

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PESQUISA DO FATOR V LEIDEN E DA MUTAÇÃO 20210A NO GENE
DA PROTROMBINA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO

AUTOR: GUSTAVO FIORAVANTI VIEIRA

Trabalho apresentado como
Conclusão de curso para obtenção
de título de Bacharel na área
Molecular do Curso de Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dra. Eliane Bandinelli
Co-orientador: Prof. Dr. Israel Roisenberg

BIO
BIO
164

PORTO ALEGRE, OUTUBRO DE 2002.

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC	Anticorpos anticardiolipinas
APC	Proteína C ativada
APCR	Resistência à proteína C ativada
APLS	Anticorpos antifosfolipídicos
AT	Antitrombina
ET	Eventos trombóticos
FVL	Fator V Leiden
LA	Lúpus anticoagulante
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
PC	Proteína C
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PS	Proteína S
β -2-GP-I	Beta-2-glicoproteína I
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TVP	Trombose venosa profunda

UFRRS
Instituto de Biociências
Biblioteca Setorial

Nº. Sistema
Registro
Nº. Origem
Data: 28/10/2010
Nº. Chamada: 210

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	1
1.1.1. ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDICOS.....	2
1.1.1.1. LÚPUS ANTICOAGULANTE.....	3
1.1.1.2. ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINAS.....	4
1.2. TROMBOSE.....	5
1.2.1. TROMBOSE VENOSA.....	6
1.2.2. TROMBOFILIAS HEREDITÁRIAS.....	7
1.2.2.1. FATOR V LEIDEN.....	8
a) FATOR V LEIDEN EM LES.....	10
1.2.2.2. MUTAÇÃO G20210A NO FATOR II.....	11
a) MUTAÇÃO G20210A EM LES.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. AMOSTRA.....	13
2.2. METODOLOGIA.....	13
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
3. RESULTADOS E PERSPECTIVAS.....	15
4. BIBLIOGRAFIA.....	17

1.INTRODUÇÃO

1.1.LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) continua sendo um dos enigmas da medicina clínica, pois trata-se de uma patologia sistêmica de etiologia desconhecida. Os pacientes apresentam sintomas clínicos variados, tais como artrites, serosites, nefrites, vasculites, miosites, pneumonites, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, quadros neuropsiquiátricos diversos e hiperatividade retículo-endotelial. Por serem estes sintomas tão diversos, convencionou-se a realização de diagnósticos através da associação de manifestações, conforme proposto pelos critérios diagnósticos do Colégio Americano de Reumatologia.

Participam de sua fisiopatogênese diversos fatores, incluindo processos imunológicos autodirecionados complexos, formação e deposição de imunocomplexos, ativação do complemento, dano tecidual mediado por células, ativação intravascular da coagulação e da agregação plaquetária, deficiências no sistema do complemento e liberação de citocinas (BRENNER et al., 2001).

Nas últimas quatro décadas a incidência de LES mais do que triplicou, passando de 1,51/100000 entre 1950-79 para 5,56/100000 entre 1980-92. O aumento da incidência de LES pode ser devido a um aumento na sobrevida dos pacientes. Durante a década de 1990 90% dos pacientes sobreviviam mais do que 5 anos após o início da manifestação da doença, enquanto que na década de 1950 apenas 50% alcançavam esse período. Atualmente 75-85% dos pacientes com LES apresentam uma sobrevida superior a 10 anos. O aumento na sobrevida resulta da combinação de diagnósticos precoces, novas terapias farmacológicas e melhor manejo clínico. Alguns estudos realizados na Ásia e África confirmam este quadro, onde apenas 60% dos pacientes de países como Malásia, China e Índia alcançam uma sobrevida de 10 anos e em países como Senegal apenas 70% conseguem sobreviver mais do que 1 ano (RUIZ-IRASTORZA et al., 2001).

Infecções são a principal causa de mortalidade em todos os estágios de LES. Mortalidade precoce é devido usualmente à doença ativa (infecções e exacerbações não

controladas), enquanto aterosclerose é a principal causa de morte tardia. Na revisão realizada por BRENNER et al. (2001), foi identificada a coronariopatia aterosclerótica como segunda causa mais comum de internação hospitalar. Tanto o sistema vascular coronariano quanto o cerebral e o periférico são afetados por trombose e vasculopatias, sendo importantes causas de mortalidade, morbidade e custo. A trombose é considerada a segunda manifestação mais freqüente depois das infecções, tendo em alguns casos a mesma responsabilidade pelo número de mortes (RUIZ-IRASTORZA et al., 2001).

Lúpus Eritematoso Sistêmico caracteriza-se pela presença de múltiplos autoanticorpos. Aproximadamente um terço dos pacientes com LES apresentam anticorpos antifosfolipídicos (aPLs) (LOVE & SANTORO, 1990).

1.1.1. ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDICOS (aPLs)

Anteriormente pensava-se que os aPLs eram dirigidos a fosfolipídeos aniônicos, atualmente sabe-se que os aPLs fazem parte de um grupo heterogêneo de autoanticorpos dirigidos a fosfolipídeos ligados a proteínas plasmáticas (ROUBEY, 1994).

