

Christiane Patricia de Oliveira Mendes

***DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE TRÊS
POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
PROTEÍNA C***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Co-Orientadora: Profa. Dra. Christine Hackel

UNICAMP

1997

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	10096
V.	10096
TOMBO	33446
PROD.	395198
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/98
N.º CPD	

CM-00108706-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M522d

Mendes, Cristiane Patricia de Oliveira

Determinação da frequência alélica de três polimorfismos da região promotora do gene da proteína C / Cristiane Patricia de Oliveira
Mendes. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteínas. 2. Polimorfismo (genética). 3. Trombose. I. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi. II. Christine Hackel. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Christiane Patricia de Oliveira Mendes

***DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE TRÊS
POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
PROTEÍNA C***

Orientadora: Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Co-Orientadora: Profa. Dra. Christine Hackel

**Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da
Bióloga Christiane Patricia de Oliveira Mendes.**

Campinas, 12 de dezembro de 1997



**Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi
- Orientadora -**

Banca Examinadora da Dissertação de Mestre

Aluna: Christiane Patricia de Oliveira Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Membros:

1. Profa. Dra Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

2. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

3. Prof. Dr. Sergio Bidsloski

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 12/12/1997

Dedicatórias

*À meu irmão, Wladimir de Oliveira Mendes, “in
memorian” pelo exemplo de força, amizade e por
ter me mostrado os mais belos horizontes da vida.*

*Aos Meus Pais, Ari e Suzana, grandes companheiros
de muitas tristezas e alegrias. Sem os quais este trabalho
não seria possível. À vocês meu eterno muito obrigado.*

*Ao Meu Grande Amor pelo carinho,
dedicação, incentivo, participação e
compreensão nos momentos de
dificuldades. Te amo.*

À minha irmã, Susie, pelo apoio e amizade.

À minha avó, Beatriz, pelo amor e dedicação incondicionais.

Ao meu sobrinho Greg, que com sua juventude e garra me levou a prosseguir nesta difícil trilha das ciências.

À minha segunda mãe, Mara, pelo carinho, amizade e dedicação.

Agradecimentos

De forma muito especial à FAPESP, pela concessão da bolsa de auxílio, sem a qual este trabalho não teria sido viável, e, principalmente pela competência científica, que nos inspira a cada dia a prosseguir nesta difícil trilha da Ciência.

De forma muito especial à **Profa. Dra. Joyce Maria. Annichino-Bizzacchi**, pelo apoio atenção e principalmente pela competência ao orientar este trabalho.

À **Profa. Dra. Christine Hackel**, pela incalculável compreensão e grande apoio dispensados nos transcorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Valder R. Arruda**, pelo incentivo científico e colaboração sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Marcos de Bastos**, professor do departamento de Hematologia Clínica do Hospital dos Servidores de Minas Gerais, pelo apoio científico e colaboração.

Ao Prof. **Vagner Castro**, pelo apoio e amizade. Obrigada por tudo.

À **Pontifícia Universidade Católica de Campinas**, por ter mostrado pela primeira vez os caminhos para a pesquisa.

À **Cristina C. Ribeiro, Tânia F. G. S. Machado, Andréa M. Galizoni, Lucia Helena de Siqueira e Devanira Paixão**, do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, pela atenção e dedicação.

Aos **doadores de sangue** do Hemocentro que participaram deste estudo, que com um ato de grandeza doaram um pouco de si para que este trabalho de pesquisa fosse realizado.

Aos **pacientes (e seus familiares)** do Hemocentro, que participaram deste estudo, com um ato, antes de tudo, de amor ao próximo, doaram um pouco de si para que este trabalho de pesquisa fosse realizado.

Aos **Professores do Departamento de Farmacologia**, na especial ao **Prof. Dr. Edson Antunes** e a **Profa. Dra. Julia Prado Franceschi**, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Aos **Professores do Departamento de Genética Médica**, na especial ao **Prof. Dr. Magna**, **Profa. Dra. Antonia Paula** e a **Profa. Dra. Andrea**, por complementarna minha aprendizagem.

À **Sandra Sousa de Andrade** e **Rosana Gon Rocha**, do Departamento de Comunicação Social-Produções do Hemocentro da UNICAMP, pela atenção, colaboração e a dedicação. Muito obrigada!

Aos meus amigos **Silvio** e **David** pela força, amizade e carinho. Valeu amigos!

Abreviaturas

Abreviaturas de Enzimas

<i>Apa</i> I	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>Bst</i> XI	<i>Bacillus stearothermophilus</i> X
<i>Msp</i> I	<i>Moraxella</i> sp.
<i>Pvu</i> II	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Rsa</i> I	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas campestris</i>

Abreviaturas dos Aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspártico, ácido
Cys	Cisteína
Gly	Glicina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
Try	Tirosina
Val	Valina

Sumário

Resumo.....	i
--------------------	----------

I. Introdução	01
I.1. A coagulação sanguínea.....	03
I.2. Proteína C.....	05
I.3. Estrutura e atividade funcional da PC.....	06
I.4. Ativação da PC	08
I.5. Clonagem e caracterização dos clones de cDNA da PC.....	11
I.6. Estrutura e Expressão do gene da PC.....	13
I.7. Deficiência da PC	17
I.8. Genética molecular da deficiência da PC.....	21
I.9. Polimorfismo do gene da PC.....	26
II. Objetivos	29
III. Casuística.....	31
III.1. População indígena.....	32
III.2. População brasileira.....	34
III.3. População com trombose.....	37
IV. Material e Métodos	41
IV.1. Coleta de Sangue.....	42
IV.2. Extração de DNA de sangue periférico.....	42
IV.3. Amplificação pela PCR.....	44
IV.4. Digestão dos produtos da PCR.....	50
IV.5. Determinação da atividade anticoagulante da PC.....	56
IV.6. Análise Estatística.....	58

V. Resultados.....	59
<i>V.1. Análise da frequência dos genótipos para os 3 polimorfismos</i>	<i>60</i>
<i>V.1.a. População indígena.....</i>	<i>60</i>
<i>V.1.b. População de doadores</i>	<i>63</i>
<i>a. Dosagem da atividade da PC.....</i>	<i>69</i>
<i>b. Análise da relação dos haplótipos e a concentração de PC</i>	<i>71</i>
<i>c. Fatores de risco.....</i>	<i>74</i>
<i>V.2. População trombótica</i>	<i>75</i>
<i>a. Dosagem da atividade da PC.....</i>	<i>80</i>
<i>b. Análise da relação dos haplótipos e a concentração de PC</i>	<i>81</i>
<i>c. Fatores de risco.....</i>	<i>83</i>
<i>V.3. Comparação entre as Populações.....</i>	<i>85</i>
 VI. Discussão e Conclusão.....	 89
<i>VI.1. População Indígena.....</i>	<i>92</i>
<i>VI.2. População de Doadores</i>	<i>94</i>
<i>VI.3. População com trombose.....</i>	<i>98</i>
 VII. Summary	 101
 VIII. Referências Bibliográficas.....	 105

Anexos (1 - 5)

*Tabelas, Gráficos,
Figuras e Fotografias*

TABELAS

Tabela 1a-Exons da PC	14
Tabela 1b-Introns da PC	14
Tabela 2-População Indígena (espelho)	ANEXO 1
Tabela 3a-População Indígena: Resumo por sexo	32
Tabela 3b-População Indígena: Resumo por aldeia	32
Tabela 4-População Brasileira (espelho)	ANEXO 3
Tabela 5a-População Brasileira: Resumo por sexo	35
Tabela 5b-População Brasileira: Resumo por raça	35
Tabela 5c-População Brasileira: Resumo por sexo X raça	35
Tabela 5d-População Brasileira: Resumo média e desvio padrão	35
Tabela 6a-Resumo dos Fatores de Risco Pessoais	36
Tabela 6b-Resumo dos Fatores de Risco Antecedentes	36
Tabela 7-População com trombose (espelho)	ANEXO 4
Tabela 8a-População com trombose: Resumo por sexo	38
Tabela 8b-População com trombose: Resumo por raça	38
Tabela 8c-População com trombose: Resumo por sexo X raça	38
Tabela 8d-População com trombose: Resumo média e desvio padrão	38
Tabela 9a-Frequência das manifestações clínicas	39
Tabela 9b-Resumo das etiologias para trombose	40
Tabela 10-Localização dos três Polimorfismos e a Posição dos primers	45
Tabela 11-Descrição das enzimas para as digestões	50
Tabela 12-Possíveis genótipos a serna encontrados	55
Tabela 13a-Frequência do polimorfismos CT na População Indígena	60
Tabela 13b-Frequência do polimorfismos AG na População Indígena	61
Tabela 13c-Frequência do polimorfismos AT na População Indígena	61
Tabela 14-Genótipo encontrado na População indígena	62
Tabela 15a-Frequência do polimorfismos CT na População brasileira	63
Tabela 15b-Frequência do polimorfismos AG na População brasileira	64
Tabela 15c-Frequência do polimorfismos AT na População brasileira	64
Tabela 16a-Frequência do polimorfismos CT na População brasileira por raça	65
Tabela 16b-Frequência do polimorfismos AG na População brasileira por raça	65
Tabela 16c-Frequência do polimorfismos AT na População brasileira por raça	65
Tabela 17-Frequência dos genótipos encontrados na População brasileira	66

<i>Tabela 18a- Frequência dos genótipos encontrados na População caucasóide</i>	67
<i>Tabela 18b-Frequência dos genótipos encontrados na População negróide</i>	68
<i>Tabela 19- Média da concentração de PC corelacionados aos genótipos</i>	70
<i>Tabela 20- Média da concentração de PC</i>	ANEXO 5
<i>Tabela 21- Análise comparativa independente entre os genótipos os NPC</i>	72
<i>Tabela 22- Análise comparativa entre os genótipos na duplas e os NPC</i>	73
<i>Tabela 23-Análise de regrasso entre os NPC e os fatores de risco</i>	74
<i>Tabela 24a-Frequência do polimorfismos CT na População com trombose</i>	75
<i>Tabela 24b-Frequência do polimorfismos AG na População com trombose</i>	76
<i>Tabela 24c-Frequência do polimorfismos AT na População com trombose</i>	76
<i>Tabela 25a-Frequência do polimorfismos CT na Pop. com trombose por raça</i>	77
<i>Tabela 25b-Frequência do polimorfismos AG na Pop. com trombose por raça</i>	77
<i>Tabela 25c-Frequência do polimorfismos AT na Pop. com trombose por raça</i>	77
<i>Tabela 26-Frequência dos genótipos encontrados na Pop. com trombose</i>	78
<i>Tabela 27a-Frequência dos genótipos encontrados na Pop. caucasóide</i>	79
<i>Tabela 27b-Frequência dos genótipos encontrados na Pop. negróide</i>	79
<i>Tabela 28-Média da concentração de PC</i>	80
<i>Tabela 29-Análise comparativa entre os genótipos na duplas e os níveis PC</i>	82
<i>Tabela 30-Análise de regrasso entre os níveis de PC e os fatores de risco</i>	83
<i>Tabela 31-Comparativa dos genótipos com N>10 entre doadores e pac.</i>	86
<i>Tabela 32-Comp.dos genótipos entre controles caucasóides MENDES e SPEK</i>	87
<i>Tabela 33-Comp. dos genótipos entre pacientes caucasóides MENDES e SPEK</i>	87

FIGURAS

<i>Figura 1- Cascata da Coagulação</i>	03
<i>Figura 2- Estrutura da PC</i>	06
<i>Figura 3- Ativação e Inativação da PC</i>	10
<i>Figura 4- Mapa de Restrição do cDNA do gene clonado da PC</i>	11
<i>Figura 5- Mapa de Restrição: Exons e Intros da PC</i>	13
<i>Figura 6a- Região Promotora da PC polimorfismo C/T</i>	46
<i>Figura 6b- Região Promotora da PC polimorfismo A/T</i>	46
<i>Figura 6c- Região Promotora da PC polimorfismo A/T</i>	46
<i>Figura 6- Região Promotora da PC com Posição dos primers (resumo)</i>	47
<i>Figura 7a- Ciclo dos Primers 1-3</i>	48
<i>Figura 7b- Ciclo dos Primers 2-3</i>	49

FOTOGRAFIAS

<i>Foto 1-Análise da Digestão do Polimorfismo CT primer 1-3</i>	52
<i>Foto 2- Análise da Digestão do Polimorfismo CT primer 2-3</i>	52
<i>Foto 3- Análise da Digestão do Polimorfismo AG primer 1-3</i>	53
<i>Foto 4- Análise da Digestão do Polimorfismo AG primer 2-3</i>	53
<i>Foto 5- Análise da Digestão do Polimorfismo AT primer 1-3</i>	54
<i>Foto 6- Análise da Digestão do Polimorfismo AT primer 2-3</i>	54

ANEXOS

<i>ANEXO 1- Tabela 2-População Indígena (espelho)</i>	
<i>ANEXO 2- Questionário aplicado na população de doadores</i>	
<i>ANEXO 3- Tabela 4-População Brasileira (espelho)</i>	
<i>ANEXO 4- Tabela 7-População com trombose (espelho)</i>	
<i>ANEXO5- Tabela 7-Nível de PC na Pop. de doadores (espelho)</i>	

GRÁFICOS

<i>Gráfico 1-Distribuição dos níveis de PC</i>	69
--	----

Resumo

A cascata da coagulação sanguínea humana, em condições normais, é regulada por vários mecanismos naturais de anticoagulação. Entre esses mecanismos está a chamada Via da Proteína C (PC) Anticoagulante. A PC é uma proteína hepática dependente da vitamina K, que, quando ativada, exerce uma potente atividade anticoagulante e pró-fibrinolítica. Os pacientes com deficiência de PC apresentam quadro clínico caracterizado por fenômenos tromboembólicos.

Apenas 2-5% dos pacientes com trombose venosa apresentam deficiência de PC. Contudo, devido à importância desse anticoagulante natural, a diminuição de sua concentração, mesmo que ainda dentro dos limites da normalidade, talvez possa ser um fator de risco a mais, que contribua para a trombose nesses pacientes.

Recentemente foram descritos três polimorfismos na região promotora do gene da PC; um polimorfismo C/T, na posição -1654 e um polimorfismo A/G, : um polimorfismo na posição -1641 A/T, na posição -1476 (REITSMA, 1993). A análise desses três polimorfismos, em 24 famílias normais da Holanda, demonstrou que os três haplótipos mais frequentes eram CAA, CGT e TAA, e representavam 88% dos casos. Segundo os autores os polimorfismos CGT e TAA tinham relação com a concentração da atividade plasmática de PC, na qual o genótipo CGT está associado a um risco elevado de trombose venosa, uma vez que foi mais frequente nos indivíduos com trombose (risco relativo associado a doença de 1.9 ou OR de 1.9) frente ao genótipo TAA (OR de 1.6).

Neste trabalho determinamos a frequência destes 3 polimorfismos em três grupos étnicos da população brasileira (caucasóide, negróide e indígena), e em pacientes com trombose venosa mas sem deficiência congênita de PC. Analisamos se em nossa população havia uma correlação entre o genótipo e a concentração da atividade de PC, ou se algum dos genótipos estava associado ao risco de trombose.

A população indígena foi constituída por 87 indivíduos. Observou-se uma maior frequência de homozigotos nos três genótipos estudados (CC - 52,9%; GG - 54% e AA - 70,1%), que também se manteve na análise considerando os três genótipos, simultaneamente (CC/GG/AA -21,8%). Tal resultado leva-nos crer que os índios brasileiros estudados no presente trabalho ainda não sofreram forte influência da miscigenação, bastante comum em nosso país. Esse grupo indígena tem sua tribo em localização razoavelmente isolada do convívio do homem civilizado, o que resulta na pouca variação genômica (baixo fluxo gênico).

A população de doadores caucasóide e negróide foi constituída por 216 homens e 50 mulheres. A população caucasóide foi constituída por 188 indivíduos (147 homens e 41 mulheres) e a negróide por 78 indivíduos (69 homens e 9 mulheres). Quando esses grupos foram analisados em conjunto, observou-se uma maior frequência de heterozigotos nos 3 polimorfismos (CT - 59,4% e AG - 59,4%; AT-70,7%). A análise conjunta dos 3 polimorfismos revelou uma predominância do genótipo heterozigoto (CT/AG/AT - 27,4%). Isto sugere um elevado fluxo gênico, o que é esperado, visto a alta taxa de miscigenação em nossa população.

A frequência dos polimorfismos na raça caucasóide foi CT-57%, AG-59%; e AT-64%; e na raça negróide CT-65%, AG-60% e AT-77%. A conjugação dos 3 polimorfismos mostrou que na raça caucasóide houve predominância do genótipo CT/AG/AT (28,3%) assim como na raça negróide (30,1%). Sendo que as populações caucasóide e negróide não apresentaram diferença significativa.

A dosagem da atividade de PC na população de doadores variou de 70 a 150%, com uma média de 102%. Contudo, não se evidenciou nenhuma relação entre os níveis de PC e os genótipos, exceto para o polimorfismo A/T, conforme descrito na população holandesa. Também, o genótipo CC/GG/TT, associado a níveis diminuídos de PC naquela população foi praticamente nulo (menor que 1%) em nossa população de brasileira, não permitindo qualquer análise.

A média da atividade de PC dos 2 genótipos mais frequentes (CT/AG/AT e CC/AG/AT) na população de doadores caucasóide e holandesa foi semelhante ($p=0,039$).

Verificou-se nos doadores uma diferença significativa nos níveis de PC no polimorfismo 3, entre AA e AT com uma concentração da atividade de 108% e 99% ($p=0,015$), respectivamente, associada a homozigose CC, que também mostrou uma diferença significativa entre CC/AA e CC/AT com uma concentração da atividade de 112.76% e 99.96% ($p=0,004$), respectivamente). Isto poderia sugerir que o polimorfismo AT em homozigose para o C influencia na diferença dos níveis de PC, em relação ao polimorfismo 3. Como os resultados na população holandesa são opostos aos nossos, pois aqueles indivíduos com o genótipo CC/AT exibem níveis de PC mais elevados, não permitem que se faça qualquer afirmativa com segurança.

Na população com trombose, houve predominância do sexo feminino, sendo 35 homens e 88 mulheres. Quanto à raça, também houve uma predominância de indivíduos caucasóides ($n=108$) sobre os negróides ($n=15$).

Verificou-se uma maior frequência de heterozigossidade dos 3 polimorfismos (CT-65,5%; AG-54% e AT-55,5%), assim como do genótipo heterozigoto (CT/AG/AT-21,1%).

Mesmo quando os pacientes foram separados por raça, também verificou-se um maior índice de heterozigossidade, sendo CT-64%;e AG-52,3% e AT-54% no caucasóides e, CT-75%; AG-66,7% e AT-77,7% nos negróides. Sendo que as populações caucasóide e negróide não apresentaram diferença significativa.

