

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FÁRMACIA



MONOGRAFIA
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Sara Ferreira Santos Batalha

LISBOA, 2011/12

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FÁRMACIA



FACTOR GENÉTICO DE RISCO TROMBÓTICO: MUTAÇÃO DO FACTOR V DE LEIDEN
ORIENTAÇÃO: DR. CARLOS CARDOSO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Sara Ferreira Santos Batalha

LISBOA, 2011/12

RESUMO

O tromboembolismo venoso (VTE) refere-se a uma trombose na circulação venosa. Apesar do evento trombótico venoso mais comum ser a trombose venosa profunda nas pernas, as tromboembolias também podem ocorrer nas extremidades superiores, pélvis, abdómen e cérebro. O embolismo pulmonar é a principal complicação da trombose venosa profunda, na qual uma porção do trombo venoso é transportada para uma artéria pulmonar, potencialmente obstruindo a vasculatura pulmonar. O tratamento inicia-se com anticoagulantes parentéricos em curta duração, por vezes terapêutica trombolítica e depois prolonga-se com antagonistas da vitamina K, comumente Warfarina. A duração da terapia depende da consideração sobre a existência de factores de risco permanentes que conduzam à recorrência.

Tem sido efectuado um grande esforço para quantificar o risco de recorrência de trombose. Se o paciente tem um factor de risco permanente para trombose, a terapia anticoagulante pode ser prolongada, por vezes por toda a vida. O clínico e o paciente podem tentar minimizar os factores de risco modificáveis e ainda utilizar meios mecânicos ou farmacológicos para prevenir tromboembolias em situações de alto risco como hospitalizações ou gravidez.

Com este trabalho pretendo fazer uma revisão de conjunto reunindo informação sobre os factores de risco associados a VTE, especificamente o Factor V de Leiden (FVL). É caracterizado o interesse clínico e epidemiológico da sua determinação, com estratificação nos diferentes grupos de risco e são também descritos vários métodos utilizados para a sua determinação laboratorial, bem como algumas das vantagens e desvantagens associadas a cada um deles.

Palavras-chave: Factor V Leiden, Polimorfismo, Tromboembolismo Venoso

ABSTRACT

Venous thromboembolism (VTE) is characterized by a stroke in the venous circulation. Although the most common venous thrombotic event is the deep vein thrombosis in the legs, thrombosis may also occur in the upper extremities, pelvis, abdomen, and brain. The pulmonary embolism is the major complication of deep venous thrombosis, in which a portion of the venous thrombus is conveyed to a pulmonary artery, potentially blocking the pulmonary vasculature. The treatment starts with parenteral anticoagulants as a first response, sometimes followed by thrombolytic therapy and it may be extended with vitamin K antagonists, commonly Warfarin. The duration of therapy depends on the consideration about the presence of risk factors that may lead to permanent recurrence.

It has been made a major effort to quantify the risk of recurrent thrombosis. If the patient has a permanent risk factor for thrombosis, anticoagulation therapy may be a permanent option. The clinician and the patient may try to minimize modifiable risk factors and also use mechanical or pharmacologic options for preventing thrombosis in high-risk situations such as hospitalizations or pregnancy.

With this paper i intend to do a comprehensive revision of the gathered information on risk factors associated with VTE, specifically the FVL. I characterized the clinical and epidemiological interest of its determination, with stratification in different risk groups and also described various methods used for determining laboratory as well as some of the advantages and disadvantages associated with each method.

Key Words: FactorV Leiden; polymorphism, Venous Tromboembolism

ÍNDICE

RESUMO	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS / TABELAS	6
TEXTO	7
INTRODUÇÃO	7
MÉTODOS	11
DESENVOLVIMENTO	12
1. Introdução ao risco trombótico, com especial ênfase nos biomarcadores:	12
2. Interesse clínico e epidemiológico:	16
3. Identificação e estratificação do risco:	18
4. Os principais biomarcadores, mutações associadas como a da protrombina e do gene MTHFR:	23
5. A abordagem laboratorial e metodológica:.....	26
6. Comparação entre principais métodos e desempenhos:	32
DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS / TABELAS

Figura 1: Esquema da cascata da coagulação (a), mecanismo de acção da APC sobre o FVa (b) e (c) [2].....	9
Figura 2: Comparação do risco de recorrência de VTE em portadores heterozigóticos de FVL e não portadores, em vários estudos de revisão. [10].....	19
Figura 3: Comparação do risco de recorrência de VTE em portadores heterozigóticos de Protrombina G20210A e não portadores, em vários estudos de revisão. [14].....	20
Figura 4: Razão entre o risco de recorrência de VTE em portadoras de FVL, com e sem o uso de terapêutica hormonal de substituição. [17]	21
Figura 5: Razão entre trombofilias seleccionadas e o risco de recorrência de VTE durante a gravidez. [17]	22
Figura 6: Esquema do ensaio Invader. [24].....	29
Figura 7: Sequências de “primers”, perfil de temperaturas de PCR e dimensão de produtos de PCR para determinação das mutações FV G1691A e Protrombina G20210A. [12]	32
Figura 8: Genotipagem do FVL com o teste Invader. [24]	33
Figura 9: Validade analítica dos testes para detecção da mutação FVL. [26].....	34
Figura 10: Validade analítica dos testes multiplex para detecção simultanea da mutação FVL e Protrombina G20210A. [26].....	34
Figura 11: Representação dos resultados obtidos por RFLP, Ligth Cycler e Nanogen [17].....	36
Tabela 1: Descrição dos factores da Coagulação. [1].....	7
Tabela 2: Comparação de métodos utilizados para determinar FVL	31

TEXTO

INTRODUÇÃO

O sistema Hemostático protege o organismo, garantindo que em caso de lesão vascular os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas. É um sistema complexo que reúne uma sequência de acções locais para controlo da hemorragia a partir de um vaso lesado, designado de Hemóstase. Este processo é regulado por diversos mecanismos e inclui diferentes fases.

A Resposta Vascular constitui a resposta imediata por constrição dos vasos, com diminuição do fluxo sanguíneo na área afectada.

A Hemóstase Primária é a designação atribuída ao processo de formação do trombo plaquetário.

A Hemóstase Secundária é a designação atribuída ao processo de formação do coágulo de fibrina, que ocorre por activação de duas vias distintas, a extrínseca e a intrínseca que depois culminam ambas na via comum. Os agentes intervenientes são designados de factores da coagulação, apresentados na tabela seguinte. [1]

Factor	Sinónimo	(mg/dL)	Semi-vida (h)	Função
I	Fibrinogénio	200-400	100-150	Percursor da fibrina
II	Pró-Trombina	10	50-80	Percursor da trombina, a qual converte o fibrinogénio em fibrina, activa os FV, FVIII, XIII e a proteína C; dependente da vitamina K.
III	Tromboplastina	0		Lipoproteína presente na membrana de células como fibroblastos perivasculares, células epiteliais; liga-se ao FVII dando início á cascata.
IV	Ião Cálcio	9-10		Co-factor de várias reacções da cascata.
V	Pró-acelerina	1	24	Actua como co-factor na formação do complexo pró-trombinase, presente nos grânulos alfa das plaquetas.
VII	Pró-convertina	0.05	6	Liga-se ao factor tecidual formando o complexo enzimático VIIa/FT/Ca que activa os factores IX e X.
VIII	Factor anti-hemofílico	0.01	12	Actua como co-factor na formação do complexo enzimático IXa/VIIIa/ fosfolípidos/Ca, que vai activar o FX.
IX	Factor Christmas	0.3	24	Actua como enzima do complexo IXa/VIIIa/fosfolípidos/Ca, que vai activar o FX.
X	Factor Stuart-Prower	1	25-60	Funciona como enzima do complexo pró-trombinase que activa a pró-trombina.
XI	Percursor da tromboplastina	0.5	40-80	Activa o FIX tendo como único co-factor o ião Ca. Circula complexado com o “ <i>High Molecular Weight Kininogen</i> ” (HMWK).
XII	Factor de Hageman	3	50-70	Activa a pré-caliceína e o FIX nas reacções de activação por contacto
XIII	Estabilizador da fibrina	1-2	150	Catalisa a formação de ligações peptídicas entre moléculas de fibrina, estabilizando o coágulo

Tabela 1: Descrição dos factores da Coagulação. [1]

Estes factores são os agentes responsáveis pela activação da cascata de coagulação. No esquema a seguir apresentado, podemos observar o mecanismo de activação da cascata pela via extrínseca através do factor tecidual (TF) e do FVIIIa e pela via intrínseca através do FXII, da pré-caliceína e do cininogénio de alto peso molecular (HMWK). Após a activação do FX o desenvolvimento da cascata ocorre por um mecanismo único designado de via comum que culmina com a formação do coágulo de fibrina.

Além dos factores da coagulação outros agentes intervêm no processo, regulando o mecanismo.

A antitrombina é o principal regulador da trombina, por inactivação directa da mesma, inactivando ainda os factores IXa, Xa, XIa e XIIa, a plasmina e a caliceína. A actividade da antitrombina é potenciada na presença de heparina. A actividade da trombina é inibida pela acção da α 2-macroglobulina, cofactor II da heparina e α 1-antitripsina.

A proteína C é uma protease que actua como reguladora do processo de coagulação. A Proteína S serve de cofactor para as funções da proteína C activada (APC). A clivagem da Proteína C pelo complexo trombina-trombomodulina, remove o péptido de activação originando a APC. A APC tem como função clivar os factores Va e VIIIa inactivando-os, exercendo assim a sua acção anticoagulante.

No esquema apresentado podemos observar de forma integrada todo o mecanismo da cascata da coagulação, com a representação dos intervenientes da via extrínseca, da via intrínseca e da via comum (a). No círculo, observamos o processo de regulação da cascata pela acção da proteína C. O factor Va é um heterodímero constituído por uma cadeia leve (A3-C1-C2) e outra pesada (A1-A2), unidas por um único ião Ca^{2+} . A subunidade C2 liga-se com grande afinidade aos fosfolípidos carregados negativamente sobre a superfície celular (b). O factor Va é rapidamente inactivado por clivagem, pela APC em três locais distintos da cadeia pesada, Arg^{306} , Arg^{506} e Arg^{679} nomeadamente. A clivagem nos três locais é distinta, verificando-se uma clivagem rápida sobre o resíduo Arg^{506} , sendo esta necessária para uma exposição óptima dos outros locais de clivagem. A clivagem junto a Arg^{306} é lenta, membrana dependente, aumentada pela Proteína S e necessária para a completa inactivação do factor Va (c). [2]

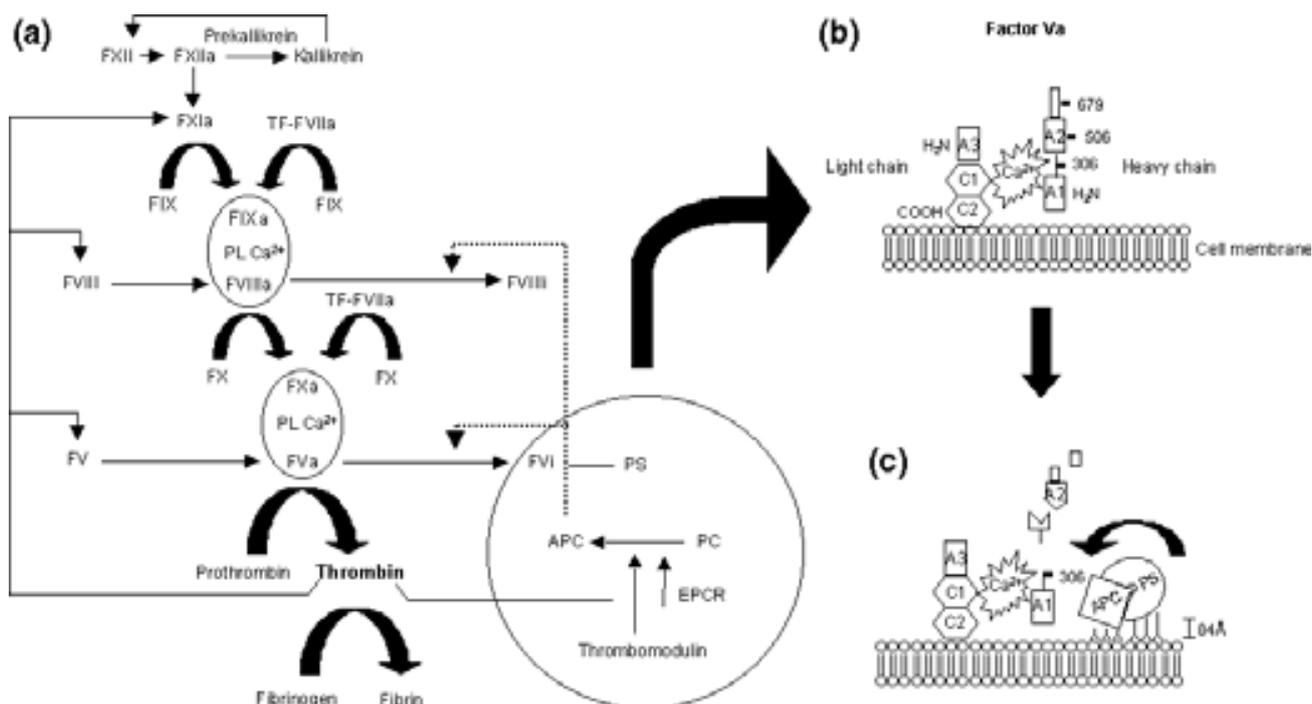


Figura 1: Esquema da cascata da coagulação (a), mecanismo de ação da APC sobre o FVa (b) e (c) [2]

O gene da Proteína C encontra-se no cromossoma 2p 13-14 e é composto por 9 exões que codificam uma proteína composta por 419 aminoácidos. A proteína C sofre uma série de modificações pós-translacionais que incluem diversos locais de N-linked glicosilações e carboxilação de 9 resíduos glutamina (gla resíduos) na zona N-terminal. [3]

O factor V é uma proteína lábil que circula no plasma como uma molécula de cadeia simples, com uma semivida de aproximadamente 12 horas. O gene que codifica para o factor V (F5) encontra-se no cromossoma 1q 24.2 e é composto por 25 exões.

