

Artigo / Article

Avaliação de anticoagulantes naturais e de fatores da coagulação em pacientes com distúrbios congênitos de glicosilação (DCG) tipo I

An evaluation of natural anticoagulants and coagulation factors in patients with congenital disorders of glycosylation type I

Anna Leticia Soares¹

Maria Tereza I. Pinto²

Isabela M. P. O. Rizzo³

Mônica M. M. Navarro³

Walquíria D. Mello³

Caio A. Mendonça⁴

Carlos E. S. Martins³

Jaime M. Brum⁵

Defeitos na incorporação de N-glicanos nas proteínas humanas ocasionam um grupo de doenças multissistêmicas denominadas coletivamente distúrbios congênitos de glicosilação (DCG). Os DCG manifestam-se na infância com sintomas neurológicos que incluem principalmente atraso psicomotor, ataxia, hipotonia e episódios de acidente vascular cerebral. Várias proteínas do sistema hemostático somente tornam-se biologicamente ativas após a glicosilação. O objetivo deste estudo foi avaliar os anticoagulantes naturais (proteína S livre, proteína C e antitrombina) e os fatores da coagulação (VIII, IX e XI) em pacientes com DCG tipo I. Foram avaliados 11 pacientes com diagnóstico positivo para DCG tipo I (três do gênero masculino e oito do gênero feminino), idade média de 5,6 anos; e oito pacientes com diagnóstico negativo para DCG (quatro do gênero masculino e quatro do gênero feminino), idade média de 4,5 anos (grupo-controle). O diagnóstico de DCG tipo I foi realizado pela identificação do padrão de hipoglicosilação da transferrina plasmática. Na avaliação dos anticoagulantes naturais pode-se observar redução dos valores de PS livre e PC e uma redução marcante de AT, quando comparados com o grupo controle. Em relação aos fatores de coagulação não houve diferença significativa para os fatores VIII e IX e houve redução marcante do fator XI. Os resultados do presente estudo sugerem que a deficiência combinada de anticoagulantes naturais é responsável pelo estado pró-trombótico observado em pacientes com DCG. Sugerimos também que a análise dos parâmetros hemostáticos seja realizada para pacientes com DCG quando apresentarem sintomas clínicos de alteração do sistema hemostático e antes de procedimentos invasivos. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(2):131-135.

Palavras-chave: Glicosilação; trombofilia; fatores de coagulação sanguínea.

Introdução

Grande parte das proteínas humanas sofre modificações pós-traducionais e uma das mais comuns é a glicosilação. A adição de carboidratos em glicoproteínas é um processo complexo que necessita da coordenação de muitos

genes. Defeitos na incorporação de N-glicanos ocasionam um grupo de doenças multissistêmicas denominadas coletivamente distúrbios congênitos de glicosilação (DCG). Os DCG são reconhecidos atualmente como síndromes de hipoglicosilação de proteínas.^{1,2} A N-glicosilação de proteínas é um processo essencial nas células eucarióticas e a

¹Farmacêutica bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica.

²Biomédica do Laboratório de Patologia Clínica.

³Médica geneticista.

⁴Médico hematologista do Laboratório de Patologia Clínica.

⁵Médico do Laboratório de Patologia Molecular.

Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação – Brasília-DF

Correspondência: Anna Leticia Soares

SGAS 905 – Residencial Central Park, Bloco B, apt 215 – Asa Sul

70390-050 – Brasília-DF – Brasil

E-mail: annaleticia@sarah.br

Doi: 10.1590/S1516-84842010005000027

total ausência de glicosilação é incompatível com a vida.^{3,4}

Os DCG são herdados de forma autossômica recessiva e apresentam em comum uma deficiência enzimática específica, que leva a distúrbios na incorporação de açúcares nas glicoproteínas. Desde o reconhecimento da primeira forma de DCG, em 1980, pelo menos 40 outras doenças já foram descritas e nomeadas DCG Ia - In, e DCG IIa - IIg, além de mais algumas formas envolvendo outras vias de glicosilação.⁵

