

*Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar*  
*Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil*  
*Thomas Jefferson Medical College*

**Estudo de marcadores genéticos de risco na  
discriminação de doentes oncológicos em risco  
de desenvolver doença tromboembólica**

*Tese de Mestrado de*

**Maria Teresa Fernandes Cunha**

Porto 2004

*Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar  
Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil  
Thomas Jefferson Medical College*

## **Mestrado em Oncologia**

# **Estudo de marcadores genéticos de risco na discriminação de doentes oncológicos em risco de desenvolver doença tromboembólica**

*Dissertação apresentada pela licenciada Maria Teresa Fernandes Cunha, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Oncologia, sob a orientação do Prof. Doutor José Manuel Cabeda*

Porto, 2004

# Agradecimentos

Queria deixar aqui os meus agradecimentos a todos os que, de uma forma ou de outra, colaboraram comigo, tornando possível a elaboração deste trabalho.

Agradeço especialmente ao Professor Doutor José Manuel Cabeda pela disponibilidade e simpatia e pela forma como me orientou durante o trabalho laboratorial e a elaboração da tese.

À Dr.<sup>a</sup> Alexandra Estevinho, minha amiga querida, pelo encorajamento e companheirismo e sobretudo pela amizade.

Ao Dr. José Miguel Oliveira cuja ajuda foi indispensável para a realização deste trabalho e que dedicou muito do seu tempo a este projecto. Obrigada pela simpatia e pelo apoio.

Às Dr.<sup>a</sup> Mónica Pereira, Dr.<sup>a</sup> Cristina Bacelar Correia e Dr.<sup>a</sup> Maria Luís Amorim pela forma carinhosa como me acolheram no laboratório.

Queria agradecer também aos meus pais e ao Daniel pelo apoio e encorajamento dado ao longo deste projecto.

# Abstract

Thrombosis has long been identified as a frequent complication of cancer, and has been described as the second most common cause of death in cancer patients.

Since tumour cells activate in a number of ways the haemostatic system, cancer is a pro-thrombotic condition. In addition to the neoplasia, therapeutic proceedings per se are also risk factors predisposing to thrombosis. Despite the extensive studies involving numerous coagulation activation markers, the multifactorial nature of thrombosis in these patients makes their risk of thrombosis still difficult to define. The numerous genetic risk factors identified in recent years constitute potentially useful markers whose value needs to be clarified.

Despite extensive studies aiming at the identification of the causes of thrombosis in cancer, these are still poorly understood. The relevant risk factors include the site of cancer, use of chemotherapy and central catheters, surgery and hormone therapy.

The role of genetic risk factors in thrombosis has been less well studied in the context of the cancer patient, but is otherwise extensively documented. It is nowadays generally accepted that Factor-V-Leiden and Prothrombin G20210A are major genetic risk factors for thrombosis. Other polymorphisms such as MTHFR C677T, PAI-1 4G/5G and hpa-1a/1b have also been studied, but their role is controversial. Furthermore, recent reports have indicated that the clarification of the role of these polymorphisms in thrombosis is further complicated by their interaction with each other, and with the environmental risk factors. Modulation of the effect of these polymorphisms has been clearly demonstrated for the interaction of Factor-V with Prothrombin, as well as of these polymorphisms with estrogen replacement therapy, suggesting that exclusion of polymorphic loci from

the study, albeit economically sound may lead to erroneous conclusions, or at least result in incomplete information.

In the present work we investigated the possible use of genetic polymorphisms (Factor-V-Leiden, Prothrombin G20210A, MTHFR C677T, PAI-1 4G/5G and hpa-1a/1b) in the identification of cancer patients at risk of developing thrombosis.

**Results:** Significantly more solid tumour cases were found in the thrombosis group in comparison with the controls. Only FV-Leiden and homozygous MTHFR were found to be different between the patient and the control group when studied individually. A binary logistic regression was used to derive a genetic risk score. The resulting significant regression ( $p < 0,001$ ; Odds Ratio= 17.483 (2.162-141.340)) used only the number of alleles of Factor-V-Leiden, Prothrombin 20210A and presence of MTHFR 677T homozygosity. This score index was then used to discriminate patients at risk of developing thrombosis yielding a sensitivity of 31%, specificity of 97.5%, Positive Predictive Value of 92.9% and negative predictive value of 57%.

**Conclusion:** Genetic risk factors, if considered as a panel of genetic assays may have a predictive value for thrombosis in oncology patients, particularly if considered in the context of the remaining risk factors.

# Resumo

Há muito que a trombose foi identificada como uma complicação frequente do cancro e foi descrita como a segunda causa mais comum de morte nos doentes com cancro.

Uma vez que as células tumorais activam um grande número de mecanismos hemostáticos, o cancro é um factor pró-trombótico. Para além da neoplasia, também os procedimentos terapêuticos por si só envolvem numerosos marcadores de activação da coagulação. A natureza multifactorial da trombose, nestes doentes torna difícil a definição do risco de trombose.

Os numerosos factores de risco identificados nos últimos anos constituem marcadores potencialmente válidos cuja utilidade tem que ser clarificada.

Embora sejam muitos os estudos feitos para identificar as causas da trombose nos doentes com cancro, estas ainda são mal conhecidas. Alguns factores de risco relevantes incluem o local do cancro, a utilização de quimioterapia, de cateters centrais ou de hormonoterapia e cirurgia.

Apesar do papel dos factores genéticos de risco de trombose estar bem documentado, tem sido menos estudado no contexto dos doentes com cancro.

Actualmente é aceite que o Factor V Leiden e a protrombina G20210A são os principais factores genéticos de risco de trombose. Outros polimorfismos como a metileno-tetra-hidrofolato redutase C677T, o PAI-1 4G/5G e o HPA-1a/1b também têm sido estudados, mas o seu papel é controverso.

No entanto, recentes estudos indicam que a clarificação do papel destes polimorfismos na trombose é mais complicada, pela interacção entre si e com factores de risco ambientais.

A modulação deste efeito tem sido claramente demonstrado pela interacção entre o

Factor V Leiden e a protrombina, assim como entre estes polimorfismos e a terapia hormonal de substituição, sugerindo que a exclusão de polimorfismos do estudo pode conduzir a conclusões erróneas ou, pelo menos, resultar em informação incompleta.

O presente estudo pretendeu investigar a utilidade dos polimorfismos genéticos (Factor V Leiden, protrombina G20210A, metilenotetrahidrofolato redutase C677T, PAI-1 4G/5G e HPA-1a/1b) na identificação de doentes com cancro em risco de desenvolverem trombose e na discriminação de doentes com cancro que possam beneficiar de profilaxia antitrombótica.

**Resultados:** Dos doentes oncológicos estudados, um número significativo de doentes com tumores sólidos foram encontrados no grupo de doentes com trombose.

Apenas o factor V Leiden e a MTHFR 677T em homozigotia apresentaram uma frequência diferente entre o grupo com trombose e o grupo sem trombose.

Foi encontrada uma regressão que relaciona significativamente o factor V Leiden, a protrombina e a MTHFR 677T em homozigotia com a ocorrência de trombose ( $p < 0,001$ ; Odds Ratio= 17.483 (2.162-141.340)).

Este índice, utilizado para discriminar os doentes em risco de desenvolverem trombose apresentou uma sensibilidade de 31%, uma especificidade de 97,5%, um valor predizente positivo de 92,9% e um valor predizente negativo de 57%.

**Conclusão:** Este estudo sugere que os factores genéticos de risco devem ser avaliados nos doentes oncológicos, particularmente se forem considerados também no contexto de outros factores de risco presentes nestes doentes.

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1– TROMBOSE VENOSA.....	3
1.1.1. <i>Factores de Risco de Trombose venosa.....</i>	4
1.2- TROMBOSE ARTERIAL.....	5
1.2.2. <i>Factores de risco de trombose arterial.....</i>	6
1.3- TROMBOSE E O CANCRO.....	7
1.4- TROMBOFÍLIA HEREDITÁRIA.....	11
1.4.1- <i>Factor V Leiden.....</i>	12
1.4.2- <i>Protrombina G20210A.....</i>	16
1.4.3 - <i>Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR) C677T.....</i>	18
1.4.4 - <i>Inibidor do Activador do Plasminogénio tipo 1 (PAI-1) 4G/5G.....</i>	20
1.4.5 - <i>Antigénio das Plaquetas Humanas (HPA) -1a/b.....</i>	22
1.5 - PCR EM TEMPO REAL.....	24
1.5.1 - <i>Detecção de mutações no sistema LightCycler.....</i>	25
1.5.2 - <i>Detecção de mutações no sistema SmartCycler.....</i>	28
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 - POPULAÇÃO DE DOENTES EM ESTUDO.....	31
2.2 - COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	32
2.3 - EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO.....	32
2.4 - PESQUISA DAS MUTAÇÕES PROTROMBÓTICAS POR PCR EM TEMPO REAL.....	33
2.4.1 - <i>Factor V Leiden e Protrombina.....</i>	33
2.4.2 - <i>Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) C677T.....</i>	33
2.4.3 - <i>Inibidor do Activador do Plasminogénio tipo 1 (PAI-1) 4G/5G.....</i>	34
2.4.4 - <i>Antigénio das Plaquetas Humanas (HPA) -1a/b.....</i>	35
2.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>3 – RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>5 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>

<b>6 – BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>
------------------------------	-----------

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Cascata da coagulação e sistema fibrinolítico _____	<b>13</b>
---	-----------

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Frequência de doentes com cancro com pelo menos um alelo mutante _____	<b>38</b>
<b>Tabela 2.</b> Frequência de doentes sem cancro e de dadores controlo com pelo menos um alelo mutante _____	<b>39</b>
<b>Tabela 3.</b> Avaliação estatística do Índice de Risco Genético de Trombose proposto _____	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interação entre a fluoresceína e o LightCycler-red 640 quando ligados à sequência alvo _____	<b>26</b>
<b>Figura 2.</b> Espectros de excitação e emissão do doador e do receptor de fluorescência _____	<b>26</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo das fases de desnaturação, extensão e hibridização _____	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Histograma do índice de risco genético para a trombose em função da presença de trombose em doentes com cancro _____	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> Histograma do índice de risco genético para a trombose em função da presença de trombose em doentes com cancro _____	<b>41</b>

# Abreviaturas

<b>CBS</b>	cistationina B-sintase
<b>CID</b>	coagulação intravascular disseminada
<b>EM</b>	enfarte do miocárdio
<b>EP</b>	embolia pulmonar
<b>FRET</b>	fluorescence resonance energy transfer
<b>FVa</b>	factor V activado
<b>FVIIIa</b>	factor VIII activado
<b>FVL</b>	factor V Leiden
<b>G</b>	guanina
<b>GPIIb</b>	glicoproteína IIb
<b>GPIIIa</b>	glicoproteína IIIa
<b>HPA</b>	antigenio das plaquetas humanas
<b>MTHFR</b>	metilenotetrahidrofolato redutase
<b>PAI-1</b>	inibidor do activador do plasminogenio tipo 1
<b>PCA</b>	proteína C activada
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PS</b>	proteína S
<b>PTH</b>	protrombina
<b>TEV</b>	tromboembolismo venoso
<b>tPA</b>	activador do plasminogenio tecidular
<b>TV</b>	trombose venosa
<b>TVP</b>	trombose venosa profunda
<b>UK</b>	uroquinase
<b>uPA</b>	activador do plasminogenio urinário
<b>vWF</b>	factor von Willebrand

# 1. Introdução

# 1 – Introdução

O desenvolvimento de doenças trombóticas no Homem é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental (Lane & Grant, 2000).

O sistema hemostático normal resulta da interacção precisa entre componentes das paredes dos vasos, as plaquetas circulantes e proteínas do plasma. A activação não regulada do sistema hemostático pode causar trombose ou embolismo, reduzindo o fluxo sanguíneo a órgãos críticos como o cérebro ou o miocárdio (Handin, 1998).