O polimorfismo 2 em homozigose para o A foi significativamente mais frequente na população com trombose (46%), quando comparada à população de doadores (24.4%) ($p=0.005$). Tais dados sugerem que o genótipo AA é um fator de risco para trombose (OR 1.93, 95% CI, 1.11 a 3.24). Contudo, em nossa população esse genótipo não está associado a níveis

Por outro lado, o haplótipo CGT, considerado um fator de risco para trombose nos pacientes holandeses, foi encontrado em apenas 1% dos nossos pacientes. Apesar de serem 2 populações diferentes, caso esse genótipo fosse um fator de risco, esperaríamos uma maior frequência em nossos pacientes, assim como verificamos um aumento da prevalência de outras alterações genéticas associadas à trombose, como o fator V de Leiden, a mutação da protrombina e a mutação no gene da metilenotetrahidrofolatoredutase.

A frequência dos genótipos com maior e menor concentração da atividade de PC não é diferente entre doadores e pacientes com trombose, sugerindo que esses polimorfismos parecem não estar diretamente ligados ao risco de trombose.

Portanto, nossos resultados demonstraram que em nossa população, tanto de doadores como de pacientes com trombose, esses 3 polimorfismos praticamente não estão associados com os níveis de atividade plasmática de PC.

Esses resultados mais uma vez ilustram a grande diversidade genética, nas populações humanas, mesmo entre grupos étnicos semelhantes, apontando para a importância de se analisar individualmente cada população, para que as conclusões possam ser bem fundamentadas.

I - Introdução

A progressiva complexidade do sistema circulatório dos organismos multicelulares foi acompanhada pelo desenvolvimento paralelo de um mecanismo capaz de impedir a perda do líquido circulante sob pressão. Este mecanismo encontra sua mais completa e complexa expressão nos mamíferos superiores, sendo denominado sistema hemostático. São partes integrantes de tal sistema os vasos sanguíneos, os elementos figurados do sangue, as plaquetas e as substâncias existentes no plasma em estado inativo, os fatores pró-coagulantes. Além desses fatores, que poderíamos chamar de estritamente hemostáticos, colaboram no controle da hemorragia outros fatores peri-vasculares locais. (REISTMA; *et al.*; 1991)

O mecanismo normal da coagulação é absolutamente essencial à hemostasia. Para a melhor compreensão deste mecanismo, o estudo da sequência dos acontecimentos que ocorrem quando um pequeno vaso sanguíneo é lesado, tem sido abordado de modo experimental, utilizando para isto diversos métodos: a microscopia eletrônica, análises bioquímicas e nos últimos tempos técnicas moleculares. (REISTMA *et al.*; 1993)

Toda teoria atual da coagulação, iniciada pelos trabalhos fundamentais de *Moravitz* no início do século, baseia-se na demonstração da existência no plasma, de substâncias pró-coagulantes que reagem entre si no decurso do processo da coagulação. As substâncias pró-coagulantes existem ou como zimógenos, os quais sofrem ativação para se transformarem em enzimas, ou então são cofatores enzimáticos. A maioria destas substâncias apresentam-se em quantidades mínimas no plasma.

Quando um vaso sanguíneo sofre uma lesão, os mecanismos hemostáticos de vasoconstrição, adesão e agregação plaquetária e coagulação do sangue são ativados no sentido de controlar o extravasamento sanguíneo. Como resultado, um coágulo sanguíneo é formado, nos indivíduos normais. Durante o processo de hemostasia este coágulo sanguíneo é incorporado aos tecidos que circundam a lesão, ocorrendo a cicatrização, com restauração do endotélio vascular.

Especificamente, a coagulação sangüínea tem por finalidade a formação de uma rede de filamentos insolúveis de fibrina, estancando a hemorragia.

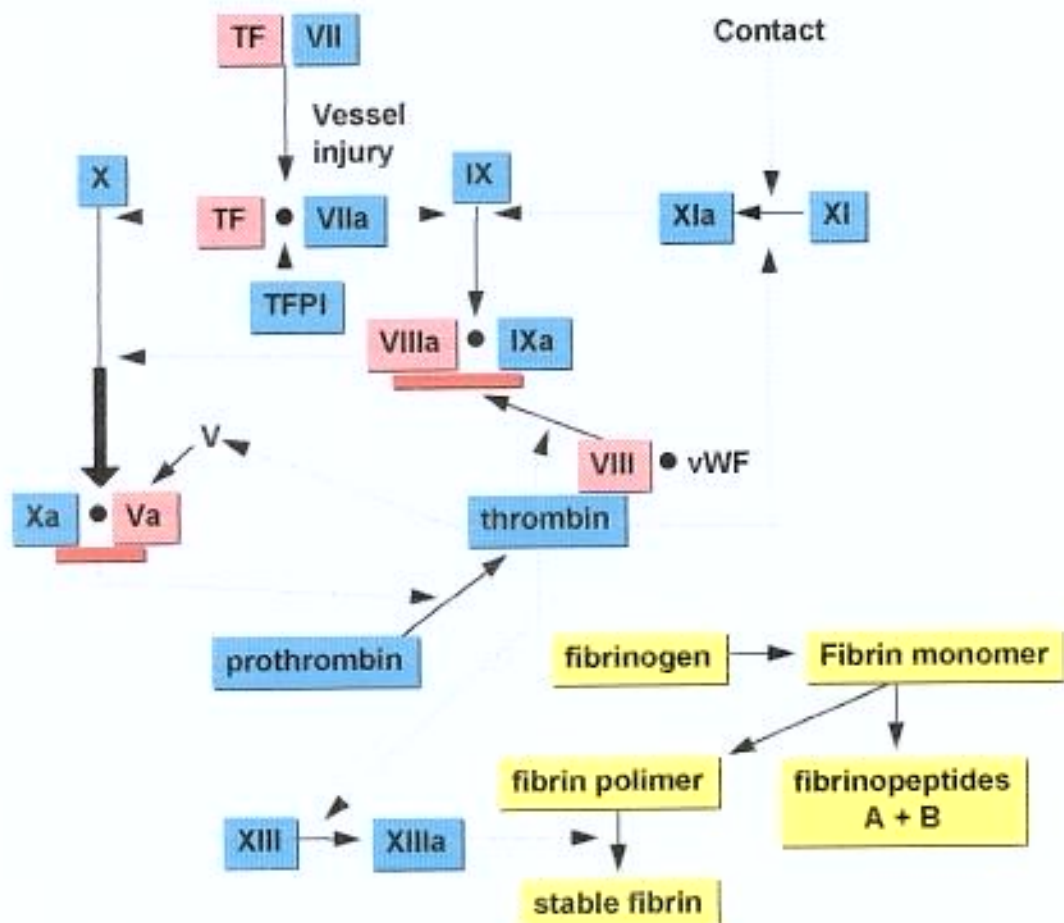
O mecanismo de coagulação é formado por uma sequência de transformações de pró-enzimas em enzimas, onde cada fator (enzima), ao ser ativado, atua sobre o próximo precursor transformando-o em sua forma ativa. O resultado final é a formação de fibrina. Esta teoria sequencial, ou em cascata da coagulação, foi proposta por McFARLANE (1964) e DAVIE & RATNOFF (1964), de forma independente, e permanece inalterada até os dias de hoje.

1.1. A Coagulação Sanguínea

A coagulação é desencadeada no momento em que fatores inativos transformam-se em substâncias ativas, com atividade enzimática específica. Esses fatores da coagulação são todos proteínas que, em sua grande maioria, são produzidas pelo fígado (figura 1).

A ativação da cascata sanguínea pode ser efetuada por duas vias. A via intrínseca é desencadeada através do contato dos fatores da coagulação sanguínea com superfícies estranhas, que não o endotélio vascular íntegro. A outra via é a extrínseca, que é ativada pelo fator tissular, liberado de células e tecidos da área lesada. Ao contrário do que se pensava antigamente, sabe-se hoje que essas vias são inter-relacionadas.

Fig 1: *Cascata da coagulação Sanguínea*



A via intrínseca iniciada pela ativação dos fatores de contato (F.XII, pré-caliceína plasmática e cininogênio de alto peso molecular) continua seu caminho através da sequência enzimática, até formar um complexo com forte atividade coagulante representada pelos fatores ativados IX, FVIII, fator 3 plaquetário e Ca^{2+} . Este complexo atua sobre o fator X (FX), ativando-o (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

O FX ativado (FXa) é o produto final da atuação das duas vias, visto que é formado quando o FVII, que inicia a via extrínseca da coagulação, é fixado e ativado pelo fator tissular.

O FXa forma um novo complexo junto ao FV, previamente ativado pela trombina, fator 3 plaquetário e cálcio (Ca^{2+}), para transformar a pro-trombina em trombina.

A trombina, enzima altamente proteolítica, degrada a molécula de fibrinogênio, rompendo-a e liberando os fibrinopeptídeos A e B, das cadeias peptídicas α e β , respectivamente. O monômero assim formado se polimeriza facilmente, formando o coágulo de fibrina solúvel. Através de reação de transamidação, o FXIII, previamente ativado pela trombina e Ca^{2+} , consolida o coágulo, estabilizando-o (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Ao mesmo tempo em que estas substâncias pro-coagulantes são ativadas, os inibidores fisiológicos da coagulação, que também são proteases, formam complexos com os fatores ativados, inibindo e modulando fisiologicamente a coagulação sanguínea. Os anticoagulantes naturais mais importantes são a antitrombina III, a proteína C (PC), a proteína S e o inibidor da via extrínseca da coagulação (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

1.2. Proteína C (PC)

A PC é um dos componentes do sistema de anticoagulação natural humano. Ela é uma serinoprotease, de produção hepática, dependente da vitamina K, que inibe a coagulação sanguínea pela inativação dos fatores Va e VIIIa (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Usualmente a PC circula como um zimógeno inativo (DAHLBACK *et al.*; 1986) e é ativada na microcirculação pela trombina, na presença de um cofator endotelial, a trombomodulina (ESMON, 1989) (DITTMAN & MAJARUS, 1990). A trombina cliva a cadeia pesada da PC em uma única ligação peptídica, entre Arg12 e Leu13 (KISIEL, 1979). Uma vez ativada, a PC modula a degradação dos fatores V e VIII da coagulação, tendo a proteína S como cofator dessa reação. (BROEKMANS & BERTINA, 1985); (CONARD *et al.*; 1992); (DOLAN *et al.*; 1989).

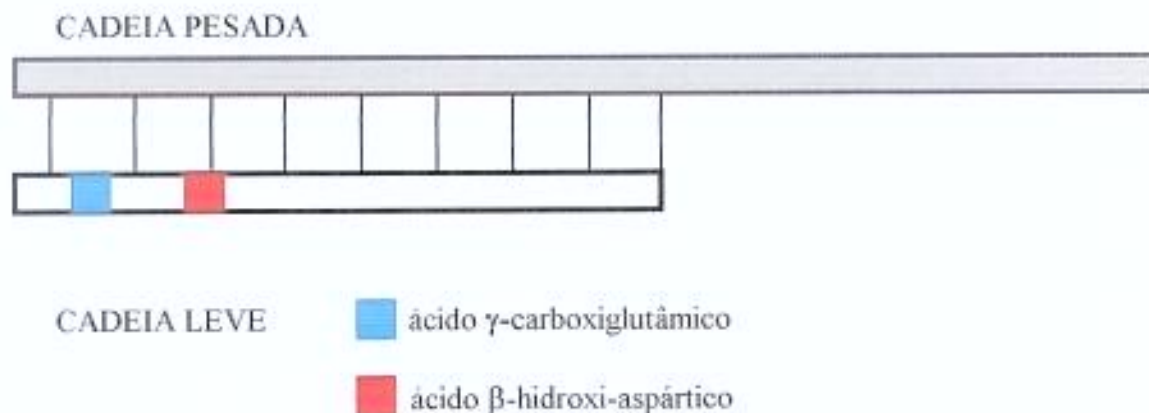
Além da PC inativar (PCI), os fatores Va e VIIIa, ela também tem uma ação pró-fibrinolítica, inibindo o inibidor do ativador tissular do plasminogênio (SAKATA, *et al.*; 1985).

A PC possui também um inibidor, que é uma glicoproteína de cadeia simples (57kDa) sintetizada pelo fígado, que apresenta uma concentração plasmática de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O inibidor forma um complexo molecular de 1:1 com a PC ativada, e neste processo o sítio ativo da PC é clivado (Arg 354-Ser 355), liberando um peptídeo na porção C-terminal.

O PCI, também chamado de inibidor do ativador do plasminogênio tipo 3, inativa tanto o ativador tissular do plasminogênio como a uroquinase, assim como a calicreína plasmática e o FXIa. A sequência de aminoácidos do inibidor da PC apresenta homologia com outros inibidores de serino-proteases, como a α_1 -antiquimotripsina, a α_1 -antitripsina, a antitrombina III e o angiotensinogênio (SUZUKI *et al.* 1987).

1.3. Estrutura e Atividade Funcional da Proteína C

A PC humana é sintetizada inicialmente no fígado como uma molécula de cadeia simples originária de um gene de cópia única (FOSTER & DAVIE, 1984) (BECKEMAMN *et al.*, 1985). Com a remoção do dipeptídeo Lys-Arg transforma-se numa molécula de cadeia dupla. A cadeia leve, com peso aproximado de 25kDa contém o ácido γ -carboxiglutâmico, que é Ca^{2+} dependente e possibilita sua ligação com os receptores de membrana, para que possa ocorrer sua ativação. Também na cadeia leve encontra-se o ácido β -hidroxi-aspartico na posição 71, de função ainda não esclarecida. A cadeia pesada possui um peso aproximado de 41kDa e está ligada à cadeia leve por pontes de dissulfetos (FOSTER & DAVIE, 1984); (BECKEMAMN *et al.*; 1985); (KISIEL, 1979). A figura 2 mostra a estrutura da PC.



A PC humana plasmática é encontrada predominantemente sob a forma de cadeia dupla, e apenas de 10 a 25% sob a forma de cadeia simples (HEEB & GRIFFIN; 1988); (GREFFE *et al.*; 1989). A sequência completa de aminoácidos da PC de cadeia dupla é prescrita através do seu

cDNA (FOSTER *et al.*; 1985), e comprova que o dímero é originário da proteína de cadeia simples.

A cadeia *leader* da PC é composta por 42 aminoácidos, apresentando em sua sequência 2 regiões distintas: a sequência pré (-42 até -25), que possui domínios hidrofóbicos (-40 até -29), e a sequência pró (-24 até -1) com elementos conservados e uma sequência homóloga comum a todas as proteínas Gla que evidenciam carboxilação dependente da vitamina K.

Foster e colaboradores (1987a) mostraram que os elementos Arg -1 e Arg -4 do pró-peptídeo são importantes para a sua liberação. A sequência de clivagem Ala-Asn-Ser-Phe-Leu, está localizada na porção N-terminal, na qual, um dipeptídeo, Lys-Arg, que liga Leu 155 ao Asp 158, é removido antes da liberação da endoprotease.

A estrutura secundária da PC é quase na sua totalidade semelhante aos fatores IX, X e VII. A região N-terminal compreende 37 aminoácidos incluindo os domínios Gla, ligados por hélice anfipática (38 até 46) a dois domínios do fator de crescimento.

Durante a biossíntese da PC humana, dois processos ocorrem para que esta obtenha sua funcionalidade. O primeiro é a γ -carboxilação de 9 resíduos de ácidos glutâmicos nas posições 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26 e 29 da cadeia leve (BECKEMANN *et al.*, 1985), para que a mesma possa se ligar ao Ca^{2+} e receptores de membrana (SUGO, *et al.*; 1985) e, conseqüentemente, participe das atividades anticoagulantes (ZHANG, *et al.*; 1992). O processo de γ -carboxilação da PC tem sido analisado por mutação dirigida e expressão *in vitro* (FOSTER *et al.*; 1987a) e os elementos de -12 até -17 mostraram ser essenciais para que ocorra esta γ -carboxilação. Uma PC mutante que não apresente esta sequência perde sua atividade anticoagulante. O outro processo é a β -hidroxilação, originando o ácido eritro- β -hidroxi-aspartico, que também é dependente de cálcio (DRAKENBERG *et al.*; 1983).

1.4. Ativação da Proteína C

A incubação da PC com a α -trombina humana resulta na sua ativação, em uma enzima com atividade serínica-amidase. A eletroforese em gel SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis), demonstrou que a PC ativada apresenta uma diminuição da cadeia pesada de 41KDa para 40KDa, e nenhuma alteração na cadeia leve. A cadeia pesada da PC humana possui o sítio ativo serínico, que lhe confere atividades proteolíticas e anticoagulantes.

A ativação da PC é simples, ocorre pela clivagem do sítio de ligação entre os peptídeo Arg 169 e Leu 170 com a liberação do dodecapeptídeo da porção amino-terminal da cadeia pesada (KISIEL, 1979), o que explica a alteração de peso molecular verificada no gel de eletroforese. A rápida ativação da PC requer a formação de um complexo de alta afinidade entre a trombina e a trombomodulina. A trombomodulina é um cofator celular que se liga às células endoteliais, identificado por Esmon e Owen (1980; 1981, 1989). A formação do complexo aumenta a ativação da PC em aproximadamente 20 mil vezes (DITTAMAN.; 1991, ESMON.; 1989, PARKINSON *et al.*; 1992).

A reação de ativação da PC é Ca^{+2} dependente, que se liga ao fator de crescimento epidermal da cadeia leve, induzindo uma mudança conformacional, que altera o sítio de ativação da cadeia pesada (ESMON 1989). Fosfolipídios de membrana também aceleram o processo de ativação da PC (ESMON.; 1993).

Experimentos empregando preparações homólogas desta proteína, revelaram que o efeito anticoagulante da PC é causado em parte pela inativação do FVa. Esta reação de inativação envolve clivagens proteolíticas de polipeptídeos específicos na cadeia do FVa. Este processo também é Ca^{+2} dependente e requer a presença de fosfolipídios. Posteriormente verificou-se que a PC ativada também inibe o FVIIIa (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Estudos *in vivo* de PC podem fornecer importantes informações sobre doenças tromboembólicas em geral, porém é necessário escolher um sistema homólogo de proteínas, pois cada espécie parece ter um modelo de ativação particular de PC (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Os últimos estudos, usando primatas como modelo, demonstraram que a ativação da PC pode ser usada como um agente efetivo antitrombótico (TAYLOR, *et al.*; 1987); (GRUBBER, *et al.*; 1989, 1990, 1991). A infusão de PC ativada nestes animais possui um efeito antitrombótico pela prevenção da deposição de plaquetas e do aumento de fibrina.