Em pacientes com LES a presença de anticorpos antifosfolipídicos está associada a uma poderosa predisposição a eventos trombóticos (MALE et al., 2001). Embora essa associação esteja estabelecida, os mecanismos que a envolvem ainda não estão bem esclarecidos, sendo que várias propostas tem sido feitas tentando explicá-los, incluindo entre estas a ativação plaquetária promovida por aPLs, predispondo portanto pessoas a trombose e trombocitopenias (LOVE & SANTORO, 1990; LIN & WANG, 1992), distúrbios nas funções das células endoteliais (OOSTING et al., 1992) e relatos de anormalidades adquiridas da rota da proteína C associada com aPLs, com resistência à proteína C ativada (APCR) e diminuição da concentração plasmática da proteína S (MARCINIAK & ROMOND, 1989; PARKE et al., 1992). Em estudo realizado por MALE et al. (2001) em pacientes pediátricos com LES, foi encontrada uma interação significativa entre APCR e lúpus anticoagulante, ambos associados com um alto risco de eventos trombóticos (ETs). Concentrações de proteína S e proteína C não foram associadas com a presença de aPLs, APCR ou ETs.

Anticorpos antifosfolipídicos também são reconhecidas causas de complicações na gravidez, incluindo ocorrência de abortos espontâneos, morte-fetal e pré-eclampsia. Lúpus tende a reaparecer durante a gravidez, no entanto, esta reaparição tende a ser branda quando a doença é bem controlada, sendo associado com um aumento da prematuridade (RUIZ-IRASTORZA et al., 2001).

Existem dois grandes grupos de aPLs: lúpus anticoagulante e anticorpos anticardiolipinas.

1.1.1.1.LÚPUS ANTICOAGULANTE (LA)

Desde a década de 1950, observou-se a atividade anticoagulante *in vitro* do anticorpo lúpus anticoagulante, anos mais tarde soube-se que indivíduos com LES possuíam uma imunoglobulina que tinha a habilidade de prolongar os testes de coagulação dependentes de fosfolipídeos. Alguns estudos atuais indicam uma atividade anticoagulante *in vitro* dos aPLs, porém, de acordo com FIELD et al. (1999) isto se daria porque estes testes são feitos em condições estáticas de fluxo, bem diferentes daquelas que ocorrem durante a formação do trombo, e sugerem que, sob condições de fluxo sanguíneo, os aPLs propagariam a coagulação, facilitando a interação da protrombina com a parede do vaso sanguíneo danificado.

De acordo com artigo de revisão de BICK (2001) em torno de 10% dos pacientes com LES apresentam LA. Estes anticorpos também podem ser observados em outras condições, como tumores malignos, desordens linfoproliferativas e infecções virais (especialmente na infecção por HIV), ocorrendo também em associação com a ingestão de certas drogas, como a cocaína.

Entre os pacientes com LES, aproximadamente 25% apresentam uma deficiência na formação de trombina. Essa deficiência pode ser explicada pela análise de purificados de LA que inibem a ligação de protrombina e fator Xa a fosfolipídeos, inibindo a atividade do complexo requerido para a conversão de protrombina em trombina (ROUBEY, 1994). Embora exerça atividades pró-coagulante e anti-fibrinolítica, a trombina, juntamente com a

trombomodulina, ativa a proteína C, a qual inibe os fatores V e VIII da cascata de coagulação, desempenhando um papel anticoagulante.

A grande importância clínica da presença de LA está no fato de que pacientes que apresentam estes autoanticorpos tem um aumento no risco de adquirir doenças tromboembólicas, mais comumente trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar e trombose de grandes vasos (BICK, 2001). Em estudo feito por FIJNER et al. (1996) a ocorrência de LA é apontada como fator de risco para trombose arterial e trombose venosa.

1.1.1.2.ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINAS (AAC)

Os anticorpos anticardiolipinas não estão limitados à população de pacientes com lúpus, sendo também encontrados na população não lúpica. A presença de AACs está associada com trombose e tromboembolismo dos sistemas arterial e venoso, abortos recorrentes e trombocitopenia.

Anticorpos anticardiolipinas tem afinidade por importantes fosfolípidos envolvidos na hemostasia, sendo direcionados primariamente contra fosfatidilserina e fosfatidilinositol.

Algumas diferenças entre anticorpos anticardiolipinas e lúpus anticoagulante incluem diferentes apresentações clínicas. Anticardiolipinas são usualmente mas nem sempre dependentes de um co-fator *in vitro* (β -2-GP-I), enquanto que a atividade do lúpus anticoagulante *in vitro* apresenta-se independente de β -2-GP-I. Ambos autoanticorpos parecem ser direcionados para diferentes complexos fosfolipídicos, mas ao contrário dos LAs, purificados de AACs não prolongam os testes de coagulação dependentes de fosfolípidos (SHI et al., 1993).

Atualmente foram reconhecidos novos “subgrupos” de aPLs, anticorpos contra β -2-GP-I, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina e anti-anexina-V. Anti-anexina-V constitui-se no “subgrupo” mais recentemente associado com trombose arterial e venosa. Anexina-V é uma proteína ligada a fosfolípidos e um importante componente vascular, sendo que anticorpos dirigidos a essa

proteína parecem lesionar o endotélio levando, portanto, à tendências trombóticas (BICK, 2001).