Os pacientes com DCG tipo I são identificados laboratorialmente através da focalização isoelétrica da transferrina, que apresenta padrão de hipoglicosilação, com aumento das frações asiática e dissialica. Para a classificação dos subtipos de DCG tipo I (Ia - In) é necessário realizar exames complementares, tais como dosagem de oligossacarídeos ligados a lipídios, determinação da atividade de enzimas específicas e pesquisa de mutações em genes identificados.²

O DCG tipo Ia é a forma mais prevalente (83% dos casos de DCG tipo I) e é causado pela deficiência da enzima fosfomanomutase.^{2,6} Os principais sinais clínicos da doença são atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, atrofia cerebral, ataxia, hipotonia, dismorfias faciais, disfunção hepática, cardiopatia, nefropatia, distúrbio hormonal, coagulopatia e episódios semelhantes ao acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico (*stroke-like*). A mortalidade é de 20% nos primeiros anos de vida, causada principalmente pela falência de variados órgãos.^{3,7,8} A Figura 1 ilustra algumas dessas manifestações.

Em alguns subtipos de DCG, os pacientes apresentam sintomas de sangramento gastrointestinal consequente à

fibrose hepática progressiva e, de uma forma precoce e oposta, cerca de 40% a 55% dos afetados por DCG apresentam episódios semelhantes a AVC isquêmico (*stroke-like*).^{1,6,9} Essa condição de risco aumentado para eventos trombóticos é justificada, em parte, pela redução dos níveis plasmáticos de antitrombina e das proteínas C e S. A redução do fator XI também é um achado comum nesses pacientes, embora não esteja associado a eventos hemorrágicos.^{3,10}

Frente a esse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar anticoagulantes naturais (proteína S livre, proteína C e antitrombina) e fatores de coagulação (fator VIII, fator IX e fator XI) em pacientes com diagnóstico positivo de DCG tipo I e em pacientes com fenótipo semelhante, porém, com resultado negativo para DCG.

Casística e Método

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação.

Os pacientes com suspeita de DCG foram selecionados no ambulatório de Genética da Rede Sarah. Os sinais clínicos dos pacientes foram atraso de desenvolvimento neuropsicomotor ou retardo mental, além de, pelo menos, um dos seguintes sinais: dismorfias faciais, ataxia, microcefalia, baixa estatura, hipotonia ou diminuição de reflexos tendinosos profundos.

O diagnóstico confirmatório de DCG tipo I foi realizado pela identificação do padrão de hipoglicosilação da transferrina com aumento das frações asiática e dissialica.

Para excluir a possibilidade de alteração dos níveis plasmáticos dos marcadores avaliados decorrente de imaturidade relacionada à idade, bem como para determinar a especificidade dos achados bioquímicos, foi composto um grupo controle constituído por crianças de faixa etária semelhante e com fenótipo próximo ao de DCG, porém, com diagnóstico negativo para DCG.

Foram identificados 11 pacientes com diagnóstico positivo para DCG tipo I (três do gênero masculino e oito do gênero feminino) com faixa etária média de 5,6 anos; e oito pacientes com diagnóstico negativo para DCG (quatro do gênero masculino e quatro do gênero feminino) com faixa etária média de 4,5 anos, denominados como grupo controle.

Somente um paciente do grupo DCG tipo I apresentou AVC isquêmico aos 20 meses de vida associado à miocardiopatia e hemiplegia súbita persistente. Não houve relato de paciente com histórico de eventos hemorrágicos.