O factor V activado actua como uma proteína essencial na cascata da coagulação e participa como cofactor da conversão da protrombina em trombina pelo factor Xa. Como já foi referido o FV é inativado pela PCA. A proteína do FV é composta por 2224 aminoácidos, que integram três domínios A e dois domínios C.

Em 1994, Bertina et al. identificou uma mutação heterozigótica R506Q, no gene F5 que codifica para o factor V. Esta variante foi designada como factor V de Leiden em homenagem á cidade Holandesa onde Bertina et al. descobriu a mutação.

Uma mutação pontual no nucleótido 1691 do gene F5, resulta na substituição de uma molécula de Glutamina por uma de Arginina no resíduo 506 (R506Q), um dos três locais de clivagem pela proteína C activada (R306, R506, R679). A clivagem inicial da APC ao nível do resíduo R506 é necessária para uma exposição óptima e subsequentemente uma rápida inactivação

do factor V, pela clivagem nos outros resíduos R306 e R679. [5] Uma manifestação clínica comum, designada de resistência à APC pode observar-se quando esta mutação ocorre, originando uma menor susceptibilidade do FVa à acção da APC. A clivagem do resíduo de Arginina na posição 506 por si só, não inactiva o Fva, mas diminui a velocidade a que ocorrem as clivagens ao nível dos resíduos Arg³⁰⁶ e Arg⁶⁷⁹.

As mutações que resultam na ausência ou disfunção do FVa levam a doenças hemorrágicas, enquanto mutações que resultam num aumento da longevidade do FVa estão associadas a fenómenos trombóticos. [4]

MÉTODOS

Para a realização desta revisão de conjunto foram utilizadas fontes de informação primária, secundária e terciária. A pesquisa foi realizada com recurso à Internet, através de motores de busca: <http://www.google.com>; *sites* de revistas e sociedades científicas como <http://www.ncbi.nih.gov/>; <http://www.pubmed.com> , <http://www.sciencedirect.com/>.

Os critérios utilizados para seleção das fontes passam pela sua relevância relativamente ao tema abordado neste trabalho. Neste sentido a pesquisa efectuada dirigiu-se a artigos relacionados com a mutação do factor V de Leiden e o seu contributo enquanto factor genético de risco trombótico. Foram ainda pesquisados métodos utilizados e comparação entre os mesmos, para determinar o FVL.

Foi considerada a credibilidade das fontes e a data de realização dos respectivos trabalhos com preferência dada aos artigos mais recentes.

DESENVOLVIMENTO

1. Introdução ao risco trombótico, com especial ênfase nos biomarcadores:

Ao longo dos anos o termo Trombofilia referiu-se a desordens da hemóstase que provavelmente predisõem para ocorrência de trombozes. Mais recentemente é definido como uma tendência para o desenvolvimento de trombose, em consequência de factores de predisposição que podem ser geneticamente determinados, adquiridos ou ambos. A definição mais recente, inclui situações que aparentemente não estão diretamente relacionadas com o sistema hemostático (ex: homocisteinémia).

A trombofilia refere-se então a uma condição adquirida ou herdada, que predis põe ao desenvolvimento de trombozes. As alterações do fluxo sanguíneo e hipercoaguabilidade são os principais factores fisiopatológicos da trombose. Os fenómenos trombóticos podem ser variados, sendo o tromboembolismo venoso (VTE) um dos mais comuns.

Existem várias condições congénitas ou adquiridas associadas ao VTE. De entre os factores congénitos podemos referir a deficiência em Antitrombina (AT), deficiência em proteína C ou S, a Disfibrinogénia, a Hiperhomocisteinémia atribuída a deficiências congénitas de CBS (*cystathionine- β -synthase*), MS (*methionine synthase*) ou MTHFR (*methylenetetrahydrofolate reductase*), a mutação no gene da protrombina G20210A, ou ainda o Factor V de Leiden. Destas condições a deficiência em AT é a mais severa, a deficiência em PC/PS apresenta severidade intermédia e a resistência à APC é a menos severa.

De entre os factores adquiridos podemos referir os Anticorpos anti-fosfolípidos, a Hiperhomocisteinémia atribuída a carências vitamínicas, resistência à APC não devida a mutações genéticas, ou Factor VIII aumentado. O síndrome associado aos anticorpos anti-fosfolípidos é caracterizado pela repetida positividade do teste do anticoagulante lúpico e/ou presença de anticorpos anti-fosfolípidos determinados em fase-sólida, por trombocitopenia e perda de feto. A Hiperhomocisteinémia pode ser provocada por deficiência congénita das enzimas envolvidas no seu metabolismo, ou pode ser atribuída a uma dieta pobre em vitaminas que actuam como cofactores (ácido fólico e vitamina B12). Nesta situação, é facilmente tratada com suplementos alimentares. Sendo a Hiperhomocisteinémia um importante factor de risco, torna-se interessante em termos laboratoriais como biomarcador.

A principal manifestação clínica do FV de Leiden é o tromboembolismo venoso (VTE). A ocorrência de VTE pode ser expressa de diferentes formas, sendo a trombose venosa profunda

(DVT) nos membros inferiores a mais comum. A trombose venosa superficial também pode ocorrer, sendo a complicação mais comum reportada em indivíduos homozigóticos para FV de Leiden. Os VTE podem ainda manifestar-se por trombozes em locais incomuns ou por embolismo pulmonar, mas com menor frequência. [5]

Para investigar o risco trombótico de um indivíduo é natural que se inclua na investigação laboratorial diversos testes funcionais e de determinação de biomarcadores.

Episódios tromboembólicos agudos com ou sem terapêutica concomitante, podem influenciar a investigação laboratorial, excepto para análises em DNA. Por este motivo, os testes funcionais com plasma devem ser realizados pelo menos 6 meses após o episódio agudo. A terapia anticoagulante oral para prevenção de tromboembolismos, afecta os resultados dos testes da PC, PS, resistência à APC, sendo por isto preferível efectuar estas avaliações pelo menos duas semanas após o termo da terapêutica. [6]

A determinação de AT por técnicas Ag-Ac não é adequada para a triagem dos doentes porque não identifica os casos de deficiência em AT devidas a alterações funcionais, que normalmente apresentam concentrações normais de AT, mas com actividade reduzida. As determinações funcionais devem basear-se na utilização da heparina como cofactor de actividade. A actividade da AT é determinada através da trombina ou factor Xa como enzimas alvo. A utilização da heparina como cofactor é a adequada porque permite identificação de todos os casos de deficiência em AT com relevância clínica. O factor Xa parece mais adequado que a trombina para enzima alvo, porque permite melhor discriminação entre portadores e não portadores da deficiência, não sendo afectado pela presença plasmática de outros inibidores da trombina (ex: protrombina).

A determinação de proteína C baseia-se na actividade anticoagulante da APC, exercida sobre os seus substratos naturais o factor VIIIa e Va. O teste exige activação plasmática da proteína C, que se consegue pela trombina, pelo complexo trombina-trombomodulina ou com veneno de cobra. A utilização do veneno de cobra é recomendável porque ao contrário dos activadores que mimetizam as condições fisiológicas, este não é afectado por outras condições como a resistência à APC ou níveis aumentados de FVIII.

O teste de Resistência á APC é baseado numa análise funcional do efeito anticoagulante, no plasma do paciente, após a adição de APC exógena. Avalia-se o tempo de formação do coágulo através do aPTT, na presença e na ausência de APC. Os dois resultados são expressos sob a forma de rácio (aPTT+APC/ aPTT-APC). O fenótipo de resistência à APC é caracterizado pelo prolongamento mínimo do tempo de aPTT em resposta à APC, caracterizado por uma razão baixa. Para realização do teste utiliza-se plasma deficiente em APC, sendo o mais comum e exacto o teste de veneno da

víboras Russel. O teste primário sofreu modificações, verificando-se que no de segunda geração o plasma do indivíduo é inicialmente diluído (1:4) com plasma deficiente em FV contendo polibreno, um neutralizador da heparina. A adição de plasma deficiente em FV corrige possíveis deficiências de outros factores ou proteínas, aumentando a sensibilidade e especificidade, conseguindo bons resultados mesmo em doentes a fazer terapia anticoagulante ou portadores de anticoagulante lúpico. Devido aos falsos positivos para FV de Leiden que se detectam com a avaliação da resistência à APC, esta análise constitui-se como um teste de rastreio que carece confirmação por técnicas moleculares para diagnosticar a presença de FV de Leiden. [7]

Mais uma vez as determinações funcionais são a melhor opção para determinação da PS, uma vez que deficiências por diminuição de função podem ocorrer em doentes trombofílicos. Os testes baseiam-se na actividade de cofactor da PS sobre a APC, tornando-os poucos específicos porque são muito afectados pela resistência à APC. Nesta situação é razoável considerar-se a determinação antigénica como uma alternativa. A PS encontra-se distribuída no plasma de forma específica, estando 60% complexada com a proteína de ligação C4b e 40% encontra-se livre e activada para actuar como cofactor da APC. Nos testes de ELISA a forma livre e complexada reagem de forma distinta com os Ac's anti-PS. Como na avaliação do risco trombótico o que interessa é avaliar a forma livre, deve-se proceder a um pré tratamento da amostra para separar a PS livre da complexada antes de promover a reacção, ou utilizar um Ac monoclonal capaz de diferenciar apenas a forma livre. A utilização de polietileno glicol permite a precipitação da forma complexada, deixando-a livre no sobrenadante.

A determinação da hiperprotrombinémia tem sido associada á presença da mutação G20210A no gene da protrombina.

A disfibrinogénia é avaliada por determinação do tempo de trombina ou de reptilase. Os casos positivos deverão ser confirmados por ensaios paralelos de determinação funcional e imunológica do fibrinogénio.

O diagnóstico laboratorial de Síndrome anti-fosfolipídica é complicado devido á falta de especificidade dos testes disponíveis e da heterogeneidade dos Ac. Os dois principais anticorpos anti-fosfolípidos são o anticoagulante lúpico e o anti-cardiolipina. O termo anticoagulante lúpico refere-se a um grupo heterogéneo de auto-anticorpos que reagem com complexos fosfolípidos-proteína. Prolongam a coagulação "in vitro" dos testes que utilizam uma quantidade limitante de fosfolípidos para formar o coágulo. Os anticorpos anti-cardiolipina reagem contra a cardiolipina, que é um fosfolípido mitocondrial usado no teste do V.D.R.L. (Venereal Laboratory Research Laboratory) para o diagnóstico de Sífilis, mas não ocasionam o prolongamento dos testes de coagulação. Os

pacientes trombofilicos devem ser avaliados por testes dependentes dos fosfolípidos para detectar Anticoagulante Lúpico e por testes em fase sólida de ELISA para detectar Ac anti-Cardiolipina (aCL). Os resultados positivos devem ainda ser repetidos passado algum tempo, para confirmar que não se trata de uma situação passageira.

A determinação da Homocisteína é feita por métodos de HPLC com detecção electroquímica ou fluorimétrica, ou por métodos imunológicos.

A determinação do FVIII pode ser feita por métodos funcionais ou imunológicos. A actividade pode ser medida por determinação do aPTT com plasmas deficientes em FVIII.[8]

Vários estudos associam a presença de D-Dímeros com fenómenos de DVT ou EP, sendo reportada uma sensibilidade na determinação de D-Dímeros para diagnóstico de DVT de 96-98%. Em estudos de comparação de métodos para determinar D-Dímeros, conclui-se que a técnica de ELISA ou teste rápido de ELISA quantitativo demonstram resultados clinicamente mais uteis. Foram reportadas sensibilidades de 96% para DVT e de 95% para EP, levando os autores a confirmar que um resultado negativo para D-Dímeros pode com segurança excluir um diagnóstico de trombose venosa. A determinação dos níveis de D-Dímeros tem sido investigada também enquanto indicador de duração de terapêutica inicial, em pacientes com eventos tromboembólicos.