A doença trombótica pode ocorrer no sistema venoso, de baixo fluxo e pressão, ou no sistema arterial, de alto fluxo e pressão. Existem algumas diferenças básicas e genéricas entre a trombose arterial e a trombose venosa, como a composição do trombo (rico em plaquetas na trombose arterial ou rico em fibrina na trombose venosa) ou a presença de lesão da parede vascular (ateroma) na trombose arterial. No entanto estas distinções não são absolutas e há passos comuns nos mecanismos pelos quais ocorrem (Lane & Grant, 2000).

Influencias ambientais transitórias ou de longa duração podem representar um importante papel na perturbação da hemostase e condicionar o risco de trombose venosa ou arterial.

O termo ambiental é usado em sentido lato de modo a incluir as alterações induzidas por diversas influências como a ingestão de hormonas, gravidez, dieta e o tabaco, ou por doenças como a Diabetes Mellitus, hipertensão, dislipidémia, a hiperhomocisteinemia ou por alterações da parede vascular. A perturbação da hemostase também pode ser determinada geneticamente e neste caso a sua influencia é potencialmente profunda uma

vez que a sua presença se verifica ao longo de toda a vida. Uma vez que a maioria das trombozes se dá relativamente tarde, as alterações genéticas dificilmente serão o seu único determinante e o mais importante para o desenvolvimento da doença parece ser a interação gene- ambiente (Lane & Grant, 2000). De facto, apesar dos muitos estudos feitos nesta área, continua a não ser possível estabelecer uma relação clara entre os polimorfismos hemostáticos e a trombose arterial. Pelo contrário, está bem definida a relação entre alguns polimorfismos e doença trombotica venosa (Simmonds et al, 2001).

Apesar da fisiopatologia da trombose não estar totalmente esclarecida, alguns grupos de doentes têm maior predisposição para a trombose ou o embolismo. Estão incluídos doentes: 1) imobilizados após cirurgia; 2) com insuficiência cardíaca congestiva crónica; 3) com doença vascular aterosclerótica; 4) com neoplasia ou 5) grávidas. A maioria destes doentes com “predisposição para trombose” não têm anomalias hemostáticas identificáveis. No entanto, alguns grupos de doentes têm um estado pré-trombótico ou de hipercoaguabilidade hereditária ou adquirida que os predispõe a trombozes recorrentes (Handin, 1998).

## ***1.1– Trombose Venosa***

A trombose venosa (TV) é a 3º causa mais comum de doença cardiovascular, depois da doença isquémica cardíaca e do enfarte. A TV é comum nos caucasianos, afectando um em cada 1000 indivíduos todos os anos e está fortemente associada à embolia pulmonar (EP) (Margaglione et al, 2000).

Recentemente a trombose venosa profunda (TVP) e a EP têm sido consideradas como uma entidade única designada por tromboembolismo venoso. De facto, foi demonstrado que 90% das EP resultam de TVP dos membros inferiores (Perrier, 2000).

A maioria das TVP inicia-se nas veias profundas da perna e resolve-se espontaneamente mas pode também, a partir destas estender-se para as veias proximais podendo depois causar embolismo pulmonar. Em qualquer uma destas fases podem ocorrer sintomas dependendo da extensão da trombose, da adequação dos vasos colaterais e da severidade associada à oclusão vascular e à inflamação (Kearon, 2003).

Normalmente a TVP proximal tende a resolver-se lentamente com o tratamento com anticoagulantes mas a resolução da TVP em doentes com grande trombo inicial ou com cancro é menos provável (Kearon, 2003).

A incidência de TV em doentes com cancro é mais elevada que em doentes sem neoplasia (Schmitt et al, 1999).

### **1.1.1. Factores de Risco de Trombose venosa**

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença multifactorial e os mecanismos que contribuem para a sua ocorrência incluem estados de hipercoaguabilidade, estase e lesão endotelial (Ramacciotti et al, 2003).

Existem vários factores que são considerados como factores de risco adquiridos TEV como idade avançada, imobilização prolongada, cirurgia, fracturas, uso de contraceptivos orais, terapia hormonal de substituição, gravidez, puerpério, cancro, sexo feminino, primeiro evento trombótico e síndrome antifosfolipídico (Lane & Grant,2000; Droulet, 2001; Perrier 2000).

Para além dos factores de risco adquiridos, nas últimas décadas emergiu o conceito de factores genéticos de risco que influenciam o risco de trombose. A descoberta destes factores genéticos reforçou o conceito de hipercoaguabilidade hereditária, também designada por trombofilia hereditária, que está presente em muitos doentes com TEV. Os factores de risco incluem mutações nos genes da antitrombina III, proteína C, proteína S, do factor V e da protrombina (factor II). Existem também indicadores de risco plasmático, como a hiperhomocisteinemia e concentrações elevadas dos factores II, VIII, IX, XI e de fibrinogénio, que têm sido descritos (Franco & Reitsma, 2001).

Esta lista extensa de factores de risco adquiridos e genéticos demonstra que não existe uma causa única para a trombose mas que esta deve ser considerada como resultado de uma interacção complexa e multifactorial de circunstâncias predisponentes (Lane & Grant, 2000; Franco & Reitsma, 2001).

## ***1.2- Trombose Arterial***

As doenças trombóticas arteriais resultam de dois processos: aterosclerose e trombose (Simmonds et al, 2002). A aterosclerose é uma doença inflamatória degenerativa da íntima das artérias de médio e grande calibre (Franco, 2001) que resulta de alterações crónicas dos fenótipos das células das paredes dos vasos (Simmonds et al, 2002). A aterosclerose é uma doença complexa que resulta de vários factores adquiridos e hereditários. Alguns factores de risco que predisõem para a aterosclerose são: tabagismo, inactividade física, dislipidémia hereditária ou adquirida, hipertensão,

diabetes, obesidade, síndrome metabólico, menopausa, hiperhomocisteinemia, sexo masculino e história familiar de doença arterial (Franco, 2001).

O evento trombótico é um processo agudo (Simmonds et al, 2002) que resulta da ruptura da placa provocando a exposição do tecido conectivo subendotelial, o que por sua vez desencadeia a cascata da coagulação com formação do trombo (Handin, 1998; Lane & Grant, 2000). A angina e o enfarte do miocárdio (EM) são as manifestações clínicas do desenvolvimento crónico de ateroma arterial coronário seguido do processo patológico final de ruptura da placa e trombose coronária (Lane & Grant, 2000). Embora factores de risco adquiridos como o sedentarismo e a obesidade possam explicar o aumento dos enfartes do miocárdio nos países ocidentais, verifica-se que existem também mecanismos que envolvem o equilíbrio hemostático, envolvidos na sua ocorrência. Assim, alguns estudos revelaram concentrações elevadas de proteínas hemostáticas como o fibrinogénio, o factor VII, o inibidor do activador do plasminogénio tipo 1 (PAI-1), o activador do plasminogénio tecidual (tPA) e o factor von Willebrand (vWF), que estariam relacionadas com risco vascular e cardiovascular (Lane & Grant, 2000).

### **1.2.2. Factores de risco de trombose arterial**

As doenças trombóticas arteriais podem apresentar-se de várias formas, dependendo da sua localização. Alguns exemplos destas doenças são o EM, a angina de peito ou a isquemia cerebral (Franco, 2001). Vários factores de risco adquiridos contribuem para o aparecimento de doenças trombóticas como o EM. Estes factores incluem o

tabagismo, os hábitos alimentares, alterações do metabolismo dos lípidos, hipertensão, alterações do metabolismo do açúcar, inactividade física, diabetes, obesidade, síndrome metabólico, menopausa, hiperhomocisteinemia, sexo masculino e história familiar de doença arterial (Simmonds et al, 2002; Franco, 2001; Streifler et al, 2001).

### ***1.3- Trombose e o cancro***

As metástases tumorais e a ocorrência de trombose são as principais causas de morte em doentes com cancro. As neoplasias estão associadas com o aumento do risco de alterações vasculares, sendo a TVP a complicação tromboembólica mais frequente (Schmitt et al, 1999).

As manifestações clínicas da alteração da hemostase podem variar desde a TVP, mais frequente em tumores sólidos, à coagulação intravascular disseminada (CID), mais frequente nas doenças hematológicas malignas (Falanga et al, 1999). De facto, a TVP, a CID e a trombocitopenia em conjunto são a segunda causa mais frequente de morte, em doentes com cancro (Carroll et al, 1999).

Apesar da relação entre neoplasia e trombose estar bem estabelecida, a patogenese da TV em doentes com cancro ainda não está totalmente esclarecida (Lee et al, 1999).

É inquestionável que múltiplos mecanismos contribuem para um estado trombofílico nos doentes com cancro, incluindo a actividade procoagulante intrínseca e factores extrínsecos como os agentes antineoplásicos, cirurgia, imobilização e cateteres venosos centrais (Lee & Levine, 1999; Falanga & Rickles, 1999; Bona, 1999)

A fisiopatologia da trombose em doentes com cancro e os factores que a predis põem têm sido objecto de intenso estudo. Factores gerais como o desenvolvimento de reacções de fase aguda, metabolismo anormal de proteínas, necrose e rearranjos hemodinâmicos podem contribuir para a activação geral da coagulação, nestes doentes. No entanto, um papel relevante é atribuído a mecanismos específicos do tumor promotores da coagulação, que incluem uma serie de propriedades protrombóticas das células tumorais. As células malignas podem interagir com o sistema hemostático de várias maneiras (Falanga & Rickles, 1999). As células tumorais podem activar directamente a cascata da coagulação ou indirectamente estimular as células mononucleares a sintetizar e expressar substâncias procoagulantes que conduzem à activação da protrombina, à formação da fibrina e à geração do trombo (Schmitt et al, 1999). As células neoplásicas também inibem as propriedades anticoagulantes das células do endotélio vascular, plaquetas, monócitos e macrófagos (Falanga & Rickles, 1999).

Assim, os mecanismos de interacção das células malignas com o sistema hemostático podem ser divididos em duas grandes categorias:

- 1) síntese de peptídeos e polipeptídeos mediadores, incluindo moléculas procoagulantes (ex. factor tecidual), moléculas fibrinolíticas e inflamatórias, e citocinas pró-angiogénicas (ex. IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) (Falanga, 2002);
- 2) interacção celular directa, resultando na activação, pelas células tumorais, do endotélio, plaquetas, monócitos e macrófagos com uma sub-regulação das suas propriedades anticoagulantes e uma super-regulação das suas propriedades procoagulantes (Falanga, 2002).

Nos doentes com cancro, para além da interacção das células tumorais com o sistema hemostático (factores intrínsecos), também os procedimentos terapêuticos levam à activação da coagulação (factores extrínsecos).

### **Factores Intrínsecos**

Os procoagulantes tumorais mais bem caracterizados são o factor tecidular e o *cancer procoagulant* (Falanga & Rickles, 1999; Schmitt et al, 1999).

O factor tecidular é uma glicoproteína transmembranar não proteolítica que forma um complexo macromolecular com o factor VII (FVII/VIIa) para activar o factor IX e o factor X e é encontrado tanto em tecido normal como em tecido maligno.

O *cancer procoagulant* é uma proteína cinase da cisteína que activa directamente o factor X de modo independente do factor VII e é encontrado principalmente em tecido maligno mas também em tecido fetal humano.

Tanto o factor tecidular como o *cancer procoagulant* podem ser encontrados em grande variedade de tumores humanos e animais (Falanga & Rickles, 1999).

### **Factores Extrínsecos**

Há muito que é reconhecido que os agentes antineoplásicos e hormonais podem precipitar toxicidade vascular em doentes com cancro contudo o mecanismo envolvido ainda não é conhecido (Lee & Levine, 1999).

Ainda está por determinar se os agentes terapêuticos por si só são suficientes ou se ocorrem interacções específicas entre a neoplasia e os mesmos, para precipitar as complicações trombóticas (Lee & Levine, 1999).

A maior evidência de uma relação causal entre os agentes antineoplásicos e TV é dada pela experiência clínica no cancro da mama (Schmitt et al, 1999).