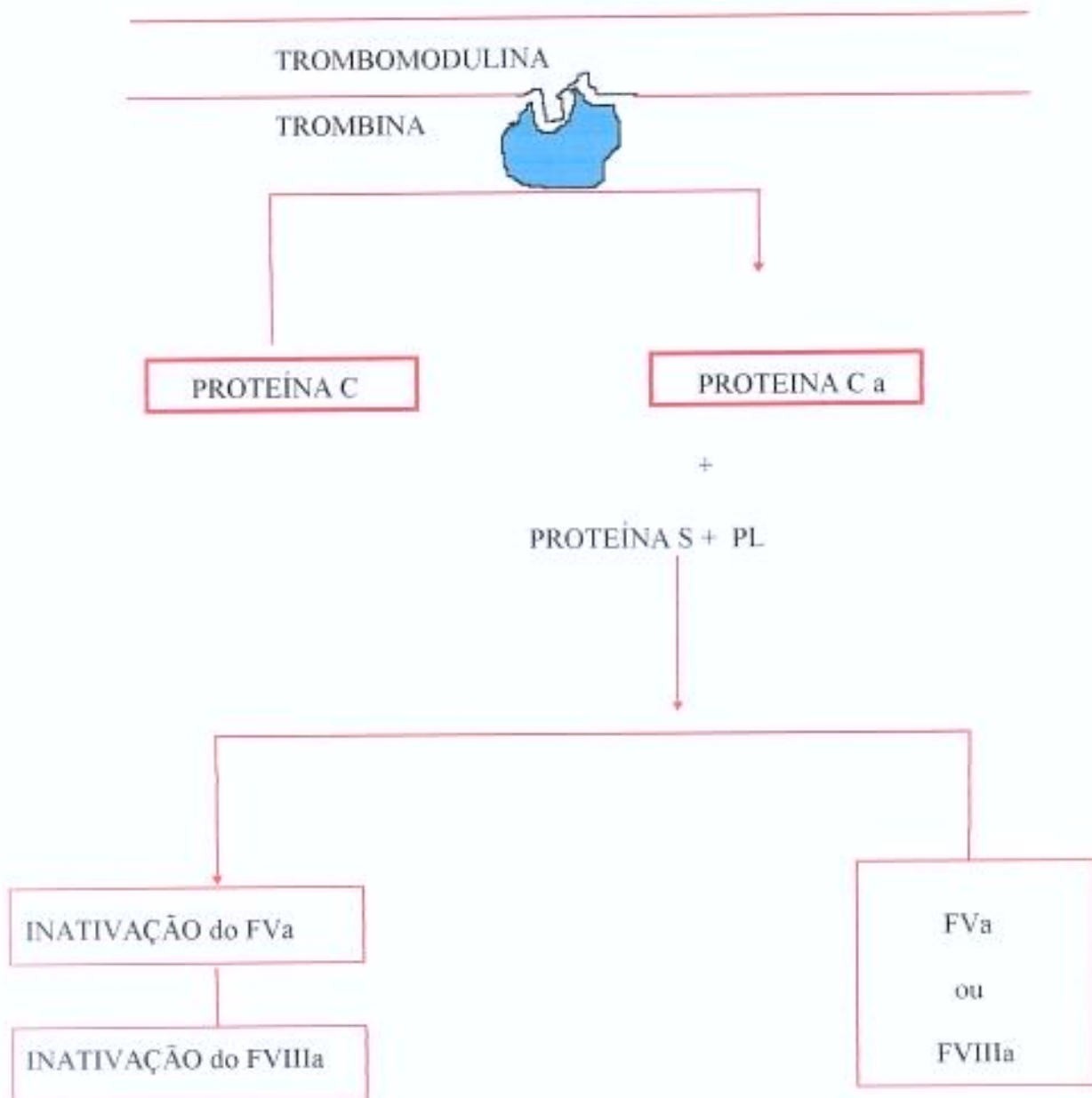
A PC ativada gerada pelo complexo trombina/trombomodulina é uma serino-protease de alta especificidade, que atua sobre os fatores V e VIII. A clivagem do FVIII ocorre entre a Arg 336 e Met 337 da cadeia pesada. O FVa é inativado através da clivagem sequencial dos sítios Arg 506 e Arg 306. Os sítios de clivagem dos fatores V e VIII são muito mais susceptíveis à PC após terem sido ativados pela trombina.

Walker (1980) mostrou que a presença de proteína S acelera a velocidade de inativação do FVa pela PC. Este processo requer a presença de fosfolipídios e íons Ca^{+2} . Um estudo recente sobre cinética da inativação (SOLYMOSS *et al.*; 1988), demonstrou que a proteína S tem apenas uma pequena participação sobre a inativação do FVa. Todavia, a proteína S anula o efeito protetor do FXa. Isto sugere que o efeito fisiológico da proteína S é permitir a inativação do FVa pela PC ativada, na presença de FXa. Independente de seu mecanismo de ação, a proteína S tem um importante papel fisiológico como anticoagulante, uma vez que sua deficiência está associada a trombofilia clínica.

A infusão de PC ativada em cães acarreta um aumento da atividade fibrinolítica (COMP & ESMON 1981). Estudos de cultura de células endoteliais *in vitro*, às quais se adicionou PC ativada mostraram a formação de complexos com o inibidor do ativador do plasminogênio tipo I, que resultaram em sua neutralização.

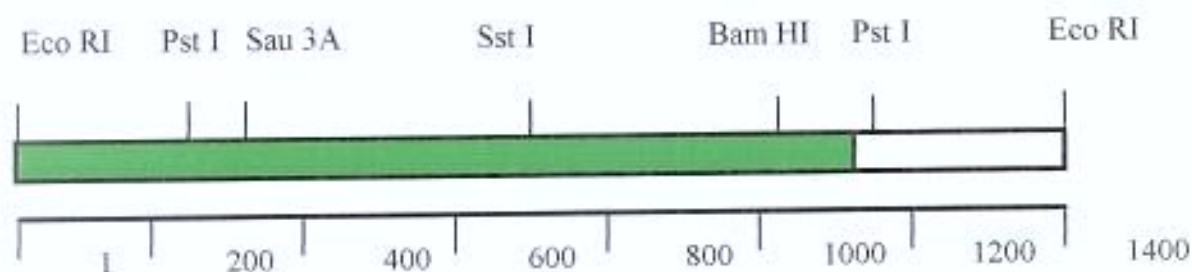
mostraram a formação de complexos com o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, que resultaram em sua neutralização. (figura 3)

Figura 3 mostra esquematicamente a formação da PC ativada e a inativação dos fatores V e VIII ativados:



1.5. Clonagem e Caracterização dos Clones de cDNA da Proteína C

Parte do cDNA da PC humana foi obtido primeiramente por Foster e David (1984). A figura 4 mostra um mapa de restrição do cDNA clonado por esses autores.



Uma outra parte do cDNA foi obtido por Beckmann *et al.*; (1985). O sequenciamento destes clones permitiu a determinação da sequência de aminoácidos que compõem a PC humana, o que até então não havia sido possível, devido a sua baixa concentração plasmática.

A sequência completa do cDNA da PC apresenta 1790bp compreendendo 75bp da região 5' não codificante; 1383bp que codifica a proteína final com 461 aminoácidos; 294bp da região não codificante na porção 3' e 38bp da sequência de poliadenilação.

A sequência *leader* da PC é formada por 42 aminoácidos, sendo que 33 deles são peptídeos codificantes que fazem parte do peptídeo final (sequência pré) e 9 deles são análogos a peptídeos de ligação, relacionados aos fatores dependentes da vitamina K (sequência pró).

A cadeia pesada apresenta 262 aminoácidos, enquanto que a cadeia leve 155, separadas pelo dipeptídeo Lys-Arg. A PC ativada é gerada pela remoção proteolítica de um peptídeo de ativação composto por 12 aminoácidos, na porção amino-terminal da cadeia pesada da PC. Isto ocorre pela clivagem pela trombina da ligação entre Arg 169 e Leu 170 (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

composto por 12 aminoácidos, na porção amino-terminal da cadeia pesada da PC. Isto ocorre pela clivagem pela trombina da ligação entre Arg 169 e Leu 170 (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

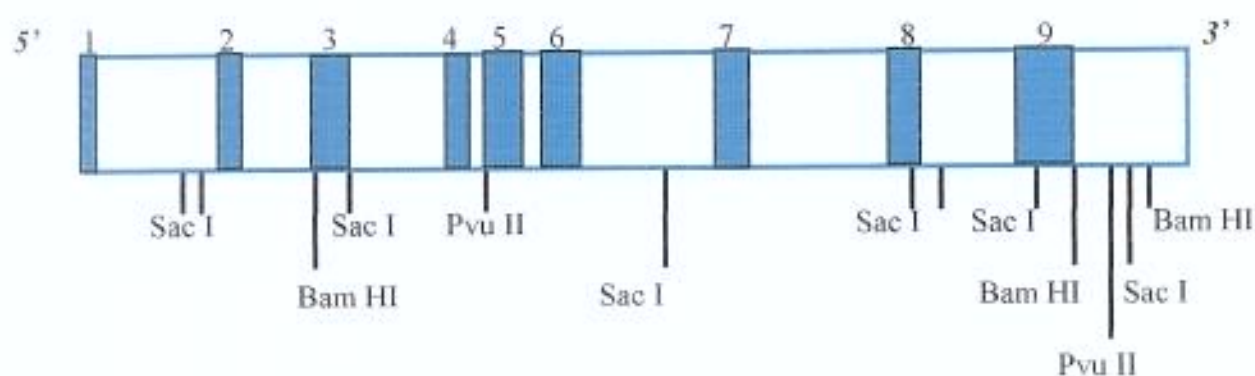
Duas possibilidades de sítio de poliadenilação (poli (A)) -ATTAAA- estão presentes na posição 3' do gene da PC, gerando 68bp ou 294bp em 3'. Ambas as seqüências -ATTAAA- estão localizadas 16bp e 9bp *upstream*, do sítio de adição de poli (A), respectivamente. Existem então dois mRNA, observados por *Northern blot*, com 1850 e 1650 nucleotídeos (BECKMANN *et al.*; 1985). Ambos apresentam semelhante número de clones isolados (FOSTER *et al.*, 1985).

A localização do gene da PC no cromossomo 2 foi determinada por hibridização de um clone de cDNA com um painel de células somáticas híbridas de hamster e humanas (ROCCHI *et al.*; 1986). Essa localização foi confirmada posteriormente por Long *et al.* (1988). A hibridização *in situ* permitiu a localização do gene da PC no cromossomo 2 na região: 2q14→q21 (KATO *et al.*; 1988). Esta localização foi posteriormente restringida à região: 2q13→q14 (PATRACCHINI *et al.*; 1989).

1.6. Estrutura e Expressão do Gene da Proteína C

Clones genômicos da PC de comprimento de 11Kb foram isolados por dois grupos de pesquisadores (FOSTER *et al.*;1985; PLUTZKY *et al.*;1986). Inicialmente, Foster *et al.* (1985), detectaram somente 8 *exons* no gene da PC. O *exon* 9, que contém 587bp e está localizado na região não codificante 3,' foi descrito posteriormente por PLUTZKY *et al.* em 1986. (Figura 5).

Figura 5. Mapa de restrição da PC, destacando seus exons:



O tamanho dos *exons* é variável; o menor apresenta um tamanho de 25bp (*exon* 4) e o maior de 587bp (*exon* 9). Similarmente, o tamanho dos *introns* também é variável, de 92bp (*intron* 4) até 2668 (*intron* 6) (Tabela I).

Tabela Ia. Tamanho, posição e domínios dos exons do gene da PC.

EXONS	bp	posição	domínios
1	53	-	região não codificante
2	70	-42 até -20	sequência leader
3	167	-19 até 37	SL e ácido γ -carboxiglutâmico
4	25	38 até 45	região de conexão (RC)
5	138	46 até 91	fator de crescimento epidermal
6	135	92 até 136	fator de crescimento epidermal
7	143	137 até 184	RC e sítio de ativação
8	115	185 até 222	sítio catalítico
9	587	223 até 419	sítio catalítico

Tabela Ib. Tamanho dos introns do gene da PC.

ÍNTRONS	bp	ÍNTRONS	bp
1	1446	5	102
2	1263	6	2668
3	1462	7	873
4	92	8	1130

Os sítios de *splicing*, via de regra, são compostos pelos nucleotídeos de consenso GT/AG e ocorrem em posição homóloga aos *introns* dos genes dos fatores VII, IX e X (YOSHITAKE *et al.*; 1985, O' HARA *et al.*; 1987, LEYTUS *et al.*; 1984). Por outro lado, a protrombina possui

al.; 1985, O' HARA *et al.*; 1987, LEYTUS *et al.*; 1984). Por outro lado, a protrombina possui em posição homóloga à PC somente os *exons* 2, 3 e 4 (FURIE e FURIE 1988), apesar de sua estreita relação evolutiva (PATTHY 1985).

A posição dos *introns* no gene da PC, assim como os de outros genes de proteases vitamina K dependentes, tem como função, separar de forma funcional as seqüências codificantes, e refletem a origem e história desta família multigênica. Todavia, a seqüência dos *introns* não é conservada, não havendo portanto homologia entre eles.

Uma seqüência TATA *box-like* (AATATTT) está presente entre a posição 34bp e 26bp, *upstream* do *exon* 1 da PC. O *exon* 1 possui 53bp, e sua localização tem relação com o TATA *box* assim como com a seqüência consenso Py-C-A-Py-Py-Py-Py do sítio de iniciação de transcrição, descrita por Corden *et al* (1980).

Dentro do *intron* 6 foram encontradas duas seqüências *Ahu*, a primeira com 300bp e na direção *antisense* (3'→5'); a segunda, com homologia parcial à primeira, com aproximadamente 146bp e na orientação *sense* (5'→3'). Tais seqüências são conectadas por seqüências repetidas de 18bp e 8bp, respectivamente, estando separadas por apenas 30bp dentro do *intron*. Ambas são flanqueadas por seqüências intrônicas ricas em AT. O *intron* 6 possui ainda outras duas repetições de aproximadamente 160bp, homólogas em 93%, mas que não tem nenhuma semelhança com outras seqüências repetidas.

A expressão da PC foi detectada por radioimunoensaio em cultura de células HepG2 (FAIR & MARLAR.; 1986), e em células humanas de fígado (WION *et al.*; 1985). O resultado foi confirmado através de clones isolados de cDNA provenientes de uma biblioteca de clones de cDNA de células de fígado humano (e.g. BECKMANN *et al.*; 1985). O mRNA da PC compreende 0.03% do mRNA total do fígado, de acordo com a concentração plasmática desta proteína, e em comparação com os níveis plasmáticos de protrombina. O nível de mRNA de PC

aumenta, de 30% para 50% do nível adulto, em fetos humanos, entre 5 e 10 semanas de gestação (HASSAN *et al.* 1990).

Tanabe *et al.* (1991) também descreveram a presença de mRNA da PC, com 1.8kb em células endotéliais originárias de veia umbilical.

I.7. Deficiência de Proteína C

O primeiro caso de deficiência de PC associado a recorrência de trombose foi descrito por Griffin *et al.* (1981). Desde então, vários estudos confirmaram a associação da deficiência de PC com trombose venosa (revisão realizada por BROECKMANS & CORNAD 1988). A deficiência de PC é freqüente (2%-5% em trombóticos), mas nem sempre hereditária. Os casos de origem genética possuem um modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável (SORIA, *et al.*; 1992). Heterozigotos podem apresentar tromboflebite superficial, doença trombótica venosa e/ou embolismo pulmonar, que podem ocorrer sem a presença de um fator de risco. Uma manifestação mais rara é a trombose arterial. Pacientes homozigotos com deficiência de PC podem apresentar um quadro grave, a *purpura fulminans*, que pode ocorrer logo após o nascimento.

A deficiência hereditária da PC pode ser classificada em dois tipos:

a) Deficiência Tipo I, a mais comum, caracterizada pela diminuição do antígeno e da atividade de PC, secundária à diminuição na síntese ou aumento de proteólise de PC. Nestes pacientes a atividade e concentração antigênica de PC no plasma pode ser muito abaixo do limite normal. A atividade normal de PC gira em torno de 72%-142%.

b) Deficiência Tipo II, na qual a atividade de PC no plasma está muito abaixo dos níveis de antígeno de PC. Tal situação ocorre devido a síntese de moléculas anormais de PC, as quais tem uma atividade reduzida.

Ambos os tipos de deficiência apresentam sintomas clínicos e idade de manifestação semelhantes e não são observadas variações nas concentrações dos demais fatores de coagulação dependentes da vitamina-K.

A probabilidade de tromboembolismo em um paciente heterozigoto da deficiência de PC aumenta com a idade. BROEKMANS (1985) demonstrou que cerca de 50% de todos os pacientes tem pelo menos um episódio trombótico antes dos 30 anos de idade, e 80% antes dos 40 anos. Entretanto, nenhum paciente manifestou qualquer sintoma clínico antes dos 15 anos de idade.

A maioria dos pacientes deficientes em PC são heterozigotos e possuem atividade plasmática de PC entre 30 e 65%. Inicialmente acreditava-se que os estados em homozigose teriam níveis de PC incompatíveis com a vida. Contudo, recentemente tem sido relatados alguns casos caracterizados por níveis antigênicos indetectáveis de PC, que cursam muitas vezes com quadro grave de *purpura fulminans* ou trombooses extensas.

A consangüinidade apresenta-se freqüentemente correlacionada a deficiência de PC em homozigose (TUDDENHAM *et al.*; 1989; MARLA *et al.*; 1989). Porém, duas situações fogem a esta regra. Primeiramente, em algumas famílias com pacientes homozigotos, nenhum parente manifesta sintomas óbvios de doença trombótica. Em outra situação, pacientes homozigotos somente apresentam sintomas trombóticos tardiamente, e muitas vezes, frustros. Tais situações permanecem sem esclarecimento e talvez outras influências genéticas e/ou ambientais possam explicar esses achados.

Portanto homozigose e deficiência grave de PC não são obrigatoriamente sinônimos. A gravidade da deficiência de PC é dependente da natureza, tipo e localização da mutação genética.

Há uma grande dificuldade na obtenção de dados confiáveis sobre incidência e prevalência da deficiência de PC, tanto em pacientes com doenças trombóticas como na população em geral. Isto ocorre devido a estudos incompletos, inadequada descrição da população alvo, documentação incompleta sobre a presença de doença trombótica ou pela falta de avaliação laboratorial.

Isto ocorre devido a estudos incompletos, inadequada descrição da população alvo, documentação incompleta sobre a presença de doença trombótica ou pela falta de avaliação laboratorial.

A prevalência da deficiência de PC em pacientes com doença trombótica está relacionada a idade, e quanto mais jovem (antes dos 40 anos), maior a probabilidade de deficiência. Esta probabilidade aumenta ainda mais quando os pacientes apresentam recorrência do quadro trombótico (revisão de DOLAN *et al.*; 1989).