A P-Selectina (GMP-140) é uma glicoproteína de adesão presente nos grânulos α das plaquetas e em células endoteliais responsáveis pela iniciação do rolamento dos leucócitos, estando envolvida no processo de inflamação da parede venosa. A exposição a um estímulo activador como a trombina ou histamina resultam na deslocação da P-Selectina para a superfície das plaquetas e células endoteliais numa forma receptiva ao ligando. A P-Selectina glicoproteína de ligação 1 (PSGL-1) é uma mucina homodimerica encontrada na maioria dos leucócitos e em algumas plaquetas. A ligação da P-Selectina à PSGL-1 inicia uma cascata que envolve fosforilação da tirosina, activação da MAP Kinase (*mitogen activated protein kinase*) e actividade de ligação da $\alpha_m B_2$. Esta sinalização medeia as interacções leucócitos-células endoteliais, leucócitos-plaquetas, leucócitos-leucócitos e em menor grau plaquetas-células endoteliais. Quando *in vivo* a P-Selectina transmembranar é redistribuída na superfície das células endoteliais activadas, mediando o rolamento dos leucócitos e iniciando a cascata inflamatória. Durante a trombose, a P-Selectina expressa nas plaquetas activadas do trombo, suporta o recrutamento dos leucócitos. Em modelos animais de trombooses, a expressão da P-Selectina demonstrou também regular a deposição da fibrina e o tamanho do trombo. Vários estudos demonstram níveis elevados de P-Selectina em pacientes com DVT. [8]

Rectenwald et al. mediram os níveis de P-Selectina em 21 pacientes com DVT e compararam os resultados com 30 controlos saudáveis, notando que os seus pacientes apresentaram níveis elevados com média de 88,7 ng/ml comparativamente à média do controlo 22,1 ng/ml. [9]

Num outro estudo também com pacientes com DVT, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de P-Selectina após sete dias de terapêutica com heparina. [10]

Jilma et al. demonstraram que um genótipo homozigótico para o SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) Ser128Arg no gene da E-Selectina em humanos, pode estar associada a fenómenos de VTE recorrentes. [11]

As micropartículas são pequenos fragmentos de fosfolípidos das membranas celulares de plaquetas, leucócitos ou células endoteliais, com dimensões inferiores a 1micra e que circulam no plasma de indivíduos saudáveis. Estas micropartículas são ricas em factor tecidual, fosfatidilserina e PSGL-1, facilitando e amplificando o processo de coagulação quando recrutadas para um trombo em desenvolvimento. Níveis elevados de micropartículas em circulação estão associados a vários processos vasculares, inflamatórios e de coagulação patológicos. [8]

Estudos recentes suportam a ideia de que os vários biomarcadores disponíveis podem auxiliar o diagnóstico e poderão ainda servir de orientação na terapêutica após VTE, pela identificação de pacientes com alto risco de recorrência, que poderão beneficiar de terapêuticas mais prolongadas com anticoagulantes. [8]

2. Interesse clínico e epidemiológico:

Os testes laboratoriais, em geral, devem ser efectuados sempre que os seus resultados possam influenciar decisões sobre terapêutica ou prevenção. No caso da avaliação de risco trombótico, é mais provável que os resultados laboratoriais possam influenciar decisões relativas a prevenção de trombooses recorrentes, podendo ainda auxiliar o clínico na decisão da duração e intensidade do tratamento a aplicar.

As determinações plasmáticas dão resultados fenotípicos, enquanto os testes com DNA dão informações genotípicas. As determinações fenotípicas são geralmente mais fáceis de executar e empregam equipamentos mais simples, no entanto são difíceis de standardizar e os resultados sofrem mais interferências. As determinações genotípicas dão resultados inequívocos, no entanto não se pode ignorar a variação e discrepância entre laboratórios e metodologias aplicadas. Uma desvantagem adicional dos testes genotípicos é o facto de algumas condições trombofilicas,

(deficiências de AT, PC e PS) poderem ser devidas não a uma mas a várias mutações distintas, tornando assim as pesquisas mais complexas.

A avaliação do risco trombótico pode ser importante para familiares em 1º grau de indivíduos portadores de defeitos genéticos, mesmo sendo assintomáticos. A estes indivíduos pode ser fornecida profilaxia primária quando expostos a situações de risco como cirurgia, gravidez, imobilização. A realização dos testes laboratoriais pode ainda identificar indivíduos portadores de alterações genéticas combinados. Apesar de não ser frequente, a combinação de condições trombofílicas não é muito rara se considerarmos a frequência de mutações como o FV de Leiden e da protrombina em determinados grupos étnicos, como a população caucasiana. Indivíduos com defeitos genéticos combinados na PC ou PS com FV de Leiden apresentam maior risco de tromboembolismo do que indivíduos com qualquer dos defeitos isolados. Sabe-se ainda que a combinação de deficiência na AT com FV de Leiden está associada à ocorrência de tromboembolismo em idades mais jovens, do que nos indivíduos apenas com deficiência em AT. Considerando os factores de risco adquiridos, sabe-se que a Hiperhomocisteinémia moderada, pode aumentar consideravelmente o risco de tromboembolismo em indivíduos com a mutação do FV de Leiden. [6]

Considerando os diversos factos relatados, será de prever que para maximizar a efectividade do rastreio laboratorial para avaliação do risco trombótico, deverão ser testados os diversos marcadores referidos.

Considerando que testes de rastreio para doentes trombofílicos são executados em pacientes com historial de VTE, principalmente se forem jovens com episódios recorrentes ou se tiverem parentes em 1º grau positivos para algum dos factores de risco, interessa ainda avaliar se a identificação de um resultado positivo vai interferir na manutenção clínica do doente.

Os episódios de VTE têm tendência para ser recorrentes, com uma incidência cumulativa de ocorrência de um 2º episódio de aproximadamente 30% em 8 anos. Saber se a presença de uma condição trombofílica pode prever a recorrência de fenómenos trombóticos, é algo ainda pouco claro apesar dos diversos estudos feitos neste sentido. Os testes efectuados devem conduzir a uma estratégia predefinida que evite a recorrência, garantindo ganhos ou melhorias na manutenção clínica dos doentes. Segundo Saskia Middeldorp [12], não se observaram benefícios reais e práticos sobre o risco de recorrência de VTE, em pacientes que foram testados para condições trombofílicas. De um modo geral, após um 1º episódio de VTE é aplicada uma terapia anticoagulante durante 3 a 6 meses, sendo este o período de tempo que apresenta um melhor balanço entre o risco trombótico e o risco hemorrágico. Enquanto não se realizarem ensaios clínicos que comparem o tratamento de rotina com

o tratamento prolongado de doentes com condições trombofílicas positivas, não se pode justificar a terapêutica prolongada uma vez que esta pode ser mais prejudicial que benéfica.

Quando se pondera a realização de rastreio laboratorial, com a aplicação de métodos moleculares, é necessário ter em atenção a falsa segurança que pode resultar de um resultado negativo. Da mesma forma, devem ser avaliadas as implicações sociais que podem advir de um resultado positivo. [12]

Segundo as indicações da American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing, a pesquisa deve ser efectuada pelo menos nas seguintes situações:

- Idade < 50 anos, com qualquer episódio de trombose venosa;
- Trombose venosa em locais pouco usuais (veias hepáticas, mesentéricas ou cerebrais);
- Trombose venosa recorrente;
- Trombose venosa associada a historial familiar de trombozes;
- Trombose venosa em grávidas ou mulheres a tomar contraceptivos orais;
- Familiares de indivíduos com trombose venosa antes dos 50 anos;
- Enfarto do miocárdio em mulheres fumadoras com menos de 50 anos.

A realização da pesquisa pode ainda ser considerada nas seguintes situações:

- Trombose venosa depois dos 50 anos, excepto quando existe doença maligna activa;
- Familiares de indivíduos que se sabe serem portadores de FV de Leiden. Saber se se é portador ou não da mutação pode influenciar a manutenção de uma gravidez, ou ser um factor de decisão sobre utilização de contraceptivos orais;
- Mulheres com sucessivas perdas de gravidez ou preeclampsia severa inexplicada, ruptura da placenta, retardamento do crescimento fetal intrauterino. Nestas situações o conhecimento sobre a presença da mutação pode influenciar a manutenção de novas tentativas de gravidez.

O rastreio indiscriminado sobre a população geral não é recomendado. [13]

3. Identificação e estratificação do risco:

A prevalência de qualquer das condições clínicas associadas ao risco trombótico, não é suficiente para justificar o rastreio da população em geral, podendo considerar-se a mutação da protrombina e do FV de Leiden na população caucasiana uma excepção. A avaliação laboratorial deve ser efectuada em indivíduos com historial de tromboembolismos não explicado. Esta

investigação pode ser estendida a familiares em 1º grau dos indivíduos com deficiências identificadas.

A prevalência da mutação FV de Leiden varia entre a população. Portadores heterozigóticos para o FV de Leiden ocorrem em 3%-8% nas populações europeias, sendo a maior prevalência para os caucasianos. A mutação é extremamente rara na população asiática, africana e australianos indígenas. Dentro da Europa a prevalência varia de 10%-15% no Sul da Suécia e Grécia e 2%-3% na Itália e Espanha. Nos EUA as prevalências observadas correlacionam-se com a distribuição mundial da mutação, sendo de 5,2% nos americanos de origem europeia, 2,2% nos americanos hispânicos, 1,2% americanos africanos, 0,45% nos americanos asiáticos e de 1,25% nos americanos nativos. A frequência de homozigóticos para o FV de Leiden é de aproximadamente 1:5000.

A mutação encontra-se presente em aproximadamente 15%-20% dos indivíduos com um primeiro episódio de DVT e em mais de 50% dos indivíduos com tromboembolismo venoso recorrente ou tromboes associadas a estrogénios. [13]

Portadores heterozigóticos do FV de Leiden apresentam um risco 5 a 7 vezes superior de ocorrência de primeiro evento de trombose venosa, comparativamente com os não portadores. Para os portadores homozigóticos o risco é aumentado em 80 vezes.

Segundo a meta análise de Wai Khoon Ho et. al [14], o Odds Ratio (OR) de recorrência nos portadores heterozigóticos para a mutação FV de Leiden após um primeiro evento de VTE é de 1,41 (95% CI, 1,14-1,75). Na figura 2 está representado o risco de recorrência de VTE em portadores de FV de Leiden versus ausência de FV de Leiden para as revisões incluídas no estudo. Os resultados são apresentados como nº de pacientes com recorrência de VTE/ nº de pacientes com primeiro episódio de VTE. Entre os pacientes com primeiro episódio de VTE, a estimativa de risco de recorrência atribuído a portadores heterozigóticos de FV de Leiden é de 9,0% (95% CI, 4,5%-13,2%).

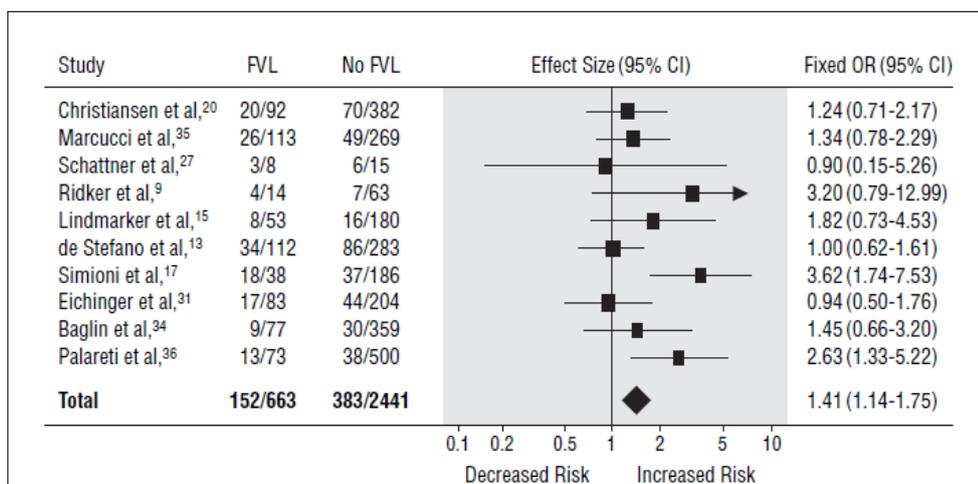


Figura 2: Comparação do risco de recorrência de VTE em portadores heterozigóticos de FVL e não portadores, em vários estudos de revisão. [10]

Os resultados obtidos com Wai Khoon Ho et al., para a associação entre o FVL e a OR para recorrência de VTE, são consistentes com outras metas análises. Marchetti et al. [15] reporta um OR de recorrência de 1.36 (95% CI, 1,05-1,78) entre pacientes heterozigóticos, baseando-se no resultado de 6 estudos que envolveram 1721 doentes. Vink et al. [16] reporta um OR de recorrência de 1,3 (95% CI, 1,0-1,7) baseado em 7 estudos que envolveram 1984 pacientes.

Segundo a meta análise de Wai Khoon Ho et al., o OR de recorrência nos portadores heterozigóticos para a mutação da protrombina G20210A após um primeiro evento de VTE é de 1,72 (95% CI, 1,27-2,31). Na figura 3 podemos ver os estudos contemplados na meta análise, com os resultados individuais e a média global. Está representado o risco de recorrência de VTE em portadores de protrombina G20210A versus ausência de protrombina G20210A para as revisões incluídas. Os resultados são apresentados como nº de pacientes com recorrência de VTE/ nº de pacientes com primeiro episódio de VTE. Entre os pacientes com primeiro episódio de VTE, a estimativa de risco de recorrência atribuído a portadores de protrombina G20210A é de 6,7% (95% CI, 3,4%-9,9%).