Trombose arterial, incluindo enfarte agudo do miocárdio e angina, acidentes vasculares cerebrais e trombozes arteriais periféricas têm sido relatadas com uma variedade de regimes de quimioterapia, hormonoterapia e factores de crescimento hematopoiéticos (Doll & Yarbrow, 1992; Saphner, 1991; Levine et al, 1988). Tal como a TV, a maior parte da informação quanto a efeitos arteriais adversos após quimioterapia foram obtidos em doentes com cancro da mama (Lee & Levine, 1999).

Após quimioterapia foram descritas:

- 1) alterações nos níveis dos factores de coagulação (elevação dos marcadores da activação da coagulação foi registada após a administração de vários agentes antineoplásicos) (Canobbio et al, 1986; Kuzel et al, 1990; Edwards et al, 1990; Zurbrun et al, 1991);
- 2) supressão dos níveis de anticoagulantes endógenos (foram descritas reduções dos níveis plasmáticos de antitrombina, proteína C e proteína S com quimioterapia e hormonoterapia) (Rella et al, 1996; Rogers et al, 1988; Feffer et al, 1989; Love et al, 1992);
- 3) supressão da actividade fibrinolítica (são poucos os relatos de alterações da fibrinólise após quimioterapia);
- 4) lesão directa do endotélio (são vários os agentes antineoplásicos para os quais foi registado um efeito tóxico directo do endotélio (Lazo, 1986). A lesão do endotélio conduz à activação do sistema de coagulação (Lee & Levine, 1999)).

A hormonoterapia, principalmente com tamoxifeno, como tratamento adjuvante do cancro da mama está também associada a um aumento do risco de TEV, especialmente quando combinado com quimioterapia (Lee & Levine, 1999).

Doentes com cancro submetidos a cirurgia correm o risco de desenvolver TVP devido aos procedimentos cirúrgicos. A TVP pós-operatória em doentes com cancro ocorre com uma frequência cinco vezes maior, relativamente a doentes sem cancro. Após a ocorrência do primeiro evento trombótico, para a maioria dos doentes com cancro permanece um risco elevado de recorrência de trombose (Agnelli, 1997; Schmitt et al, 1999).

Nos doentes com cancro estão presentes vários factores de risco como a idade, tipo e estadio do cancro, tratamento com quimioterapia, cirurgia, presença de outras doenças e outros factores de risco para trombose que tornam o quadro clínico mais complicado e que dificulta a definição da relação causal e o risco relativo de cada factor (Lee & Levine, 1999).

## ***1.4- Trombofilia hereditária***

A deficiência hereditária dos anticoagulantes endógenos proteína C, proteína S e antitrombina foram reconhecidos há décadas mas são pouco comuns mesmo em doentes com trombofilia familiar (menos de 1% da população e menos de 10% de doentes seleccionados (Stefano et al, 2002)). No entanto, na década de 90 foram feitos grandes progressos para a compreensão do risco de trombose na população em geral e na possibilidade de identificar factores específicos que predispõem os doentes para a

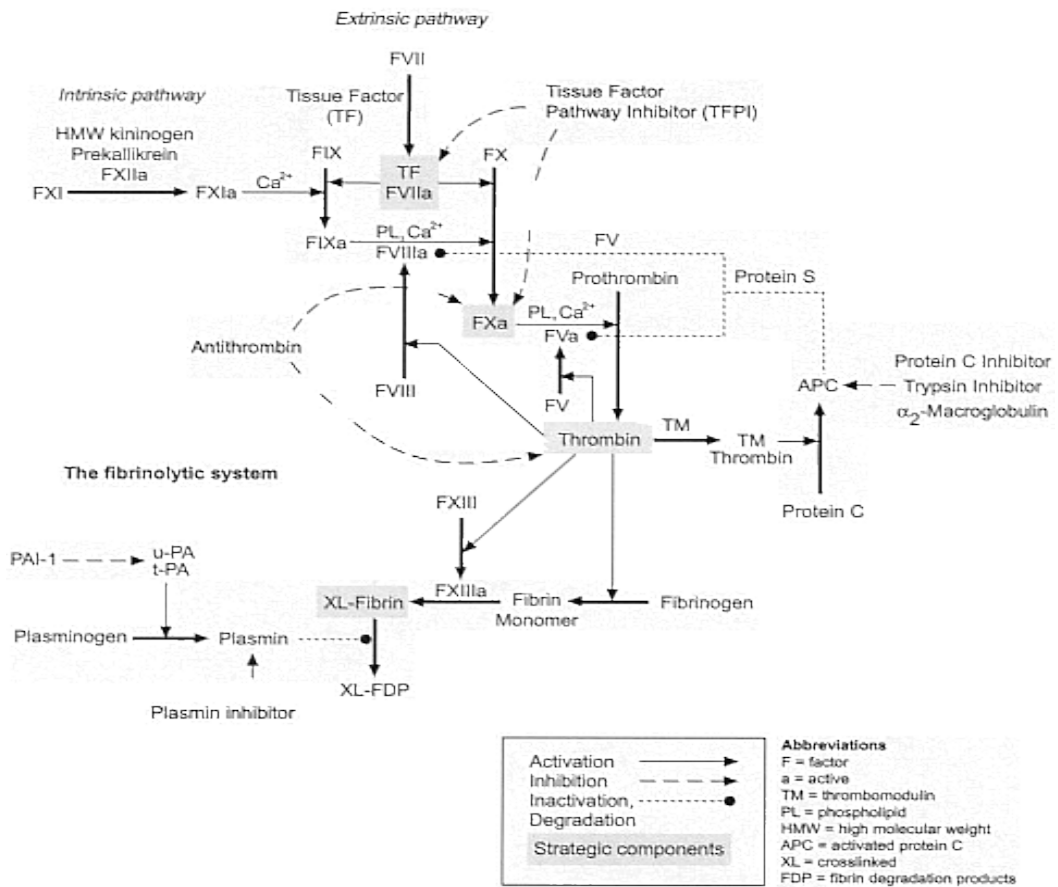
trombose. Um passo fundamental foi dado com a descoberta da resistência à proteína C activada (PCA) e o factor V Leiden (Bertina et al, 1994). Posteriormente foi descrito o polimorfismo protrombina G20210A como sendo uma causa importante de trombofilia familiar, embora não seja tão prevalente nem represente um risco tão elevado como o factor V Leiden (Poorts et al, 1996). Sabe-se também que a hiperhomocisteinemia moderada, que resulta de factores genéticos (como o polimorfismo da metilenotetrahidrofolato redutase C677T) e adquiridos, influencia o risco de trombose (D'Angelo & Selhub, 1997).

Actualmente verifica-se que uma alteração genética de risco é identificada em 1/3 de doentes não seleccionados com TEV e em mais de metade de doentes com trombose familiar. Estas alterações podem coexistir entre si assim como com outras deficiências da coagulação. De facto, múltiplas alterações são detectados nos doentes com predisposição marcada para trombose (Murin et al, 1998).

### **1.4.1- Factor V Leiden**

Um passo fundamental na compreensão da heterogeneidade do risco de trombose foi dado com a descoberta de resistência à proteína C activada (PCA). Esta alteração resulta, na grande maioria dos casos, de uma mutação no gene do factor de coagulação V, sendo esta alteração muito mais frequente que todas as outras alterações previamente conhecidas, na trombofilia hereditária, juntas (Bertina et al, 1994). A proteína C é uma proteína inibidora da coagulação, que é convertida numa protease activa, pela trombina, depois de esta se ligar a uma proteína do endotélio vascular - a trombomodulina

(esquema 1). A PCA leva à clivagem e inativação de dois cofactores plasmáticos, o factor V activado (FVa) e o factor VIII activado (FVIIIa) (esquema 1). As funções inibitórias da PCA são potenciadas pela proteína S (PS) (Handin, 1998).



**Esquema 1:** Cascata da coagulação e sistema fibrinolítico.

A resistência à PCA resulta, normalmente, de uma mutação pontual no gene do factor V. A transição G→A no nucleótido 1691 leva à substituição da arginina (Arg) 506 por uma glutamina (Gln) (Bertina et al, 1994). Esta mutação pontual foi descrita pela primeira vez em 1994 por um grupo de investigadores em Leiden (Holanda) pelo que é correntemente designado por factor V Leiden. A substituição Arg 506 Gln ocorre num dos locais onde o factor V é reconhecido, clivado e inactivado pela PCA (Murin et al, 1998). O factor V Gln 506, que também é activado pela trombina, não é tão facilmente inactivado pela PCA como o factor V Arg 506, prolongando-se assim o efeito trombogénico da activação do factor V (Lane & Grant, 2000).

Sabe-se que os dois locais primários de clivagem e inactivação do factor V são a Arg 506 e Arg 306. Com base neste conhecimento foram descritos dois mecanismos distintos de inactivação do factor V, que tentam explicar a resistência à PCA.

A primeira explicação parte do principio que a clivagem inicial é feita na Arg 506 e que, este passo inicial, promove uma clivagem mais rápida da Arg 306, (passo principal de inactivação). A segunda teoria defende que a clivagem faz-se aleatoriamente nos dois locais mas é mais lenta na Arg 306. De acordo com a primeira teoria, a resistência deve-se ao facto de não haver uma potenciação da clivagem da Arg 306 pela clivagem prévia da Arg 506. A segunda teoria defende que a resistência resulta do facto de só se efectuar a clivagem lenta da Arg 306 (Lane & Grant, 2000).

A prevalência do factor V Leiden varia muito entre grupos étnicos. Na população caucasiana a prevalência é de 1 a 15% sendo considerada a causa mais comum de trombofilia hereditária. De facto, o factor V Leiden está presente em 20 a 50% dos casos de tromboembolismo venoso. Em populações africanas e asiáticas nativas o factor V Leiden é muito raro ( Franco & Reitsma, 2001).

A manifestação clínica mais frequente da trombofilia associada ao factor V Leiden é a trombose venosa profunda (TVP). A mutação é identificada em 20% de doentes não seleccionados com TVP e em 40 a 60% de doentes seleccionados, em centros de coagulação, para avaliação ( Murin et al, 1998; van der Meer et al, 1997; Price & Ridker, 1997). Alguns estudos indicam que o risco de TVP em doentes heterozigóticos aumenta 5 a 10 vezes, enquanto nos doentes homozigóticos o risco parece aumentar 80 vezes (van der Meer et al, 1997; Price & Ridker, 1997). Embora os portadores do factor V Leiden tenham um risco acrescido de TVP, a maioria nunca terá nenhum episódio de trombose. Este facto sugere que factores de risco adicionais, genéticos ou adquiridos, são determinantes para o risco de trombose (Murin et al, 1998). A ocorrência de trombose antes da idade adulta é rara. Mas o risco de ocorrência de tromboembolismo venoso (TEV) aumenta com a idade, talvez porque com esta também aumenta a exposição a outros riscos adquiridos. A gravidez e o uso de contraceptivos orais causam uma resistência adquirida à PCA. Quando esta resistência está associada ao factor V Leiden resulta um aumento significativo do risco de trombose (Murin et al, 1998).

A associação do factor V Leiden com a doença trombótica arterial é pouco clara. A maioria dos estudos efectuados não consegue demonstrar que a resistência à PCA ou o factor V Leiden são factores de risco para a doença arterial. Alguns investigadores defendem que o factor V Leiden pode contribuir para a aterotrombose, actuando sinergicamente com outros factores de risco, no entanto por si só o factor V Leiden parece não ser um factor de risco para doença arterial mas leva ao aumento do risco, quando existem outros factores de risco clássicos (Franco, 2001).

Dos factores genéticos de risco de trombose conhecidos, o factor V Leiden é o mais prevalente (Murin et al, 1998). A sua identificação e a sua presença num grande número

de casos de TEV demonstrou a importância dos factores genéticos de risco na ocorrência de trombose.

### **1.4.2- Protrombina G20210A**

A protrombina, também designada por factor II, é a molécula precursora da trombina. A trombina tem várias funções entre as quais converter o fibrinogénio em fibrina (função principal) e a activação dos factores V, VIII e XIII (esquema 1) (Hadin, 1998).