Gladson *et al.* (1988) descreveram que a prevalência de heterozigotos deficientes em PC do tipo I é de 4% em um grupo de pacientes jovens não relacionados com trombose venosa; e de 12 % em pacientes com trombose recorrente.

Através dos resultados de Broekmans *et al.* (1983b) e Gladson *et al.* (1988) estima-se que os heterozigotos sintomáticos (cl clinicamente dominantes) ocorrem numa frequência entre 1/16000 e 1/36000 na população geral. Entretanto, essa estimativa foi obtida através da população de pacientes com trombose venosa, e não pode ser transferida para uma população assintomática, mas com deficiência de PC.

Miletich *et al.* (1987) verificaram que 1/60, dentro de uma amostra de 5422 adultos doadores de sangue, apresentavam níveis de antígeno de PC no limite inferior da normalidade ou compatível com a deficiência de PC tipo I (55 a 65% do nível normal). Dentre esses doadores, 10 apresentavam atividade de PC entre 34 e 51%. A confirmação de um padrão de herança autossômico nos heterozigotos foi realizado pelo estudo de 4 famílias, e uma frequência de 1/200 a 1/300 pode ser inferida. A presença de indivíduos heterozigotos para PC dentro da população normal assintomática é claramente aceita.

Bertina *et al.* (1988) sugeriram que os dados observados por Miletich *et al.* (1987) refletem a heterogeneidade clínica da deficiência de PC. Esta heterogeneidade foi confirmada por Bovill *et al.* (1989), que estudaram 184 membros de uma família da Inglaterra com deficiência de PC e que apresentavam uma elevada incidência de tromboembolismo venoso. A história trombótica estava

apresentavam uma elevada incidência de tromboembolismo venoso. A história trombótica estava presente em 13 dos 46 membros das famílias com deficiência de PC, o que sugere que a deficiência de PC em heterozigose é um fator de risco independente para trombose. Contudo, a ausência de doença em muitos familiares deficientes em PC, sugerem que outros fatores interferem em sua expressão clínica.

O estudo molecular do gene que codifica a PC poderá esclarecer a respeito da heterogenidade clínica observada nos pacientes com deficiência de PC sintomáticos e assintomáticos. Por outro lado, pode não haver diferença entre os espectros mutacionais e a apresentação clínica da deficiência, o que indicaria o envolvimento de outros fatores (MILETICH *et al.*; 1987, BERTINA *et al.*; 1988, BOVILL, *et al.*; 1989).

1.8. Genética Molecular da Deficiência de PC

Romeo *et al.* (1987) estudou o DNA de 29 indivíduos, que apresentavam deficiência de PC sem relação familiar aparente, com uma sonda de cDNA de PC e 8 enzimas de restrição (RFLP). Todos os casos, exceto um, foram classificados como deficientes em PC tipo I, e a maioria como heterozigotos para a alteração. Nenhuma deleção ou rearranjo foi localizado. Entretanto, duas variantes foram detectadas com as enzimas *Bam* HI e *Pvu* II respectivamente, em dois indivíduos que eram heterozigotos para a deficiência do tipo I. Verificou-se que as 2 mutações estavam localizadas no *exon* 9. A mutação detectada pela *Bam* HI é uma transversão TGG→TGC que ocasiona a conversão da Try 402 para uma Cys. A outra mutação é uma transição CGA→TGA na arginina Arg 306, levando a um códom de terminação (stop codon). Reitsma *et al.* (1990.; 1991) verificaram que esta mutação ocorreu também em 3 pacientes holandeses com deficiência tipo I, e que possuíam um ancestral comum 250 anos atrás. Os alelos nesses pacientes estavam associados a um fragmento de restrição raro, identificado pela *Msp* I, localizado no intron 8, e que parece ser comum na população holandesa, e não uma mutação recorrente.

Grundy *et al* (1992d) estudaram 60 pacientes, não aparentados, de origem sueca, com deficiência de PC do tipo I, por *Southern blotting* detectando a mutação Arg306→Stop, confirmada por seqüenciamento. Este exemplo quase que certamente resultou de uma mutação recorrente, uma vez que o alelo ligado a doença carrega o alelo com o polimorfismo de restrição detectado pela *Msp* I. A probabilidade estimada de recorrência da mutação e a identificação nos descendentes foram comparadas e favoreceram a hipótese de mutação recorrente.

Matsuda *et al.* (1988) relataram outra mutação de dinucleotídios CpG no gene da PC: CGG (Arg)→TGG (Trp) no códon 169, dentro do sítio de ativação pela trombina Arg-Leu. Esta mutação, conhecida como PC Tochigi, foi encontrada em pacientes japoneses com dupla

heterozigose e deficiência grave de PC, no qual o outro alelo estava deletado, e o paciente apresentava fenômenos tromboembólicos recorrentes. Uma mutação semelhante em heterozigose foi verificada em um paciente de origem britânica, não aparentado, com 30% de atividade e 40% de antígeno de PC (GRUNDY *et al.*;1989), o que ocasionou a primeira evidência de mutação recorrente para dinucleotídeos CpG, como causa de deficiência de PC.

O mais completo estudo sobre pesquisa de alterações genéticas em pacientes com deficiência de PC foi realizado por Reitsma *et al.* (1991), que avaliaram um total de 40 portadores do tipo I. Quinze mutações diferentes foram encontradas, 6 das quais representaram 75% dos defeitos observados. Estas 6 mutações envolvem os aminoácidos: Phe 76; Cys 105; Arg 230; Ile 403; Gln 132 e Arg 306. Os cromossomos portadores da mutação na Arg 230 possuem haplótipos idênticos para polimorfismos de restrição, o que sugere que essas mutações são idênticas em descendentes, e não mutações de novo.

Portanto, o espectro das mutações no gene da PC não parece ser ao acaso, uma vez que uma grande maioria ocorre em dinucleotídeos CpG, compatível com um modelo de desaminação mediado por metilação da 5-metilcitosina. Setenta e cinco por cento das 12 substituições conhecidas de apenas um par de bases no *exon* 7 ocorreram em dinucleotídeos CpG, e nenhuma das 13 mutações de ponto descritas nos *exons* 5 e 6 estão localizadas em dinucleotídeos CpG. É importante notar que a supressão de CpG é mínima nas regiões dos *exons* 4 a 6 do gene da PC. Esta alta frequência de CpG é indicativa de reduzida metilação de citosina e consistente com a ausência de desaminação mediados por metilação (REITSMA *et al.* 1993).

A predominância de mutações *missense* que ocasionam deficiência de PC é surpreendente, o que sugere que essas mutações exercem um efeito deletério sobre a estabilidade e não sobre sua função (TUDDENHAM & COOPER, 1994). Recentemente, tem sido descritas várias mutações de ponto no gene da PC que estão reunidos em uma base de dados, que é atualizado anualmente.

Várias destas mutações genéticas responsáveis pela deficiência homozigótica de PC já foram caracterizadas (GRUNDY *et al.*; 1991d, 1992c; CONARD *et al.*; 1992). O primeiro caso relatado foi de uma mutação GCA→GTA em homozigose, no qual o paciente acometido apresentava 5% de atividade e 7% de antígeno de PC, sendo que tal mutação levava a uma substituição da Ala 259 por Val, próximo ao sítio ativo Asp 257 (GRUNDY *et al.*, 1991 d). O aminoácido Ala-259 faz parte de um tetrapeptídeo, Ala-Ile-Ala-Leu, altamente conservado entre os fatores dependentes da vitamina-K. A troca desse aminoácido ocasiona mudanças conformacionais na região α -helicoidal. A importância desse resíduo é evidenciada por uma mutação análoga no gene do FIX entre GCG→GTC (Ala-271→Val) adjacente ao sítio Asp 269, que resulta em hemofilia B grave.

Outra mutação associada a deficiência de PC em homozigose é uma transição CCC→CTC, que converte Pro 247 em Leu, descrita em um paciente com atividade e concentração antigênica de PC de 6% (GRUNDY *et al.*, 1992c). A Pro 247 está localizada no final de uma sequência de 43 aminoácidos que apresenta uma conformação α -helicoidal. A remoção da Pro altera a conformação α -helicoidal a 10 aminoácidos do sítio ativo Asp 257 na porção N-terminal, alterando de uma maneira importante a estrutura e função da PC. Uma vez que tanto a atividade como o antígeno de PC estão paralelamente diminuídos, qualquer efeito deletério na função da PC deve ser secundária à alteração em sua estrutura e estabilidade.

Conard *et al.* (1992) relataram 3 casos de deficiência de PC em homozigose, com início tardio, secundários a mutações *missense*, nos códons 168, 267 e 301. Estes pacientes somente apresentaram fenômenos tromboembólicos na idade adulta (acima de 17 anos de idade) e os níveis de atividade e antígeno de PC encontravam-se entre 16 e 23% em relação aos valores considerados normais. Uma das complicações frequentes descritas nestes pacientes foi a necrose de pele quando do tratamento com anticoagulante oral.

Yamamoto *et al.*; (1992), descreveram o caso de um paciente, com níveis indetectáveis de atividade e antígeno de PC e uma importante história de recorrência de tromboembolismo desde os 31 anos de idade, no qual ocorria a substituição da Gly-292 pela Ser, em homozigose.

Todos os exemplos descritos previamente confirmam, através do sequenciamento do DNA, a existência de deficiência de PC em homozigose. O reconhecimento de formas recessivas ou dominantes é muito importante para o aconselhamento genético pois, sem uma análise fenótipo/genótipo adequada, estas formas podem ser indistinguíveis. No caso da mutação Ala 259, os heterozigotos são clinicamente assintomáticos, apesar de apresentarem níveis de PC característicos de pacientes com a forma dominante da doença, além de que os homozigotos somente apresentam sintomas numa idade mais tardia.

Através de estudos moleculares que avaliaram os domínios de Ser da PC, em que os aminoácidos foram substituídos de acordo com mutações descritas, pode-se inferir qual a alteração proteica provocada por essas mutações. Geralmente as substituições de aminoácidos que levam a deficiência do tipo I caracterizam-se por interações defeituosas do aminoácido mutante com os aminoácidos vizinhos e ruptura do dobramento da proteína. Por outro lado, as substituições que causam a deficiência do tipo II estão confinadas a regiões de importância funcional e não afetam a interação com os aminoácidos vizinhos.

Todas as mutações *nonsense*, as mutações na região promotora, inserções e deleções estão associadas a deficiência tipo I. A maioria das mutações no tipo I e todas as no tipo II são mutações *missense*. A maioria das mutações nos domínios Gla (*exon* 3) estão associadas com o tipo II. Outras mutações no tipo II incluem aquelas na Arg 1 (sítio de clivagem do pro-peptídeo), Arg 169 (sítio de clivagem pela trombina), e His 211 (sítio ativo) (REITSMA *et al*, 1993).

Tsay *et al.* (1991) descreveram 2 substituições de pares de bases que podem ser candidatos a mutações de regulação. A primeira é uma transição A→G na posição -32 dentro do TATA box, e a segunda é uma transição C→T na posição -10.

1.9. Polimorfismos no Gene da Proteína C

Um polimorfismo genético, segundo a definição clássica de Ford (1940), é a ocorrência, em uma mesma localidade, de duas ou mais formas diferentes de uma base, em tais proporções que a forma mais rara não pode ser mantida meramente por mutação recorrente.

A interpretação da alta frequência de polimorfismos genéticos detectados nas populações tem sido um problema para a genética evolutiva e levou à formação de várias correntes teóricas, que procuram interpretar o significado evolutivo de tal variação.

Em Genética Humana, uma linha de investigação surgiu buscando explicar a manutenção de certos polimorfismos nas populações através da associação com certas características fisiológicas, inclusive com certas patologias. Desta forma, alguns polimorfismos seriam mantidos nas populações por fazerem parte de sistemas multifatoriais, os quais influenciariam a suscetibilidade a doenças não mendelianas (VOGEL & MOTULSKI, 1986).

A primeira associação descrita entre polimorfismos humanos e doenças mendelianas foi entre grupo sanguíneo A e câncer de estômago (AIRD e cols., 1953). A partir daí houve uma grande proliferação de pesquisas sobre associações entre doenças e grupos sanguíneos do sistema ABO.

Estudos da sequência da região codificadora do gene da PC revelaram a existência de duas sequências polimórficas, nas populações caucasóides (FOSTER & DAVID 1984; FOSTER *et al.*; 1985; BECKMANN *et al.*; 1985; PLUTZKY *et al.*; 1986). O primeiro polimorfismo é um GAT/GAC, na posição 7228, e codifica uma Asp 214 (FOSTER *et al.*; 1985; FOSTER & DAVID 1984; REITSMA *et al.*; 1991).

O segundo polimorfismo é um TCG/TCT na posição 3342, e codifica uma Ser 99 (BECKMANN *et al.*; 1985; FOSTER *et al.*; 1985; REITSMA *et al.*; 1991).

Yamamoto *et al.*; (1991c) descreveram 2 polimorfismos no gene da PC, na população japonesa. O primeiro é um polimorfismo CGC/CGT, localizado na posição 3204 (Arg 87). O segundo polimorfismo é um AAA/AAG, localizado na posição 6181 (Lys 156). Lintel-Hekkert *et al.*; (1988) descreveram 2 polimorfismos localizados a 7kb da região 5' do gene da PC humana.

Mais tarde, foram estudadas famílias com deficiência hereditária de PC pelo método de RFLP, buscando utilizar esses resultados como método alternativo para o diagnóstico de deficiência de PC assintomática. O estudo da segregação do RFLP em deficiência de PC permitiu identificar o alelo associado à patologia em 21 das 27 famílias estudadas e permitiu ainda, a identificação do portador assintomático da deficiência de PC, que pela análise do nível da PC plasmática seria normal (SORIA *et al.*; 1992) .

Koenhen *et al.*; (1989) descreveram um segundo polimorfismo de restrição, com a enzima *MspI*, localizado no *intron* 8 do gene da PC. O fragmento de 297bp, quando clivado pela enzima de restrição, origina dois fragmentos, de 204 e 93 bp, sendo chamado de alelo A2. O alelo A1 não é clivado pela enzima de restrição. A frequência desses alelos é de 0.01 e 0.99 respectivamente, dentro de uma amostra da população caucasóide européia.

Recentemente foram descritos três polimorfismos na região promotora do gene da PC: um polimorfismo C/T na posição -1654, um polimorfismo A/G na posição -1641 e um polimorfismo A/T na posição -1476 (REITSMA, 1993). A análise desses três polimorfismos, em 24 famílias holandesas normais, demonstraram que os três haplótipos mais frequentes eram CAA, CGT e TAA, e representavam 88% dos casos. Segundo os autores, esses polimorfismos podem ser úteis no estudo do comportamento deste gene e também na forma de herança beneficiando desta maneira as famílias deficientes em PC através do estudo familiar.

Posteriormente esses polimorfismos foram avaliados por Spek, et al.; (1995) em pacientes com doença tromboembólica, sem deficiência de PC. Verificou-se que havia uma relação entre a concentração de PC e os genótipos **CC/GG/TT** do polimorfismo **CGT** e o **TT/AA/AA** do polimorfismo **TAA**. A análise também permitiu definir que o genótipo **CC/GG/TT** do polimorfismo **CGT** era um fator de risco para trombose nessa população estudada.

A relevância encontrada na correlação entre prováveis genótipos da região promotora do gene da PC e os níveis de PC podem ser avaliados por diversos caminhos. Em primeiro, a determinação do genótipo poderia afetar a afinidade com proteínas nucleares envolvidas na regulação da transcrição do gene da PC. Em segundo, os genótipos destes polimorfismos podem estar em desequilíbrio de ligação com importantes seqüências do gene da PC, o que desencadearia a produção de uma PC mutante. Provavelmente o genótipos da região promotora do gene da PC não estão ligados a seqüências funcionais importantes do gene da PC, pois em amostras de indivíduos saudáveis não ocorrem substituições importantes (REITSMA, 1993).

II - Objetivo

Uma vez que até o presente momento os polimorfismos localizados na região promotora da proteína C, descritos recentemente por Reitsma et al. (1993), ainda não foram determinados na população brasileira; que esses polimorfismos podem estar relacionados ao nível plasmático de proteína C e ao risco de trombose, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar a frequência desses três polimorfismos na região promotora do gene da proteína C em 3 grupos étnicos diferentes de uma população brasileira.
2. Verificar se na população brasileira normal também há uma correlação entre a concentração plasmática de PC e o genótipo CCGGTT e TTAAAA, conforme descrito na população caucasóide holandesa.
3. Avaliar a frequência desses três polimorfismos na região promotora do gene da proteína C em pacientes que apresentaram trombose venosa profunda (TVP) e/ou embolia pulmonar, verificando se algum genótipo pode ser considerado um fator de risco para trombose.

III - Casuística

III.1. População Indígena

A população indígena estudada foi formada por 44 mulheres (50,6%) e 43 homens (49,4%) perfazendo um total de 87 indivíduos distribuídos em 5 aldeias. A faixa etária variou de 11 a 70 anos, com uma média de 32,97anos, e um desvio padrão de 14.65.

Todas as amostras foram colhidas no próprio habitat selvagem de cada aldeia. Todas as aldeias pertencem a uma mesma tribo de uma mesma região do Estado do Pará. A tabela 2 mostra a população indígena, de acordo com o sexo, idade e a aldeia de origem (ANEXO 1). A tabela 3 **a b e c** mostra um resumo de todos os dados descritos anteriormente.

Tabelas de Resumo 3 a, b e c:

- a)** Distribuição das características na população indígena em relação a sexo:

SEXO	FEMININO	MASCULINO
FREQÜÊNCIA	44	43
PORCENTAGEM	50,6%	49,4%

- b)** Distribuição da média e desvio padrão na população de indígena:

IDADE	TOTAL
MÉDIA	32,97%
DESVIO PADRÃO	14,65%

c) Distribuição da tribo por aldeias na população indígena:

ALDEIA	FREQÜÊNCIA	PORCENTAGEM
MAROXEWARA	20	22,99%
PARANATINGA	21	24,14%
APITEREWA	01	1,15%
IGARAPÉ	23	26,44%
XINGÚ	22	25,29%

III.2. População Doadores

A população estudada foi composta por 50 mulheres (18,8%), sendo 41 (15,4%) da raça caucasóide e 09 (3,4%) da raça negróide; e 216 homens (81,2%), sendo 147 (55,3%) da raça caucasóide e 69 (25,9%) da raça negróide; perfazendo um total de 266 indivíduos adultos. Portanto, quanto à raça obtivemos 188 indivíduos caucasóides (70,7%) e 78 negróides (29,3%). A faixa etária na população geral variou de 18 a 64 anos, com uma média de 26,07 anos e um desvio padrão de 11. Quando separados por raça, a população caucasóide apresentou uma média de 35 anos (18-52), com um desvio padrão de 24,04. A população negróide apresentou uma idade média de 41 anos (18-64), com um desvio padrão de 32,53.