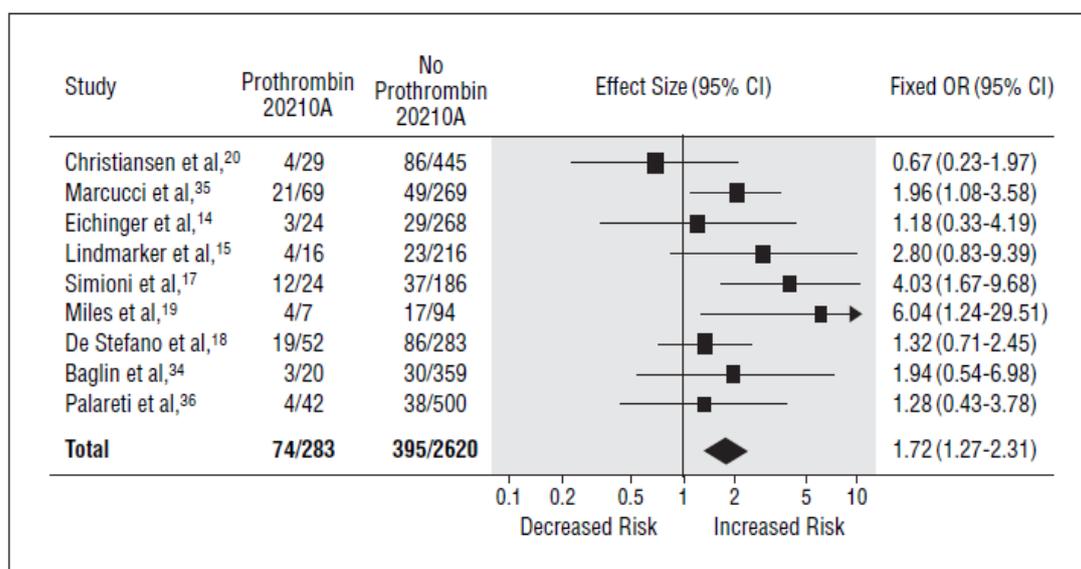


Figura 3: Comparação do risco de recorrência de VTE em portadores heterozigóticos de Protrombina G20210A e não portadores, em vários estudos de revisão. [14]

As implicações clínicas associadas ao estudo apresentado, indicam que os pacientes com episódios recorrentes de VTE apresentam maior probabilidade de serem portadores heterozigóticos de FVL ou protrombina G20210A, do que os não recorrentes, sendo a magnitude do aumento de risco associado baixa. Desta forma, na ausência de outros factores de risco, a presença de heterozigotia para FVL ou protrombina G20210A isoladas, não são justificativas para prolongamento de terapêuticas anticoagulantes. [14]

Segundo a meta análise de O Wu et al. [17] , os resultados mostram fortes associações entre o uso de anticoncepcionais orais e trombofilia (condições isoladas ou combinadas) e VTE. A OR entre o uso de anticoncepcionais e o risco de VTE varia entre 1,32 e 4,9.

O uso de terapêutica hormonal de substituição é associado a um aumento de três vezes no risco de ocorrência de VTE, OR 3,16 (95% CI 1,90-5,23). Um efeito semelhante foi observado na presença de FV de Leiden, OR 3,58 (95% CI 1,43-8,97). Pacientes com ambos os factores de risco apresentam uma maior probabilidade de ocorrência de VTE, com OR 13,16 (95% CI 4,28-40,47).

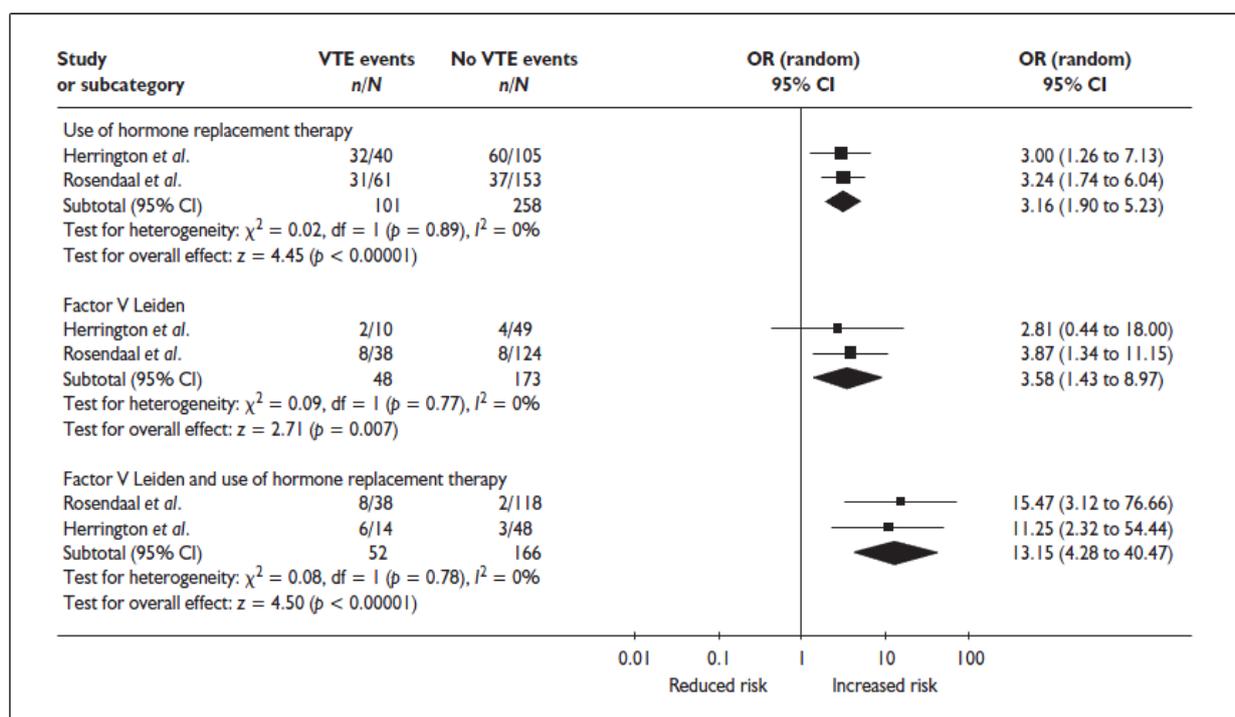


Figura 4: Razão entre o risco de recorrência de VTE em portadoras de FVL, com e sem o uso de terapêutica hormonal de substituição. [17]

Foi observada uma forte associação entre VTE durante a gravidez e a presença de FV de Leiden. Para as portadoras homocigóticas o OR encontrado foi de 34,40 (95% CI 9,86-120,05). As portadoras heterocigóticas apresentam menor risco, com um OR 8,32. O risco de VTE durante a gravidez pode encontrar-se aumentado quando associado a outras trombofilias hereditárias. Portadoras heterocigóticas para a protrombina G20210A apresentam OR 6,8, com deficiência em proteína C apresentam OR 4,76, com deficiência em antitrombina apresentam um OR 4,69 e com deficiência em proteína S apresentam um OR 3,19.

As grávidas portadoras de FV de Leiden apresentam maior risco de perda fetal durante o segundo trimestre, comparativamente ao risco durante o primeiro trimestre, com OR 4,12 e 1,91 respectivamente. Mulheres com deficiência em proteína S são as que apresentam maior risco de

perda fetal, segundo um estudo com n=816 que obteve um OR de 20,09. O risco de ocorrência de preeclampsia apresenta maiores probabilidades em grávidas com Hiperhomocisteinémia do que com outras condições trombofílicas, ainda assim o risco para portadoras homozigóticas de FV de Leiden apresenta um OR de 1,87 e nas heterozigóticas um OR de 2,34.

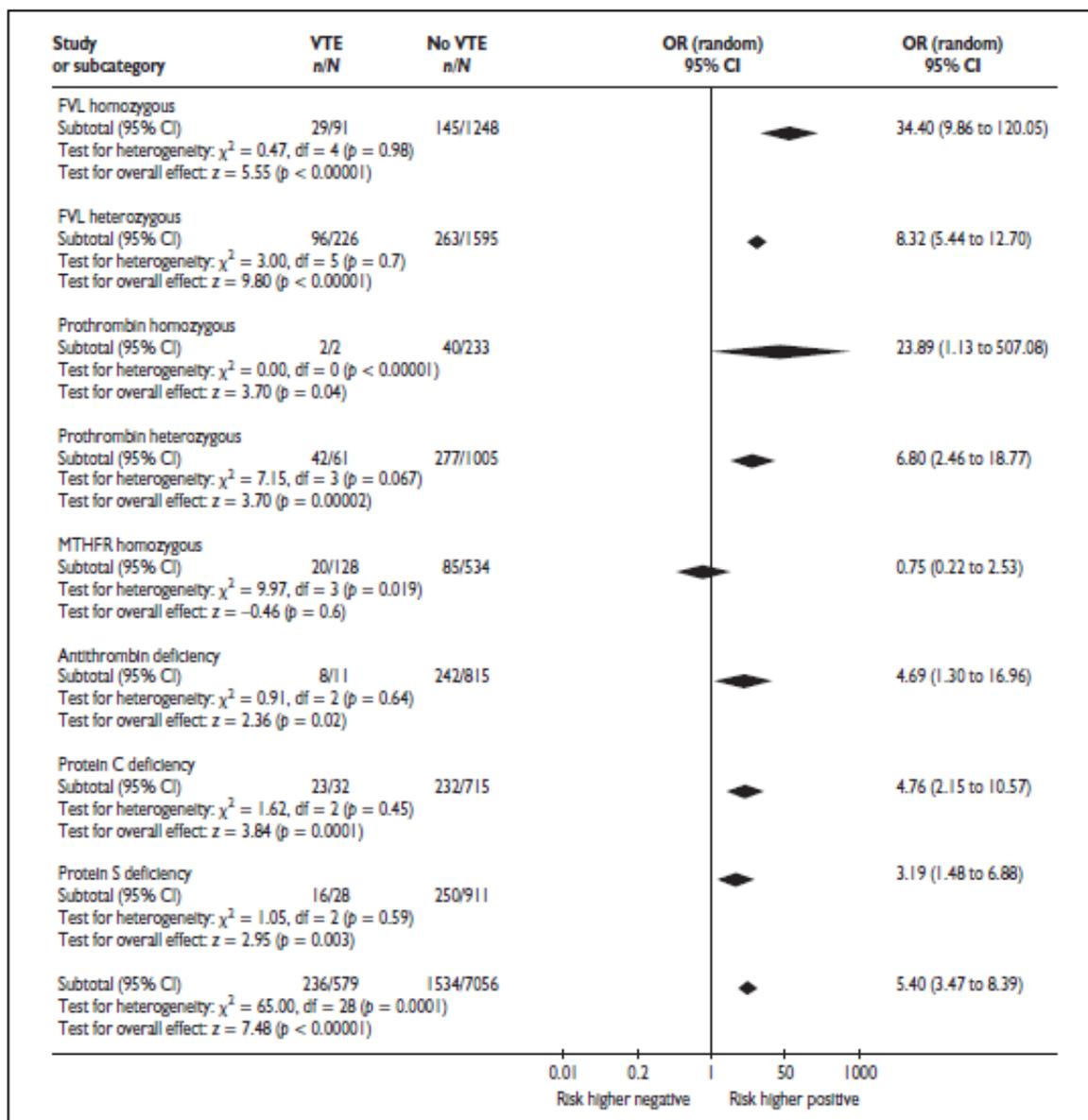


Figura 5: Razão entre trombofilias selecionadas e o risco de recorrência de VTE durante a gravidez. [17]

As grandes variações observadas nos resultados dos estudos considerados para a meta análise, podem ser provocadas pela utilização de diferentes critérios de inclusão de cada estudo.

Nos EUA, aproximadamente 5,1%, 2,0% e 1,2% da população caucasiana não hispânica, caucasiana hispânica e afroamericana são heterozigóticas para o FV de Leiden, respectivamente. As frequências para os correspondentes homozigóticos são muito inferiores, nomeadamente 65, 10 e 4

por cada 100.000 indivíduos. A mutação FVL encontra-se presente em 15-20% dos indivíduos com um primeiro episódio de VTE, tornando-a o factor de risco trombótico hereditário mais comum. Estudos populacionais sugerem que uma mutação heterozigótica de FVL aumenta o risco de primeiro episódio de VTE em 4 a 7 vezes, enquanto a homozigotia aumenta o risco entre 9 a 80 vezes. Um estudo retrospectivo recente, envolvendo sujeitos que eram familiares em 1º grau de pacientes com DVT, PE ou trombose arterial antes dos 50 anos, conclui que a incidência da DVT é de 0,41% (95% IC, 0,28-0,58) entre portadores e de 0,19% (95% IC, 0,16-0,23) entre não portadores, para um risco relativo de 2.1 (95% IC, 1,40-3,2). Quando outros factores de risco trombofilicos herdados são excluídos da análise, o risco relativo para DVT aumenta para 7,0% (95% IC, 2,3-21,7) entre portadores de FVL. A mutação G20210A da Protrombina é o segundo factor de risco herdado mais comum. Na população em geral, indivíduos com ambas as mutações (heterozigóticos) ocorrem numa frequência de 22 por cada 100.000. Nestes indivíduos observa-se um aumento de 30 vezes no risco de ocorrência de um primeiro episódio de VTE. Entre pacientes com VTE que são heterozigóticos para o FVL, 12% apresenta também heterozigotia para a mutação da PT. As evidências indicam que a prevalência da mutação FVL é maior em pacientes com DVT não complicada do que em pacientes com PE. Em contraste, a frequência da mutação PT em indivíduos com DVT não complicada, não é diferente da observada em doentes com PE. [18]

Segundo um estudo (Study 1) apresentado nas Recomendações da EGAPP Working Group, em doentes com VTE, o efeito protector da toma de warfarina não varia em função do status genético do paciente relativamente á mutação do FVL ou PT G20210A. [18]

4. Os principais biomarcadores, mutações associadas como a da protrombina e do gene MTHFR:

Já foram referidos neste trabalho, quais os parâmetros a avaliar no screening da função hemostática do paciente. No entanto, quando se avaliam os estudos com dados estatísticos sobre o risco de ocorrência de VTE observa-se uma forte associação do FV Leiden a outras alterações genéticas, designadamente mutações associadas à protrombina e ao gene MTHFR.