1.2.TROMBOSE

O desenvolvimento de desordens trombóticas em humanos é uma das causas mais comuns de mortalidade e morbidade no mundo ocidental. Embora dados diretos de incidência e prevalência ainda sejam escassos, alguns estudos sugerem que a prevalência mínima de trombose venosa profunda está entre 5 e 10%, sendo que quando se inclui trombose arterial, outras trombozes venosas e condições trombóticas não diagnosticadas este número pode ser maior do que 10% (NORDSTROM et al., 1992).

A trombose consiste no processo de coagulação do sangue circulante dentro do sistema cardiovascular de um animal vivo. Resulta da formação de uma massa sólida ou semi-sólida, formada a partir dos constituintes do sangue, denominada trombo. A fisiopatologia básica da trombose é conhecida desde a proposta da Tríade de Virchow, na metade do século XIX, que inclui: 1) anormalidades na parede do vaso; 2) estase sangüinea; 3) mudanças na composição do sangue.

Existem dois tipos de trombose de acordo com a localização do trombo: a trombose arterial e a trombose venosa. Estas seriam formas amplas de classificação em que uma ocorre no sistema venoso onde predominam baixas condições de fluxo e pressão e outra em condições de alto fluxo e pressão que é o caso do sistema arterial. As duas patologias tem etiologias diferentes, tendo a trombose venosa, principalmente, associação com as alterações das proteínas envolvidas nos mecanismos coagulantes e anticoagulantes e trombo rico em fibrina. No caso da trombose arterial, o que ocorre geralmente são alterações na parede do vaso, aterosclerose, por exemplo. No sistema arterial o trombo apresenta-se rico em plaquetas e com uma rede frouxa de fibrina, forma-se primeiramente um agregado dessas plaquetas e fibrina na superfície vascular, a propagação do trombo e a fisiopatologia em muitas formas da trombose arterial continuam incertas. A parede vascular na trombose venosa não apresenta alterações histológicas e fatores extrínsecos ao vaso parecem desempenhar o papel principal na fisiopatologia. O trombo se forma sob condições repetidas de fluxo sangüineo lento até a completa estagnação.

1.2.1.TROMBOSE VENOSA

Esta doença apresenta uma incidência anual de aproximadamente 1/1000 indivíduos em países desenvolvidos (WHO, 1995). Em estudo de revisão feito por ROSENDAAL (1999), esse número pode variar entre 1/10000 antes dos 40 anos a 1/100 por ano em indivíduos com mais de 75 anos, demonstrando que o risco para trombose aumenta com a idade. Embora as razões não estejam totalmente claras, o mais provável é que seja uma combinação de fatores como diminuição da mobilidade e do tônus muscular e desgaste dos vasos.

A trombose venosa tem como manifestação clínica mais freqüente a trombose venosa profunda (TVP) dos membros inferiores, podendo levar a situações mórbidas como a síndrome pós-flebítica e a insuficiência respiratória no caso de tromboembolismo pulmonar (TEP). O tromboembolismo pulmonar ocorre pelo desprendimento e subsequente migração do trombo através da circulação até a obstrução dos vasos pulmonares, pela formação de um êmbolo. Conforme revisão de HIRSH & HOAK (1996), cerca de 30% dos indivíduos com TVP desenvolvem TEP e destes 10% morrem devido a estas complicações. Em trabalho de revisão de SCHAFER (1999) são apresentados dados de que 80% dos pacientes que morrem de TEP sucumbem dentro de duas horas do início dos sintomas, o que demonstra que a intervenção deve se concentrar na prevenção. Tromboembolismo pulmonar também é apontado como causa mais freqüente de morte pós-parto.

Em todos os casos de trombose o mecanismo central da patogênese são perturbações do sistema hemostático, onde a natureza da doença difere dependendo da localização. Influências transientes ou duradouras de fatores ambientais podem ser importantes na perturbação hemostática e portanto aumentar o risco tanto na trombose venosa como na arterial. O termo fator ambiental é também chamado de fator adquirido e é usado de forma ampla para englobar todos aqueles fatores capazes de induzir algum tipo de mudança, dentre estes podemos destacar: cirurgias, gravidez, puerpério, uso de anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal, câncer, quimioterapia e anticorpos antifosfolipídicos. Ainda que sem evidências contundentes pode-se citar também

como fatores adquiridos: dieta, diabetes, fumo, hiperlipidemia e aterosclerose (WHO, 1995).

1.2.1.1. TROMBOFILIAS HEREDITÁRIAS

Trombofilias hereditárias são tendências geneticamente determinadas para tromboembolismo venoso e que se desenvolve normalmente em pacientes jovens (menos de 45 anos) e que tendem a ser recorrentes.

Até o ano de 1965, o fato de que a trombose venosa pudesse ter um traço herdável ainda não era totalmente reconhecido. Neste ano então foi feito um estudo com uma família com trombofilia em que esta foi associada com a heterozigosidade para a deficiência de antitrombina (AT) (EGEBERG, 1965). Desde então alguns componentes da cascata de coagulação e do sistema fibrinolítico têm sido estudados para determinar seus possíveis papéis na trombose herdada. Em revisão feita por KOELEMAN et al. (1997) são apontadas as prováveis anormalidades aceitas como fatores de risco genético para trombose venosa: deficiência da proteína C (PC), deficiência da proteína S (PS), estas duas últimas envolvem os principais inibidores fisiológicos do sistema de coagulação sangüínea, deficiência da antitrombina (AT), a mutação do Fator V Leiden e mais recentemente o alelo 20210A do gene da protrombina. Por causa desses fatores de risco serem segregados de maneira autossômica dominante, pensava-se que as trombofilias poderiam ser causadas por um defeito de um gene dominante com penetrância incompleta.

