta todos os parâmetros relativos à proteína S (níveis de proteína S livre, total e atividade) diminuídos. No tipo IIa, a proteína S livre e atividade estão diminuídos, no entanto, o nível da proteína total apresenta-se normal. E no tipo IIb, somente a atividade da proteína S está diminuída.

Deficiências adquiridas de proteína S foram descritas em pacientes que fazem uso de anticoagulantes orais, na gravidez, em mulheres que usam anticoncepcional oral, na deficiência de vitamina K, nas doenças hepáticas, diabetes do tipo I, inflamações agudas e em recém-nascidos.<sup>7</sup>

A proteína S total pode ser determinada no plasma por meio de metodologias de eletroimunodifusão e testes de enzimmunoensaio (ELISA). A proteína S livre pode ser separada da proteína ligada por meio da precipitação do complexo com polietilenoglicol (PEG), segundo Comp *et al* (1986)<sup>11</sup> e, posteriormente, dosada com as metodologias já descritas para a proteína S total.

O nível de anti-trombina III circulante no plasma pode ser determinado por ensaio cromogênico, baseado em método amido-lítico (colorimétrico), mediante o uso do substrato cromogênio sintético (H-D-CHT-ABut-Arg-pNA).<sup>12</sup>

Deficiências adquiridas de antitrombina III podem ser observadas em doenças hepáticas, síndrome nefrótica, coagulação intravascular disseminada, uso de contraceptivos orais e presença de níveis aumentados de L-asparaginase.<sup>7</sup>

laboratorial para a determinação da resistência à proteína C ativada, que recebeu o mesmo nome (RPCA), e baseia-se na determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) do plasma do paciente, antes e após adicionar proteína C ativada (exógena) ao plasma. O resultado é obtido pela razão do valor do TTPA utilizando reagente contendo proteína C ativada, pelo valor do TTPA sem proteína C ativada. A prova RPCA é utilizada como triagem da presença de fatores V mutantes.

Em alguns casos especiais, cuja a prova TTPA já se encontra alterada devido à presença de anticoagulantes lúpicos, ou em pacientes que fazem uso de warfarina, recomenda-se a diluição dos plasmas destes pacientes com plasma deficiente em fator V na proporção de 1:9 para a realização da prova de resistência à proteína C ativada.<sup>54</sup>

As alterações genéticas presentes nos pacientes que apresentam trombofilias estão relacionadas às mutações nos genes do fator V, protrombina (fator II) e genes relacionados ao metabolismo da homocisteína, o que poderiam explicar a ocorrência de trombose em indivíduos que não apresentam níveis diminuídos de inibidores da coagulação.

### ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO GENE DO FATOR V

Foram descritas pelo menos oito alterações no gene que codifica a síntese do fator V, relacionadas às substituições de nucleotídeos, originando proteínas mutantes (Tabela II).

Dentre as mutações do fator V, o fator de Leiden (Arg506Gln) e o fator V Cambridge (Arg306Thr) são as mais citadas.

O fator V de Leiden foi descrito por Bertina *et al* em 1994<sup>4</sup> e está presente em cerca de 90% dos pacientes que apresentam RPCA. O defeito molecular corresponde a uma mutação pontual no exon 10 do gene que codifica a síntese do fator V, conservando a sua função procoagulante. No entanto, há como consequência da substituição da base nitrogenada no DNA, a troca de um aminoácido (arginina por glutamina na posição 506) exatamente em um dos sítios na qual a proteína C cliva a molécula do fator Va, inativando-a e fornecendo-lhe características diferentes do fator V, já que a proteína C ativada não reconhece o fator Va mutante.

O fator V de Leiden está presente em cerca de 5% da população caucasóide e ausente em negros e asiáticos.<sup>23</sup>

Os outros 10% de pacientes com RPCA, teriam outras mutações no gene do fator V.

O fator V Cambridge corresponde a outra mutação na qual há a substituição do aminoácido arginina pela tirosina na posição 306 do peptídeo.<sup>59</sup>

Tabela II - Alterações moleculares descritas para o fator V: número do códon na qual houve a substituição da base nitrogenada, nucleotídeo e aminoácido e os respectivos fenótipos.