A mutação no gene da Protrombina é a segunda mais frequente condição de risco herdada, associada a ocorrência de trombose. A mutação pontual consiste na substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 20210 (G20210A), localizada na último nucleótido da região 3' não traduzida do cDNA, justamente antes do local de fixação da cauda poli A. Esta alteração aumenta a estabilidade do RNA mensageiro, resultando no aumento da concentração da proteína produzida. A

mutação está associada a um aumento de aproximadamente 30% nos níveis de protrombina em indivíduos heterozigóticos e de 70% nos homozigóticos. A função proteica não fica comprometida, verificando-se apenas o aumento das concentrações da proteína.

O gene da protrombina codifica para uma proteína com 622 resíduos, com peso molecular de 70kD. A forma madura em circulação apresenta 579 resíduos. A proteína é constituída por 5 domínios, o propeptido (resíduos -43 a -1), domínio Gla (resíduo 1 a 40), domínio kringle (resíduo 41 a 155), domínio kringle-2 (resíduo 156 a 271) e um domínio serina protease (resíduo 272 a 579). A protrombina sofre diversas clivagens para originar a forma activa, composta por uma cadeia leve e outra pesada, ligadas de forma covalente por uma ponte dissulfito.

O trabalho de Gohil et al. [19], conduziu uma meta análise sistemática sobre vários genes candidatos, para estimar a sua contribuição na etiologia de VTE. Foram incluídos 21 genes como candidatos de interesse, com 28 polimorfismos a serem avaliados. Desta avaliação foram identificadas associações estatisticamente significativas com ocorrência de VTE para os polimorfismos FVL G1691A, FV A4070G, Protrombina G20210A, Protrombina G11991A, PAI-1 4G/5G, α -fibrinogénio Thr312Ala na população caucasiana, MTHFR C677T na população Chinesa/Tailandesa e ACE I/D na população Afro-Americana. O polimorfismo FXIII Val34Leu e β -fibrinogénio G455A demonstraram efeitos protectores. [19]

O gene que codifica para a enzima metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR), envolvida na metabolização da Homocisteína (Hcy), apresenta grande interesse na prática clínica. A Homocisteína é um aminoácido que deriva do catabolismo proteico, estando presente no plasma sob diversas formas, encontrando-se 70% ligada à albumina. Níveis elevados de Hcy (Hiperhomocisteinémia) têm sido identificados como factor de risco para aterosclerose. A concentração sérica de Hcy está aumentada em 40% dos pacientes com doenças arteriais, enquanto nos grupos controlo apenas 15% dos indivíduos apresentam os seus valores aumentados. O mecanismo para ocorrência de lesão vascular associada à Hiperhomocisteinémia continua a ser uma incógnita. Evidências experimentais sugerem que a Hcy pode estar envolvida na aterogénese e trombogénese levando a uma hiperplasia do tecido celular e fibrótico. Adicionalmente, facilita o processo oxidativo vascular, alerta o sistema de coagulação e reduz a regulação vasomotora do endotélio. Um aumento moderado da Hcy é geralmente associado com uma substituição citosina/timina no nucleótido 677 (C677T) no gene da MTHFR, originando uma substituição nos aminoácidos de alanina por valina. Esta alteração é associada a uma fragilidade térmica que causa uma redução de 50% na actividade normal da enzima MTHFR. [20]

A glicoproteína serina protease Inibidor-1 Activador Plasminogénio (PAI) constitui um elemento chave na inibição da fibrinólise. O principal papel da PAI-1 *in vivo* é a inibição rápida do activador tecidual e uroquinase do plasminogénio. A PAI-1 é também uma das proteínas de fase aguda que caracterizam o processo inflamatório. Os níveis plasmáticos da PAI-1 são influenciados por factores genéticos, metabólicos, endócrinos, dietéticos e de actividade física, encontrando-se aumentados em resposta à inflamação e ferimentos. O gene que codifica a PAI-1 tem vários *loci* polimórficos, de entre os quais o mais estudado é o polimorfismo 4G/5G inserção/deleção (rs1799768) contendo quatro ou cinco (4G/5G) bases guaninas na posição -675 situada na região promotora do gene humano *PAI-1* (*SERPINE1*). Ambos os alelos deste SNP podem ligar-se a um activador transcripcional, enquanto o alelo 5G se liga a uma proteína repressora num local de sobreposição. Um genótipo homozigótico para o alelo 4G torna este regulador negativo incapaz de actuar, resultando numa transcrição aumentada do gene *PAI-1*, enquanto o genótipo heterozigótico apresenta fenótipo intermédio. [21]

Um dos polimorfismos identificados no gene que codifica o fibrinogénio conduz a uma substituição de uma treonina por uma alanina no codão 312, no terminal carboxilo da fracção A α do fibrinogénio, englobando cerca de 2/3 da cadeia A α . Esta região é importante para o processo dependente do FXIII, no estabelecimento de ligações *cross-linking*. Os resíduos A α 242 a 424, que rodeiam o local do polimorfismo, promovem a dissociação das subunidades A e B do FXIII e deste modo aumentam a activação do FXIII. A localização molecular do polimorfismo Thr312Ala sugere que a substituição do aminoácido tem potencial para influenciar os mecanismos dependentes do FXIII que determinam a formação e estabilidade do coágulo, tornando-o um candidato de interesse para estudos clínicos e funcionais. [22]

O polimorfismo comum no Factor XIII, caracterizado pela substituição de G100T no exão 2 da subunidade α , resulta numa substituição do aminoácido valina por leucina na posição 34 (FXIII Val34Leu), e é associado há diminuição do risco de ocorrência de trombose venosa. Esta associação não é consensual entre os diversos estudos científicos disponíveis. O factor XIII é uma proteína tetramérica ($\alpha_2\beta_2$), activada pela trombina, que vai estabilizar o coágulo pela formação de dímeros de fibrina. A substituição Val34Leu localiza-se a três aminoácidos de distância do local de corte pela trombina. Parece associada ao aumento de activação do FXIII, conduzindo a um maior índice de dissociação, mas não afectando o *cross-linking*. A activação prematura do FXIII esgota o FXIII disponível resultando na formação de coágulos de fibrina menos estáveis e mais sujeitos á fibrinólise. Em alguns estudos a associação do polimorfismo Val34Leu com episódios de Trombose venosa é mais significativa em pacientes com elevadas concentrações de fibrinogénio. [23]

Vários estudos encontram-se em desacordo relativamente à associação inversa do polimorfismo na fracção β do fibrinogénio, Hae III ou G455A e o risco de ocorrência de trombose venosa. O polimorfismo G455A localiza-se na cadeia β , na região promotora e é associado a níveis aumentados de fibrinogénio. Este facto sugere que a variante da β -fibrinogénio possa estar relacionada com estados de hipercoagulação e trombóticos. No estudo de Cushman et al. [25] é avaliada a associação dos polimorfismos FXIII Val34Leu, β -fibrinogénio G455A e de níveis elevados de fibrinogénio, com a ocorrência de VTE e EP. O objectivo do trabalho consistia em determinar se esses polimorfismos estão associados a uma redução no risco de Trombose venosa quando outros factores de risco mais comuns estão presentes, especificamente o FVL e obesidade. Os resultados obtidos não são totalmente concordantes com as hipóteses colocadas, deixando em aberto algumas das conclusões que se podem retirar da associação destes polimorfismos com risco aumentado para ocorrência VTE ou EP. [23]

5. A abordagem laboratorial e metodológica:

Entre as causas hereditárias associadas a VTE podemos indicar a mutação do FV de Leiden, Protrombina G20210A, deficiências em anticoagulantes naturais como a antitrombina, Proteína C, proteína S. Entre as causas adquiridas podemos referir o cancro, cirurgias, quimioterapia, doenças autoimunes, a toma de contraceptivos orais e terapia hormonal de substituição.

A avaliação laboratorial normalmente envolve testes para resistência à APC com confirmação de resultados positivos por determinação do FV de Leiden, determinação de Protrombina, de antitrombina, deficiência em Proteína C, Proteína S, anticoagulante lúpico, Ac anti-cardiolipina e determinação do FVIII. As determinações são habitualmente efectuadas depois do diagnóstico de VTE, particularmente se ocorrer em idade jovem, se a trombose ocorrer em local pouco usual, se for recorrente, ou se ocorrer numa mulher grávida.

Na maioria dos pacientes com VTE, incluindo mais de metade daqueles que apresentam predisposição genética, uma combinação de factores de risco trombótico estão presentes. Estes têm tendência para actuar de forma sinérgica. Por razões ainda não esclarecidas, o FV de Leiden e a mutação G20210A da Protrombina são simultaneamente herdadas mais frequentemente do que o esperado. A análise genética ao FV de Leiden pode ser utilizada para confirmação de resultados positivos ou equívocos de testes de resistência à APC ou para diferenciar formas heterozigóticas das homozigóticas e assim orientar o acompanhamento clínico do paciente. Actualmente os métodos de

biologia molecular para detecção simultânea das mutações FVL e PT já estão disponíveis em muitos laboratórios clínicos, como testes definitivos para determinação destas condições.

Podem ser utilizadas diversas metodologias, como métodos baseados no PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ARMS (Amplification-Refractory Mutation System), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assays), NanoChip microelectronic array technology.

Os métodos de PCR empregam “*primers*” específicos para amplificar a sequência que contém a mutação alvo. Geralmente, dois “*primers*” são utilizados para amplificar a sequência alvo contida numa região do gene, de forma a obter 10^5 - 10^6 cópias. Para amplificar estes fragmentos são empregues a enzima Taq DNA polimerase, dNTPs, Cl_2Mg e tampão apropriado. O DNA genómico é necessário para a análise genética, mas a quantidade e qualidade desse DNA pode variar, dependendo dos requisitos do método. A maioria dos laboratórios procede rotineiramente á purificação do DNA, mas quando apenas um ou dois Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) vão ser avaliados, pode ser vantajoso evitar o consumo de tempo na preparação do DNA. Os métodos de PCR no Ligth Cycler da Roche ou de RED (restriction enzyme digestion) seguida de electroforese em gel, não apresentam grandes requisitos relativamente à qualidade do DNA utilizado para determinar FVL ou PT G20210A. Outros ensaios como Invader Assay podem necessitar de DNA mais puro ou concentrado.

Os métodos de PCR utilizam diferentes formas para detectar os génotipos dos alelos amplificados, como restriction enzyme digestion (RED), amplification-refractory mutation system (ARMS), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based primer extension assay e fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay. Quando se utiliza electroforese pode haver muitos fragmentos presentes, sendo necessário cuidado para assegurar que a interpretação dos génotipos é clara e não propensa a erros.

Mutações raras ou muito próximas do local do SNP de interesse podem sugerir génotipos diferentes, dependendo da metodologia. Por exemplo, o polimorfismo silencioso raro A1692C no gene F5, que é erroneamente identificado como FVL pelo método RED, pode ser claramente distinguido das formas “*wild type*” do gene F5 e FVL quando testado pelo LightCycler.