A importância dessas proteínas (PC, PS e AT) é demonstrada em trabalhos como o de MARTINELLI et al. (1998) em que 90% dos pacientes com deficiência para AT, 88% para PC e 100% para PS apresentavam TVP com ou sem TEP. Ou então no trabalho de PABINGER et al. (1996) em que 50% dos pacientes com deficiência de AT provavelmente desenvolveriam trombose até os 21 anos. No caso de deficiência para PC e PS 50% dos indivíduos desenvolveriam trombose até os 26 anos.

Apesar da trombose venosa ser considerada uma doença multifatorial, que envolve a interação de fatores genéticos e adquiridos, pouco se sabe quanto cada um desses fatores

contribui para o desenvolvimento da doença. SOUTO et al. (2000) concluíram que mais de 60% da suscetibilidade para trombose é atribuída a fatores genéticos.

Os mais comuns fatores de risco genéticos associados com trombose venosa são a resistência a proteína C ativada (APCR), a qual é causada pelo fator V Leiden e a mutação pontual (G20210A) no gene da protrombina.

1.2.1.1.1.FATOR V LEIDEN

O fator V é uma glicoproteína de 300 Kd, tendo como principais sítios de síntese o fígado e os megacariócitos. O gene que codifica esta proteína está localizado no cromossomo 1 na região 1q21-25, contém 25 exons e uma extensão de 80 Kb (CRIPE et al., 1992).

De todos os fatores que predispõe a trombose venosa, a resistência a proteína C ativada (APCR) tem sido apontada como a mais prevalente. Este fenótipo é causado por uma mutação pontual no gene do fator V (fator V Leiden), salientando que esta mutação já foi associada em 95% dos casos de APCR (BERTINA et al., 1994).

A mutação do gene do fator V localiza-se na região do exon 10, nucleotídeo 1691 G→A e acarreta uma substituição da arginina 506 por uma glutamina (R506Q). Estudo feito através da análise de haplótipos por COX et al. (1996) indicam que o aparecimento desse alelo teria ocorrido em uma única mutação e em um período recente na população européia. Esta substituição de aminoácidos ocorre em um dos três sítios de clivagem do fator Va pela APC, os outros dois sítios seriam a Arg 306 e Arg 679. Ainda não se sabe ao certo a cinética dessas clivagens, no entanto o que se sabe é que sem o sítio de clivagem da Arg 506 não ocorre a total inativação do fator V (BERTINA et al., 1994). Como o fator V complexado com o fator Xa e com fosfolípídeos ativam a protrombina em trombina, ocorre um favorecimento dos processos de coagulação.

Sabe-se também que o fator V tem participação nos processos anticoagulantes, pois este na presença da proteína S acentua a degradação do fator VIIIa pela APC (SHEN & DAHLBÄCK, 1994).

Em revisão feita por ZÖLLER et al. (1999) a presença do fator V Leiden é associado com um aumento do risco entre 5 e 10 vezes e é encontrado com uma frequência entre 20 e 60 % dos pacientes caucasóides.

RINTELEN et al. (1996) realizaram um trabalho na Áustria tentando avaliar o risco de recorrência em pacientes que apresentavam história de tromboembolismo venoso. Entre os pacientes homozigotos para o fator V Leiden, todos haviam experimentado eventos tromboembólicos recorrentes, já em indivíduos heterozigotos a proporção de recorrência não foi significativamente diferente entre pacientes e grupo controle.

Embora exista uma variação na frequência do fator V Leiden em diferentes populações, este tem se demonstrado um importante fator de risco para trombose. Em revisão feita por EMMERICH et al. (2001) foram apresentados valores de análise de oito estudos de caso-controle. Alguns serão citados a seguir, apresentando respectivamente as frequências do fator V Leiden nos controles e nos pacientes: na Holanda foram 3% e 19,5%, na Suécia as frequências foram 2,8% e 11,4%, no Reino Unido 4,3% e 14,9%, na Itália 2,9% e 19,7%, no Brasil 6,1% e 8,5% e na França as frequências foram de 3,8% e 20,4%. Observa-se claramente que o estudo realizado no Brasil apresentou uma menor diferença nas frequências apresentadas, isso é facilmente entendido pelo fato de todos os outros países apresentarem populações principalmente caucasóides.

MARTINELLI et al. (1998) associaram a presença do FVL a manifestações trombóticas mais brandas como trombose venosa superficial. Em contrapartida LEROYER et al. (1997) não observaram diferenças significativas na severidade dos episódios de trombose entre pacientes diferenciados segundo a presença de FVL. No entanto o FVL pode ser importante atuando como fator de risco adicional, exemplo disso é o observado em usuários de anticoncepcionais orais em que a incidência pode ser dez vezes maior naqueles que apresentam fator V Leiden do que os que não apresentam (DIZON-TOWSON et al., 1995).