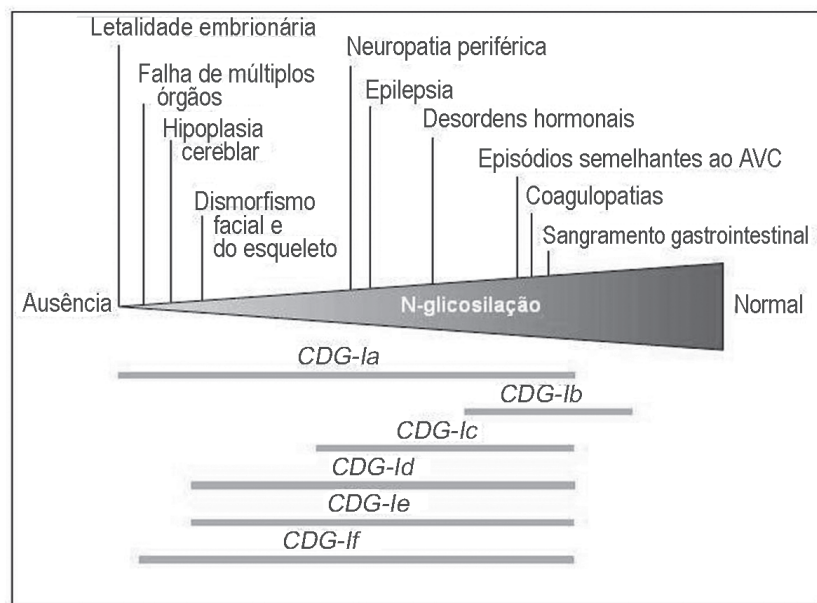


Figura 1. Relação entre as manifestações clínicas e a extensão da hipoglicosilação nos pacientes com DCG. O triângulo simboliza o grau de N-glicosilação sobre as proteínas. Os sintomas apresentados pelos pacientes estão indicados na parte superior da figura e as barras simbolizam a extensão dos sintomas para os subtipos mais frequentes. Figura adaptada.³

Amostras de sangue venoso, coletadas com citrato de sódio 3,2%, foram obtidas para as dosagens dos marcadores hemostáticos. As amostras foram centrifugadas a 2.500 g por 20 minutos e o plasma foi alíquotado, identificado e estocado a -80°C até o momento da realização dos testes.

A PS livre foi determinada pelo método de ELISA através do uso do conjunto diagnóstico Asserachrom® Free Protein S (Diagnostica Stago®, Asnières, France). A determinação da PC foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico PC CHRO® (Diagnostica Stago®, Asnières, France) pelo método cromogênico. AAT foi determinada pelo método cromogênico através do uso do conjunto diagnóstico Antithrombin® (Diagnostica Stago®, Asnières, France). Os fatores VIII, IX e XI foram determinados pelo método coagulométrico através do uso do conjunto diagnóstico PTTa® (Diagnostica Stago®, Asnières, France) juntamente

com os plasmas deficientes em fator VIII, IX e XI (Diagnostica Stago®, Asnières, France). As dosagens coagulométricas e cromogênicas foram realizadas no aparelho STA Compact (Stago®). Os valores de referência indicados pelo fabricante para os marcadores analisado são: PS livre - 61% a 128%; PC - 70% a 130%; AT - 80% a 120%; VIII - 60% a 150%; IX - 60% a 150% e XI - 60% a 140%.

Para as variáveis contínuas foram calculados os valores de média e desvio-padrão. O teste t de Student foi utilizado para comparação dos grupos utilizando o programa Prism® 3.0. Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 2.

Na avaliação dos anticoagulantes naturais pode-se observar redução dos valores de PS livre e PC e uma redução marcante de AT, quando comparados com o grupo controle.

Em relação aos fatores de coagulação, os pacientes com DCG I apresentaram valores semelhantes ao grupo controle para os fatores VIII e IX e redução marcante do fator XI. Comparando com os valores de referência do fabricante, pode-se observar um discreto aumento do valor médio de fator VIII.