Os testes de multiplex permitem um procedimento único para detectar mais do que uma mutação. Apesar de pouco frequente, é necessário lembrar que “*primers*” ou sistemas de detecção podem ser influenciados por mutações raras. [2]

Os **métodos de RED** baseiam-se no facto de que mutações ou SNPs podem eliminar ou criar locais de restrição enzimática, permitindo a discriminação do génotipo pela visualização de

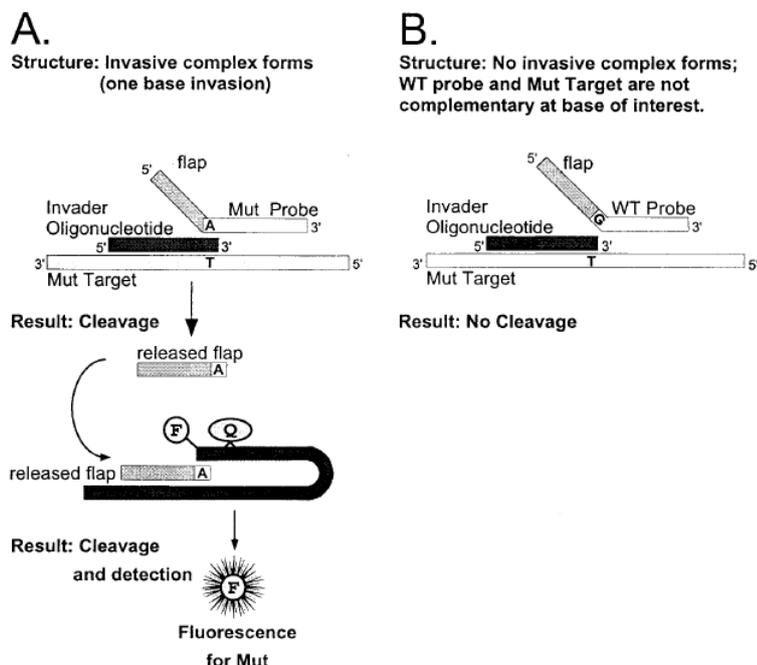
fragmentos de diferentes dimensões durante a separação electroforética (por agarose ou poliacrilamida). Frequentemente os fragmentos são visualizados sobre luz UV, após coloração com Brometo de Etídio. O produto amplificado deve incluir um segundo, não variável, local de restrição, que actua como controlo para a digestão enzimática de restrição em cada amostra processada. Se mais do que uma mutação é detectada, os fragmentos devem apresentar tamanho suficiente para possibilitar uma interpretação no gel que seja clara e simples. Os métodos de RED são muito manuais e laboriosos. Alguns analistas preferem a detecção com electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em vez de gel de agarose, mas tanto a acrilamida como a poliacrilamida são neurotóxicas e carcinogénicas. Além disso, ambos os géis são corados com Brometo de Etídio que é um agente mutagénico. [2]

Os **Métodos de ARMS** constituem técnicas multiplex, onde alelos mutantes e “*wild type*” são amplificados simultaneamente por PCR com os “*primers*” específicos para cada genótipo, formando assim “*amplicons*” com diferentes pesos moleculares. Os produtos da reacção são detectados por electroforese com gel de agarose ou poliacrilamida seguida de coloração com Brometo de Etídio. Esta técnica revela-se simples e de confiança para detectar alelos FVL e F2, mas requer mais de 10µg/µl de DNA para detectar os genótipos de forma consistente. [2]

Métodos de SSCP são simples e rápidos e não necessitam de digestão enzimática de restrição. O DNA amplificado é desnaturado a cadeia simples e depois analisado por electroforese em gel. A mobilidade da cadeia simples de DNA é dependente do comprimento, peso molecular e conformação do “*amplicon*”. A conformação é determinada pela sequência nucleotídica. O método permite identificar algumas mutações raras. A interpretação dos resultados tem de ser cuidadosa porque as mutações podem causar alterações relativamente pequenas na mobilidade electroforética. [2]

Métodos de ELISA geralmente hibridizam um produto de PCR biotilado com oligonucleotidos fixados nos poços de microplacas. A “*streptavidin*” conjugada com peroxidase liga-se ao “*amplicon*” ligado e finalmente o peróxido de hidrogénio com o cromóforo detectam o “*amplicon*” ligado. A comparação da densidade de coloração produzida pela reacção com a sequência “*wild type*” e as sequências mutantes determina o genótipo. O “*amplicon*” é preparado a partir de DNA purificado e é recomendada a leitura das placas de ELISA por espectrofotómetro. Existem disponíveis no mercado, Kits de ELISA para a detecção de FVL e PT G20210A combinada (StripA Assay, ViennaLab). [2]

As técnicas de FRET, constituem técnicas de detecção em tempo real dos fragmentos de PCR hibridizados com fluoróforos marcados, específicos de alelo e pela sua energia de ressonância de transferência de fluorescência.



A discriminação de SNP requer uma correspondência entre a sonda primária (1691A ou 1691G) e a sequência alvo na base a ser discriminada, bem como invasão de pelo menos uma base pela sonda Invader. (A) Formação de um complexo de sobreposição entre a sonda 1691A e o modelo 1691A, com a libertação do fragmento 59, que por sua vez serve como uma sonda invasora na reacção secundária, produzindo fluorescência. (B) A hibridação da sonda 1691G com o modelo 1691A não gera a estrutura invasiva reconhecida pela enzima VIII Cleavase, portanto, a clivagem da sonda primária não ocorre. Mut, mutante; WT selvagem tipo; F, fluoresceína; Q, quencher

Figura 6: Esquema do ensaio Invader. [24]

Este princípio é aplicado no LigthCycler® da Roche. O ensaio para determinação do FVL e PT G20210A utiliza um PCR muito rápido, seguido de detecção da curva de dissociação do DNA amplificado. A temperatura de fusão (T_m) de um alelo mutante é inferior à da sua forma “wild type” e o genótipo é facilmente interpretado através do “software” informático. Este método permite detectar algumas mutações que passam despercebidas por outras técnicas, como é o caso da mutação C20209T da PT que apresenta T_m de aproximadamente 54°C, enquanto o alelo “wild type” tem T_m de 59°C e a mutação mais frequente G20210A tem T_m de aproximadamente 49°C. O método é altamente sensível, muito rápido, com pouca intervenção manual e permite desenvolvimento de técnicas multiplex pela utilização de diferentes marcadores que emitam fluorescência a diferentes comprimentos de onda. Apresenta a desvantagem de ser uma metodologia ainda muito cara. Com o Ligth Cycler da Roche a amplificação do DNA ocorre em capilares de vidro borossilicado, com ciclos muito rápidos. A quantidade de “amplicons” formados é medida pelo aumento da fluorescência, que é gerada por FRET. As duas cadeias formadas hibridizam e podendo uma conter o SNP em estudo, rodeado por zonas de hibridização durante a PCR. Após a amplificação, o aumento da temperatura causa dissociação das cadeias e redução do sinal de fluorescência, formando uma curva de

dissociação. A presença de um SNP origina uma dissociação a temperatura mais baixa, revelando uma ligação não perfeita entre as cadeias na presença da mutação. As temperaturas de dissociação são específicas de sequência, altamente reprodutíveis, de tal forma que as amostras “wild type” são rapidamente diferenciadas das sequências homozigóticas ou heterozigóticas.

No estudo de Erali et al. [28] é feita uma avaliação de um método que utiliza um “*microarray*” electrónico para análise de várias mutações no DNA. A mutação G1691A no FVL, a mutação G20210A da Protrombina e a mutação C677T da MTHFR (Metileno-tetra-hidrofolato redutase) são as variações genéticas mais comuns associadas a trombozes venosas. Com a utilização do “*microarray*” é possível determinar vários génotipos em simultâneo.[2]

A tecnologia de “**Microarrays**” **Electrónicos** consiste num suporte onde um produto de PCR previamente amplificado, é direccionado electronicamente para locais específicos na assembleia do NanoChip. Subsequentemente as formas “*wild type*” e mutante, que apresentam diferentes sequências de oligonucleotidos com diferentes fluorescências (Cy3 e Cy5 respectivamente), passivamente hibridizam na assembleia do NanoChip. Esta hibridização é fortificada com a presença de oligonucleotidos estabilizadores. A detecção dos sinais de fluorescência ocorre no módulo de leitura, sendo os resultados computadorizados apresentados sob a forma de histogramas, tabelas e cartas. As formas “*wild type*”, homozigóticas e heterozigóticas são identificadas com base nas variações de fluorescência apresentadas. Segundo a técnica é feito um PCR “*multiplex*” que origina produtos com 220pb e 163pb para factor V e Protrombina respectivamente e um segundo PCR para o MTHFR que origina um “*amplicon*” com 173pb. Estes produtos de PCR são depois analisados com o NanoChip e paralelamente com o Light Cycler da Roche, como método comparativo. Observou-se uma concordância de 100% entre ambos os métodos, na avaliação dos três génotipos distintos. Segundo o método de NanoChip os resultados para FVL, Protrombina e MTHFR são apresentados sob a forma de razão de fluorescência. Uma razão Cy5/Cy3 (mutante/ wild type) de 5:1 é necessário para caracterizar uma amostra homozigótica mutante, Cy3/Cy5 de 5:1 caracteriza uma amostra homozigótica “*wild type*”, uma razão de fluorescência <2:1 caracteriza uma amostra heterozigótica e as razões intermédias entre 2:1 e 5:1 são indeterminadas e necessitam de confirmação. [28]

Métodos de sequenciação directa do DNA podem detectar SNPs e qualquer mutação. A tecnologia de sequenciação automática encontra-se já disponível, tornando-a uma alternativa válida. Os “*primers*” convencionais são biotinilados e vários produtos de PCR são simultaneamente sequenciados numa reacção rápida de adição sequencial dos nucleótidos. A acção da DNA polimerase é monitorizada pela libertação do pirofosfato que é convertido em ATP e detectado pela reacção luciferina-luciferase. [2]

As vantagens e desvantagens dos vários métodos estão detalhadas na tabela.

Método	Teste	Vantagens	Desvantagens
PCR	RED simples ou “multiplex”	Facilmente disponível, exacto e preciso. Podem ser desenvolvidos testes “in house”, tornando o ensaio mais barato e acessível.	Vários passos manuais na técnica, laborioso. Risco de toxicidade pelo uso de Brometo de Etídio e radiação UV. Na utilização de “multiplex” a presença de várias bandas pode originar erros de interpretação.
	ARMS	Não necessita de digestão enzimática de restrição.	A utilização de gel acarreta risco de toxicidade pelo uso de Brometo de Etídio e/ou acrilamida.
	SSCP	Não necessita de digestão enzimática de restrição. Pode detectar outras mutações, não usuais.	A utilização de gel acarreta risco de toxicidade pelo uso de Brometo de Etídio e/ou acrilamida. Não é específico para detecção de mutações raras, a discriminação pode ser baixa.
	ELISA- “based primer extension assay”	Técnica relativamente simples, que não acarreta os riscos de utilização gel e químicos tóxicos.	Técnica manual, com alguns passos automatizáveis.
	FRET (LigthCycler, PCR tempo real)	Técnica muito simples, resultados disponíveis em <2h. muito sensível e não necessita de DNA altamente purificado. Pode detectar mutações pouco usuais.	Equipamento caro, mais susceptível a contaminações do que técnicas menos sensíveis.
	Sequenciação automática	Muito simples e relativamente rápida.	Sequenciador é equipamento muito caro.
	Nanochip	Totalmente automático e altamente exacto.	Necessita de DNA purificado. Amostras com variações adicionais próximas da mutação alvo indicam que a presença de tais mutações podem originar resultados duvidosos.
Não PCR	FRET (Invader®)	Técnica simples, menos susceptível a contaminação. Facil interpretação dos resultados pelo uso do “software”.	Necessita de concentrações relativamente grande de DNA purificado, > 10ng/µl.

PCR: Polymerase Chain Reaction, FRET: Fluorescent Resonance Energy Transfer; RED: Restriction Enzyme Digestion, ARMS: Amputation Refractory Mutation System; SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism; ELISA: Enzyme Linked Imunosorbent Assay

Tabela 2: Comparação de métodos utilizados para determinar FVL

Morteza BAGHERI e Isa Abdi RAD[12] descrevem um método de Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) para detecção de FVL e PT em simultâneo. O DNA foi isolado por métodos de “Salting Out” a partir de amostras de 5mL de sangue. Foram utilizadas sequências de “primers” específicos para a mutação G1691A do FVL e para a G20210A da Protrombina, para serem utilizados na mesma reacção. Na tabela encontra-se descrito o protocolo utilizado, bem como as sequências de “primers”.

Mutations	Sequences of primers	PCR products	PCR Thermal profile
FV G1691A	(C): 5'-gga cta ctt gac aat tac tgt tct ctt g-3'	150bp	initial denaturation: 95°C for 10 min 10 cycles: denaturation: 94°C for 30 sec, annealing: 60°C for 30 sec, extension: 72°C for 1 min; and 25 cycles: denaturation: 94°C for 30 sec, annealing: 55°C for 30 sec, extension: 72°C for 1 min
	(N): 5'-gca gat ccc tgg aca gac g-3'		
	(M): 5'-gca gat ccc tgg aca gac a-3'		
Prothrombin G20210A	(C): 5'-tct aga aac agt tgc ctg gca g-3'	340bp	initial denaturation: 95°C for 10 min 10 cycles: denaturation: 94°C for 30 sec, annealing: 60°C for 30 sec, extension: 72°C for 1 min; and 25 cycles: denaturation: 94°C for 30 sec, annealing: 55°C for 30 sec, extension: 72°C for 1 min
	(N): 5'-gca ctg gga gca ttg agg atc-3'		
	(M): 5'-gca ctg gga gca ttg agg att-3'		

Figura 7: Sequências de “primers”, perfil de temperaturas de PCR e dimensão de produtos de PCR para determinação das mutações FV G1691A e Protrombina G20210A. [12]

O DNA genómico foi amplificado utilizando um “*primer*” específico mutante ou normal como “*forward primer*” e um “*reverse primer*” comum. Os produtos da amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 2%. O gel obtido foi corado com Brometo de Etídio, e a presença ou ausência de produtos de PCR foi visualizada por UV “*transilluminator UV gel documentation*”. Os produtos de PCR obtidos com o FV de Leiden G1691A e PT G20210A originam sequências com 150 e 340pb respectivamente. [25]

6. Comparação entre principais métodos e desempenhos:

Segundo a FDA, os produtores de novos métodos analíticos devem comparar o seu método com um método de referência. O método de PCR seguido de Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ou AS-PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction) são aceites como métodos de referência, sendo utilizados em muitos estudos de comparação de métodos. No entanto, o método “*gold standard*” é a sequenciação bidireccional de DNA, ainda pouco utilizada. [26]

A identificação do FVL e da mutação da PT foi reportada por esquemas de testes de proficiência nos EUA, Reino Unido, Europa e Austrália. Colectivamente estes relatórios demonstram um índice de erro de 1% para detecção de FVL, com sensibilidade analítica de 98,8%, especificidade analítica de 99,3%. O índice de erro observado na detecção da mutação PT é de 0,9%, com sensibilidade analítica de 98,3%, especificidade analítica de 99,6%. A credibilidade da performance dos testes é elevada para ambas as determinações quer do FVL ou do PT. Este mesmo estudo observou que 3 dos 39 laboratórios incluídos, eram responsáveis por 46% dos erros detectados, permitindo identificar os laboratórios responsáveis pela má performance e encorajar a aplicação de medidas correctivas. [18]

Sodi et al [27] descrevem um método de detecção rápida do FVL por Real Time PCR com sondas TaqMan Minor Groove Binder (MGB). Dos resultados obtidos concluem que o método é robusto e conveniente para a determinação do FVL. O uso de sondas TaqMan MGB resulta numa discriminação clara dos genótipos, independentemente da quantidade de DNA utilizada na amostra. O processamento em Tempo Real diminui o tempo necessário para a análise, os riscos de contaminação e a ausência de resultados ambíguos diminui a necessidade de repetições. [27]

Table 1. Summary of FVL genotyping with the Invader assay.