Dentre os participantes, 213 eram candidatos à doação de sangue, do Setor de Coleta da Divisão de Hemoterapia do Hemocentro. Após um convite para participar do trabalho, todos os indivíduos que aceitaram foram entrevistados, através de um questionário (ANEXO 2) que continha os antecedentes pessoais de tabagismo, trombose venosa ou arterial, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, diabetes, hipertensão arterial e uso de anticoncepcional oral. Os antecedentes familiares para doença tromboembólica arterial ou venosa, diabetes e hipertensão arterial também foram pesquisados. O único critério de exclusão para participação no trabalho foi o uso de antagonistas da vitamina K.

Os outros 53 participantes já haviam colhido sangue anteriormente para um outro estudo realizado pelo Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, e pertenciam à mesma área geográfica dos doadores de sangue. Todos já tinham respondido a um questionário semelhante ao que os doadores de sangue preencheram durante a entrevista.

A tabela 4 mostra todos os dados descritos anteriormente (ANEXO 3). A tabela 5 **a, b, c e d** mostra um resumo de todos os dados descritos anteriormente. A tabela 6.a mostra um

resumo da distribuição dos diversos fatores de risco na população estudada. A tabela 6.b apresenta um resumo dos antecedentes familiares da população estudada.

Tabelas de Resumo 5 a, b, c e d:

a) Distribuição das características na população de doadores em relação a sexo:

SEXO	FEMININO	MASCULINO
FREQÜÊNCIA	50	216
PORCENTAGEM	18.8%	81.2%

b) Distribuição das características na população de doadores em relação a raça:

RAÇA	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE
FREQÜÊNCIA	188	78
PORCENTAGEM	70.7%	29.3%

c) Distribuição das características na população de doadores em relação a sexo e raça:

	FEMININO	MASCULINO	TOTAL
CAUCASÓIDE	41 (15.4%)	147 (55.3%)	188 (70.7%)
NEGRÓIDE	09 (3.4%)	69 (25.9%)	78 (29.3%)
	50 (18,8%)	216 (81,2%)	266

d) Distribuição da média e desvio padrão na população de doadores:

IDADE (18-64)	CAUCASÓIDE (18-52)	NEGRÓIDE (18-64)	TOTAL
MÉDIA	35	41	26,07
DESVIO PADRÃO	24,04	32,53	11

Tabela 6.a Distribuição dos fatores de risco na população de doadores estudada, de acordo com a resposta ao questionário empregado.

	Não	Sim
DIABETES	256	10
DTV	266	0
IM	266	0
AVC	266	0
HA	231	35
TABAGISMO	194	72
ACO	50	0

DTV- doença tromboembólica venosa IM-infarto do miocárdio
 AVC-acidente vascular cerebral HA-hipertensão arterial
 ACO-anti concepcional

Tabela 6.b Distribuição dos antecedentes familiares para os fatores de risco na população de doadores estudada, de acordo com a resposta ao questionário empregado.

	Não	Sim
DIABETES	226	40
DTV	262	4
IM	247	19
AVC	244	22
HA	178	88
TABAGISMO	**	**

DTV- doença tromboembólica venosa IM-infarto do miocárdio
 AVC-acidente vascular cerebral HA-hipertensão arterial
 **está pergunta não foi respondida por vários entrevistados com precisão

III.3. População com Trombose

Os pacientes analisados no presente estudo são indivíduos portadores de doença tromboembólica acompanhados no ambulatório de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de 1993-1997. Os pacientes procuraram o hospital espontaneamente com doença tromboembólica ou foram encaminhados de outros serviços médicos.

A amostra dos pacientes com trombose foi composta por 88 mulheres (72%) sendo 77 (63,2%) da raça caucasóides e 11 (8,8%) da raça negróide e 35 homens (28%) sendo 31 (24,8%) da raça caucasóide e 04 (3,2%) da raça negróide, perfazendo um total de 123 indivíduos adultos. A faixa etária variou de 08 a 69 anos, com uma média de 36,1 anos e desvio padrão de 43, 13. Quanto a raça, 108 indivíduos eram caucasóides (88%), 15 negróides (12%).

A clínica da doença tromboembólica foi caracterizada por trombose de membros inferior e superior, direito e/ou esquerdo, embolia pulmonar, tromboflebite e acidente vascular cerebral.

Todos os participantes eram pacientes acompanhados no Ambulatório de Hemostasia e Hemoterapia do HEMOCENTRO/ UNICAMP e todos apresentavam dosagem de PC normal.

A tabela 7 apresenta um resumo das características da população trombótica estudada. (ANEXO 4). A tabela 8 **a, b, c e d** mostra um resumo de todos os dados descritos anteriormente. A tabela 9 **a e b**, resume as manifestações clínicas dos pacientes com trombose e fatores etiológicos para este grupo, respectivamente.

Tabela 8. Distribuição das características na população com trombose em relação ao sexo a, raça b, sexo e raça c e idade d:

a) Distribuição das características na população com trombose em relação a sexo:

SEXO	FEMININO	MASCULINO
FREQÜÊNCIA	88	35
PORCENTAGEM	72%	28%

b) Distribuição das características na população com trombose em relação a raça:

RAÇA	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE
FREQÜÊNCIA	108	15
PORCENTAGEM	81.25%	18.75%

c) Distribuição das características na população com trombose em relação a sexo e raça:

RAÇA / SEXO	FEMININO	MASCULINO	TOTAL
CAUCASÓIDE	77 (63.2%)	31 (24.8%)	108 (88%)
NEGRÓIDE	11 (8.8%)	04 (3.2%)	15 (12%)
	88 (72%)	35 (28%)	

d) Distribuição da média e desvio padrão na população com trombose:

IDADE (08-69)	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	TOTAL
MÉDIA	38,5	42,5	36.1
DESVIO PADRÃO	43,13	26,16	43.13

Tabela 9 a. Frequência das manifestações clínicas dos pacientes com trombose:

TIPO	N	Frequência
TVP MSE	11	8.9%
TVP MSD	12	10.0%
TVP MID	22	25.3%
TVP MIE	52	59.8%
TVP MID e E	09	10.3%
TVP + VCR	01	1.1%
TROMBOFLEBITE	03	3.4%
TVP + EP	05	5.7%
AVCi + EP	02	2.3%
AVCi	04	4.6%
EP	02	2.3%
total	123	100%

TVP- trombose venosa profunda

MSE- membro superior esquerdo

MSD- membro superior direito

MID- membro inferior direito

MIE- membro inferior esquerdo

VCR- veia central da retina direita

EP -embolia pulmonar

AVC -acidente vascular cerebral

Tabela 9 b. Frequência da deficiência de proteína S ou antitrombina III, ou mutações relacionadas a etiologia da trombose no grupo de pacientes estudados

Causa	N	Frequência
ACL	10	8,12%
FVL	06	4,88%
F II-	06 heterozigotos	4,88%
DPS	08 heterozigotos	6,50%
AT-III	00	00
MTHFR-T	04	3,25%
IDIOPÁTICA	89	72,36%
total	123	100%

ACL- anticoagulante lúpico

FVL- fator V de Leiden

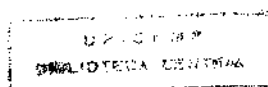
F II- mutação no gene da protrombina

DPS- deficiência de Proteína S

AT-III- anti-trombina III

MTHFR-T metilenotetrahidrofolatoredutase-termolábil

IV - Material e Métodos



IV.1. Coleta de Sangue

O sangue foi colhido pela manhã, com os doadores em repouso e em jejum. Foram coletados 20ml de sangue, em 4 tubos *Vacutainer*, utilizando-se o citrato de sódio 3,8% como anticoagulante, na proporção de 9:1.

Este sangue foi utilizado tanto para obtenção do DNA, como para a determinação da atividade anticoagulante da proteína C.

IV.2. Extração de DNA de Sangue Periférico

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 10 ml de sangue venoso coletado. O plasma foi descartado, após centrifugação do sangue a 3000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Para a lise das hemácias adicionou-se NH_4Cl 0.144M na proporção de 0,5 vezes o volume de células. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 2.000rpm, a 4°C, por 20 minutos. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 ml de tampão TKM-1 (KCl 1M, EDTA 0,2M, Tris/HCl 2M pH 7.6 MgCl_2 1M). A seguir acrescentou-se 125µl de Triton X-100 e após homogeneização por inversão, o material foi novamente centrifugado a 2.200 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 5ml de TKM1 e centrifugado novamente. Desta vez, o sedimento obtido foi ressuspensão em 0,8ml de tampão TKM2 (KCl 1M, EDTA 0.2M, Tris/HCl 2M pH 7.6, MgCl_2 1M, NaCl 5M).

Após a adição de 50µl de SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10%, a suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55°C, por 30 minutos. Acrescentou-se então, 300µl de NaCl 5M, e após mistura por inversão, centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos.

Ao final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um tubo estéril de 15 ml. Procedeu-se a extração de DNA, adicionando-se 10ml de fenol (redesilado e saturado em Tris/Hcl 0.2mM, pH 8.0, contendo 0.1% de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool-isoamílico, na proporção de 25:24:1. Após mistura por inversão, centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido e novamente adicionou-se 1ml de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos.

Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado na proporção de 2 vezes o volume da fase aquosa, à temperatura ambiente. Esta mistura foi invertida diversas vezes até a obtenção do precipitado de DNA.

O DNA precipitado foi lavado em etanol gelado a 70%, para eliminar resíduos de sal. O DNA obtido foi ressuspensão em quantidade apropriada de TE (Tris pH 8,0 10mM, EDTA 0,1mM pH 7,4) e a sua concentração e pureza foram determinadas em espectrofotômetro, pela leitura das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, em luz ultravioleta (MANIATIS, *et al.*; 1989).

IV.3. Amplificação de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a determinação dos 3 polimorfismos utilizou-se a técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al*, 1985), seguida da digestão com enzimas de restrição. A PCR foi realizada em um termo ciclador automático de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA).

Para a amplificação do DNA genômico das amostras utilizou-se os *primers* descritos por Spek *et al*, (1994) (Figura 6):

1: (-1696 a -1655)

5'-ACATCTGTCAAGGGTTTTGCCCTCACCTCCCTCCCAGCTGGA-3'

2: (-1683 a -1642)

5'-TTTTGCCCTCACCTCCCTCCCTGCTGGA^T/CGGCCACCTTGGT-3'

3: (-1470 a -1451)

5'-GGCGGGTCGTGGAGATACTG-3'

Os nucleotídeos sublinhados na sequência dos *primers* não estão presentes na sequência normal. O segundo iniciador consiste de uma mistura (1:1) de 2 oligonucleotídeos, um contendo T e outro C na posição -1654. A utilização desta mistura justifica-se pela presença do polimorfismo C/T na posição -1654, que poderia vir a prejudicar a identificação do polimorfismo A/T na posição -1476.

Tabela 10. Posicionamento dos 3 polimorfismos no gene da PC e os *primers* utilizados para sua determinação

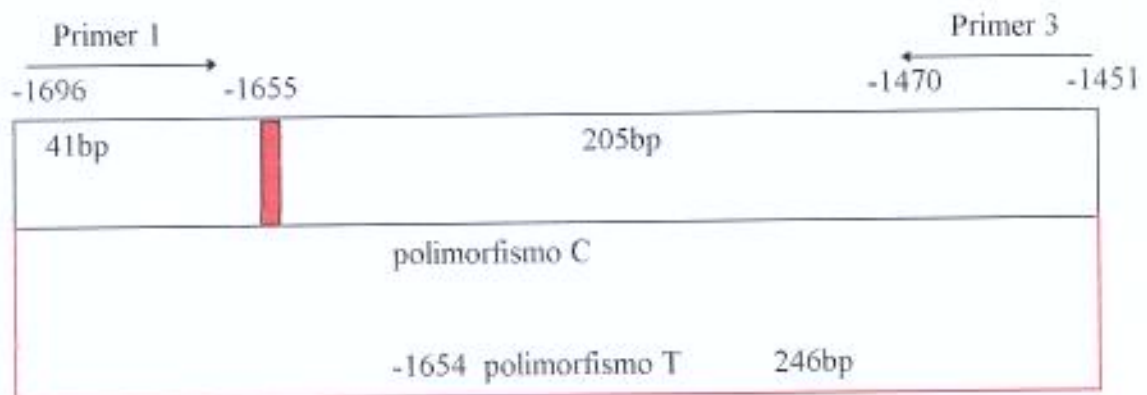
Polimorfismo	Posição	Primer
<i>CT</i>	-1654	1-3
<i>AG</i>	-1641	2-3
<i>AT</i>	-1476	1-3/2-3

Foram realizadas reações entre os *primers* 1-3 e 2-3.

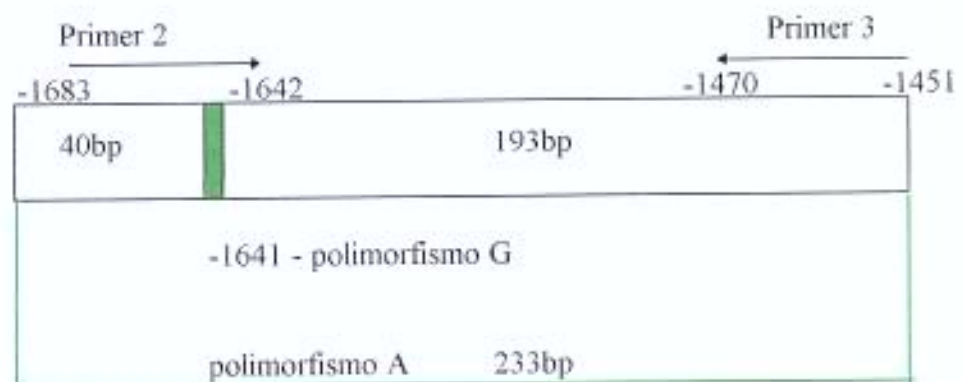
Os produtos de amplificação foram visualizado por eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão de corrida TBE (Tris/ácido bórico/Ácido etilenodiaminotetracético-EDTA), e então visualizados sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Foram realizadas reações de controle negativo (branco) e positivo (DNA amplificado para pesquisa do fator V de Leiden).

Figura 6. Posicionamento dos 3 polimorfismos no gene da PC e os *primers* utilizados para sua determinação