Discussão

É descrito na literatura que pacientes jovens com DCG tipo I apresentam alterações hemostáticas, tais como hemorragias, episódios semelhantes à AVC isquêmico (*stroke-like*) e trombozes venosas.⁸ O desequilíbrio do sistema hemostático, possivelmente ocasionado pela alteração da glicosilação das proteínas pró e anticoagulantes, é sugerido como uma provável etiologia para a ocorrência desses eventos.^{3,11}

Embora todos os fatores de coagulação sejam glicoproteínas, sabe-se que somente alguns se apresentam reduzidos nos pacientes com DCG.¹⁰ Vários mecanismos têm sido propostos para o efeito da hipoglicosilação na atividade dos fatores hemostáticos: aumento do *clearance* hepático, redução da estabilidade da proteína (alteração da solubilidade, viscosidade, carga e/ou desnaturação) ou redução direta da atividade da proteína sem perda quantitativa.^{10,12}

A deficiência de anticoagulantes naturais é reconhecida como fator de risco para eventos trombóticos em adultos e crianças, entretanto, pouco se conhece sobre a redução discreta e simultânea de mais de um anticoagulante natural. No presente estudo, os

Tabela 1. Marcadores hemostáticos - anticoagulantes naturais e fatores da coagulação

	Grupo-controle	DCG I	
n	8	11	
Idade (anos)	4,5 ± 3,0	5,6 ± 4,6	ns
PS livre (%)	70,0 ± 7,0	56,3 ± 11,7	p = 0,009
PC (%)	89,6 ± 14,3	61,5 ± 26,1	p = 0,014
AT (%)	105,1 ± 11,0	53,6 ± 25,2	p < 0,0001
VIII (%)	158,6 ± 44,5	176,3 ± 41,0	ns
IX (%)	85,4 ± 16,8	91,9 ± 25,2	ns
XI (%)	93,4 ± 23,7	36,4 ± 19,8	p < 0,0001

Valores das médias ± desvios-padrão (DP). ns = não significativo, PS livre = proteína S livre, PC = proteína C, AT = antitrombina, VIII = fator VIII, IX = fator IX e XI = fator XI. Todos os resultados são expressos em porcentagem de atividade, com exceção da PS livre, que é expressa em quantidade de antígeno

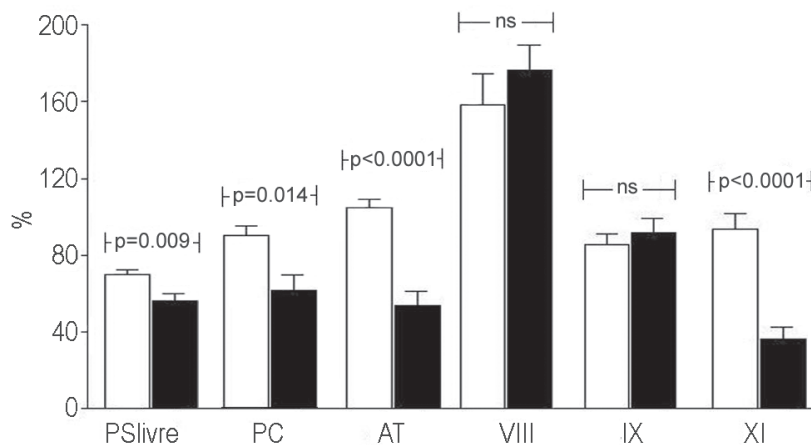


Figura 2. Distribuição dos valores de proteína S livre (PS livre), proteína C (PC), antitrombina (AT), fator VIII (VIII), fator IX (IX) e fator XI (XI). As barras em branco correspondem ao grupo-controle e as barras em negro correspondem ao grupo DCG tipo I. Todos os resultados são referentes à atividade, com exceção da PS livre que é antígeno

níveis de PS livre e PC apresentaram-se reduzidos e, notadamente, a maior redução observada entre os anti-coagulantes naturais foi em relação à antitrombina ($p < 0,0001$), confirmando relatos anteriormente publicados.^{3,9,13-15}

A redução do fator XI em indivíduos com DCG tipo I já está bem documentada na literatura.^{3,7,9} No presente estudo também foi observado redução significativa dos níveis de fator XI ($p < 0,0001$). A deficiência de fator XI é uma condição que, isoladamente, predispõe os portadores a eventos hemorrágicos. Entretanto, há concordância entre alguns estudos de que a deficiência de fator XI, na magnitude observada nos indivíduos com DCG tipo I, não ocasiona diátese hemorrágica.¹² Os dados apresentados no presente estudo apontam nesse mesmo sentido, já que não foram observados eventos hemorrágicos em nossos pacientes.