Genotype by ASPCR	n		Total signal		Net adjusted signal		G:A ratio	Concordance
			G reaction	A reaction	G reaction	A reaction		
Wild-type (1691GG)	1260	Mean	729	155	497	5	411	1256/1260 (99.7%) ^a
		SD	183	35	178	12.2	233.73	
		Range	264–1307	16–344	38–1049	1–147	5–1049	
Heterozygous (1691GA)	106	Mean	549	472	334	298	1.25	106/106 (100%)
		SD	143	170	142	166	0.43	
		Range	221–1000	126–1390	53–712	19–1192	0.25–2.96	
Homozygous (1691AA)	3	Mean	148	673	1	498	0.002	3/3 (100%)
		SD	11	51	0	61	0	
		Range	135–157	619–720		429–538		

^a Four ASPCR 1691GG samples typed 1691GA by Invader; upon repeat testing of the same DNA preparations, all samples typed 1691GG.

Figura 8: Genotipagem do FVL com o teste Invader. [24]

No trabalho de Emadi et al. [26] é feita uma avaliação da validade analítica de diversos métodos genéticos para detecção do FVL, da mutação da protrombina G20210A e ainda métodos “multiplex”. Segundo este trabalho, a ocorrência de erros nos métodos genéticos, justifica a utilização do teste de resistência à APC para determinar a presença de FVL, quer como teste de rastreio ou em conjunto com os testes moleculares. A validade analítica dos testes genéticos refere-se não só à sua capacidade para determinar de forma exacta o genótipo, mas também à confiança e robustez do método. Foram revistos estudos que avaliaram métodos comerciais ou precomerciais, verificando-se que ambos demonstraram excelentes resultados. A maioria dos resultados discordantes é esclarecida por repetição da análise, sugerindo que erros de operador ou administrativos estiveram na origem da discordância. A maioria dos estudos revistos utilizou o método de PCR-RFLP ou o AS-PCR como método de referência para comparação. No entanto, observa-se uma crescente preocupação com a utilização de métodos não sequenciais devido à sua incapacidade para diferenciar o FVL de outros polimorfismos benignos que possam encontrar-se na sua proximidade. É exemplo desta situação o polimorfismo raro e silencioso A1692C do factor V, que pode originar resultados falso positivos de alelo com FVL, quando se utiliza RFLP para a determinação desse genótipo. Nas tabelas a seguir são apresentados os resultados deste estudo. A equivalência demonstrada pelos diversos métodos, na sua validade analítica leva-nos a concluir que os factores determinantes para a selecção de um método sobre o outro, não se irão basear na sua

eficiência analítica, mas sim na ponderação de outros factores como redução do tempo de análise, custo, rendimento, tipo de “software”, entre outras. [26]

TABLE I. Analytic Validity of Testing for the FVL Mutation

Experimental test	Reference standard	Studies	Total population ^a	Concordance
Flap Endonuclease + FRET (Invader Assay)	AS-PCR or PCR-RFLP	Hessner, 2000 [13] Ledford, 2000 [14] Patnaik, 2004 [37]	1369 + 371 + 368	99.5 – 100%
FRET + Melting Curve Analysis (Light Cycler)	PCR or PCR-RFLP	Schroell-Metzger, 2003 [38] Mammo, 2006 [39] Cooper, 2003 [40] Nauck, 2000 [15] Parks, 2001 [18]	132 + 2131 + 200 + 110 + 155	100%
Taqman Real-Time PCR Assay	PCR-RFLP	Louis, 2004 [32] Benson, 2001 [17] Behrens, 2004 [41]	115 + 100 + 100	100%
Electrochemical Genosensors	PCR-RFLP	Ozkan, 2002 [35] Ozsoz, 2003 [42] Huang, 2002 [43]	90 + 90 + NR	93 – 100%
Temperature Gradient Capillary Electrophoresis	PCR-RFLP	Murphy, 2003 [31]	304	99.3%
MALDI-TOF Mass Spectrometry	PCR-RFLP	Hung, 2002 [20] Humeny, 2001 [25]	27 + 70	100%
PCR-Single Strand Conformation Polymorphism	PCR-RFLP	Simundic, 2003 [44]	150	100%
Simultaneous Allele-Specific Amplification Followed by RFLP	PCR-RFLP	DelRio-LaFreniere, 2001 [34]	49	100%
Fluorogenic Probe-Based Allelic Discrimination PCR Assay	PCR-RFLP	Sanders, 2000 [45]	120	100%
Melting Analysis of Labeled Probes System	PCR-RFLP or Conventional Dual-Hybridization Probe Genotyping	El Housni, 2003 [46] (dual-labeled probes); Vaughn, 2004 [47] Crockett, 2001 [48] (single-labeled fluorophore-based systems)	100 + 100 + 100	100%
Lanthanide-Labeled Probe	PCR-RFLP	Potter, 2001 [19]	379	99–100%
Rolling Circle Amplification Assay Using Open Circle Probes Ligation	PCR-RFLP	Alsmadi, 2003 [49]	216	99.4%
High-Resolution Melting Analysis of Small Amplicon	Light Cycler	Liew, 2004 [50]	104	100%
Pyro-sequencing	LightCycler or Direct Sequencing	Verrì, 2005 [51]	100	100%
READIT SYSTEM (Pyrophosphorylisis)	PCR-RFLP or Not Specified	Tsongalis, 2001 [52] Rhodes, 2001 [29]	280 + 510	99–100%
ELISA	Direct Sequencing or PCR-RFLP	Lopez, 2007 [36] Carmi, 2004 [53]	264 + 284	95–100%
Reverse Allele-Specific Oligonucleotide (ASO) Hybridization Assay	PCR-RFLP	Kowalski, 2000 [28] Leyte, 2000 [54]	256 + 99	100%
First Nucleotide Change Technology	PCR-RFLP	Pecheniuk, 2000 [16]	500	100%
Linked Linear Amplification—ASO Capture	PCR-RFLP & PCR-ASO	Reyes, 2001 [55]	111	100%
Nanochip Electronic Microarray	PCR-RFLP, Light Cycler, Invader Monoplex Assay	Schrijver, 2003 [56] Erali, 2003 [57] Evans, 2002 [58]	197 for the comparison to RFLP and 195 + 224 + 758 for the comparison to LightCycler	98–100%
Photo-Cross-Linking Oligonucleotide Hybridization Assay	PCR-Based Assay	French, 2004 [59]	1054	98.6%
Minor Groove-Binding Non-Fluorescent Quencher (MGB-NFQ) Probes	FRET + Melting Curve Analysis (LightCycler)	Castley, 2005 [60]	151	100%
Single- and Dual-Labeled HyBeacon Probes	RFLP or the Roche FVL Hybridization Probe Kit	French, 2008 [61]	> 500	100%

Figura 9: Validade analítica dos testes para detecção da mutação FVL. [26]

TABLE III. Analytic Validity of Simultaneous (Multiplex) Detection of FVL and Prothrombin G20210A Mutations

Experimental test	Reference standard	Studies	Total population ^a	Concordance
FRET + melting Curve Analysis (Light Cycler)	PCR-RFLP	van den Bergh, 2000 [65] Hobson-Peters, 2005 [66] Ameziane, 2003 [67]	47 + 43 + 200	100%
Mutagenically Separated PCR Followed by Gel Electrophoresis	PCR-RFLP	Endler, 2001 [26]	153	100%
Multiplex PCR-RFLP	PCR-RFLP or Light Cycler	Baris, 2004 [68] Angeline, 2005 [21] Huber, 2000 [69] Lucotte, 2003 [70] Koksai, 2007 [27]	408 + 72 + 205 + 175 + 104	100%
Multiplex PCR – Reverse Hybridization Line Probe Assay	PCR-RFLP	Leyte, 2000 [54]	99	100%
Multiplex AS-PCR - Ion-Pair Reversed Phase HPLC	PCR-RFLP	Nietzel, 2003 [71]	> 100	100%
Multiplex PCR with ASO Hybridization Using the 5' Nuclease Assay	PCR-RFLP	Ugozzoli, 2004 [72]	52	100%

^a The order of the counts corresponds to the order of studies in the row above.

ASO, allele-specific oligonucleotide; AS-PCR, allele-specific PCR; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HPLC, high performance (pressure) liquid chromatography; NA, not applicable; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

Figura 10: Validade analítica dos testes multiplex para detecção simultanea da mutação FVL e Protrombina G20210A. [26]

Nas tabelas são apresentados os testes experimentais avaliados, o método de referência utilizado para a comparação, os estudos incluídos, o total de amostras analisadas e por fim a concordância dos resultados obtidos com os métodos comparados. [26]

Apesar da concordância de resultados observada no trabalho de Erali et al. [28], também aqui se observa que a existência de mutações próximas do local da mutação em estudo, pode originar resultados de genótipos falsos positivos. Foram detectadas quatro amostras com mutações distintas para a Protrombina e a MTHFR, identificadas por alteração no padrão de temperaturas de dissociação com o Ligth Cyler e confirmadas por Sequenciação. Este tipo de erros na caracterização de genótipos pode ocorrer em métodos que utilizem a hibridização de sondas e uma temperatura fixa para a discriminação. Métodos que utilizem análise de curvas de dissociação, em intervalos de temperaturas permitem fazer a discriminação das mutações. [28]

No estudo de Schrijver et al. [29] são comparados três métodos, nomeadamente o microarray electrónico (Nanogen), para determinação do FVL e a mutação G20210A da Protrombina, com dois métodos de biologia molecular já utilizados na rotina laboratorial. São comparadas a precisão, tempo de ensaio, automatização/tempo de preparações manuais e complexidade da técnica.

O primeiro consta de uma PCR multiplex seguida de digestão restritiva e electroforese em gel de poliacrilamida. O segundo é a determinação das mutações em ensaios separados, por PCR em tempo real no Ligth Cyler da Roche. Com o Ligth Cyler o ensaio é feito de forma rápida, no interior de capilares de vidro borossilicado. Durante o PCR o número de “*amplicons*” formado é medido directamente pelo aumento da fluorescência, emitida por ressonância de transferência de energia de uma sonda marcada para outra. As duas sondas, em que uma delas se sobrepõe ao SNP em estudo, são hibridizadas em áreas próximas do “*amplicon*” formado durante o PCR. Depois da amplificação, a diminuição lenta da temperatura origina uma curva de dissociação das sondas

hibridizadas, com diminuição do sinal de fluorescência. Na curva de dissociação é possível identificar zonas de dissociação mais rápidas devidas a ligações não perfeitas das sondas hibridizadas, quando está presente a mutação. As temperaturas de dissociação são específicas de sequências nucleotídicas e altamente reprodutíveis, permitindo a fácil distinção entre genótipos “*wild type*” de mutantes heterozigóticos ou homozigóticos.