Outro trabalho realizado na Suécia corrobora com os dados apresentados anteriormente, onde a mutação R506Q está presente em mais de um quarto dos pacientes suecos com suspeitas clínicas de TVP, indicando que APCR é o maior fator de risco

trombótico que contribui para a alta incidência de trombose venosa na Suécia (SVENSSON et al., 1997).

a) FATOR V LEIDEN EM LES

Como foi descrito anteriormente pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e com presença de anticorpos antifosfolipídicos apresentam freqüentes episódios de tromboembolismo arterial e venoso, portanto é razoável imaginar que estes episódios podem estar sendo influenciados por um fator de risco genético, como a presença do fator V Leiden.

Entretanto, estudos realizados por diversos autores não evidenciaram, em princípio, a associação entre o fator V Leiden e a trombose venosa em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (TORRESAN et al., 2000; CHOPRA et al., 2002; PABLOS et al., 1999; REGECZY et al., 2000; DIZON-TOWSON et al., 1995).

Outros trabalhos, no entanto, já fizeram associações da presença do FVL com trombose em pacientes lúpicos (FIJNHEER et al., 1996; TOPALOGLU et al., 2001; SIMANTOV et al., 1996). É importante salientar que no trabalho de TOPALOGLU et al. (2001) além da associação foi também observado que o risco de desenvolver trombose venosa em pacientes lúpicos que apresentavam FVL era três vezes maior do que aqueles que não apresentavam o alelo mutado.

É importante sempre salientar que o FVL pode ser um fator trombogênico aditivo, predispondo a várias desordens vasooclusivas no LES. É o caso, por exemplo, de alguns indivíduos heterozigotos para FVL com LES da Hungria onde não foi possível observar uma associação do FVL com trombose em pacientes com LES, mas que no entanto se observou uma tendência desses indivíduos a terem um significativo aumento da prevalência de perdas fetais em até quatro vezes (REGECZY et al., 2000).

1.2.1.1.2. MUTAÇÃO G20210A NO GENE DA PROTROMBINA

A mutação no gene da protrombina é considerada como segundo fator de risco genético mais comum em pacientes com trombose venosa. Esta mutação está localizada na região 3' não traduzida do gene do fator II, não alterando a sequência da cadeia de aminoácidos da molécula da protrombina (POORT et al., 1996).

O gene que codifica a protrombina localiza-se no cromossomo 11, na região 11p11-q12. Este gene é composto de 14 exons separado por 13 íntrons, o mRNA codificado possui uma extensão de 2,1 Kb (TUDDENHANM & COOPER, 1994).

Há pouca coisa na literatura antes de 1996 relacionando protrombina, zimogênio de 72 Kd da serino-protease trombina, com trombose venosa. Esta enzima demonstra-se importante em mecanismos pró-coagulantes, anti-coagulantes e antifibrinolíticos.

No trabalho de POOR et al. (1996) já havia sido observado a relação do alelo 20210A com o aumento dos níveis de protrombina, ainda que sem saber qual o mecanismo pelo qual o polimorfismo influenciaria esses níveis, os autores sugerem que esta influência pode estar ligada a estabilidade do mRNA ou que o polimorfismo possa estar em desequilíbrio de ligação com outra mutação ainda não detectada. Em trabalho posterior SORIA et al., (2000) demonstrou a primeira evidência genética direta de que um polimorfismo no gene da protrombina influencia os níveis dessa proteína, suportando a conclusão de que G20210A é um polimorfismo funcional.

No mesmo artigo de revisão realizado por EMMERICH et al. (2001), em que se observava a importância do FVL como fator de risco para trombose através da variação da frequência desse alelo nos estudos de caso-controle, haviam análises similares referentes ao polimorfismo G20210A e esses resultados indicavam que também esse polimorfismo era de grande importância para o desenvolvimento de trombose.

Outra similaridade entre a mutação do gene da protrombina com o fator V Leiden está na possível origem do alelo 20210A, é o que diz o trabalho de ZIVELIN et al. (1998) onde a origem do alelo é sugerida ter sido um único evento e que este provavelmente tenha ocorrido após a divergência entre africanos de não-africanos e entre caucasóides dos mongóis.

O risco de recorrência de trombose venosa em pacientes que apresentavam o alelo 20210A foi avaliado em trabalho de DE STEFANO et al. (1999) porém nesse estudo não foi avaliada a influência da mutação da protrombina sozinha no desenvolvimento de trombozes, o risco foi avaliado juntamente com a presença ou não do FVL. Os resultados apontaram para um aumento significativo do risco de recorrência quando as duas alterações apresentavam-se juntas, sendo que somente a presença do FVL não alterava significativamente o risco.

a) MUTAÇÃO G20210A EM LES

Por ser o segundo fator de risco genético mais comum em pacientes com trombose venosa, a mutação do gene da protrombina torna-se também um importante elemento a ser investigado quando se quer fazer um estudo envolvendo a elucidação da relação entre trombose e lúpus eritematoso sistêmico.

Assim como no caso do fator V Leiden, a mutação G20210A do gene do fator II tem demonstrado difícil de se associar com o risco de desenvolver trombose venosa em pacientes com anticorpos antifosfolipídicos (GALLI et al., 2000; TOPALOGLU et al., 2001; CHOPRA et al., 2002).