Codon	Nucleotídeo	Aminoácido	Fenótipo	Referências
221	GCC-GTC	Ala-Val	Deficiência do fator V	Murray <i>et al</i> , 1995 <sup>45</sup>
306	AGG-ACG	Arg-Thr	Trombose	Williamson <i>et al</i> , 1998 <sup>59</sup>
306	cAGG-GGG	Arg-Gly	Trombose	Chan <i>et al</i> , 1998 <sup>9</sup>
485	AGA-AAA	Arg-Lys	Aumento de risco para trombose	Hiroshi <i>et al</i> , 1998 <sup>31</sup>
506	CGA-CAA	Arg-Gln	Trombose	Bertina <i>et al</i> , 1994 <sup>4</sup>
506	gCGA-TGA	Arg-Term	Deficiência de fator V	Kitzis, 1999 <sup>33</sup>
712	gCGA-TGA	Arg-Term	Trombose	Lunghi <i>et al</i> , 1998 <sup>40</sup>
1299	CAT-CGT	His-Arg	Trombose	Castman <i>et al</i> , 1997 <sup>8</sup>

Tabela I - Fatores adquiridos e congênitos relacionados à trombose.

ADQUIRIDOS	CONGÊNITOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cirurgia</li> <li>•Trauma</li> <li>•Imobilização</li> <li>•Neoplasias</li> <li>•Implantes de válvulas cardíacas</li> <li>•Coagulação intravascular disseminada (CIVD)</li> <li>•Hiperhomocistemia</li> <li>•Trombose prévia (causas nutricionais)</li> <li>•Presença de anticorpos anti-fosfolipídios (anticoagulantes lúpicos)</li> <li>•Síndrome nefrótica</li> <li>•Gravidez</li> <li>•Uso de contraceptivos orais</li> <li>•Uso de estrógenos</li> <li>•Fumo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Resistência à proteína C ativada,</li> <li>•Fator V (Leiden) e outras mutações</li> <li>•Deficiência de antitrombina III</li> <li>•Deficiência de proteína C</li> <li>•Deficiência de proteína S</li> <li>•Defeitos na fibrinólise</li> <li>•Mutação G20210A do gene da protombina</li> <li>•Hiperhomocistemia (causas genéticas)</li> </ul>

Fonte: Mitchell & Cotran, 1999<sup>42</sup>

### ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS ÀS TROMBOFILIAS

A resistência à proteína C ativada (RPCA) é o estado trombofílico mais freqüente, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade com incidência de 1 em 1000 por ano, principalmente em indivíduos de origem européia.<sup>29</sup>

Dahlback *et al* (1993, 1994)<sup>13,14</sup> propuseram uma prova la-

Gandrille *et al* (1995)<sup>27</sup> estudaram a frequência de mutação ARG506GLN e ARG485LYS em 113 pacientes com resistência à proteína C ativada (RPCA) e em 104 voluntários normais. Obtiveram que 14% dos pacientes com RPCA e 1% dos voluntários normais apresentavam a mutação ARG506GLN. Para a mutação ARG485LYS, as frequências foram de 6,2% no grupo com RPCA e 2,9% para os voluntários.

### ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO GENE DA PROTROMBINA

Outra mutação associada à trombose venosa e arterial é a mutação G20210A do gene da protrombina. Esta mutação está localizada em região não codificante do gene, portanto não determina a produção de proteína mutante. O mecanismo pelo qual essa mutação predispõe à ocorrência de tromboses parece estar associado à elevação dos níveis da protrombina determinada por uma maior estabilidade de seu RNAm.<sup>48,61</sup> Este fator de risco genético está presente em cerca de 1 a 3% da população caucasóide não sendo descrito em populações negras e asiáticas.<sup>23</sup>

De Stefano *et al* (1999)<sup>16</sup> pesquisaram sobre o risco de trombose venosa recorrente em portadores heterozigotos para as mutações do fator V Leiden e para a mutação G20210A da protrombina e observaram que os portadores do fator V Leiden (heterozigotos) possuem o mesmo risco dos não portadores. Os pacientes que apresentam as duas mutações têm um risco maior de recorrência após o primeiro episódio e são candidatos ao uso de anticoagulantes orais por toda a vida.

### ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS À HIPERHOMOCISTEINEMIA

Atualmente a hiperhomocisteinemia é considerada como um dos mais importantes fatores de risco para ocorrência de trombose arterial e venosa,<sup>15,23</sup> sendo o primeiro estudo de caso-controle publicado em 1991 por Bienvenu *et al*.<sup>5</sup> O mecanismo pelo qual a hiperhomocisteinemia determina a ocorrência de tromboses compreende alterações vasculares, plaquetárias e dos fatores de coagulação.<sup>15,17,28,30,47,49</sup>

Os principais fatores que influenciam a concentração da homocisteína são genéticos, nutricionais (deficiência de B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folatos e zinco) e patológicos (tais como, psoríase grave, câncer, leucemia aguda linfoblástica, insuficiência hepática e renal).<sup>58</sup>