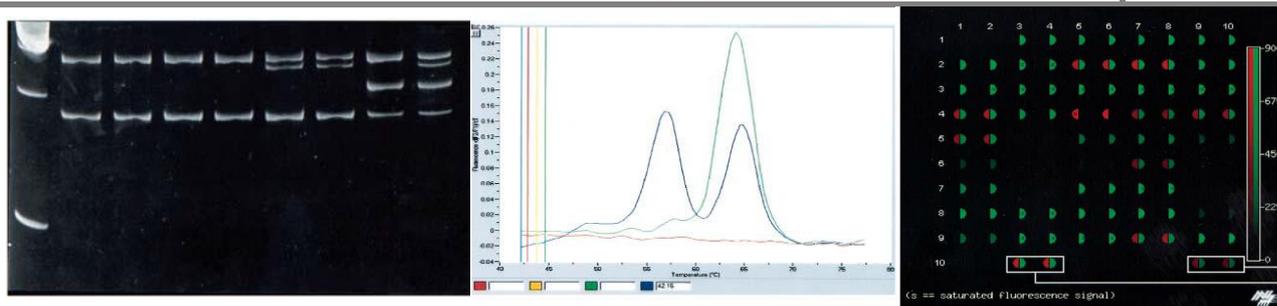


Figura 11: Representação dos resultados obtidos por RFLP, Ligth Cycler e Nanogen [17]

Dos resultados obtidos com os diferentes métodos observa-se total concordância entre o Light Cycler, PCR com RFLP e o sistema Nanochip, observando-se no entanto incapacidade de determinar o genótipo de algumas amostras, possivelmente devido a problemas relacionados com a qualidade da amostra. O tempo necessário para extracção do DNA é semelhante para os vários métodos. Relativamente ao tempo de análise e de preparações manuais, o método mais rápido é o Ligth Cycler, seguido do RFLP e por fim o NanoChip. [29]

No trabalho de Koksall et al. [30] é descrita uma técnica de PCR “multiplex” com detecção por RFLP para a detecção simultânea do FVL, da mutação G20210A da Protrombina e da mutação C677T da MTHFR. O objectivo do trabalho é apresentar um método robusto e preciso para a detecção simultânea das três mutações e respectivos alelos normais, que represente uma alternativa válida aos métodos mais rápidos e elegantes mas que requerem equipamentos muito caros como o Ligth Cycler ou “microarrays” electrónicos (NanoChip). A técnica desenvolvida apresenta como vantagens o facto de se utilizar a mesma enzima de restrição para a detecção de ambas as mutações. Além disso, os padrões electroforéticos obtidos podem ser facilmente identificados, independentemente das combinações genotípicas presentes na amostra. [30]

DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO

Para avaliar o risco trombótico de um doente, são utilizadas várias provas funcionais e são determinados vários biomarcadores. Entre os testes funcionais é de referir a pesquisa de Antitrombina pelo teste que utiliza a actividade da heparina como cofactor sobre o factor Xa. A determinação da Proteína C é feita por teste funcional utilizando veneno de cobra como activador, e da Proteína S por determinação antigénica da fracção livre. A prova de resistência à Proteína C activada baseia-se na determinação do aPTT com e sem plasma deficiente em FV. A disfibrinogénemia é determinada em função do tempo de trombina com análise paralela imunológica e funcional do fibrinogénio. A pesquisa de anticorpos antifosfolipidos inclui a pesquisa de Anticoagulante lúpico e de Ac anticardiolipina. A hiperprotrombinémia é determinada por genotipagem da protrombina pela pesquisa da mutação G20210A. A hiperhomocisteinémia é determinada por HPLC ou imunoensaio e o factor VIII deve ser determinado por testes funcionais com determinação da actividade do factor ou por testes imunológicos. A determinação de D-dímeros deve ser feita por métodos imunológicos.

Outros biomarcadores são referidos em vários estudos, pelo seu possível interesse na avaliação do risco trombótico, como a determinação da P-Selectina ou a determinação de Micropartículas.

A avaliação do risco trombótico com pesquisa do FVL apresenta interesse clínico em familiares em 1º grau de indivíduos portadores de defeito genético, em pacientes com historial de VTE, em mulheres que tomem contraceptivos orais que sofram um episódio de trombose venosa, ou mulheres que sofrem sucessivas perdas de gravidez ou preeclampsia inexplicada. Não é recomendado o rastreio indiscriminado sobre a população geral.

Os portadores heterozigóticos de FVL apresentam um risco 5 a 7 vezes superior de ocorrência de evento VTE quando comparados com os não portadores. Esse risco aumenta até 80 vezes, nos portadores homozigóticos. A mutação do FVL é considerada o factor de risco trombótico hereditário mais comum.

A prevalência da mutação varia entre a população. Na população europeia a frequência de portadores heterozigóticos é de 3 a 8%, verificando-se as maiores prevalências nos caucasianos. A mutação é rara na população asiática, africana e australianos indígenas. A frequência de portadores homozigóticos é de 1:5000.

O uso de terapêutica hormonal de substituição associado à presença de FVL é responsável por uma maior probabilidade de ocorrência de VTE.

A ocorrência de VTE durante o curso de uma gravidez tem maior probabilidade em portadoras heterozigóticas, aumentando ainda mais nas portadoras homozigóticas comparativamente com as não portadoras. Observa-se também maior risco de perda fetal em grávidas portadoras da mutação, durante o segundo trimestre de gestação.

A avaliação laboratorial deve ser efectuada em indivíduos com historial de VTE não explicada. Cerca de 15 a 20% dos indivíduos com um episódio de VTE têm mutação, subindo para 50% quando os episódios de VTE são recorrentes. A avaliação deve ser efectuada a familiares em 1º grau de portadores identificados.

Não existe tratamento que previna ou cure a desordem, no entanto existem medidas que podem diminuir a probabilidade de ocorrência de VTE. Pacientes que já apresentaram fenómenos de VTE necessitam de ser acompanhados com tratamento anticoagulante. Os portadores identificados que sejam sujeitos a situações de risco como cirurgia, traumatismos ou gravidez podem também necessitar de tratamento anticoagulante transitório.

A mutação do gene da Protrombina é o 2º mais frequente factor de risco trombótico hereditário. Caracteriza-se pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 20210 do gene da Protrombina, causando um aumento dos níveis da protrombina em circulação.

A mutação no gene da MTHFR, envolvida na metabolização da Homocisteína, também apresenta interesse clínico para avaliação do risco trombótico. Caracteriza-se pela substituição de uma citosina por uma timina na posição 677 do gene da MTHFR, causando aumento dos níveis de homocisteína.

Vários outros polimorfismos têm sido estudados, de forma a compreender-se qual o seu contributo para o aumento ou diminuição do risco trombótico. Alguns exemplos que têm sido alvo de interesse são o polimorfismo 4G/5G do gene da PAI-1, o polimorfismo Thr312Ala do fibrinogénio, o polimorfismo Val34Leu do Factor XIII ou ainda o polimorfismo G455A na fracção β do fibrinogénio.

A análise genética do FVL pode ser realizada para confirmação de resultados positivos ou equivocados de testes de resistência à APC ou para diferenciar as formas heterozigóticas das homozigóticas.

Existem diversos métodos para determinar o FVL. O método de referência continua a ser o RFLP ou AS-PCR, sendo muitas vezes utilizados para comparação de métodos. O método “*gold standard*” é a sequenciação bidireccional de DNA, ainda pouco utilizado. Os métodos de PCR utilizam diferentes formas para detectar os genótipos dos alelos amplificados, tal como RED, ARMS, ELISA ou FRET.

Quando se seleciona um método para efectuar a determinação, é muito importante avaliar a capacidade de diferenciação de polimorfismos raros situados na proximidade da mutação A1691G.

O processamento em Tempo Real diminui o tempo necessário para a análise, os riscos de contaminação e observam-se menos resultados ambíguos, diminuindo a necessidade de repetições.

Os testes multiplex também já se encontram disponíveis, inclusive sob a forma de microarrays, com possibilidade de várias determinações em simultâneo.

No trabalho de Emadi et al. [26] observa-se que quando se comparam diversos métodos de análise do FVL ou da mutação da PT G20210A, os resultados são muitos concordantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dr. Tiago Henriques Coelho, Prof. Doutor Adelino Leite Moreira; "Função Hemostática e sua Avaliação, Texto de Apoio"; Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; Ano Lectivo 2001/02.
- [2] P. C. Cooper, S. M. Rezende; "An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations"; *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2007, 29, 153–162.
- [3] <http://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.html>
- [4] <http://omim.org/entry/612309>
- [5] Jody L Kujovich, MD Division of Hematology and Medical Oncology; "Factor V Leiden Thrombophilia"; Oregon Health and Science University Portland, Last Update: March 9, 2010.
- [6] Armando Tripodi, Pier Mannuccio Mannucci; "Laboratory Investigation of Thrombophilia"; *Clinical Chemistry* 47:9; 1597–1606 (2001).
- [7] Jess G. Evans and Cindy Lee-Tataseo; "Determination of the Factor V Leiden Single-Nucleotide Polymorphism in a Commercial Clinical Laboratory by Use of NanoChip Microelectronic Array Technology"; *Clinical Chemistry* 48:9 1406–1411 (2002).
- [8] Dawn M Barnes, Thomas W Wakefield and John E Rectenwald; "Novel Biomarkers Associated with Deep Venous Thrombosis: A Comprehensive Review"; *Biomarker Insights* 2008:3 93–100.
- [9] Rectenwald, J.E., Myers, D.D., Hawley, A.E. et al.; "D-Dimer, P-Selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis." *Thromb Haemost*, 94:1312–17(2005).
- [10] Papalambros, E., Sigala, F., Travlou, A. et al. "P-selectin and antibodies against Heparin-Platelet factor 4 in patients with venous or arterial disease after a 7-day Heparin treatment"; *J. Am. Coll. Surg.*, 199:69–77(2004).
- [11] Jilma, B., Kovar, F., Hron, G. et al.; "Homozygosity in the single nucleotide polymorphism Ser126Arg in the E-selectin gene associated with recurrent venous thromboembolism". *Arch. Intern. Med.*, 166:1655–59(2006).
- [12] Saskia Middeldorp; "Evidence-based approach to thrombophilia testing"; *J Thromb Thrombolysis* (2011) 31:275–281.
- [13] Wayne W. Grody, MD, PhD1, John H. Griffin, PhD2, Annette K. Taylor, MS, PhD3, Bruce R. Korf, MD, PhD4, and John A. Heit.; "American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing".

- [14] Wai Khoon Ho, Graeme J. Hankey, Daniel J. Quinlan, John W. Eikelboom; “Risk of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients With Common Thrombophilia. A Systematic Review”; *Arch Intern Med.* 2006;166:729-736
- [15] Marchetti M, Pistorio A, Barosi G.; “Extended anticoagulation for prevention of recurrent venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden--cost-effectiveness analysis”; *Thromb Haemost.* 2000 Nov; 84(5):752-7.
- [16] Vink R, Kraaijenhagen RA, Levi M, Büller HR. ; “Individualized duration of oral anticoagulant therapy for deep vein thrombosis based on a decision model”; *J Thromb Haemost.* 2003 Dec;1(12):2523-30.
- [17] O Wu, L Robertson, S Twaddle, GDO Lowe, P Clark, M Greaves, ID Walker, P Langhorne, I Brenkel, L Regan and IA Greer; “Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study”; *Health Technology Assessment* 2006; Vol. 10: No. 11
- [18] Alfred O. Berg, Jeffrey Botkin, Ned Calonge, Doug Campos-Outcalt, James E. Haddow, Maxine Hayes, Celia Kaye, Roger D. Klein, Kenneth Offit, Stephen G. Pauker, Margaret Piper, Carolyn Sue Richards, Joan A. Scott, Ora L. Strickland, Steven Teutsch, David L. Veenstra.; Recommendations from the EGAPP Working Group: Routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and their adult family members; *Genetics IN Medicine* • Volume 13, Number 1, January 2011
- [19] Gohil R, Peck G, Sharma P.; “The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls”; *Thromb Haemost.* 2009 Aug;102(2):183-4.
- [20] Guerzoni AR, Pavarino-Bertelli EC, Godoy MF, Graça CR, Biselli PM, Souza DR, Bertollo EM.; “Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and its association with coronary artery disease”; *Sao Paulo Med J.* 2007 Jan 4;125(1):4-8.
- [21] Krisztina Madách, István Aladzsity, Ágnes Szilágyi, George Fust, János Gál, István Péntzes and Zoltán Prohászka; ”R4eGsea/rc5hG polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study”; *Critical Care* 2010, 14:R79
- [22] Kristina F. Standeven, Peter J. Grant, Angela M. Carter, Thomas Scheiner, John W. Weisel, Robert A.S. Ariëns; “Functional Analysis of the Fibrinogen Aα□Thr312Ala Polymorphism Effects on Fibrin Structure and Function”; *Circulation* 2003, 107:2326-2330

- [23] Mary Cushman, Alexandra Cornell, Aaron R. Folsom, Lu Wang, MBBS, Michael Y. Tsai, Joseph Polak, and Zhonghua Tang; “Associations of the β -Fibrinogen Hae III and Factor XIII Val34Leu Gene Variants with Venous Thrombosis”; *Thromb Res.* 2007; 121(3): 339–345.
- [23] Martin J. Hessner,* Mary Ann Budish, and Kenneth D. Friedman; “Genotyping of Factor V G1691A (Leiden) without the Use of PCR by Invasive Cleavage of Oligonucleotide Probes”; *Clinical Chemistry* 46:8; 1051–1056 (2000)
- [25] Morteza BAGHERI, Isa Abdi RAD; “A Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) for the Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A”; *A Journal of Clinical Medicine*, Volume 6 No.1 2011
- [26] Ashkan Emadi, Matthew T. Crim, Daniel J. Brotman, Alejandro J. Necochea, Lipika Samal, Lisa M. Wilson Eric B. Bass and Jodi B. Segal; “Analytic validity of genetic tests to identify factor V Leiden and prothrombin G20210A”; *Am. J. Hematol.* 85:264–270, 2010.
- [27] Ravinder Sodi* Simon Darn Anthony Stott; “Rapid Detection of the Factor V Leiden Mutation by Real-Time PCR with TaqMan Minor Groove Binder Probes”; DOI: 10.1373/clinchem.2003.025924
- [28] Maria Erali, Ben Schmidt, Elaine Lyon and Carl Wittwer; “Evaluation of Electronic Microarrays for Genotyping Factor V, Factor II, and MTHFR”; *Clinical Chemistry* 49:5 732–739 (2003)
- [29] Iris Schrijver, MD, Marla J. Lay and James L. Zehnder, MD; “Diagnostic Single Nucleotide Polymorphism Analysis of Factor V Leiden and Prothrombin 20210G>A A Comparison of the Nanogen Electronic Microarray With Restriction Enzyme Digestion and the Roche LightCycler”; *Am J Clin Pathol* 2003;119:490-496
- [30] Vedat Koksall, Ibrahim Baris, Ozdal Etlik; “Primer-engineered multiplex PCR–RFLP for detection of MTHFR C677T, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations”; *Experimental and Molecular Pathology* 83 (2007) 1–3