TORRESAN et al. (2000) encontraram uma maior prevalência do alelo mutado (20210A) no grupo dos pacientes sugerindo que esta variante poderia aumentar o risco de trombose nos pacientes com lúpus.

Talvez uma outra abordagem seria a de realizar estudos de associação entre os fatores de risco genéticos e lúpus eritematoso sistêmico, entre os pacientes que desenvolvessem trombose venosa.

Este estudo teve como objetivo comparar as frequências do fator V Leiden e do alelo 20210A do gene da protrombina entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e um grupo controle.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1.AMOSTRA

PACIENTES: foram estudados 100 indivíduos portadores de lúpus eritematoso sistêmico, diagnosticados e coletados no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, encaminhadas ao Departamento de Genética da UFRGS pelo Dr. Ricardo Machado Xavier.

CONTROLES: foi utilizada uma amostra de 220 indivíduos caucasóides doadores de banco de sangue do estado do Rio Grande do Sul.

2.2.METODOLOGIA

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO: o DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico através de procedimento padrão utilizando detergente não-iônico (LAHIRI & NURBERGER JR, 1991). A extração de DNA das amostras dos pacientes foi realizada no Laboratório de Imunogenética da UFRGS e cedidas pelo Prof. Dr. José Arthur Bogo Chies. A extração das amostras do grupo controle foi realizada no Laboratório de Hemostasia da UFRGS.

AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO E ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS: as amostras de DNA foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Cada reação de amplificação continha 0,4 μ M de cada “primer”; 200 μ M de cada dNTP; tampão de PCR 1X (na concentração final de: 10mM Tris-Cl ph 8,3, 50mM KCL, 1,5mM MgCl₂); uma unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase; 100-500ng de DNA genômico e água q.s.p. 25 μ l.

A verificação da eficiência da amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% e 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

A identificação do polimorfismo G1691A do gene do fator V (FVL) foi feita através da incubação dos fragmentos amplificados com a endonuclease de restrição *HindIII* conforme descrito por CHAMOULARD et al. (1999). A presença do alelo mutado leva a subdivisão do fragmento de DNA amplificado de 143pb em subfragmentos de 111pb e 32 pb. Na ausência da mutação, o fragmento de 143 permanece inalterado. A visualização dos alelos foi feita após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.

A mutação 20210A do gene do fator II foi identificada pela utilização da endonuclease de restrição *HindIII*, como descrito por POORT et al. (1996). O fragmento de DNA amplificado apresenta 345pb, na presença do alelo A este fragmento é clivado pela enzima *HindIII*, resultando nos subfragmentos de 322pb e 23pb. Na presença do alelo G, o fragmento de 345 permanece inalterado. Após a clivagem com a enzima de restrição, os fragmentos de DNA foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS: a distribuição dos polimorfismos nos grupos estudados foram determinadas pela contagem direta dos alelos, e as diferenças das freqüências alélicas entre os grupos de pacientes e controles foram comparadas através do teste de qui-quadrado (χ^2).

3.RESULTADOS E PERSPECTIVAS

As frequências do fator V Leiden e do alelo 20210A do gene da protrombina nos pacientes e no grupo controle estão representadas na Tabela 1. A mutação do fator V Leiden estava presente em apenas um indivíduo com LES, sendo este indivíduo heterozigoto para a alteração. Quanto a mutação do gene do fator II, três indivíduos apresentaram o alelo mutado, também neste caso os indivíduos apresentavam a mutação em heterozigosidade.

Tabela 1: Frequência de heterozigotos para o FVL e o alelo 20210A nos dois grupos estudados.

Polimorfismos	Pacientes (LES)	Controles	P
Fator V Leiden	0,01 (1)	0,023 (5)	0,437
20210A	0,03 (3)	0,018 (4)	0,503

* Valores de P foram baseados nos testes de χ^2 .

A partir das frequências alélicas encontradas para o grupo de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico comparadas com as frequências do grupo controle, observa-se que estes dois grupos não diferem estatisticamente em nenhuma das duas alterações estudadas.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com outros trabalhos descritos anteriormente, onde as frequências do FVL e do alelo 20210A não diferiam entre os grupos de pacientes lúpicos e de controles, porém seria interessante investigar se estas alterações podem ser importantes no aparecimento de trombose nestes pacientes, conforme sugere o trabalho de GALLI et al. (2000) realizado na Itália em que a princípio a frequência do FVL em pacientes com lúpus apresentava-se similar a da população em geral, porém observou-se que 100% dos pacientes com LES e portadores da mutação FVL apresentavam trombose venosa.

A obtenção de novas informações à respeito dos pacientes estudados, através da análise dos prontuários, permitirá outros tipos de abordagens a partir dos dados obtidos, como a classificação dos pacientes de acordo com os seguintes critérios: idade, tempo de duração da doença (LES), presença de trombose venosa (TVP, embolia pulmonar, tromboflebitis), presença de trombose arterial (AVC, infarto do miocárdio), abortos espontâneos e uso de anticoncepcionais orais.