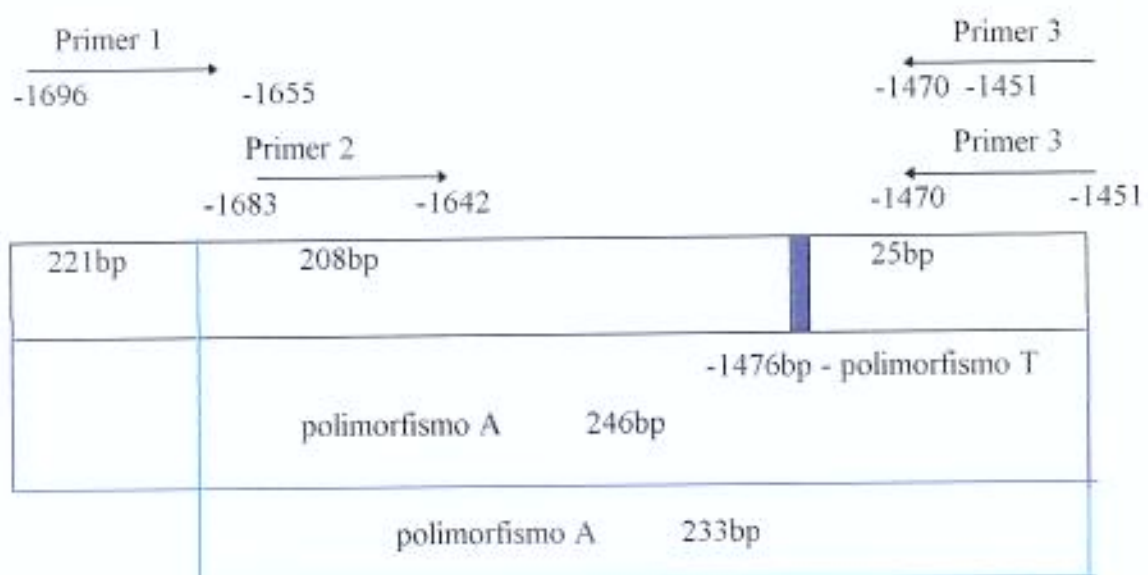
Polimorfismo C/T



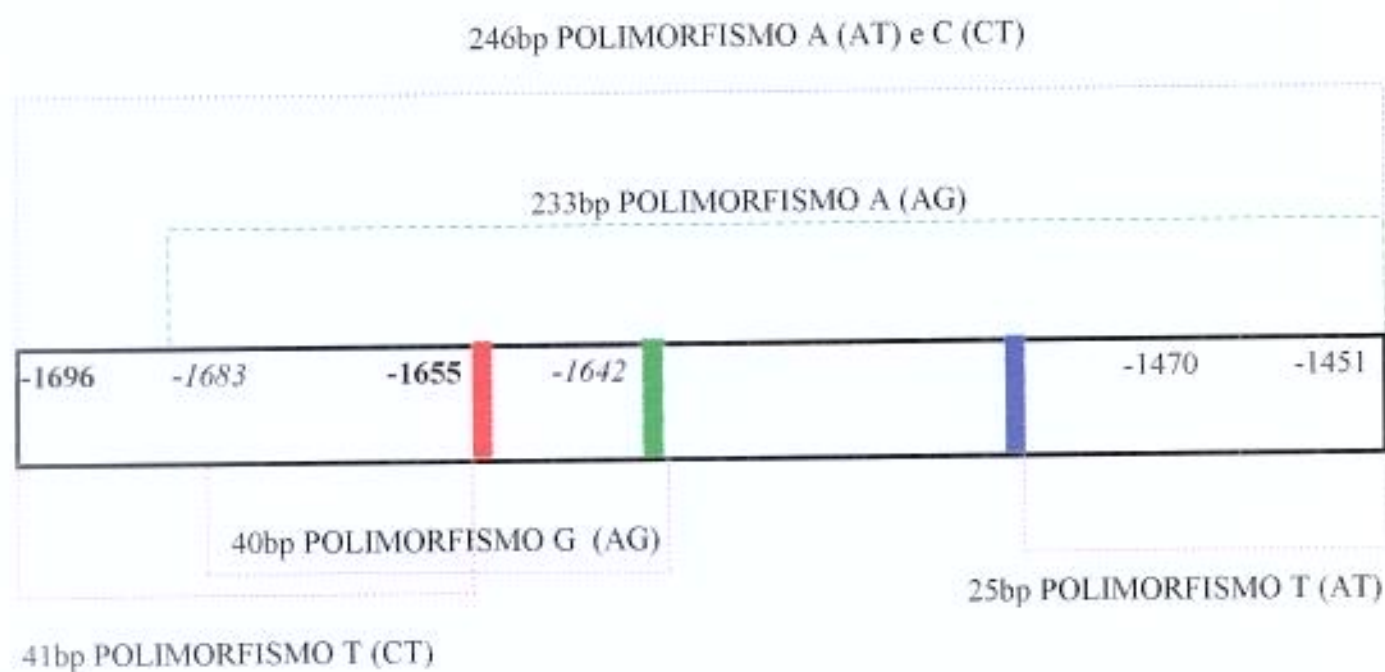
Polimorfismo A/G



Polimorfismo A/T



RESUMO



-1696/-1655 PRIMER 1

-1683/-1642 PRIMER 2

-1470/-1451 PRIMER 3

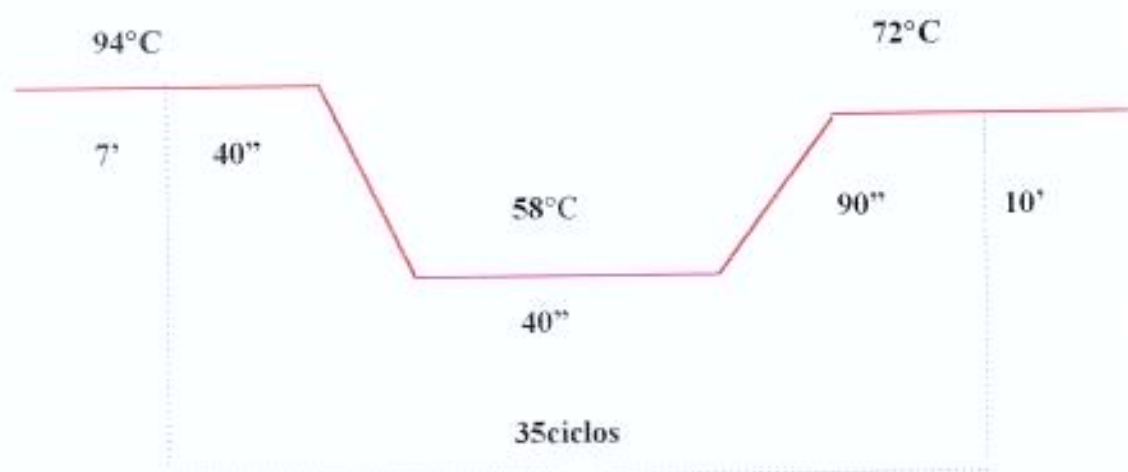
 -1654 SÍTIO POLIMÓRFICO C/T

 -1641 SÍTIO POLIMÓRFICO A/G

 -1476 SÍTIO POLIMÓRFICO A/T

Reação com os primers 1-3: 200ng de DNA genômico; 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 2mM de $MgCl_2$; 1,0mM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); 0,5 μg de cada iniciador; 10% de dimetilsulfóxido e 1,5 U de *Taq* polimerase, para um volume final de reação de 30 μl .

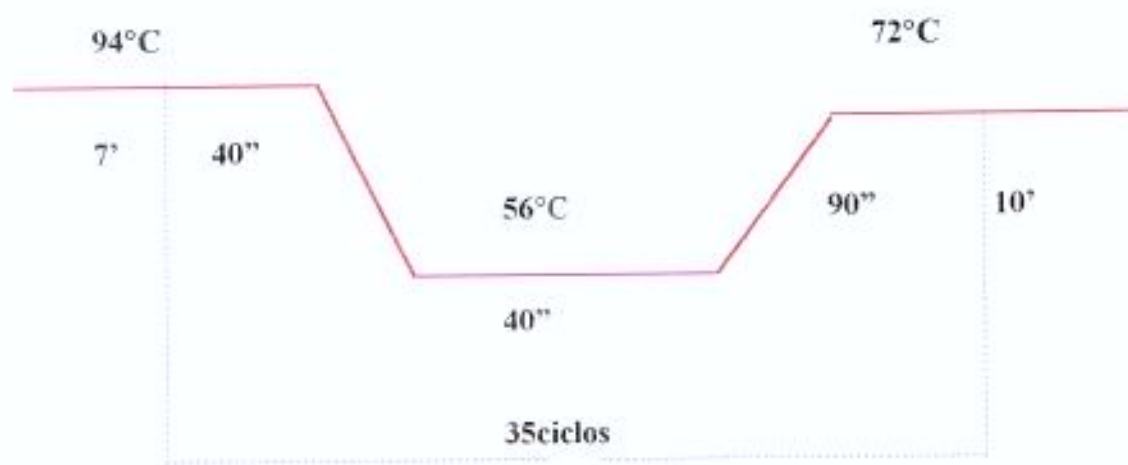
Figura 7a:



As amostras foram desnaturadas inicialmente por 7 minutos a 94°C, e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 40 segundos, hibridação a 58°C por 40 segundos e alongamento a 72°C por 90 segundos. Finalmente, realizou-se um último etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Reação com os primers 2-3: 200ng de DNA genômico; 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 2mM de MgCl₂; 2,5mM de cada deoxi-nucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); 0,5µg de cada iniciador; 15% de dimetilsulfóxido e 1,5 U de *Taq* polimerase, para um volume final de reação de 30µl.

Figura 7 b.



As amostras foram desnaturadas inicialmente por 7 minutos a 94°C, e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 40 segundos, hibridação a 56°C por 40 segundos e elongamento a 72°C por 90 segundos. Finalmente, realizou-se um último etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

IV.4. Digestão dos produtos amplificados pela PCR

Seguida da realização da amplificação em cadeia da polimerase, realizou-se a digestão com as enzimas de restrição abaixo descritas (Tabela 11).

Tabela 11. Descrição das enzimas utilizadas e o tamanho dos fragmentos obtidos, em relação aos 3 polimorfismos estudados.

DIGESTÃO	TAMANHO (bp)	POLIMORFISMO	POSIÇÃO
<i>Bst</i> XI	246	C	-1654
amplificação P1-3	205/41	T	
<i>Bst</i> XI	233	A	-1641
amplificação P2-3	193/40	G	
<i>Rsa</i> I	246	A	-1476
amplificação P1-3	221/25	T	
<i>Rsa</i> I	233	A	-1476
amplificação P2-3	208/25	T	

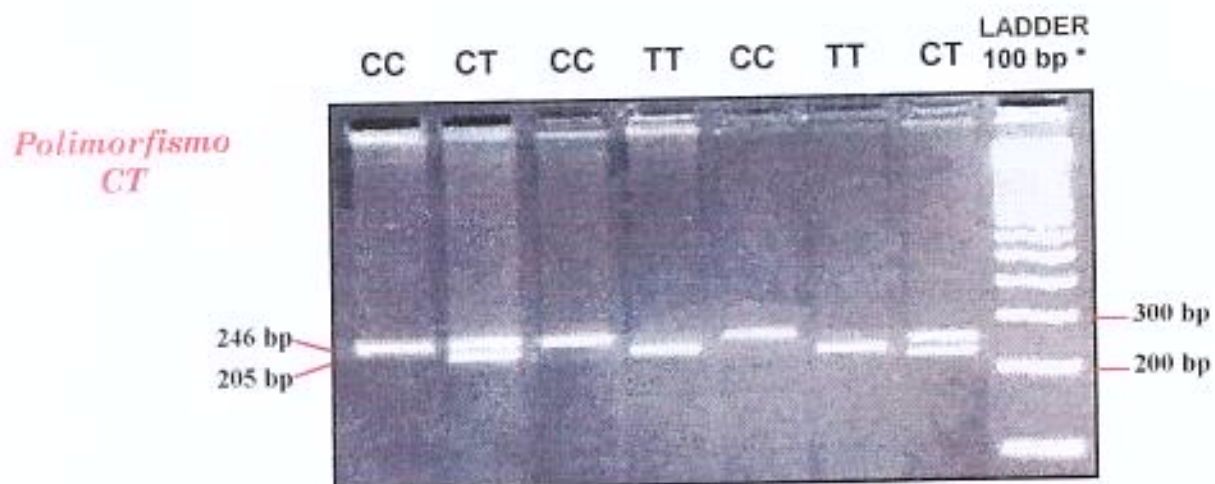
Os produtos obtidos pela PCR foram digeridos com as enzimas RsaI e BstXI, segundo os procedimentos descrito a seguir:

Digestão com a enzima RsaI: 10µl do produto da PCR; 0,2µl de BSA; 2µl do Tampão da enzima RsaI e 3U de enzima RsaI, para um volume final de 23µl foram incubados por 14 horas em banho-maria a 37°C. Os resultados foram observados em gel de agarose 3%, em tampão de corrida TBE 1X (fotos pg 47 e 48).

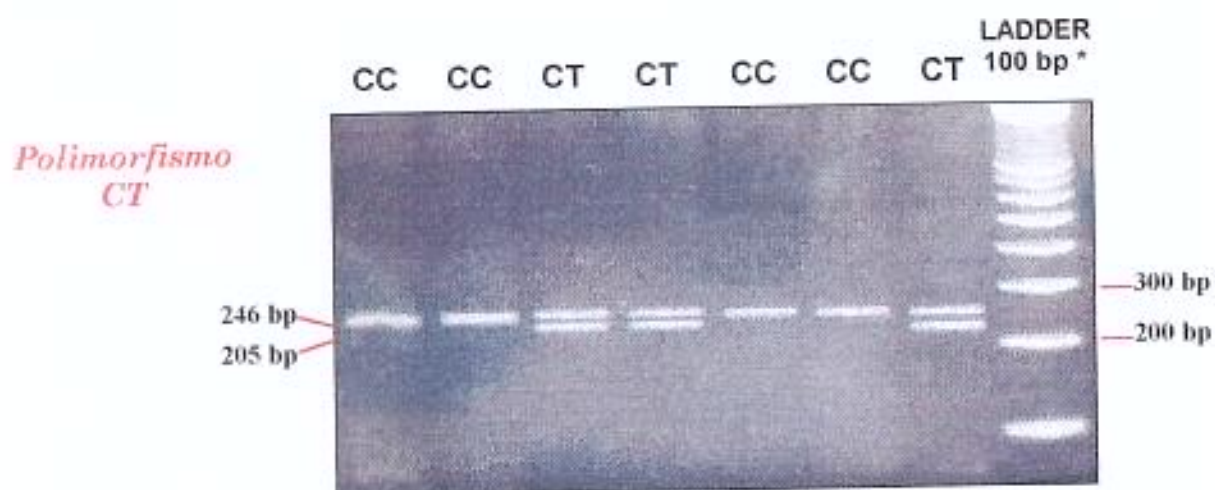
Digestão com a enzima BstXI: 10µl do produto da PCR; 0,5µl de BSA; 2µl do Tampão da enzima BstXI e 3U de BstXI para um volume final de 23µl permaneceram 2 horas em banho-maria a 56°C. Os resultados foram observados em gel de agarose a 3% em tampão de corrida TBE 1X (fotos pg 49 e 50).

Os produtos da digestão foram visualizado por eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão de corrida TBE (Tris/ácido bórico/Ácido etilenodiaminotetracético-EDTA), e então visualizados sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Foram realizadas reações de controle negativo (branco) e positivo (DNA amplificado para pesquisa do fator V de Leiden). As fotos a seguir mostram o gel de digestão:

População de Doadores

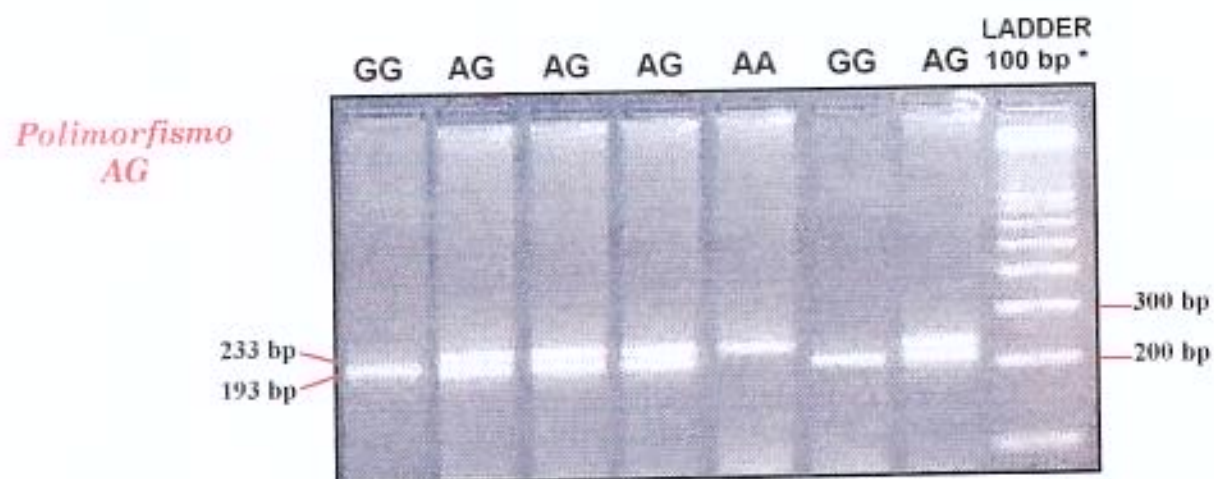


População com Trombose

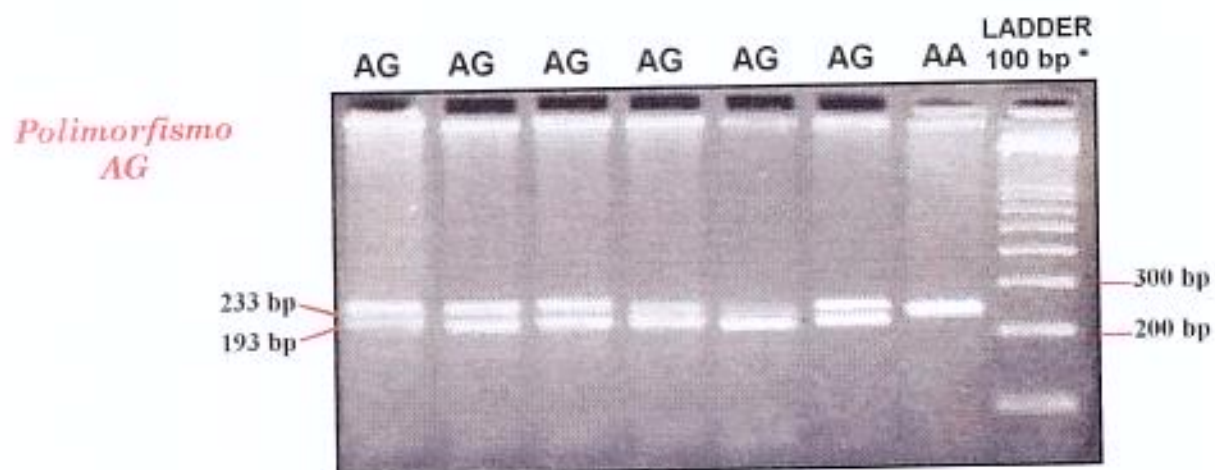


* PHARMACYA

População de Doadores



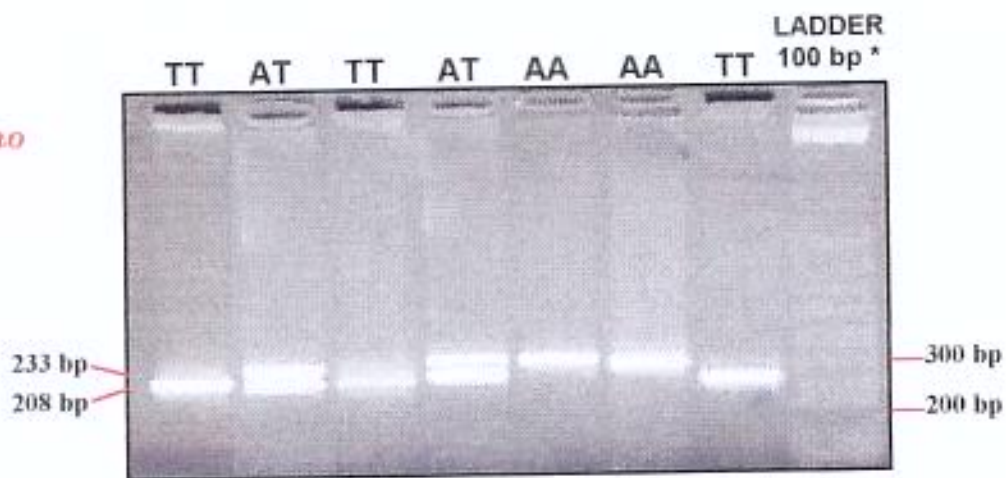
População com Trombose



* PHARMACYA

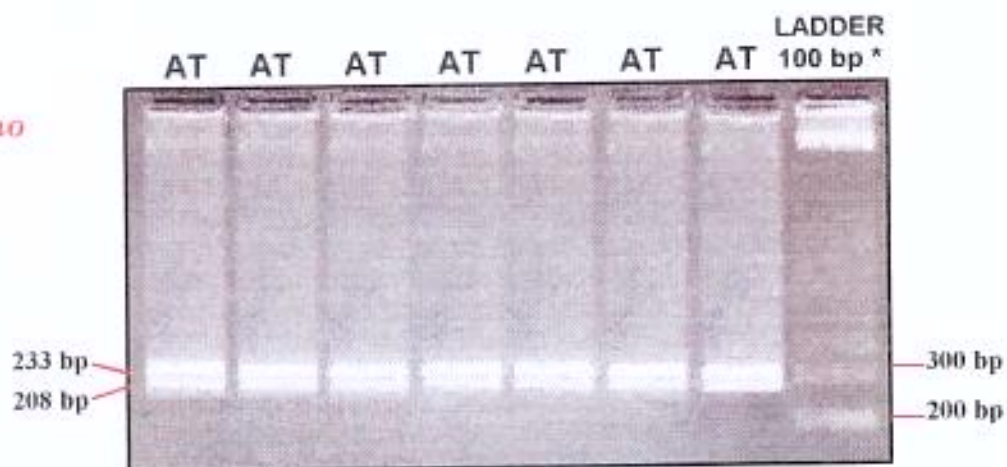
População de Doadores

*Polimorfismo
AT*



População com Trombose

*Polimorfismo
AT*



* PHARMACYA

Os polimorfismos foram determinados para cada amostra, com resultados obtidos pela digestão da PCR com *Bst* XI ou *Rsa* I. Os possíveis genótipos, de acordo com os 3 polimorfismos estudados, são em número de 27, e estão listados na Tabela a seguir:

Tabela 12. Possíveis genótipos a serem encontrados

	AA	AG	GG	
CC	CC/AA/AT	CC/AG/AT	CC/GG/AT	AT
	CC/AA/AA	CC/AG/AA	CC/GG/AA	AA
	CC/AA/TT	CC/AG/TT	CC/GG/TT	TT
CT	CT/AA/AT	CT/AG/AT	CT/GG/AT	AT
	CT/AA/AA	CT/AG/AA	CT/GG/AA	AA
	CT/AA/TT	CT/AG/TT	CT/GG/TT	TT
TT	TT/AA/AT	TT/AG/AT	TT/GG/AT	AT
	TT/AA/AA	TT/AG/AA	TT/GG/AA	AA
	TT/AA/TT	TT/AG/TT	TT/GG/TT	TT

IV.5. Determinação da Atividade Anticoagulante da Proteína C

Para determinação da atividade anticoagulante da proteína C, após a coleta do sangue, o plasma pobre em plaquetas foi separado por centrifugação a 4000 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 4°C. O plasma foi então aliquoteado e conservado a -80°C.