Em 1996, um grupo de investigadores estudou 28 famílias com trombofilia idiopática e identificou uma transição G→A no nucleótido 20210, na região 3'-*untranslated* do gene, que está associada com o aumento do risco de trombose venosa. Neste estudo, 18% destes doentes com história pessoal ou familiar de TV tinham o alelo 20210A, enquanto no grupo de controlo saudável a presença deste alelo era de apenas 2,3% (Poort et al, 1996).

Os doentes com o alelo 20210A têm níveis de protrombina plasmática consideravelmente elevados, o que parece ser a causa do aumento do risco de trombose. O mecanismo que leva ao aumento dos níveis de protrombina ainda está por esclarecer (van der Meer et al, 1997).

A protrombina G20210A é considerada a segunda alteração genética mais frequente, relacionada com trombofilia (Franco et al, 2001).

Tal como para o factor V Leiden, a prevalência da protrombina G20210A é variável sendo de 1 a 4% na população caucasiana (Lane et al, 2000; Poorts et al, 1996). Alguns estudos demonstraram que no sul da Europa a prevalência desta mutação é superior à

das populações do Norte da Europa e que, de facto, a protrombina G20210A é um risco para a trombose venosa, incluindo trombose venosa cerebral (Lane & Grant, 2000).

Indivíduos heterozigóticos para o polimorfismo 20210A têm um risco de trombose aumentado em 2 a 5 vezes (Franco et al, 2001; Murin et al, 1998). O risco de trombose parece aumentar quando esta alteração ocorre em conjunto com outro factor de risco genético. A coexistência do factor V Leiden e da protrombina G20210A, em doentes com TEV sugere um possível sinergismo entre estes dois factores hereditários (Folsom et al, 2002). De facto, um estudo retrospectivo que compara 112 doentes com factor V Leiden com 17 doentes com factor V Leiden e protrombina G20210A, mostra que o risco de trombose recorrente após a primeira trombose, era maior nos doentes com os dois factores de risco. No entanto, ainda existe pouca informação sobre o risco de tromboembolismo recorrente em doentes portadores do alelo 20210A (Lane & Grant, 2000).

Quanto ao papel da protrombina G20210A na doença trombótica arterial ainda não está esclarecido. Foi descrito que em subgrupos específicos de doentes, como jovens e fumadores, a protrombina G20210A poderia aumentar o risco de trombose arterial por interacção com outros factores de risco de aterotrombose já estabelecidos (Franco, 2001 ).

### **1.4.3 - Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) C677T**

A homocisteína é um aminoácido resultante do metabolismo da metionina. Quando os níveis plasmáticos de homocisteína estão anormalmente elevados (conc. normal = 10µmol/L) ocorre um estado patológico designado por hiperhomocisteinemia.

A homocisteína é potencialmente tóxica para as células, pelo que a sua eliminação é feita através da sua metabolização intracelular. O metabolismo da homocisteína pode ocorrer por duas vias, estando envolvidas duas enzimas distintas: a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), cuja actividade é dependente da vitamina B12 e cujo metabolito resultante é a metionina (esta reacção ocorre em todos os tecidos e é reversível) e a cistationina β-sintase (CBS), com actividade independente da vit. B12 e cuja reacção ocorre principalmente no fígado (desta via metabólica irreversível resulta a taurina que é eliminada na urina). Existe ainda um mecanismo de efluxo celular de homocisteína que é responsável pela presença deste aminoácido no plasma (D'Angelo & Selhub, 1997).

A ocorrência de hiperhomocisteinemia indica que o metabolismo da homocisteína está alterado. O mecanismo de efluxo das células transporta a homocisteína em excesso para o sangue, limitando assim a toxicidade intracelular mas aumentando o risco de exposição do tecido vascular (D'Angelo & Selhub, 1997).

A hiperhomocisteinemia pode resultar de alterações genéticas ou adquiridas que interferem no metabolismo da homocisteína. Os factores de risco adquiridos são algumas deficiências nutricionais - deficiências em vitamina B12, vitamina B6 e em folato, idade avançada ou insuficiência renal crónica (Murin et al, 1998).

Alterações genéticas na MTHFR e na CBS podem também conduzir a hiperhomocisteinemia. Foram identificadas algumas mutações nestas enzimas sendo, na sua maioria mutações raras e que só têm relevância clínica em homozigotia. Uma exceção à baixa frequência destas mutações é a MTHFR C677T (Franco & Reitsma, 2001). A descoberta desta mutação teve início em 1988 com a descrição de uma variante da MTHFR em 2 doentes não relacionados, com hiperhomocisteinemia moderada e baixos níveis de folato, que se distinguia da MTHFR normal pela sua baixa actividade específica e pela sua termolabilidade (Kang et al, 1998). Posteriormente demonstrou-se que o facto da MTHFR destes doentes ser termolabil se devia a uma mutação pontual no nucleótido 677 devido a uma transição C→T, que corresponde à substituição de uma valina por uma alanina, nesta enzima (Frosst et al, 1995).

A MTHFR C677T em homozigotia é responsável por homocisteinemia suave a moderada e a sua prevalência na população é elevada (Franco & Reitsma, 2001). No entanto, a sua frequência em diferentes grupos étnicos varia muito (Franco & Reitsma, 2001; D'Angelo & Selhub, 1997). A prevalência em homozigotia é de 13,7% entre os caucasianos (Simmonds et al, 2001). O papel da MTHFR C677T como factor de risco independente de TEV é controverso (Becattini & Agnelli, 2002). O risco de TEV devido à homocisteína parece aumentar com a idade e é maior para as mulheres. A coexistência de hiperhomocisteinemia e o factor V Leiden aumenta o risco de trombose (Murin et al, 1998). A hiperhomocisteinemia moderada parece estar relacionada com o desenvolvimento de trombose em jovens e com TEV recorrente. Níveis elevados de homocisteína no plasma são também factor de risco de trombose venosa profunda na população em geral (D'Angelo & Selhub, 1997). No *Leiden Thrombophilia Study* conclui-se que a hiperhomocisteinemia é um factor de risco independente de outros factores de risco como a deficiência em PC, PS, antitrombina e resistência à PCA (van

der Meer et al, 1997). Ligeiros aumentos nos níveis plasmáticos de homocisteína foram relacionados com doença arterial coronária, doença cerebrovascular e doença arterial periférica. A associação de hiperhomocisteinemia suave com doença oclusiva é independente da presença de factores de risco como o tabagismo, hiperlipidemia, hipertensão e diabetes (D'Angelo & Selhub, 1997). Apesar dos vários estudos que associam concentrações moderadamente elevadas de homocisteína no plasma com o aumento do risco de trombose ainda não está explicado qual o mecanismo pelo qual a homocisteína é responsável por estas alterações.

#### **1.4.4 - Inibidor do Activador do Plasminogénio tipo 1 (PAI-1) 4G/5G**

Imediatamente após a formação do tampão hemostático definitivo (coágulo de fibrina) o sistema fibrinolítico é activado e inicia-se a lise do coágulo e a reparação do vaso. Existem três potenciais activadores do sistema fibrinolítico: fragmentos do factor Hageman, o activador do plasminogénio urinário (uPA) ou uroquinase (UK) e o activador do plasminogénio tecidual (tPA) (esquema 1).

Os principais activadores fisiológicos são difundidos a partir das células endoteliais e convertem o plasminogénio adsorvido no coágulo de fibrina em plasmina (esquema 1). A plasmina degrada os polímeros de fibrina em pequenos fragmentos que são removidos pelo sistema macrófagos-monócitos.

Existem mecanismos que fazem com que esta actividade fibrinolítica se mantenha localizada e não se generalize pelo organismo:

- 1) o tPA e algumas formas de uPA activam o plasminogénio mais eficazmente se este estiver adsorvido ao coagulo da fibrina;
- 2) qualquer plasmina que entra na circulação é rapidamente neutralizada pelo inibidor da plasmina  $\alpha_2$ ;
- 3) as células endoteliais libertam o inibidor do activador do plasminogénio tipo 1 (PAI-1) que bloqueia directamente a acção do tPA (Handin, 1998).

Assim, o PAI-1 é um forte inibidor do tPA pelo que um aumento dos níveis de PAI-1 resulta numa diminuição da actividade do tPA.

São conhecidos vários polimorfismos no gene do PAI-1 sendo o mais estudado o que resulta da deleção/inserção de uma guanina (G) na região do promotor do gene (675 bp antes do local de inicio da transcrição) o que origina alelos com 4 ou 5 guaninas seguidas (alelos 4G e 5G) (Simmonds et al, 2001). O promotor com o alelo 5G possui um local de regulação que não está presente no alelo 4G, resultando neste último um aumento significativo dos níveis circulantes do PAI-1, uma maior actividade plasmática do PAI-1 e consequentemente uma diminuição da actividade fibrinolítica (Droulet, 2001; Franco, 2001; Simmonds et al, 2001; Segui et al, 2000).

A distribuição dos alelos 4G/5G é semelhante em doentes com TVP ou sem TVP mas, como se disse, a presença do alelo 4G está associada a níveis plasmáticos de PAI-1 mais elevados e aumenta significativamente o risco de trombose em doentes com outros factores trombofilicos (Segui et al, 2000).

Existe evidência de que o aumento dos níveis de PAI-1 está associado à progressão aterosclerótica mas ainda não está demonstrado que o PAI-1 seja um factor de risco independente para a doença cardiovascular (Simmonds et al, 2001). Também não é

claro que os polimorfismos do PAI-1 estejam associados a enfarte do miocárdio (Droulet, 2001) embora esteja descrito um aumento moderado do risco de enfarte do miocárdio associado ao alelo 4G (Iacovello et al, 1998).

### **1.4.5 - Antígeno das Plaquetas Humanas (HPA) -1a/b**

A actividade funcional normal das plaquetas depende da presença de glicoproteínas de membrana que desempenham um papel importante na adesão e agregação das plaquetas (Lane & Grant, 2000; Streifler et al, 2001).

A glicoproteína IIIa (GPIIIa) associada à glicoproteína IIb (GPIIb) forma um receptor funcional (GPIIb/IIIa) para o fibrinogénio na superfície das plaquetas. A afinidade do complexo GPIIb/IIIa, também designado como integrina  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3, para o fibrinogénio aumenta marcadamente com a activação das plaquetas (Franco, 2001)

Têm sido descritas varias variações do GPIIb/IIIa na população em geral, mas o polimorfismo que tem despertado mais atenção, devido à sua associação com doença arterial, é o polimorfismo que consiste na substituição de um nucleótido T→C e que resulta na substituição de uma leucina (Leu<sup>33</sup>) por uma prolina (Pro<sup>33</sup>) no aminoácido 33 (Newman et al, 1989).

Na GPIIIa encontra-se o determinante antigénico das plaquetas humanas HPA-1a (ou PI<sup>A1</sup>) que contem a Leu<sup>33</sup>. Quando ocorre a substituição pela Pro<sup>33</sup> o antígeno passa a designar-se por HPA-1b (ou PI<sup>A2</sup>) (Lane & Grant, 2000; van der Meer et al, 1997; Newman et al, 1989).

Em 1996 foi relatada, pela primeira vez, a relação entre a variação genética HPA-1b e o enfarte do miocárdio (EM). Este estudo incluiu 71 doentes com diagnóstico de EM ou angina instável, internados numa unidade de cuidados coronários e concluiu que em comparação com um grupo controlo de 68 indivíduos, a presença do alelo HPA-1b era de 39,4% no primeiro grupo versus 19,1% no segundo grupo (Weiss et al, 1996).

Alguns estudos subsequentes também apontavam para uma relação entre o alelo HPA-1b e o EM (Ardissino et al, 1999; Carter et al, 1997) e com doença coronária arterial (Gardemann et al, 1998; Mikkelsen et al, 1999).

Dois estudos descreveram uma associação entre o alelo HPA-1b e o ateroma coronário extenso. Um dos estudos mostra associação deste factor em cerca de 50% dos casos de estenose em mais do que um vaso (Carter et al, 1997), o outro estudo relacionava o HPA-1b com a doença arterial coronária grave em doentes de baixo risco (Gardemann et al, 1998). No entanto, vários estudos semelhantes concluíram não haver associação do HPA-1b com o ateroma arterial (Durante-Mangoni et al, 1998; Zotz et al, 1998).