Os fatores da coagulação vitamina K dependentes (II, VII, IX e X) normalmente não são afetados pela hipoglicosilação.¹³ No presente estudo pode-se observar que nenhum indivíduo apresentou resultado alterado do fator IX.

Não há concordância na literatura em relação aos níveis plasmáticos de fator VIII nos pacientes com DCG tipo I, tendo sido relatados níveis reduzidos, normais e aumentados.^{7,9,14,16} No presente estudo foi possível observar um discreto aumento do valor médio do fator VIII em relação ao valor de referência do fabricante. O aumento de fator VIII, também é reconhecido como um fator de risco independente para eventos trombóticos.¹⁷ Nenhum participante deste estudo apresentou sinais e sintomas de processos inflamatórios e/ou infecciosos, descartando o possível aumento do fator VIII ocasionado por processo agudo.

Especula-se que a redução combinada dos anticoagulantes naturais, observada no presente estudo e em outros,¹⁰⁻¹² associada ao aumento do fator VIII, possa explicar, pelo menos em parte, os episódios similares a AVC isquêmico (*stroke-like*), observados em pacientes com DCG tipo I. É descrito também que os eventos trombóticos tendem a ocorrer na faixa etária de 4 a 15 anos.⁶ No presente estudo, apenas um paciente apresentou acidente vascular isquêmico, em idade bem mais precoce, aos 20 meses de idade. Como diversos pacientes deste estudo são menores de 4 anos, não se pode descartar que alguns deles ainda venham a apresentar esses eventos.

Alterações laboratoriais de marcadores hematológicos estão presentes nos pacientes com DGC tipo I, independente da ocorrência de eventos trombóticos ou hemorrágicos prévios. Acredita-se que o equilíbrio hemostático desses pacientes encontre-se no limite, favorecendo o estado pró-trombótico. Quaisquer condições clínicas como infecção, estresse metabólico, imobilização prolongada, desidratação, procedimentos cirúrgicos ou outra condição ocasional que favoreça o estado pró-coagulante podem levar ao desencadeamento do evento trombótico.¹⁸

Van Geet *et al*¹⁹ relataram alterações plaquetárias em pacientes com DCG tipo I. No referido estudo foi observada

agregação espontânea de plaquetas e esse fato pode ser um fator de risco adicional associado ao estado pró-trombótico.

Até o presente momento não há consenso na literatura quanto a tratamento preventivo para trombose nesses pacientes. Alguns autores especulam sobre o uso do ácido acetil-salicílico como profilaxia secundária. Para pacientes com DCG que apresentem complicações hemorrágicas o uso de medicamentos que alterem o mecanismo hemostático está contraindicado.^{8,16,18}

Sugerimos que a análise de parâmetros hemostáticos seja realizada para pacientes com DCG antes de procedimentos invasivos ou quando apresentarem sinais clínicos de alteração do sistema hemostático. Estes parâmetros podem, ainda, ser utilizados como marcadores auxiliares no diagnóstico laboratorial de DCG tipo I.

Estudos complementares são de grande interesse para a ampliação dos conhecimentos sobre a hemostasia nos pacientes com DCG tipo I. Marcadores como GPIIb/IIIa de plaquetas, trombosmodulina, fator de Von Willebrand, Adamts 13, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e dímero D podem contribuir para melhor compreensão das alterações e dos processos envolvidos na regulação hemostática dos pacientes com DCG tipo I.