4.BIBLIOGRAFIA

- BERTINA, R.M., KOELEMAN, B.P.C., KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., DIRVEN, R.J., RONDE, H., VAN DER VELDEN, P.A., REITSMA, P.H. (1994). Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C. **Nature**, **369**: 64-67.
- BICK, R.L. (2001). Antiphospholipid Thrombosis Syndromes. **Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis**, **7**: 241-258.
- BRENNER, M., XAVIER, R.M., BRENOL, J.C.T. (2001). Risco de Vasculopatia Aterosclerótica no Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Ano X nº 2**: 68-72.
- CHAMOUARD, P., PENCREACH, E., MALOISEL, F., GRUNEBaum, L., ARDIZZONE, J.F., MEYER, A., GAUB, M.P., GOETZ, J., BAUMANN, R., URING-LAMBERT, B., LEVY, S., DUFOUR, P., HAUPTMANN, G., OUDET, P. (1999). Frequent Factor II G20210A Mutation in Idiopathic Portal Vein Thrombosis. **Gastroenterology**, **116**: 144-148.
- CHOPRA, N., KOREN, S., GREER, W.L., FORTIN, P.R., RAUCH, J., FORTIN, I., SENEAL, J.L., DOCHERTY, P., HANLY, J.G. (2002). Factor V Leiden, prothrombin gene mutation, and thrombosis risk in patients with antiphospholipid antibodies. **The Journal of Rheumatology**, **29**: 1683-1688.
- COX, M.J., REES, D.C., MARTINSON, J.J., CLEGG, J.B. (1996). Evidence for a single origin of factor V Leiden. **British Journal of Haematology**, **92**: 1022-1025.

CRIFE, L.D., MOORE, K.D., KANE, W.H. (1992). Structure of the Gene for Human Coagulation Factor V. **Biochemistry**, **31**: 3777-3785.

DE STEFANO, V., MARTINELLI, I., MANUCCI, P.M., PACIARONI, K., CHIUSOLO, P., CASORELLI, I., ROSSI, E., LEONE, G. (1999). The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both Factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. **The New England Journal of Medicine**, **341**: 801-806.

DIZON-TOWSON, D., HUTCHISON, C., SILVER, R., BRANCH, D.W., WARD, K. (1995). The Factor V Leiden Mutation which Predisposes to Thrombosis Is Not Common in Patients with Antiphospholipid Syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, **74**: 1029-1031.

EGEBERG, O. (1965). Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. **Thrombosis and Diathesis Haemorrhagica**, **13**: 516-530.

EMMERICH, J., ROSENDAAL, F.R., CATTANEO, M., MARGAGLIONE, M., DE STEFANO, V., CUMMING, T., ARRUDA, V., HILLARP, A., RENY, J. (2001). Combined Effect of Factor V Leiden and Prothrombin 20210A on the Risk of Venous Thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, **86**: 809-816.

FIELD, S.L., HOGG, P.J., DALY, E.B., DAI, Y.P., MURRAY, B., OWENS, D., CHESTERMAN, C.N. (1999). Lupus Anticoagulants Form Immune Complexes With Prothrombin and Phospholipid That Can Augment Thrombin Production in Flow. **Blood**, **94**: 3421-3431.

FIJNHEER, R., HORBACH, D.A., DONDEERS, R.C.J.M., VILÉ, H., OORT, E.V., NIEUWENHUIS, H.K., GMELIG-MEIJLING, F.H.J., DE GROOT, P.G.,

- DERKSEN, R.H.W.M. (1996). Factor V Leiden, Antiphospholipid Antibodies and Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus. **Thrombosis and Haemostasis**, **76**: 514-517.
- GALLI, M., FINAZZI, G., DUCA, F., NORBIS, F., MOIA, M. (2000). The G1691A mutation of factor V, but not the G20210A mutation of factor II or the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase genes, is associated with venous thrombosis in patients with lupus anticoagulants. **Brazilian Journal of Haematology**, **108**: 865-870.
- HIRSH, J., & HOAK, J. (1996). Management of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. **Circulation**, **93**: 2212-2245.
- KOELEMAN, B.P.C., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M. (1997). Familial Thrombophilia: A Complex Genetic Disorder. **Seminars in Hematology**, **34**: 256-264.
- LEROYER, C., MERCIER, B., ESCOFFRE, M., FÉREC, C., MOTTIER, D. (1997). Factor V Leiden Prevalence in Venous Thromboembolism Patients. **CHEST**, **111**: 1603-1606.
- LIN, Y.L. & WANG, C.T. (1992). Activation of human platelets by the rabbit anticardiolipin antibodies. **Blood**, **80**: 3135-3143.
- LOVE, P.E. & SANTORO, S.A. (1990). Antiphospholipid Antibodies: Anticardiolipin and the Lupus Anticoagulant in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and in Non-SLE Disorders. **Annals of Internal Medicine**, **112**: 682-698.
- MALE, C., MITCHELL, L., JULIAN, J., VEGH, P., JOSHUA, P., ADAMS, M., DAVID, M., ANDREW, M.E. (2001). Acquired activated protein C resistance is associated