Também, tanto o estudo prospectivo *US Physicians Health Study* com 374 doentes com EM e 704 controlos (Ridker et al, 1997) como o estudo ECTIM com 620 doentes com EM e 700 controlos (Hermann et al, 1997) sugerem não haver relação entre o alelo HPA-1b e o EM.

O estudo de Weiss et al de 1996 encontrou uma grande representatividade do alelo HPA-1b em jovens caucasianos com enfarte. No entanto, a maioria dos estudos efectuados posteriormente não confirmam esta conclusão, com excepção do estudo de Carter et al de 1997 que demonstrou um aumento estatisticamente significativo do alelo HPA-1b num pequeno grupo de indivíduos com idades inferiores a 47 anos. Um outro estudo com 200 indivíduos com menos de 45 anos, sobreviventes a EM concluiu que

em fumadores portadores do alelo HPA-1b, cerca de 50% do desplotar do EM pode ser atribuído à interacção destes dois factores de risco (Ardissino et al, 1999).

Devido à dificuldade em estabelecer uma relação entre o alelo HPA-1b e trombose arterial e as circunstâncias em que ocorrerá, essa interacção deverá continuar a ser investigada.

## ***1.5 - PCR em tempo real***

Com o PCR em tempo real surgiu a possibilidade de identificar os genótipos de doentes e controlos, em larga escala, com um aumento de especificidade, automatismo e velocidade. A utilização desta técnica também contribuiu para a melhoria da qualidade de resultados (Cabeda et al, 2002).

De facto, são várias as vantagens do PCR em tempo real: permite uma técnica mais rápida (os ciclos podem ser mais rápidos); tem um menor risco de contaminações (não é necessário abrir os tubos no final da técnica); permite caracterizar os produtos segundo a sua sequência (temperatura de melting); permite ainda quantificar o produto.

A quantificação no PCR convencional requer a existência de múltiplas amostras ou a preparação de várias aliquotas de uma amostra. O produto amplificado é então detectado e identificado por electroforese em gel e brometo de etídio ou por Southern Blot. Todos estes procedimentos têm várias desvantagens: a preparação de múltiplas amostras é cara; a preparação de aliquotas conduz, muitas vezes, a contaminações; a análise dos resultados em gel de agarose carece de sensibilidade e especificidade; e a

técnica de Southern Blot é muito trabalhosa (<http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online/>; <http://www.smartcycler.com>).

A utilização de aparelhos de PCR em tempo real, como o termociclador LightCycler (Roche, Germany) e o termociclador SmartCycler (Cepheid, USA) tem, sem dúvida, inúmeras vantagens.

### **1.5.1 - Detecção de mutações no sistema LightCycler**

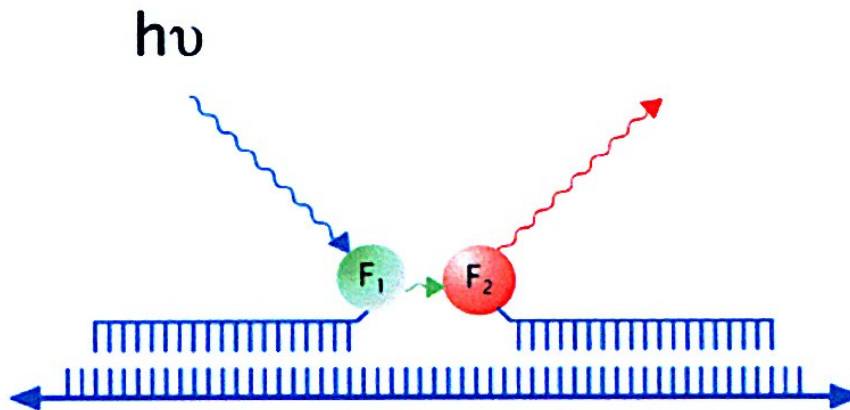
O PCR em tempo real tem vantagens experimentais e simplifica os métodos de genotipagem de genomas complexos, incluindo a detecção e caracterização de mutações em genes, relacionadas com doenças. Como se disse, outros métodos estão disponíveis mas são mais demorados e com maior risco de contaminação das amostras.

O método de análise das sequências amplificadas, na técnica do factor V Leiden, da protrombina G20210A, da metilenotetrahydrofolato redutase C677T e do antigénio das plaquetas humanas 1a/b, tem como base a utilização de duas sondas de hibridização (oligonucleótidos) que hibridizam com sequências internas adjacentes.

O oligonucleótido-5' (doador) tem na extremidade 3' a fluoresceína. O oligonucleótido-3' (receptor) tem na extremidade 5' o LightCycler-red 640.

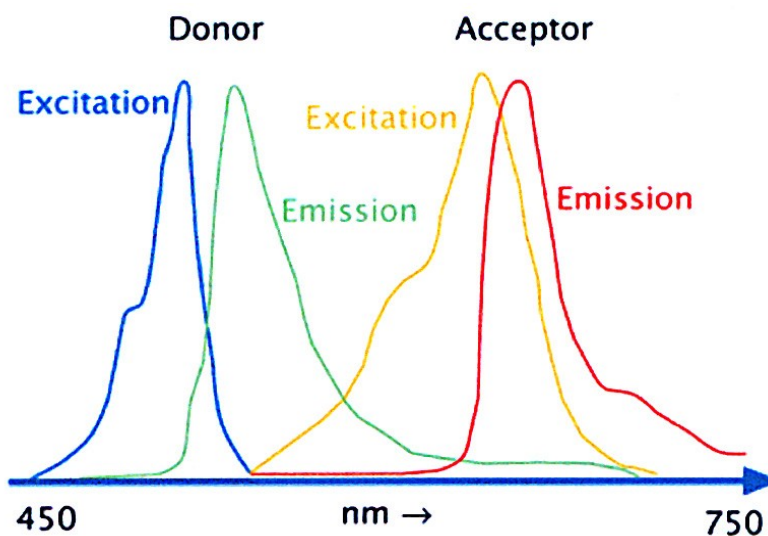
A interacção entre a fluoresceína e o LightCycler-red 640 só ocorre se ambos os oligonucleótidos estiverem ligados às suas sequências alvo (figura 1). Quando as duas

sondas hibridizam com as sequências alvo, os marcadores estão próximos e pode ocorrer a *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) entre eles.



**Figura 1:** Interação entre a fluoresceína e o LightCycler-red 640 quando ligados à sequência alvo (retirado de <http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online/>)

A FRET é uma transferência de energia dependente da distância entre dois fluoróforos adjacentes, sem a emissão de um fóton. As principais condições para a FRET são: as moléculas doadora e receptora têm que estar próximas e o espectro de excitabilidade do receptor tem que se sobrepor ao espectro de emissão de fluorescência do doador (figura 2).



**Figura 2:** Espectros de excitação e emissão do doador e do receptor de fluorescência (retirado de <http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online/>)

Durante a FRET, a fluoresceína (doador) é excitada e parte da energia é transferida para o LightCycler-red 640 (receptor), que por sua vez emite fluorescência, que é então medida pelo aparelho LightCycler.

Com este método de detecção é muito improvável que as sondas hibridizem com outras sequências que não a que se pretende amplificar. Portanto, sequências não específicas e os *primer-dimers*, que eventualmente tenham sido amplificados, devido a uma hibridização errada dos primers, não emitem sinal mensurável.

A combinação do método de detecção com sondas e a análise subsequente das curvas de *melting*, tornam possível uma rápida genotipagem e análise de mutações. Os oligonucleótidos são complementares a uma região específica da sequência amplificada, no entanto se o gene amplificado contiver uma mutação pontual nessa região específica pode ocorrer um ou vários *mismatch* provocando uma alteração drástica da temperatura de *melting*.

Normalmente, o maior efeito na temperatura de *melting* é observado se o *mismatch* estiver localizado a meio do oligonucleótido. A redução da temperatura de *melting* pode ser determinada experimentalmente. O sistema LightCycler permite verificar a temperatura de *melting* exacta porque faz a análise da curva de *melting* (<http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online/>).

## 1.5.2 - Detecção de mutações no sistema SmartCycler

No método de detecção do polimorfismo PAI 4G/5G utilizou-se a técnica de PCR em tempo real no termociclador SmartCycler, recorrendo a sondas MGB Eclipse™ e a primers desenhados pela Epoch Biosciences.

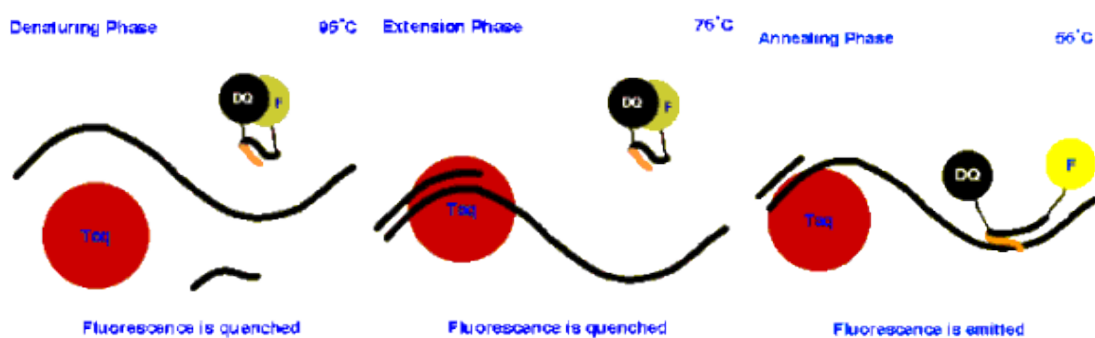
O sistema de sondas MGB Eclipse consiste num conjunto de sondas e primers que incorporam alguns subcomponentes importantes como o Eclipse™ Dark Quencher e as bases modificadas ou Superbases™ (Super G™ e Super A™).

As sondas contêm um fluoróforo ligado à sonda de DNA (extremidade 3') cuja fluorescência é absorvida pelo *quencher*, ligado à extremidade 5' da sonda. Esta interacção ocorre quando o fluoróforo e o *quencher* se encontram a uma curta distância, um do outro. A adequação do fluoróforo e do *quencher* consiste na sobreposição dos espectros de emissão e absorção de cada um, respectivamente.

Para a detecção do PAI 5G utilizou-se uma sonda em cuja extremidade 3' está ligado o fluoróforo FAM (ou fluoresceína) e na extremidade 5' encontra-se o Eclipse™ Dark Quencher. Na sequência de cinco guaninas está incorporada a base modificada Super G™. Para a detecção do PAI 4G utilizou-se uma sonda com o fluoróforo TET na extremidade 3' e com o Eclipse™ Dark Quencher na extremidade 5'. Também nesta sonda está incorporado um Super G™, na sequência de 4G.

O mecanismo de funcionamento destas sondas consiste na presença do Eclipse™ Dark Quencher que é uma molécula não fluorescente com um largo espectro de absorção para altos comprimentos de onda (400-650nm). Este *quencher* é universalmente aplicável a sistemas de detecção baseados na FRET e é adequado para interagir com diversos fluoróforos, como o FAM e o TET.

Durante a fase de desnaturação a sonda adquire uma conformação tridimensional que conduz a uma grande proximidade entre o *quencher* e o fluoróforo, logo a fluorescência emitida pelo fluoróforo é absorvida pelo *quencher* (figura 3). No entanto, na fase de hibridização a sonda liga-se à sua sequência alvo “desdobrando-se”, pelo que as duas extremidades ficam distanciadas e o *quencher* e o fluoróforo ficam espacialmente separados. Nesta fase a fluorescência emitida pelo fluoróforo não é “retida” pelo *quencher*, logo há detecção de fluorescência pelo sistema (figura 3). Na fase de polimerização a sonda volta a separar-se da sequência alvo e adquire a conformação tridimensional. Nesta fase deixa de haver detecção de fluorescência pelo sistema.