Abstract

Defects in the biosynthesis of N-linked human protein glycosylation leads to a group of multisystem disorders collectively called congenital disorders of glycosylation (CDG). CDG present in infancy with neurologic symptoms that include psychomotor retardation, ataxia, hypotonia and stroke-like episodes. Many haemostatic system proteins only present biological activity after glycosylation. The aim of this study was to evaluate coagulation inhibitors (free protein S, protein C and antithrombin) and coagulation factors (VIII, IX and XI) in CDG type I patients. Eleven patients with CDG type I (three males and eight females) with a mean age of 5.6 years old, and eight patients without CDG (four males and four females) with a mean age of 4.5 years old (control group) were evaluated. The diagnoses of CDG type I were confirmed by isoelectric focusing of serum transferrin. When coagulation inhibitors were evaluated, decreased activity of free protein S and protein C, and a pronounced reduction of antithrombin were observed compared to the control group. There was no significant difference for coagulation factors VIII and IX but a markedly decrease in factor XI. The present results suggest that a combined deficiency of coagulation inhibitors is responsible for the pro-thrombotic state observed in CDG patients. We recommend that a haemostatic analysis should be performed in CDG patients with clinical haemostatic manifestations before invasive procedures are performed. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(2):131-135.

Key words: Glycosylation; thrombophilia; blood coagulation factors.

Referências Bibliográficas

- Schachter H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(8):1085-104.
- Eklund EA, Freeze HH. The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. *Neuro Rx.* 2006;3(2):254-63.
- Aebi M, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol.* 2001;11(3):136-41.
- Jaeken J. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): its all in it! *J Inherit Metab Dis.* 2003;26(2-3):99-118.
- Jaeken J, Hennet T, Freeze HH, Matthijs G. On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). *J Inherit Metab Dis.* 2008;31(6):669-72.
- Miossec-Chauvet E, Mikaeloff Y, Heron D, Merzoug V, Cormier-Daire V, de LP, et al. Neurological presentation in pediatric patients with congenital disorders of glycosylation type Ia. *Neuropediatrics.* 2003;34(1):1-6.
- Young G, Driscoll MC. Coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: case report and review of the literature. *Am J Hematol.* 1999;60(1):66-9.
- Grunewald S. The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochim Biophys Acta.* 2009;13.
- Fiumara A, Barone R, Buttitta P, Musso R, Pavone L, Nigro F, et al. Haemostatic studies in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Thromb Haemost.* 1996;76(4):502-4.
- Okamoto N, Wada Y, Kobayashi M, Otani K, Tagawa T, Futagi Y, et al. Decreased blood coagulation activities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis.* 1993;16(2):435-40.
- Dinopoulos A, Mohamed I, Jones B, Rao S, Franz D, de Grauw T. Radiologic and neurophysiologic aspects of stroke-like episodes in children with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatrics.* 2007;119(3):e768-e772.
- Van GC, Jaeken J. A unique pattern of coagulation abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Pediatr Res.* 1993;33(5):540-1.
- Iijima K, Murakami F, Nakamura K, Ikawa S, Yuasa I, Motosumi H, et al. Hemostatic studies in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Thromb Res.* 1994;76(2):193-8.
- Funk M, Becker S, Potzsch B, Kreuz W, Bohles H. Thrombophilia in a child with CDG-syndrome type I. *Thromb Haemost.* 1995;74(4):1199-200.
- Stibler H, Holzbach U, Tengborn L, Kristiansson B. Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996;7(2):118-26.
- Arnoux JB, Boddaert N, Valayannopoulos V, Romano S, Bahi-Buisson N, Desguerre I, et al. Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol Genet Metab.* 2008;93(4):444-9.
- Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001;47(9):1597-606.
- Ishikawa N, Tajima G, Ono H, Kobayashi M. Different neuro-radiological findings during two stroke-like episodes in a patient with a congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain Dev* 2009;31(3):240-3.
- Van GC, Jaeken J, Freson K, Lenaerts T, Arnout J, Vermylen J, et al. Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J Inherit Metab Dis.* 2001;24(4):477-92.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 10/07/2009
Aceito após modificações: 09/09/2009