O defeito genético mais grave do metabolismo da homocisteína é a deficiência da cistationina-b sintetase, que é uma alteração rara (1 caso em 250.000).<sup>58</sup> Em sua forma homozigota, produz uma hiperhomocisteinemia grave (até 400 mmol/L) com excreção de homocisteína na urina (homocistinúria).<sup>58</sup> No entanto, mesmo a deficiência heterozigota da cistationina-b sintetase (prevalência de 1 em 70 a 200) já é considerada como fator de risco aumentado de aterosclerose e trombose arterial e venosa.<sup>43</sup>

Outra alteração relacionada ao metabolismo da homocisteína é a deficiência da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).<sup>44</sup> A deficiência homozigota desta enzima é bastante comum, chegando a 10% na população caucasóide no Brasil.<sup>3</sup>

As alterações genéticas relacionadas aos fatores V, protrombina e níveis séricos aumentados de homocisteína, podem ser estudadas pela biologia molecular.

### TROMBOFILIAS SECUNDÁRIAS

As trombofilias secundárias mais frequentes ocorrem em estados pós-operatórios, traumatismos, pós-partos, neoplasias malignas, tratamentos com estrógenos e uso de anticoncepcional oral,<sup>53</sup> doenças autoimunes (com presença de anticorpos anti-fosfolípidos) e lúpus eritematoso generalizado.

Em algumas situações, os níveis plasmáticos dos fatores I (fibrinogênio) e VIII estão aumentados, tais como procedimentos cirúrgicos, trauma, infarto do miocárdio e doenças agudas. Na gravidez além desses, estão aumentados os níveis dos fatores IX e X e diminuídos os níveis dos fatores XI, XIII e anti-trombina III.<sup>32</sup>

Dentre as causas de trombofilias secundárias, o câncer tem sido descrito como a causa mais frequente em pacientes que apresentam trombofilias com idades superiores a 40 anos.<sup>46</sup>

É conhecido que a presença de anticoagulantes lúpicos predispõe à trombose.<sup>6,26,38</sup> Os anticoagulantes lúpicos estão presentes em gestantes com complicações obstétricas<sup>2,21,60</sup> e após uso de alguns medicamentos.<sup>52</sup>

A denominação de anticoagulantes lúpicos é incorreta, pois não são anticoagulantes e sim anticorpos antifosfolípidos (imunoglobulinas do tipo IgG, IgM, IgA ou misturas delas), que interferem "in vitro" nos testes TTPA e no tempo de veneno de cobra de Russel diluído (DRVVT).<sup>39</sup> A presença destes anticorpos "in vivo" acarreta ao paciente tendência à trombose. Não são encontrados apenas em pacientes com lúpus eritematoso, mas também na população sadia na frequência de 0 a 14%. Os anticorpos lúpicos, em conjunto com os anticardiolipina e a reagina, fazem parte da família dos anticorpos antifosfolípidos.

Os antígenos que desencadeiam a formação destes anticorpos incluem os complexos proteína-fosfolípidos.<sup>22,57</sup> Algumas proteínas têm sido consideradas como cofatores para a formação destes complexos, tais como protrombina, beta 2 glicoproteína I, ane-xina V, proteína C, proteína S, trombomodulina, cininogênio de alto peso molecular, entre outras.<sup>23,24</sup>

As metodologias utilizadas para o diagnóstico laboratorial da presença de anticorpos antifosfolípidos incluem: TTPA alterado e não corrigido com a diluição com plasma normal; tempo de coagulação com caolim; tempo de veneno de cobra de Russel diluído (DRVVT) e teste de neutralização com plaquetas.<sup>19,20,25,55,56</sup>

Vários pesquisadores estudaram a relação entre as complicações obstétricas, tais como pré-eclâmpsia e retardado de crescimento intra-útero, e a maior tendência destas mulheres a desenvolverem trombofilias.<sup>34,37,60</sup>

Lindqvist *et al* (1998)<sup>37</sup> fizeram um estudo retrospectivo com um grupo de 122 mulheres que tiveram pré-eclâmpsia ou retardado do crescimento intra-útero na última gravidez e um grupo controle de 465 gestantes saudáveis. Observaram que não houve diferença significativa entre as frequências de RPCA entre os grupos de mulheres com pré-eclâmpsia e retardado do crescimento intra-útero, quando comparadas com as observadas no grupo controle. No entanto, os autores observaram que o sub-grupo composto pelas mulheres que apresentavam resistência à proteína C ativada tinham menor risco de sangramento intra-parto, quando comparado com o sub-grupo das não resistentes à proteína C ativada. Este fato sugere que a mutação do fator V (representada pelos alelos dos FV:506) poderia ser um mecanismo evolutivo de seleção.