**Figura 3:** Esquema representativo das fases de desnaturação, extensão e hibridização (retirado de [http://epochbio.com/products/mgbe\\_how\\_it\\_works.htm](http://epochbio.com/products/mgbe_how_it_works.htm))

A incorporação da base modificada Super G<sup>TM</sup> nas sondas utilizadas é feita para eliminar o risco de autoassociação guanina-guanina, comum em sequências ricas em G e que conduz a estruturas designadas por tetradas, que interferem ou impedem a hibridização correcta da sonda. A base Super G<sup>TM</sup> impede as ligações de hidrogénio que se estabelecem entre as G e aumenta a temperatura de *melting* das sondas. Assim, a utilização da base modificada Super G<sup>TM</sup> tem a vantagem de melhorar a eficiência da hibridização e a especificidade das sequências ricas em G, melhorar a discriminação dos *mismatch*, e melhorar as temperaturas de *melting*.

O primer em concentração limitante, utilizado nesta técnica contém também uma base modificada - o Super A<sup>TM</sup>, com o objectivo de reduzir os efeitos competitivos e inibitórios na amplificação do gene com interesse, reduzindo a necessidade de optimização da técnica. A presença desta base modificada também melhora a estabilidade das ligações A-T e aumenta a temperatura de *melting*, de modo a obter uma hibridização e uma discriminação mais eficiente (<http://epochbio.com>).

## **2 - Material e Métodos**

### ***2.1 - População de doentes em estudo***

Neste estudo foram seleccionados aleatoriamente 97 doentes oncológicos. Deste grupo de doentes 15 foram excluídos da análise estatística por não estar disponível informação clinica suficiente.

Dos 82 doentes disponíveis para o estudo, 40 doentes não tinham história de trombose (grupo de controlo) e 42 doentes tinham pelo menos um episódio de trombose. Do grupo de doentes com trombose, 3 apresentavam episódios de trombose arterial e 39 apresentavam episódios de trombose venosa.

Os diagnósticos destes doentes relativamente a neoplasias eram diversos: 6 neoplasias orais; 6 gastrointestinais, 13 da mama; 7 ginecológicas; 1 do pulmão; 2 da pele; 1 neurológica; 9 urológicas e 37 hematológicas.

Foi também estudado um segundo grupo de controlo que incluiu 792 indivíduos sem cancro. Deste grupo, 319 são dadores de sangue saudáveis e 473 doentes com episódio de trombose venosa. Os episódios de trombose venosa incluem 14 doentes com trombose venosa cerebral, 406 doentes com trombose venosa profunda, 6 doentes com trombose da veia porta e 47 doentes com outros eventos trombóticos.

## ***2.2 - Colheita e processamento das amostras***

A colheita de sangue periférico foi feita pelo sistema *vacutainer* para tubos de 4 mL com EDTA.

Cada amostra foi aliquoteada para tubos de 1,5 mL e guardada a – 20°C.

## ***2.3 - Extração de DNA a partir das amostras de sangue periférico***

A extração foi efectuada pelo sistema automático MagNA Pure LC (Roche Diagnostics, USA) a partir de 200 µL de sangue total, utilizando o kit MagNA Pure LC – DNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Germany).

## ***2.4 - Pesquisa das mutações protrombóticas por PCR em tempo real***

### **2.4.1 - Factor V Leiden e Protrombina**

A detecção das mutações Factor V Leiden e Protrombina foi realizada por PCR em tempo real, com recurso aos kits LightCycler – Factor V Leiden Mutation Detection Kit e LightCycler – Prothrombin (G20210A) Mutation Detection Kit (Roche, Germany).

### **2.4.2 - Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) C677T**

Para a detecção do polimorfismo MTHFR C677T usaram-se sondas e primers previamente publicados (Ahsen et al, 1999). O procedimento experimental foi feito de acordo com o kit DNA FastStart Hybridization Probes Kit (Roche, Germany) otimizado para uma concentração de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

A amplificação realizou-se com um passo inicial para a activação enzimática a 94°C durante 8 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 94°C durante 0 segundos, hibridização a 55°C durante 10 segundos e polimerização a 72°C durante 15 segundos. A detecção da fluorescência foi efectuada durante a hibridização. No final da amplificação foi efectuada uma análise de “melting” iniciada

com a desnaturação a 94°C durante 0 segundos, seguida de estabilização a 40°C durante 5 segundos, e rampa de desnaturação até 80°C, com variação de 0,6°C/segundo e leitura constante de fluorescência.

### **2.4.3 - Inibidor do Activador do Plasminogénio tipo 1 (PAI-1) 4G/5G**

Para detectar o polimorfismo PAI 4G/5G utilizou-se a técnica de PCR em tempo real no termociclador SmartCycler (Cepheid, USA). Para discriminar os alelos 4G/5G foram desenhadas sondas (sondas MGB Eclipse™) com a colaboração da Epoch (USA) e do software desenvolvido por esta empresa para o efeito.

A sonda de detecção do alelo 5G foi mgb – dq – CGTGG(G39)GGAGTCAG – Q14 – FAM sonda Eclipse e a sonda de detecção do alelo 4G foi mgb – dq – CGTGG(G39)GAGTCAGC – Q14 – TET sonda Eclipse. A concentração final das sondas foi de 0,2 µM sendo (G39) um nucleótido modificado para evitar que as guaninas formem tetradas.

Utilizaram-se dois primers (também desenhados pela Epoch), um dos quais em concentração limitante (conc. final 0,1 µM: GGCACAG(A33)GAGAGTCT) e outro em excesso (conc. final 1 µM: GCCTCCGATGATGATACACG). Na síntese destes primers foi utilizada uma base modificada (A33) para aumentar a temperatura de melting.

- A reacção decorreu num volume final de 25µL contendo: tampão JumpStart (Sigma); 0,125mM de dNTP's; Master Amp PCR enhancer (Epicentre); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U JumpStart Taq Polymerase (Sigma).

A amplificação realizou-se com um passo inicial para a activação enzimática a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 95°C durante 5 segundos, hibridização a 56°C durante 6 segundos e polimerização a 72°C durante 6 segundos. A detecção da fluorescência foi efectuada durante a hibridização.

#### **2.4.4 - Antígeno das Plaquetas Humanas (HPA) -1a/b**

Para a detecção do polimorfismo HPA – 1a/b usaram-se sondas e primers previamente publicados (Nauck, 1999).

O procedimento experimental foi feito de acordo com o kit DNA FastStart Hybridization Probes Kit (Roche, Germany) optimizado para uma concentração 4 mM de MgCl<sub>2</sub>.

A amplificação realizou-se com um passo inicial para a activação enzimática a 94°C durante 8 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 94°C durante 0 segundos, hibridização a 55°C durante 6 segundos e polimerização a 72°C durante 2 segundos. A detecção da fluorescência foi efectuada durante a hibridização. No final da amplificação foi efectuada uma análise de “melting” iniciada com a desnaturação a 95°C durante 0 segundos, seguida de estabilização a 50°C durante

3 segundos, e rampa de desnaturação até 80°C, com variação de 0,3°C/segundo e leitura constante de fluorescência.

## ***2.5- Analise Estatística***

Os resultados foram analisados com recurso ao programa informático *SPSS*. As frequências de grupo foram avaliadas pelo teste qui-quadrado de Pearsons. A estimativa do risco relativo foi calculada com uma confiança de 95%. A análise de regressão múltipla foi efectuada por uma regressão logística binária utilizando o método *Forward Stepwise*.

### 3 – Resultados

A média de idades do grupo de doentes oncológicos com trombose é de 59,8 anos (de 13 a 78 anos) e do grupo de doentes oncológicos sem trombose (grupo controlo) é de 53,6 anos (de 16 a 88 anos).

Dos doentes oncológicos estudados 47,5% eram mulheres (21 no grupo com trombose e 19 no grupo de controlo) e 52,5% eram homens (21 no grupo com trombose e 21 no grupo de controlo).

Verificou-se que o número de casos de tumores sólidos era significativamente ( $p < 0,0001$ ) maior no grupo com trombose (32 em 42) do que no grupo controlo (10 em 40), o que reflecte a não selecção de patologias e a maior frequência de TEV nos tumores sólidos.

Individualmente, apenas o Factor V Leiden e a metilenoetetrahidrofolato redutase (MTHFR) 677T em homozigotia têm uma frequência diferente entre o grupo com trombose e o grupo sem trombose (tabela 1).

**Tabela 1:** Frequência de doentes com cancro com pelo menos um alelo mutante

Doentes com cancro				
	Sem trombose	Com trombose	P a)	Odds Ratio b)
FV Leiden	0/40 (0%)	4/42 (9.5%)	0.0454	-
PTH 20210A	3/40 (7.5%)	3/42 (7.1%)	n.s.	0.949 (0.180-5.001)
MTHFR 677T	27/40 (67.5%)	27/42 (64.3%)	n.s.	0.867 (0.347-2.163)
MTHFR 677T/T	1/40 (2.5%)	9/42 (21.4%)	0.0088	10.636 (1.280-88.379)
PAI-1 4G	30/40 (75%)	28/42 (68.3%)	n.s.	0.718 (0.272-1.898)
Hpa-1b	9/40 (22.5%)	13/42 (31%)	n.s.	1.544 (0.574-4.153)

a) Qui quadrado; n.s.- não significativo

b) Intervalo de confiança de 95% está indicado entre parêntesis

Curiosamente, verifica-se que a frequência de MTHFR 677T em homozigotia é semelhante entre o grupo de doentes com cancro (grupo com trombose e grupo sem trombose) –  $10/82 = 12,2\%$ , o grupo controlo de dadores  $31/237 = 13,1\%$  e o grupo de doentes com trombose sem cancro  $50/463 = 10,8\%$  (tabela 2). No entanto, a maioria dos doentes com cancro com MTHFR 677T em homozigotia pertence ao grupo com trombose (9/10).

**Tabela 2:** Frequência de doentes sem cancro e de dadores controlo com pelo menos um alelo mutante

	Controlos	Trombose	P a)	Odds Ratio b)
		Venosa		
FV Leiden	5/240 (2.1%)	64/469 (13.6%)	0.0001	7.427 (2.947-18.715)
PTH 20210A	12/234 (5.1%)	41/467 (8.8%)	n.s.	1.781 (0.917-3.457)
MTHFR 677T	132/237 (55.7%)	270/463 (58.3%)	n.s.	1.113 (0.811-1.526)
MTHFR 677T/T	31/237 (13.1%)	50/463 (10.8%)	n.s.	0.804 (0.499-1.298)
PAI-1 4G	94/132 (71.2%)	46/55 (83.6%)	n.s.	0.718 (0.272-1.898)
Hpa-1b	12/42 (28.5%)	11/37 (29.7%)	n.s.	1.058 (0.400-2.796)

a) n.s.- não significativo

b) Intervalo de confiança de 95% está indicado entre parêntesis

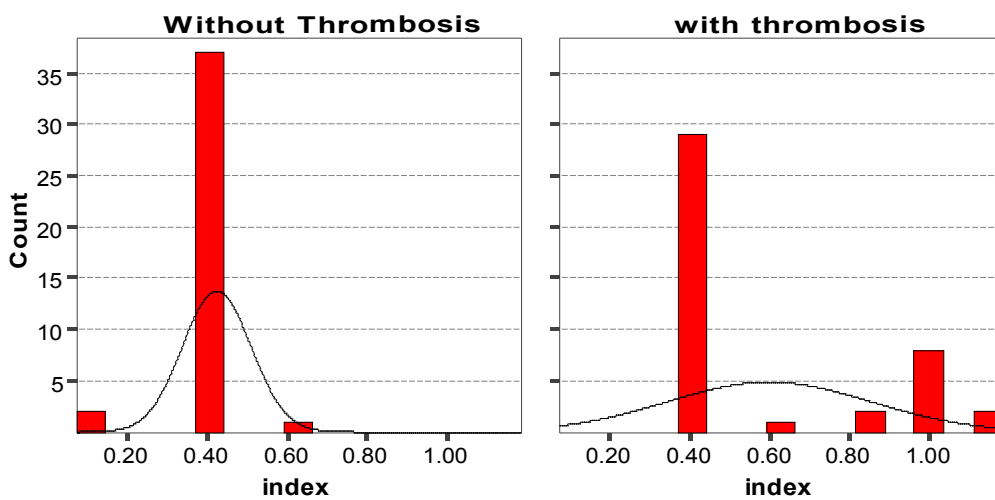
Uma vez que têm sido descritas interacções complexas entre os polimorfismos genéticos, tornou-se relevante determinar se a combinação de genótipos poderia discriminar doentes com trombose, melhor que cada genótipo individualmente.