Também foram utilizadas as amostras de plasma de 53 participantes que já haviam colhido sangue anteriormente para um outro estudo realizado pelo Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp. O plasma foi preparado da mesma maneira como descrito acima.

A atividade anticoagulante da Proteína C plasmática foi determinada pelo método de coagulação (ESPANA. *et al*, 1986), utilizando-se o Kit da Dade® (BAXTER Diagnostics Inc.).

O kit é composto por:

- Plasma deficiente em proteína C, liofilizado, que após a ressuspensão em 2ml de H₂O estéril, foi utilizado nas diluições das amostras de plasma dos doadores;
- Proteína C “Standard”, liofilizada, que após ressuspensão em 1ml de H₂O estéril, foi utilizada na realização da curva padrão;
- Ativador da Proteína C, que foi reconstituído com 5ml do Tampão da Proteína C (veneno de serpente: Agkistrodon Contortrix, Contortrix);
- Actin, fosfolípideo.

Realização da Curva Padrão:

A curva padrão foi preparada através de 3 pontos, determinados pelo tempo de coagulação em segundos, de diluições com atividade de proteína C conhecida, obtidas pela mistura da Proteína C *Standard* e do plasma deficiente em proteína C.

As diluições utilizadas foram 1:4, 1:8 e zero (somente o plasma deficiente em proteína C, e portanto com atividade de 0%).

A atividade da proteína C *standard* vem definida pelo fabricante.

Os resultados foram plotados num papel milimetrado com % de atividade da proteína C na axial-X e o tempo em segundos na axial-Y.

A amostra de plasma de cada doador foi descongelada em banho-maria a 37°C por alguns minutos, e posteriormente diluída na proporção de 1:8, com o plasma deficiente em proteína C.

Ensaio: 50 µl da amostra diluída
 50 µl do Ativador da proteína C
 50 µl de Actin

Após incubação por 4 minutos em banho-maria a 37°C, adicionou-se 50 µl de Cloreto de Cálcio, acionando-se o crômetro. Após homogeneização lenta dentro do banho-maria, observou-se a formação do coágulo. Nesse exato momento o tempo em segundos foi anotado. A concentração de proteína C foi encontrada pela localização na axial X correspondente ao tempo obtido com aquela amostra, na axial Y.

IV.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa Sigmastat- Statistical Analysis System - Version 1.01.

Os grupos de variáveis com distribuição normal (análise feita pelo método de Kolmogorov-Smirnov) foram analisados pelo teste “t” de Student para os dados pareados e não pareados. Os grupos que não obedeciam ao padrão de distribuição normal tiveram sua análise realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

A frequência alélica foi estimada pela contagem gênica. O teste de X^2 foi utilizado para comparar a distribuição genotípica dos polimorfismos esperados, quando os alelos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para analisar a correlação entre duas variáveis quantitativas distintas foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Verificou-se quais variáveis poderiam interferir com os níveis de proteína C através de uma análise de regressão pelo programa Tuckey. O risco de trombose (Odds Ratio) relacionado ao genótipo foi calculado pelo Programa EPI6.

V - Resultados

V.1. Análise da Frequência dos Genótipos para os 3 Polimorfismos

V.1.a. População Indígena

A análise dos genótipos para os 3 polimorfismos (Tabelas 12 a, b e c) mostrou sempre um maior número de homozigotos CC (52,9%), GG (54%) e AA (70,1%). A análise das frequências alélicas revelou que, nessa população, em relação ao polimorfismo C/T, o nucleotídeo C é o alelo mais frequente (0.74). Em relação ao polimorfismo A/G, o nucleotídeo mais frequente é o G (0.76), enquanto que no polimorfismo A/T, o nucleotídeo A é o mais comum (0.85). A comparação das frequências alélicas observadas com as esperadas desta população, na tabela abaixo, revelou que para os três polimorfismos, os genótipos se distribuem de acordo com a lei de Hardy e Weinberg.

Tabela 13 a. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo CT (-1654) na população indígena:

Genótipo 1	N	FGO	FA
CC	46	52.9%	p=0.73
CT	36	41.4%	q=0.27
TT	05	5.7%	$\sigma=0.03$
	87	100%	

Tabela 13 b. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo AG (-1641) na população indígena:

Genótipo 2	N	FGO	FA
AA	03	3.4%	p=0.24
AG	37	42.5%	q=0.76
GG	47	54%	$\sigma=0.03$
	87	99.9%	

Tabela 13 c. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo AT (-1476) na população indígena:

Genótipo 3	N	FGO	FA
AA	61	70,1%	p=0.85
AT	26	29.9%	q=0.156
TT	00	0%	$\sigma=0.03$
	87	100%	

A análise dos Genótipos dentro da nossa população indígena mostrou 12 combinações diferentes, entre as 27 possíveis. Observa-se na tabela a seguir uma maior frequência dos Genótipos CC/GG/AA, CC/AG/AA, CT/AG/AA e CT/GG/AA.

Tabela 14 a. Genótipos encontrados na população indígena.

Genótipos	N	Porcentagem
CC/AG/AA	14	16.1%
CC/GG/AA	19	21.8%
CT/AA/AA	03	3.4%
CT/AG/AA	11	12.6%
CT/GG/AA	10	11.5%
TT/AG/AA	01	1.1%
TT/GG/AA	03	3.4%
CC/AG/AT	07	8%
CC/GG/AT	06	6.9%
CT/AG/AT	04	4.6%
CT/GG/AT	08	9.2%
TT/GG/AT	01	1.1%
	87	100%

V.1.b.População de Doadores

A análise dos genótipos para os 3 polimorfismos na população brasileira normal (Tabelas 14 a, b e c) mostrou sempre um maior número de heterozigotos CT (59,4%), AG (59,4%) e AT (70,7%).

A análise das frequências alélicas revelou que, nessa população, no caso do polimorfismo C/T, a presença do nucleotídeo C é o alelo mais frequente (0.67). Em relação ao polimorfismo A/G, o nucleotídeo mais frequente é o A (0.61), enquanto que no polimorfismo A/T, o nucleotídeo A é o mais comum (0.60). A comparação das frequências alélicas observadas com as esperadas nessa população, revelou que, para os três polimorfismos, os genótipos não se distribuem de acordo com a lei de Hardy e Weinberg, havendo um excesso de heterozigotos em todas as situações (Tabela 15).

Tabela 15 a. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo CT (-1654) na população de doadores

Genótipo 1	N	Porcentagem	FA
CC	100	37,6%	p=0.67
CT	158	59,4%	q=0.33
TT	8	3%	$\sigma=0.02$
	266	100%	

Tabela 15 b. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo AG (-1641) na população de doadores

Genótipo 2	N	Porcentagem	FA
AA	83	31,2%	p=0.61
AG	158	59,4%	q=0.39
GG	25	8,9%	$\sigma=0.02$
	266	100%	

Tabela 15 c. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo AT (-1476) na população de doadores

Genótipo 3	N	Porcentagem	FA
AA	65	24,4%	p=0.60
AT	188	70,7%	q=0.40
TT	13	4,9%	$\sigma=0.02$
	266	100%	

As tabelas 16, 17 e 18 mostram a frequência dos três genótipos na população de doadores, de acordo com a raça.

Tabela 16a. Frequência dos genótipos do polimorfismo CT na população de doadores separada de acordo com o grupo racial

Genótipo 1	CC	CT	TT	total
Caucasóide	77 (41%)	107 (57%)	4 (2%)	188
Negróide	23 (29%)	51 (65%)	4 (5%)	78
total	100	158	8	266

Tabela 16b. Frequência dos genótipos do polimorfismo AG na população de doadores separada de acordo com o grupo racial

Genótipo 2	AA	AG	GG	total
Caucasóide	61 (32%)	111 (59%)	16 (8%)	188
Negróide	22 (28%)	47 (60%)	9 (12%)	78
total	83	158	25	266

Tabela 16c. Frequência dos genótipos do polimorfismo AT na população de doadores separada de acordo com o grupo racial

Genótipo 3	AA	AT	TT	total
Caucasóide	49 (26%)	128 (64%)	11 (6%)	188
Negróide	16 (20%)	60 (77%)	2 (3%)	78
total	65	188	13	266

A análise dos genótipos dentro da população de doadores mostrou 21 combinações diferentes, entre as 27 possíveis. Observa-se uma maior frequência dos genótipos CT/AG/AT, CT/AA/AT e CC/AG/AT.

Tabela 17. Genótipos encontrados população de doadores

Genótipos	N	Porcentagem
CC/AA/AA	11	4.1%
CC/AG/AA	16	6%
CC/GG/AA	01	0.37%
CT/AA/AA	12	4.5%
CT/AG/AA	19	7.1%
CT/GG/AA	05	1.8%
TT/AG/AA	01	0.37%
CC/AA/AT	21	7.8%
CC/AG/AT	39	14.6%
CC/GG/AT	09	3.2%
CT/AA/AT	38	14.2%
CT/AG/AT	71	26.6%
CT/GG/AT	04	1.5%
TT/AA/AT	01	0.37%
TT/AG/AT	03	1.12%
TT/GG/AT	02	0.7%
CC/AG/TT	01	0.37%
CC/GG/TT	02	0.7%
CT/AG/TT	07	2.5%
CT/GG/TT	02	0.7%
TT/AG/TT	01	0.37%

As tabelas 18 a e b, mostram a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados, nas raças caucasóide e negróide, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos, de acordo com a raça. ($p=0.45$)

Tabela 18a. Genótipos encontrados na população caucasóide:

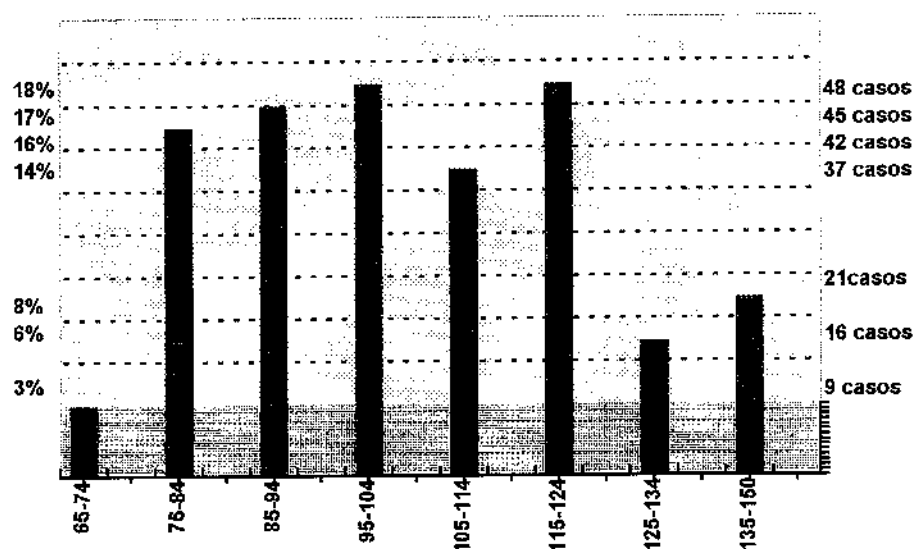
Genótipos	N	Porcentagem
CC/AA/AA	11	5.8%
CC/AG/AA	12	6.4%
CC/GG/AA	01	0.5%
CT/AA/AA	10	5.0%
CT/AG/AA	12	6.4%
CT/GG/AA	03	1.6%
CC/AA/AT	15	8.0%
CC/AG/AT	29	15.4%
CC/GG/AT	06	3.2%
CT/AA/AT	24	12.8%
CT/AG/AT	49	26.1%
CT/GG/AT	02	1.0%
TT/AA/AT	01	0.5%
TT/AG/AT	01	0.5%
TT/GG/AT	01	0.5%
CC/AG/TT	01	0.5%
CC/GG/TT	02	1.0%
CT/AG/TT	06	3.2%
CT/GG/TT	01	0.5%
TT/AG/TT	01	0.5%
	188	99%

Tabela 18b. Genótipos encontrados na população negróide

Genótipos	N	Porcentagem
CC/AG/AA	04	5.1%
CT/AA/AA	02	2.5%
CT/AG/AA	07	8.9%
CT/GG/AA	02	2.5%
TT/AG/AA	01	1.3%
CC/AA/AT	06	7.7%
CC/AG/AT	10	12.8%
CC/GG/AT	03	3.8%
CT/AA/AT	14	17.9%
CT/AG/AT	22	28.3%
CT/GG/AT	02	2.5%
TT/GG/AT	01	1.3%
TT/AG/AT	02	2.5%
CT/AG/TT	01	1.3%
CT/GG/TT	01	1.3%
	78	99%

a. Dosagem da Atividade Anticoagulante da PC

A dosagem da atividade anticoagulante da proteína C mostrou níveis que variaram de 70% a 150%, com média de 102,54% e desvio padrão de 20,47. A dosagem de PC nesta população revelou distribuição normal, pelo “Teste t”.



A tabela 19 apresenta as médias da concentração de PC encontradas no grupo de doadores, separados de acordo com o genótipo. (ANEXO 5- Tabela 20).

Tabela 19. Média da concentração de PC de acordo com os genótipos encontrados na população de doadores.

Genótipos	N	%	Média	Desvio Padrão
CC/AA/AA	11	3.9	116.4	9.0
CC/AG/AA	16	6.3	110.5	16.81
CC/GG/AA	01	0.4	80	-
CT/AA/AA	12	4.3	102	18.60
CT/AG/AA	19	7.4	104	24.28
CT/GG/AA	05	2.0	108.8	9.63
TT/AG/AA	01	0.4	79	-
CC/AA/AT	21	7.5	92.45	15.69
CC/AG/AT	39	13.5	104.25	19.84
CC/GG/AT	09	3.5	97.77	19.89
CT/AA/AT	38	15.6	103.35	19.35
CT/AG/AT	71	26.6	98.60	20.89
CT/GG/AT	04	1.6	121	35.82
TT/AA/AT	01	0.4	128	-
TT/AG/AT	03	1.2	86	18.24
TT/GG/AT	02	0.8	80	7.07
CC/AG/TT	01	0.4	138	-
CC/GG/TT	02	0.8	122.5	10.60
CT/AG/TT	07	2.3	102.32	17.32
CT/GG/TT	02	0.8	135	7.07
TT/AG/TT	01	0.4	139	-

b. Análise da Relação entre os Genótipos e a Concentração de PC

Para verificarmos se havia diferença na concentração de proteína C de acordo com o genótipo, foram separados para análise estatística apenas os 8 grupos com número de casos igual ou superior a 10. Esta análise foi realizada através do teste estatístico de **Tuckey**:

CC/AA/AA	CC/AG/AA	CT/AA/AA	CT/AG/AA
CC/AA/AT	CC/AG/AT	CT/AA/AT	CT/AG/AT

Através de análise de variância, foi observado que havia diferença significativa na concentração de PC entre esses oito grupos ($p=0,029$).

Para identificar quais grupos apresentavam a diferença significativa entre si, utilizou-se o teste de comparação múltipla de Tuckey, que demonstrou uma diferença entre os grupos CC/AA/AA e CC/AA/AT (média da concentração de PC 116.4 e 92.45, respectivamente).

Posteriormente, foi analisado se havia diferença significativa entre a concentração de PC e cada um dos polimorfismos, com seus respectivos genótipos, independentemente (tabela 21). O Teste t foi empregado, pois os dados apresentavam uma distribuição normal. Verificou-se uma diferença significativa apenas no polimorfismo 3, entre os genótipos AA e AT, com uma concentração de 108% e 99%, respectivamente ($p=0,035$).

Tabela 21. Comparação das médias da concentração de PC entre os genótipos de cada um dos 3 polimorfismos, com N maior que 10.

Genótipo	N	Média	p - valor
1			
CC	87	105.9	p=0,275
CT	141	101.98	
2			
AA	83	103.55	p=0,975
AG	145	104.34	
3			
AA	58	108.2	p=0,015
AT	169	99.66	

Verificou-se a existência de uma diferença nas médias da concentração de PC, analisando-se conjuntamente 2 genótipos e suas possíveis combinações (tabela 22), através do Teste t:

- Genótipo 1: CC ou CT (p=0,28)
- Genótipo 2: AA ou AG (p=0,98)
- Genótipo 3: AA ou AT (**p=0,02**)

Tabela 22. Comparação das médias da concentração de PC na análise conjunta de 2 genótipos, com N maior que 10.

Duplas	N	Média	p - valor	Duplas	N	Média	p - valor
CC/ <u>AA</u>	26	112.76		AA/AT	60	99.71	
CT/ <u>AA</u>	30	103.33	p=0,060	AG/AT	103	100.52	p=0,804
CC/AT	55	99.96		AG/ <u>AA</u>	35	107.02	
CT/AT	108	100.36	p=0,904	AG/AT	103	100.52	p=0,111
CC/ <u>AA</u>	26	112.76		CC/AA	30	100.43	
CC/AT	55	99.96	p=0,004	CT/AA	51	103.05	p=0,545
CT/ <u>AA</u>	30	103.33		CC/AA	30	100.43	
CT/AT	108	100.36	p=0,489	CC/AG	51	106.21	p=0,185
AA/ <u>AA</u>	21	108.85		CT/AA	51	103.05	
AG/ <u>AA</u>	35	107.03	p=0,738	CT/AG	87	99.80	p=0,375
AA/ <u>AA</u>	21	108.85		CC/AG	51	103.05	
AA/AT	60	99.71	p=0,053	CT/AG	87	99.80	p=0,082

Verificou-se que os genótipos que apresentam diferenças significativas quando interagem são o CC/AA e o CC/AT.

c. Fatores de Risco

Posteriormente, verificou-se entre os fatores idade, tabagismo, raça e sexo, quais poderiam influenciar a concentração de PC, através de uma análise de regressão (tabela 23). Comparou-se os níveis de PC apenas nos oito grupos anteriormente selecionados com N maior ou igual a 10.

Tabela 23. Resultados da análise de regressão de acordo com os fatores de risco em relação aos níveis de PC.

fatores	N	PC(%)	p-valor
FUMANTES	sim	64	85%
	não	202	105%
RAÇA	caucasóide	188	80%
	negroíde	78	100%
SEXO	fem	50	77%
	masc	216	75%
IDADE	18-44	233	100%
	>45	33	101%

Os resultados mostraram que essas variáveis não tiveram influência sobre o nível de PC, nos casos estudados.