- with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. **Blood**, **97**: 844-849.
- MARCINIAC, E. & ROMOND, E.H. (1989). Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. **Blood**, **74**: 2426-2432.
- MARTINELLI, I., MANUCCI, P.M., DE STEFANO, V., TAIOLI, E., ROSSI, V., CROSTI, F., PACIARONI, K., LEONE, G., FAIONI, E.M. (1998). Different Risks of Thrombosis in Four Coagulation Defects Associated With Inherited Thrombophilia: A Study of 150 Families. **Blood**, **92**: 2353-2358.
- NORDSTROM, M., LINDBLAD, B., BERGQVIST, D., KJELLSTROM, T. (1992). A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. **Journal of Internal Medicine**, **232**:155-160.
- OOSTING, J.D., DERKSEN, R.H., BLOKZIJL, L., SIXMA, J.J., DE GROOT, P.J. (1992). Antiphospholipid antibody positive sera enhance endothelial cell procoagulant activity-studies in a thrombosis model. **Thrombosis and Haemostasis**, **68**: 278-284.
- PABINGER, I. & SCHNEIDER, B. (1996). Thrombotic Risk in Hereditary Antithrombin III, Protein C, or Protein S Deficiency. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, **16**: 742-748.
- PABLOS, J.L., CALIZ, R.A., CARREIRA, P.E., ATSUMI, T., SERRANO, L., AMENGUAL, O., SANTIAGO, B., KHAMASHTA, M.A., HUGHES, G.R.V., GOMEZ-REINO, J.J. (1999). Risk of Thrombosis in Patients with Antiphospholipid Antibodies and Factor V Leiden Mutation. **The Journal of Rheumatology**, **26**: 588-590.

- PARKE, A.L., WEINSTEIN, R.E., BONA, R.D., MAIER, D.B., WALKER, F.J. (1992).
The thrombotic diathesis associated with the presence of phospholipid antibodies may be due to low levels of free protein S. **American Journal of Medicine**, **93**: 49-56.
- POORT, S.R., ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M. (1996). A
Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. **Blood**, **88**: 3698-3703.
- REGECZY, N., LAKOS, G., BALOGH, I., AJZNER, E., KISS, E., SZEGEDI, G. (2000).
The Leiden mutation of coagulation factor C in Hungarian SLE patients. **Clinical Applied Thrombosis Haemostasis**, **6**: 41-45.
- RINTELEN, C., PABINGER, I., KNÖBI, P., LECHNER, K., MANHALTER, C. (1996).
Probability of Recurrence of Thrombosis in Patients with and without Factor V Leiden. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 229-232.
- ROSENDAAL, F.R. (1999). Risk Factors for Venous Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 610-619.
- ROUBEY, R.A.S. (1994). Autoantibodies to Phospholipid-Binding Proteins: A New View of Lupus Anticoagulants and Other "Antiphospholipid" Autoantibodies. **Blood**, **84**: 2854-2867.
- RUIZ-IRASTORZA, G., KHAMASHTA, M.A., CASTELLINO, G., HUGHES, G.R.V. (2001). Systemic lupus erythematosus. **The Lancet**, **357**: 1027-1032.
- SCHAFER, A.I. (1999). Venous Thrombosis as a Chronic Disease. **The New England Journal of Medicine**, **12**: 955-956.

- SHEN, L. & DAHLBÄCK, D. (1994). Factor V and Protein S as Synergistic Cofactors to Activated Protein C in Degradation of Factor VIIIa. **Journal Biological Chemistry**, **269**: 18735-18738.
- SIMANTOV, R., LO, S.K., SALMON, J.E., SAMMARITANO, L.R., SILVERSTEIN, R.L. (1996). Factor V Leiden increases the risk of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. **Thrombosis Research**, **84**: 361-365.
- SOUTO, J.C., ALMASY, L., BORREL, M., BLANCO-VACA, F., MATEO, J., SORIA, J.M., COLL, I., FELICES, R., STONE, W., FONTCUBERTA, J., BLANGERO, J. (2000). Genetic Susceptibility to Thrombosis and its Relationship to Physiological Risk Factors: The GAIT Study. **American Journal of Human Genetics**, **67**: 1452-1459.
- SVENSSON, P.J., ZÖLLER, B., MATTIASSON, I., DAHLBÄCK, B. (1997). The factor VR506Q mutation causing APC resistance is highly prevalent amongst unselected outpatients with clinically suspected deep venous thrombosis. **Journal of Internal Medicine**, **241**: 379-385.
- TOPALOGLU, R., AKIERLI, C., BAKKALOGLU, A., AYDINTUNG, O., OZEN, S., BESBAS, N., OZCELIK, T. (2001). Survey of Factor V Leiden and Prothrombin Gene Mutation in Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Rheumatology**, **20**: 259-261.
- TORRESAN, M., MACHADO, T.F., SIQUEIRA, L.H., OZELO, M.C., ARRUDA, V.R., ANNICHINO-BIZZACHI, J.M. (2000). The impact of the search for thrombophilia risk factors among antiphospholipid syndrome patients with thrombosis. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, **11**: 679-682.

TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. (1994). **The Molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 585pp.

ZIVELIN, A., ROSENBERG, N., FAIER, S., KORNBROT, N., PERETZ, H., MANNHALTER, C., HORELLOU, M.H., SELIGSOHN, U. (1998). A Single Origin for the Common Prothrombotic G20210A Polymorphism in the Prothrombin Gene. **Blood**, **92**: 1119-1124.

ZÖLLER, B., DE FRUTOS, P.G., HILLARP, A., DAHLBÄCK, B. (1999). Thrombophilia as a multigenic disease. **Haematologica**, **84**: 59-70.