Para isso verificou-se quantos doentes seriam identificados de cada grupo, se o MTHFR 677T/T (que neste estudo se revelou o melhor marcador polimórfico discriminatório) estivesse associado a um, dois ou três outros polimorfismos.

De todas as combinações estudadas, verificou-se que a melhor distinção foi obtida quando incluídos MTHFR 677T e quaisquer outros dois polimorfismos (12/42 doentes com trombose e 1/40 doentes sem trombose, resultando um odds ratio de 15,097 (1.860-122.521) e  $p < 0,001$ ).

O passo seguinte foi o de tentar encontrar um índice genético de risco que relaciona-se a presença variável de trombose e os cinco polimorfismos. Obteve-se então uma regressão logística binária. Nesta regressão considerou-se como variáveis independentes, para todos os polimorfismos excepto a MTHFR, o número de alelos e não a simples presença ou não de alelo mutante. Para a MTHFR considerou a presença deste polimorfismo em homozigotia ou não. Como resultado desta análise verificou-se

que o factor V Leiden (FVL), a protrombina (PTH) e a MTHFR em homozigotia se relacionam significativamente com a ocorrência de trombose ( $p < 0,002$ ;  $R = 0,417$ ;  $R^2 = 0,174$ ). A equação desta regressão foi assim utilizada como índice de risco genético de trombose (figura 4).



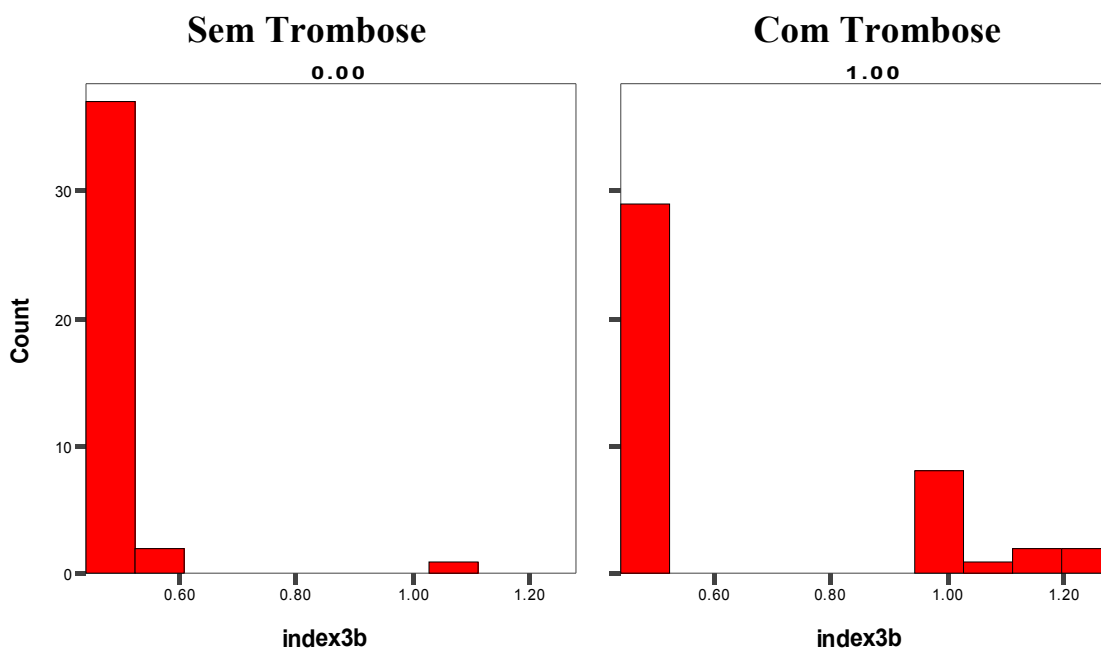
**Figura 4:** Histograma do índice de risco genético para a trombose em função da presença de trombose em doentes com cancro. Foi encontrada a regressão logística binária:

$$\text{Índice de risco genético} = 0,437 + 0,536 \text{ MTHFR} + 0,745\text{FVL} - 0,36\text{PTH}$$

No entanto, na regressão logística binária a protrombina (PTH) aparece com sinal negativo (figura 4) o que não tem sentido biológico e, relativamente ao risco de trombose, não pode ser aceite como verdadeiro.

Então, procedeu-se a uma mudança empírica da regressão linear e verificou-se que resultados eram obtidos. Foi retirada da equação a protrombina ou foi-lhe atribuída uma

contribuição positiva. Os resultados mais discriminatórios foram obtidos com a protrombina com contribuição positiva, ou seja, como factor de risco influente na ocorrência de trombose (figura 5).



**Figura 5:** Histograma do índice de risco genético para a trombose em função da presença de trombose em doentes com cancro. Foi encontrada empiricamente a equação:

$$\text{Índice de risco genético} = 0,437 + 0,536 \text{ MTHFR} + 0,745\text{FVL} + 0,1\text{PTH}$$

Verificou-se, assim que o Factor V Leiden, a protrombina G20210A e a metilenotetrahidrofolato redutase C677T em homozigotia se relacionam significativamente com a ocorrência de trombose ( $p < 0,001$ ; odds ratio=17.483 (2.162-141.340)) (figura 5).

**Tabela 3:** Avaliação estatística do Índice de Risco Genético de Trombose proposto

		Índice de Risco Genético de Trombose	
		≤ 0,6	> 0,6
Doentes (n)	Sem Trombose	39	1
	Com trombose	29	13
Qui-quadrado (p)		0,001	
Odds Ratio		17.483 (2.162 - 141.340)	
Sensibilidade		31%	
Especificidade		97.5%	
Valor predizente positivo		92.9%	
Valor predizente negativo		57%	

Considerando como 0 a inexistência de risco de trombose e valores próximos de 1 como a existência de elevado risco de trombose, avaliou-se posteriormente esta correlação utilizando empiricamente como valor limite (cut-off) entre a existência ou não de risco de trombose, o valor de 0,6. Este valor permitiu identificar como de elevado risco genético, 13 doentes com trombose (verdadeiros positivos) e 1 doente sem trombose (falso positivo) (tabela 3). Também permitiu identificar 39 verdadeiros negativos (doentes sem trombose) e 29 falsos negativos (doentes com trombose) (tabela 3). Desta análise resulta uma especificidade de 97.5% (13 de 14 doentes identificados como de risco apresentaram efectivamente trombose), uma sensibilidade de 31% (13 de 42 doentes com trombose foram identificados como doentes de risco), um valor predizente positivo de 92,9% (apenas 1 de 14 doentes do grupo de risco não teve trombose) e um valor predizente negativo de 57% (29 de 42 doentes tiveram trombose mas não foram incluídos no grupo de risco) (tabela 3).

## 4 – Discussão

Uma vez que a maioria dos eventos trombóticos, no grupo de doentes com cancro foram trombozes venosas (TV), não foi surpreendente o facto do factor V Leiden ser o polimorfismo mais frequente neste grupo, ao contrário do grupo de doentes sem trombose (tabela 1). Mas a diferença de frequência entre os dois grupos foi ainda mais evidente para a MTHFR 677T em homozigotia o que é de certa forma surpreendente, uma vez que o papel deste polimorfismo no risco de trombose é pouco claro e controverso. Também inesperado é o facto de quando se analisa a frequência total deste polimorfismo nos doentes com cancro ( $10/82=12\%$ ) se verificar que é semelhante à frequência registada nos dadores e doentes com TV sem cancro (tabela 2). Este facto sugere que os doentes com cancro que apresentem este polimorfismo serão mais susceptíveis de desenvolver TV (odds ratio = 10.6) (tabela 1).

A equação encontrada (Índice de risco genético =  $0,437 + 0,536 \text{ MTHFR} + 0,745 \text{ FVL} + 0,1 \text{ PTH}$ ) inclui o Factor V Leiden, a protrombina G20210A e a metilenotetrahidrofolato redutase C677T em homozigotia como factores que se relacionam significativamente com a ocorrência de trombose. O HPA e o PAI-1 ficaram excluídos da equação uma vez que, neste estudo, não se relacionam significativamente com a ocorrência de trombose. Isto poderá ser explicado pelo pequeno número de doentes com trombose arterial estudados neste trabalho (dos 42 doentes com pelo menos um episódio de trombose apenas 3 apresentavam episódios de trombose arterial) e pelo papel controverso destes dois polimorfismo na ocorrência de trombose.

É no entanto necessário verificar a validade desta equação num número mais elevado de doentes.

Tradicionalmente, os estudos de factores genéticos de risco tendem a utilizar apenas um ou dois marcadores polimórficos o que leva a uma caracterização incompleta dos doentes. Este facto pode explicar alguma controvérsia nos resultados obtidos, uma vez que foi demonstrado que a interacção entre factores genéticos e genético-ambientais pode alterar radicalmente o perfil de risco (Murin et al, 1998; Lane & Grant, 2000). Assim, a utilização de um índice de risco genético parece ser a melhor abordagem. Claro que mesmo esta abordagem se pode mostrar insuficiente para identificar todos os doentes com risco de trombose (de facto 29 dos 42 doentes com trombose ficam fora do grupo de risco, embora 13 dos 14 doentes identificados como doentes de risco apresentem efectivamente trombose) mas esta relativamente baixa sensibilidade (31%) pode facilmente ser explicada pelo grande número de factores de risco (para além dos genéticos) que estão presentes nos doentes com cancro. Por exemplo, o papel das patologias dos doentes é relevante e deveria também ser analisado em pormenor, seleccionando doentes segundo a patologia num grupo maior de doentes.

Assim, para uma identificação mais eficaz dos doentes com risco elevado de desenvolver trombose, seria necessário incluir na correlação analisada, factores como o tipo de cancro do doente, a utilização ou não de cateter central, se o doente foi sujeito a tratamento ou não e que tipo de tratamento (quimioterapia, cirurgia,...), entre outros factores que como se sabe contribuem de forma muito significativa para a ocorrência de trombose nos doentes com cancro.

De qualquer modo, os presentes resultados demonstram ter uma elevada especificidade e valor predizente (tabela 3).

Como trabalho futuro seria importante aumentar o número de doentes estudados e avaliar que outros factores utilizar na sua avaliação. Parece também relevante

seleccionar as patologias dos doentes estudados. A hipótese de realizar um estudo prospectivo poderia ser equacionada e ter interesse para o estudo dos doentes com cancro.

Este trabalho constitui assim, um estudo tipo “proof of concept” que poderá servir de ponto de partida para um estudo mais completo, de um maior número de doentes, de modo a definir com maior clareza os doentes com cancro em risco de trombose.

## 5 – Conclusão

Embora a patogênese do tromboembolismo venoso não esteja totalmente esclarecida, há uma evidência clara de que a doença é influenciada pela interação de factores genéticos e ambientais. A caracterização do tromboembolismo venoso representa um passo crucial para um melhor entendimento da patogénese da trombose. Apesar das influências ambientais serem muito importantes, as alterações genéticas podem desempenhar um papel crucial e até conduzir a doença venosa *aparentemente espontânea* (Lane & Grant, 2000). Nas últimas décadas foi feito um progresso substancial na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no tromboembolismo venoso. Várias alterações associadas ao sistema de coagulação e à ocorrência de trombose têm sido reconhecidas e a descrição de um estado de hipercoaguabilidade modificou a nossa visão do tromboembolismo venoso. O acontecimento mais marcante foi a confirmação do conceito de hipercoaguabilidade hereditária, que está presente num grande número de doentes com trombose ou embolia pulmonar (Franco & Reitsma, 2001). Este novo conceito deu origem à introdução do termo trombofilia para descrever a predisposição, geralmente genética, para tromboembolismo venoso.

Quanto à doença arterial, pode assumir-se que os mecanismos hemostáticos são importantes nas complicações trombóticas arteriais, mediados pela ruptura da placa aterosclerótica, pela geração de fibrina e pela activação das plaquetas. Pensa-se que a oclusão arterial resulta da interacção de um grande número de processos que concorrem para deteriorar a integridade dos vasos e promover trombose. Alguns destes processos,

que podem envolver factores hemostáticos, podem ser influenciados por variações genéticas (Simmonds et al, 2001).

No entanto, a questão não é tão clara. A premissa inicial de que os factores genéticos de risco poderiam contribuir consideravelmente para explicar o desenvolvimento de doença arterial tem sido pouco satisfatória e as explicações que surgiram após os primeiros relatos de associações positivas têm sido postas em causa pelos resultados inconsistentes obtidos com quase todos os genes estudados.

A doença arterial ocorre no sistema de alta pressão e alto fluxo com o ateroma como principal protagonista. A associação mais consistente que tem sido feita é com o fibrinogénio e embora seja possível que este funcione apenas como marcador de outro processo subjacente pode dizer-se que o fibrinogénio está envolvido na doença arterial (Lane & Grant, 2000). Outros factores hemostáticos também podem ter um papel na doença aterotrombótica, embora a evidencia seja menos clara.

Observações feitas demonstram a importância das influências ambientais e reforçam a complexidade dos processos envolvidos na doença vascular (Lane & Grant, 2000).

O cancro é um exemplo de um factor pró-trombótico. Actualmente é aceite que a patogénese da trombose no cancro é multifactorial, resultando em primeiro lugar da capacidade das células tumorais interagirem com o sistema hemostático, em segundo lugar dos procedimentos clínicos e de tratamentos administrados e, finalmente de factores de risco de trombose individuais, adquiridos e hereditários.

No entanto a natureza multifactorial da trombose, nestes doentes, torna difícil a definição do risco de trombose.

Embora os factores de risco genético não representem um papel primordial no desenvolvimento de trombose nos doentes com cancro, os resultados obtidos neste estudo parecem indicar a sua utilidade na discriminação de doentes em maior risco de desenvolverem trombose.

Conforme a revisão bibliográfica apresentada, dos factores genéticos de risco de trombose, o factor V Leiden é o mais prevalente (Murin et al, 1998). Os indivíduos com o polimorfismo protrombina G20210A têm um risco aumentado de trombose (Franco et al, 2001; Murin et al, 1998) mas o risco de trombose parece aumentar quando esta alteração ocorre em conjunto com outro factor de risco de trombose (Folsom et al, 2002). A MTHFR C677T em homozigotia é responsável por homocisteinemia suave a moderada (Franco & Reitsma, 2001) e a sua prevalência é de 13,7% (Simmonds et al, 2001). Níveis elevados de homocisteína no plasma são também factor de risco de trombose venosa profunda na população em geral (D'Angelo & Selhub, 1997). A coexistência de hiperhomocisteinemia e o factor V Leiden aumenta o risco de trombose (Murin et al, 1998). O HPA e o PAI-1 parecem estar relacionados com o risco de trombose arterial mas o seu papel é controverso (Simmonds et al, 2001; Carter et al, 1997; Durante-Mangoni et al, 1998; Zotz et al, 1998).

Este estudo sugere que pelo menos o Factor V Leiden, a protrombina G20210A e a metilenotetrahidrofolato redutase C677T devem ser avaliados. Os marcadores genéticos de risco de trombose arterial (PAI-1 4G/5G e HPA 1a/1b) parecem ser menos úteis que os marcadores de trombose venosa. Estes dados parecem estar de acordo com a bibliografia existente.

A baixa sensibilidade obtida neste estudo pode ser explicada pelo grande número de factores de risco que estão envolvidos nestes doentes, para além do risco genético. No entanto a sua grande especificidade e valor predizente positivo poderão ter interesse clínico uma vez que podem contribuir para uma identificação mais clara dos doentes em risco. No entanto este índice de risco pode ser melhorado se forem incluídas outras variáveis como o tipo de cancro, o tipo de tratamento e outras que se mostrem relevantes e que permitam uma melhor caracterização dos doentes.

De facto, este trabalho parece indicar que estudos posteriores, com um maior número de doentes, com uma análise e selecção detalhadas das patologias e a utilização de outros factores de risco no seu estudo, poderão ser um caminho a seguir para uma melhor discriminação dos doentes em risco de trombose.

## 6 – Bibliografia

Agnelli G. Venous Thromboembolism and cancer: a two way clinical association. *Thromb Haemst* 1997;78:117-120

Ahsen N, Schutz E, Armstrong V, Oellerichich M: Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A) and Methylenetetrahydrofolate redutase (C677T) by real time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clinical Chemistry* 19

Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliabue L et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999; 94:46-51.

Becattini C and Agnelli G: Pathogenesis of venous thromboembolism. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8:360-364

Bertina R, Koeleman B, Koster T, Rosendaal F, Dirven R, Ronde H, van der Velden P and Reitsma P: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C: *Nature* 1994; 369: 64-67

Bona R: thrombotic complications of central venous catheters in cancer patients. *Semin Thromb and Hemost* 1999; 25 (2): 147-155

Cabeda JM, Pereira M, Oliveira JM, Estevinho A, Pereira I, Morais S, Justiça B, Campos M. Advances in the genotyping of thrombosis genetic risk: clinical and laboratory implications. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32 (suppl 1):1-4

Canobbio L, Fassio T, Ardizzoni A, et al. Hypercoagulable state induced by cytostatic drugs in stage II breast cancer patients. *Cancer* 1986;58:1032-1036

Carroll V, Binder B: The role of plasminogen activation system in cancer. *Semin Thromb and Hemost* 1999; 25 (2): 183-197

Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet P1(A) polymorphism of glycoproteinIIb/IIIa and the fibrinogen Bb448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96:1424-1431

D'Angelo A and Selhub J: Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997; 90:1-11

De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K and Leone G: Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica* 2002; 87:1095-1108

Doll, DC, Yarbrow JW. Vascular toxicity associated with antineoplastic agents. *Semin Oncol* 1992; 19:580-596

Droulet, L: Venous thromboembolic pathology. New acquired risk factors or new data on acquired risk factors. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2001; 94 (11 Suppl): 1318-1326

Durante-Mangini E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Tuddenham EG. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIA gene P1A2 polymorphism. *Thromb Haemost* 1998; 80:218

Edwards RL, Klaus M, Mathews E, McCullen C, Bona RD, Rickles FR. Heparin abolishes the chemotherapy-induced increase in plasma fibrinopeptide A levels. *Am J Med* 1990;89:25-28

Falanga A, Rickles F: Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. *Semin Thromb and Hemost* 1999; 25 (2): 173-182

Falanga, A et al: Pathogenesis of thrombosis in patients with malignancy. *Int J Hematol* 2001; 73(2): 137-144.

Falanga, A: Cancer and thrombosis: Physiopathological bases. *Path Haem Throm* 2002; 32 (Suppl 2): 18 (Abstract).

Feffer SE, Carosino LS, Fox RL. Acquired protein C deficiency in patients with breast cancer receiving cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil. *Cancer* 1989; 63:1303-1307

Franco, R and Reitsma, P: Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001; 109: 369-384

Franco, R: Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. Review. *Brit J Haematol* 2001; 115: 491-506

Frosst P, Blom H, Milos R, Goyette P, Sheppard C, Mathews R, Boers G, den Heijers M, Kluijtmans L, van den Heuvel, Rozen R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10 (1): 111-113

Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M et al. Association of the platelet glycoprotein IIIa PlA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 214-217

Handin R: Bleeding and thrombosis in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14<sup>a</sup> Ed. McGraw-Hill 1998; Chapt 60: 339-345

Hermann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G et al. The Leu 33/pro polymorphism (PlA1/PlA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Thromb Haemost* 1997; 77:1179-1181

Iacovello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R and Donati M: The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta analysis. *Thromb and Haemost* 1998; 80:1029-1030

Jordan VC, Fritz NF, Tormey DC. Long-term adjuvant therapy with tamoxifen: Effects on sex hormone binding globulin and antithrombin III. *Cancer Res* 1987;47: 4517-4519

Kang S, Zhou J, Wong P, Kowalisyn J, Strokosch G: Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998; 43: 414

Kearon, C. Natural History of Venous Thromboembolism. *Circulation* 2003;107: I-22-I-30

Kuzel T, Esparaz B, Green D, Kies M. Thrombogenicity of intravenous 5-fluorouracil alone or in combination with cisplatin. *Cancer* 1990;65: 885-889

Lane, D and Grant, P: Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95 (5): 1517-1531

Lazo JS. Endothelial injury caused by antineoplastic agents. *Biochem Pharmacol* 1986;35:1919-1923

Lee A, Levine M: The thrombophilic state induced by therapeutic agents in cancer patient. *Semin Thromb and Hemost* 1999; 25 (2): 137-145

Levine MN, Gent M, Hirsh J. The thrombogenic effect of anticancer drug therapy in woman with stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988; 318:404-407

Love RR, Surawicz TS, Williams EC. Antithrombin III level, fibrinogen level and platelet count changes with adjuvant tamoxifen therapy. *Arch Intern Med* 1992;152:317-320

Mikkelsson J, perola M, Laipalla P, Savolainen V, Parjarinen J, Lalu K et al. Glycoprotein IIIa PLA polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in na autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2573-2578

Murins S, Mavelich G, Arroliga A and Matthay R: Hereditary thrombophilia and venous thromboembolism. *Am J Resp Crit Care Med* 1998; 158: 1369-1373

Nauck, M, Gierens H, Nauck M, März W and Wieland H: Rapid genotyping of human antigen 1 (HPA-1) with fluorophore-labelled hybridization probes on the LightCycler. *British Journal of Haematology* 1999, 105: 803-810.

Newman PJ, Derbes R and Aster R: The Human platelet alloantigens PIA1 and PIA2 are associated with a Leucine 33/Proline 33 aminoacid polymorphism in membraneglycoprotein III and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83: 1778-1781

Poorts S, Rosendaal F, Reitsma P and Bertina R: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703

Price D and Ridker P: Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. *Ann Intern Med* 1997; 127: 895-903

Ramacciotti E, Wolosker N, Puech-Leao P, Zeratti A, Gusson PR, Giglio A, Franco R. Prevalence of factor V Leiden, FII G20210A, FXIII Val34Leu and MTHFR C677T polymorphisms in cancer patients with and without venous thrombosis. *Tromb Research* 2003;109:171-174

Rella C, Coviello M, Giotta F et al. A prothrombotic state in breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 1996;40:151-159

Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349:385-388

Rogers JS, Murgu AJ, Fontana JA, Raich PC. Chemotherapy for breast cancer decreases plasma protein c and protein S. *J Clin Oncol* 1988;6:276-281

Saphner T, Tormey DC, Gray R. Venous and arterial thrombosis in patients who received adjuvant therapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 1991; 9:286-294

Schmitt M, Kuhn W, Harseck N, Graeff H: Thrombophilic state in breast cancer. *Semin Thromb and Hemost* 1999; 25 (2): 157-166

Segui R, Estelles A, Mira Y, Espana F, Falco C, Vaya A, Grancha S, Ferrando F, Aznar J: PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilia defects. *Br J Haematol* 2000; 111 (1):122-128

Simmonds R, Hermida J, Rezende S and Lane D: Haemostatic genetic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb and Haemost* 2001; 86: 374-385

Streifler JY, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela BA, Dardik R et al. Cerebrovascular Events in Patients with Significant Stenosis of the Carotid Artery are Associated with Hyperhomocysteinemia and the Platelet Antigen-1 (Leu33Pro) Polymorphism. *Stroke* 2001;32:2753-2758

van der Meer F, Koster T, Vandenbroucke J; Briet E and Rosendaal F. The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thromb Haemost* 1997; 78: 631-635

Zotz RB, Winkelmann BR, Nauk M et al. Polymorphism of platelet antigen Ib (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998;79:731

Zurbron KH, Gram J, Glander K et al. Influence of cytostatic treatment on the coagulation system and fibrinolysis in patients with non-Hodgkin's lymphoma and acute leukemias. Eur J Haematol 1991;47:55-59