V.2. População Trombótica

A análise dos genótipos para os 3 polimorfismos na população trombótica (Tabelas 24 a, b e c) mostrou sempre um maior número de heterozigotos CT (54%), AG (65.9%) e AT (55.6%).

A análise das frequências alélicas demonstrou que no polimorfismo C/T, o alelo C é o mais frequente (0.67). Em relação ao polimorfismo A/G, o alelo mais frequente é o A (0.73), enquanto que no polimorfismo A/T, o alelo A é o mais comum (0.64). A comparação das frequências alélicas observadas com as esperadas nessa população revelou que para os três polimorfismos os genótipos não se distribuem de acordo com a lei de Hardy Weimberg, havendo um predomínio de heterozigotos em todas as situações.

Tabela 24 a. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo CT (-1654) na população trombótica

Genótipo 1	N	Porcentagem	FA
CC	43	34.5%	p=0.67
CT	80	65.5%	q=0.33
TT	00	0%	$\sigma=0.03$
	123	100%	

Tabela 24 b. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo AG (-1641)
na população trombótica

Genótipo 2	N	Porcentagem	FA
AA	57	46%	p=0.73
AG	66	54%	q=0.27
GG	00	0%	σ =0.03
	123	100%	

Tabela 24 c. Distribuição dos genótipos e frequência alélica (FA) do polimorfismo AT (-1476)
na população trombótica

Genótipo 3	N	Porcentagem	FA
AA	45	36.2%	p=0.64
AT	68	55.5%	q=0.36
TT	10	8.1%	σ =0.03
	123	100%	

As tabelas 25 a, b e c mostram a frequência dos três genótipos na população trombótica, de acordo com a raça.

Tabela 25 a. Frequência dos genótipos do polimorfismo CT na população trombótica, separada de acordo com o grupo racial:

Genótipo 1	CC	CT	TT	total
Caucasóide	39 (36,1%)	68 (63,8%)	0	107
Negróide	04 (25%)	12 (75%)	0	16
total	43	80	0	123

Tabela 25 b. Frequência dos genótipos do polimorfismo AG na população trombótica, separada de acordo com o grupo racial:

Genótipo 2	AA	AG	GG	total
Caucasóide	52 (47,8%)	56 (52,3%)	0	108
Negróide	05 (33,3%)	10 (66,7%)	0	15
total	57	66		123

Tabela 25 c. Frequência dos genótipos do polimorfismo AT na população trombótica, separada de acordo com o grupo racial:

Genótipo 3	AA	AT	TT	total
Caucasóide	40 (36,7%)	58 (54,1%)	10 (0,9%)	108
Negróide	05 (33,3%)	10 (77,7%)	0	15
total	45	68	10	123

A análise dos genótipos dentro da população trombótica mostrou 12 combinações diferentes, entre as 27 possíveis (tabela 26). Observou-se uma maior frequência dos genótipos CT/AG/AT, CT/AA/AT, CT/AG/AA e CC/AG/AT.

Tabela 26. Genótipos encontrados na população Trombótica:

Genótipos	N	Porcentagem
CC/AA/AA	11	8.1%
CC/AG/AA	05	4.1%
CT/AA/AA	12	9.7%
CT/AG/AA	17	13.8
CC/AA/AT	10	8.1%
CC/AG/AT	14	11.4%
CT/AA/AT	19	15.4%
CT/AG/AT	25	21.1%
CC/AA/TT	02	1.6%
CC/AG/TT	01	0.8%
CT/AA/TT	03	2.4%
CT/AG/TT	04	3.2%
	123	100%

As Tabelas 27 a e b mostram os genótipos encontrados na população trombótica, de acordo com as raças:

Tabela 27 a. Genótipos encontrados na população com trombose, de origem caucasóide

Genótipos	N	Porcentagem
CC/AA/AA	09	8.2
CC/AG/AA	03	2.7%
CT/AA/AA	12	10.9%
CT/AG/AA	15	13.6%
CC/AA/AT	10	9.1%
CC/AG/AT	14	12.7%
CT/AA/AT	15	13.6%
CT/AG/AT	19	18.2%
CC/AG/TT	03	2.7%
CT/AG/TT	04	3.6%
TT/AG/TT	04	3.6%

Tabela 27 b. Genótipos encontrados na população com trombose, de origem negróide

Genótipos	N	Porcentagem
CC/AA/AA	02	12,5%
CC/AG/AA	02	12,5%
CT/AG/AA	02	12,5%
CT/AA/AT	04	25%
CT/AG/AT	06	37,5%

a. Dosagem da Atividade Anticoagulante da PC

A dosagem da atividade anticoagulante da PC mostrou níveis que variaram de 70% a 165%, com média de 103,87% e desvio padrão de 28,35%. Foi realizado o **Teste t** e verificou-se uma distribuição normal. A tabela 28 mostra as médias da concentração de PC, na população trombótica, de acordo com os genótipos observados.

Tabela 28. Médias da concentração de PC de acordo com os genótipos encontrados na população trombótica.

Genótipos	N	PC-Média	Desvio Padrão
		(%)	(%)
CC/AA/AA	11	106.42	31.37
CC/AG/AA	05	99	16.30
CT/AA/AA	12	105.50	32.66
CT/AG/AA	17	102.33	22.59
CC/AA/AT	10	102.33	28.38
CC/AG/AT	14	106.63	44.05
CT/AA/AT	19	107.70	26.15
CT/AG/AT	26	107.73	30.14
CC/AA/TT	03	93.33	8.38
CC/AG/TT	01	73	-
CT/AA/TT	03	93.33	8.38
CT/AG/TT	03	111.33	14.36

b. Análise da Relação dos Polimorfismos e a Concentração de PC na População Trombótica

Procedeu-se à análise das diferenças na concentração de PC de acordo com o genótipo, apenas em grupos de casos com N igual ou superior a 10, descritos a seguir:

CC/AA/AA	CT/AA/AA	CT/AG/AA	CC/AA/AT
CC/AG/AT	CT/AA/AT	CT/AG/AT	

Através da análise de variância observou-se que não houve diferença significativa entre esses grupos em relação ao nível de PC ($p=0,956$).

Para verificar se realmente não existia diferença significativa entre a concentração de PC e cada um dos polimorfismos com seus respectivos genótipos, independentemente, foi utilizado o **Teste t**, pois os dados apresentavam distribuição normal. Constatou-se que não houve diferença significativa nos níveis de PC entre os genótipos abaixo (N maior ou igual a 10):

- AA e AT $p=0,585$
- CC e CT $p=0,790$
- AA e AG $p=0,883$

Também não foram verificadas diferenças significativas na média de concentração de PC quando analisamos conjuntamente 2 polimorfismos e suas possíveis combinações através do **Teste t** (tabela 29):

- Genótipo 1: CC ou CT ($p=0,79$)
- Genótipo 2: AA ou AG ($p=0,88$)
- Genótipo 3: AA ou AT ($p=0,59$)

Tabela 29. Comparação das médias da concentração de PC na análise conjunta de 2 genótipos, com N maior ou igual a 10.

Duplas	N	PC-Média (%)	p - valor	Duplas	N	Média-PC (%)	p - valor
CC/AA	12	103.33		AA/AT	23	106.30	
CT/AA	27	103.74	p=0,965	AG/AT	34	107.38	p=0,899
CC/AT	17	105.12		CG/AA	20	101.50	
CT/AT	40	107.72	p=0,776	AG/AT	34	107.38	p=0,439
CC/AA	12	103.33		CC/AA	13	104.54	
CC/AT	17	105.12	p=0,889	CT/AA	29	106.79	p=0,814
CT/AA	27	103.74		CC/AA	13	104.54	
CT/AT	40	107.72	p=0,565	CC/AG	16	104.25	p=0,982
AA/AA	19	105.84		CT/AA	29	106.79	
AA/AG	20	101.50	p=0,612	CT/AG	38	105.60	p=0,862
AA/AA	19	105.84		CC/AG	16	104.25	
AA/AT	23	106.30	p=0,958	CT/AG	38	105.60	p=0,881

c. Fatores de Risco e a População Trombótica

Através de uma análise de regressão, comparou-se os níveis de PC apenas nos 7 grupos anteriormente selecionados (N maior ou igual a 10 casos), de acordo com os fatores idade, tabagismo, raça e sexo (tabela 30). Os resultados não mostraram nenhuma influência desses fatores de risco sobre os níveis de PC, nesse grupo de pacientes, independente do genótipo.

Tabela 30. Resultados da análise de regressão de acordo com os fatores de risco em relação aos níveis de PC na amostra total de trombóticos.

fatores	N	PC	p-valor
FUMANTES	sim	28	90%
	não	95	99%
RAÇA	caucasóide	108	100%
	negroíde	15	100%
SEXO	fem	88	101%
	masc	15	105%
IDADE	18-44	96	114%
	>45	27	110%

Quando essa mesma análise foi realizada, no mesmo grupo, levando-se em consideração o genótipo para os 3 polimorfismos, verificou-se que nos grupos CC/AG/AT e CT/AA/AA as variáveis fumo ($p=0,009$) e sexo ($p=0,038$), influenciaram o nível de PC, respectivamente.

V.3. Comparação Entre a População de Doadores e de Trombose

Abaixo descrevemos os 8 subgrupos da população de doadores e 7 subgrupos da população com trombose (N maior ou igual a 10:), que foram comparados em relação à média da concentração de PC (tabela 32).

População de doadores:

CC/AA/AA	CC/AG/AA	CT/AA/AA	CT/AG/AA
CC/AA/AT	CC/AG/AT	CT/AA/AT	CT/AG/AT

População com Trombose

CC/AA/AA	CT/AA/AA	CT/AG/AA	CC/AA/AT
CC/AG/AT	CT/AA/AT	CT/AG/AT	

Tabela 31. Análise comparativa da média da concentração de PC entre os genótipos com N maior ou igual a 10, nos doadores e trombóticos.

População de Doadores			População com Trombose		
Genótipos	N	Média	Genótipos	N	Média
CC/AA/AA	11	116.4	CC/AA/AA	11	106.42
CC/AG/AA	16	110.5	CC/AG/AA	05	99
CT/AA/AA	12	102	CT/AA/AA	12	105.50
CT/AG/AA	19	104	CT/AG/AA	17	102.33
CC/AA/AT	21	92.45	CC/AA/AT	10	102.33
CC/AG/AT	39	104.25	CC/AG/AT	14	106.63
CT/AA/AT	38	103.35	CT/AA/AT	19	107.70
CT/AG/AT	71	98.60	CT/AG/AT	26	107.73

Obs. O grupo com genótipo CC/AG/AA da população trombótica somente foi incluído para comparação com a população de doadores.

Não houve diferença significativa entre as médias da atividade de PC para os diferentes genótipos, entre pacientes com trombose e doadores.

Tabela 32. Análise comparativa da média da concentração de PC entre os genótipos com N maior ou igual a 10 em nossos doadores e os controles normais de Spek.

População de Doadores			População Controle (Spek)		
Genótipos	N	Média	Genótipos	N	Média
CC/AA/AA	11	116.4	CC/GG/TT	15	95
CC/AG/AA	16	10.5	CC/AG/AA	01	119
CT/AA/AA	12	102	CT/AA/AA	13	111
CT/AG/AA	19	104	CT/AG/AA	01	102
CC/AA/AT	21	92	CC/GG/AT	0	
CC/AG/AT	39	104	CC/AG/AT	29	106.
CT/AA/AT	38	103	TT/AA/AA	13	117
CT/AG/AT	71	99	CT/AG/AT	42	108

Houve diferença significativa nas amostras em **negrito** entre as médias da atividade de PC para os diferentes genótipos, entre doadores e as amostras controle de Spek

Tabela 33. Análise comparativa da média da concentração de PC entre os genótipos com N maior ou igual a 10 em nossos pacientess e os pacientes de Spek.

População com Trombose			Pacientes (Spek)		
Genótipos	N	Média	Genótipos	N	Média
CC/AA/AA	11	106	CC/GG/TT	25	94
CC/AG/AA	05	99	CC/AG/AA	0	
CT/AA/AA	12	105	CT/AA/AA	10	102
CT/AG/AA	17	102	CT/AG/AA	01	100
CC/AA/AT	10	102	CC/GG/AT	01	98
CC/AG/AT	14	106	CC/AG/AT	22	139.
CT/AA/AT	19	108	TT/AA/AA	15	115.
CT/AG/AT	26	108	CT/AG/AT	44	101

Houve diferença significativa nas amostras em **negrito** entre as médias da atividade de PC para os diferentes genótipos, entre pacientes com trombose e as amostras de pacientes de Spek.

VI - Discussão e Conclusão

A PC é um componente do sistema da anticoagulação natural humano; é uma serino-protease de produção hepática, que é usualmente ativada na microcirculação pela trombina, na presença da trombomodulina. Uma vez ativada, ao se associar a outro cofator vitamina K dependente, a proteína S, inativa os fatores Va e VIIIa. A deficiência hereditária de PC está associada ao tromboembolismo venoso, que freqüentemente é recorrente. A incidência de deficiência de PC em pacientes com trombofilia primária pode chegar a 5%. Estima-se que os heterozigotos sintomáticos ocorrem numa frequência entre 1/16000 a 1/36000 na população geral (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

A associação da deficiência de PC como fator etiológico para doença tromboembólica, foi descrita pela primeira vez há 16 anos, em um paciente com trombose de repetição. (GRIFFIN *et al*, 1981). Atualmente, a deficiência hereditária de PC está bem definida, é de herança autossômica dominante, com penetrância incompleta e expressividade variável. Os indivíduos heterozigotos para deficiência de PC apresentam um quadro clínico caracterizado por doença tromboembólica, mesmo na ausência de um fator de risco. (SORIA, *et al.*; 1992)

A maior parte dos pacientes com deficiência de PC possuem atividade plasmática de PC entre 30 e 65% (BERTINA, *et al.*; 1989). Miletich *et al* (1987) verificaram que 1/60, dentro de uma amostra de 5422 doadores de sangue, apresentavam níveis de antígeno de PC no limite inferior da normalidade ou compatível com a deficiência de PC. O estudo desses indivíduos confirmou a deficiência de PC em 10 famílias, mostrando que não é tão infrequente a presença de indivíduos heterozigotos para deficiência de PC dentro de uma população assintomática. Ao mesmo tempo esse achado demonstra que pode ocorrer uma superposição dos níveis plasmáticos de PC, entre indivíduos normais ou com deficiência de PC.

Por outro lado, devido a importância da via anticoagulante da PC, a concentração plasmática da PC, mesmo que no nível inferior da normalidade, talvez possa ser um fator de risco a mais para a doença tromboembólica (Spek.; *et al*, 1995).

Recentemente foi descrita a presença de três polimorfismos localizados na região promotora do gene da PC. Esses polimorfismos na população em que foram estudados, mostraram ter uma relação com os níveis de PC (SPEK *et al*, 1993). Também a análise desses polimorfismos numa população com trombose mostrou que o genótipo CC/GG/TT era um fator de risco para trombose (Spek *et al*, 1995).

Tal achado seria de grande importância se confirmado em outras populações, pois poderia ser considerado um fator de risco a mais para a predisposição à trombose.

Neste estudo caracterizamos a frequência desses três polimorfismos em três grupos étnicos da população brasileira: caucasóide, negróide e indígena. Também verificamos se há correlação entre a concentração de PC e os polimorfismos, nos grupos caucasóide e negróide. Finalmente, analisamos esses polimorfismos em um grupo de indivíduos com trombose venosa.

VI.1. População Indígena

Segundo a teoria tradicional, esses indígenas que ocupam nossas terras seriam um povo nômade que colonizou o Brasil através de uma migração lenta, que teria começado no leste da Ásia, há cerca de 50 mil anos, quando o continente era então ligado ao norte da América (Alasca). Atualmente já existe uma nova tese, defendida pela americana Dra. Anna Roosevelt e pesquisadores brasileiros, que altera o entendimento da forma e ritmo ocupacional do continente. Segundo Roosevelt *et al* (1996) diferentemente do que afirma a teoria norte-americana, um segundo grupo de paleoíndios teria descido pelo litoral da América do Norte há cerca de 12 mil anos, povoando muito mais rapidamente a América do Sul.

A análise dos dados obtidos na população indígena, demonstrou uma maior frequência de homozigotos nos três polimorfismos estudados (CC-52,9%; GG-54% e AA-70,1%). Tal resultado leva-nos a crer que os índios brasileiros estudados no presente trabalho ainda não sofreram forte influência da miscigenação, o que era de se esperar, uma vez que esse grupo indígena tem suas tribos em localização razoavelmente isolada do convívio com o homem civilizado, o que resulta na pouca variação genômica (baixo fluxo gênico). Por outro lado, como se trata de um grupo étnico isolado, a frequência elevada de homozigotos pode ser decorrente de endocruzamento, apesar de terem sido excluídos os indivíduos com descendência direta.

A análise do genótipo, isto é, a análise conjunta dos 3 polimorfismos, mostrou uma maior predominância do genótipo homozigoto CC/GG/AA (21,8%), o que confirma nossa tese a princípio. É importante ressaltar que esse genótipo não foi observado na população holandesa e nem em nossa população com trombose, apenas sendo detectado em 1 indivíduo caucasóide da população de doadores.

Todavia, os achados de 16.1% de CC/AG/AA, 12.6% de CT/AG/AA e 9.2% de CT/GG/AT podem ser explicados pela existência de um fluxo gênico mínimo.

Os dados obtidos nos levam a crer que em nossa população indígena além de ser um excelente campo para analisarmos algumas informações em genética populacionais pouco miscigenadas, contém ainda informações sobre sua origem, o que pode ser de grande valia para esclarecimentos de forma e ritmo de ocupação.

Devido às dificuldades de se centrifugar e congelar rapidamente o plasma coletado, a dosagem de proteína C não pode ser realizada, o que teria sido muito interessante, visto o predomínio de homozigotos e a ausência de fatores de risco, comuns às populações caucasóide e negróide.

VI.2. População de Doadores

Na população de doadores houve predominância do sexo masculino, já que em nossa casuística haviam 216 homens e 50 mulheres. Quanto a raça, 188 indivíduos eram caucasóides e 78 negróides.

A análise da frequência dos 3 polimorfismos na população de doadores, avaliando-se juntamente caucasóides e negróides, mostrou uma maior frequência de heterozigotos (CT-59,4%, AG-59,4%, AT-70,7%). Houve também uma maior frequência do genótipo heterozigoto (CT/AG/AT-27,4%).

O grupo caucasóide foi selecionado, tendo-se o cuidado de só se coletar amostras de sangue daqueles cujos ancestrais até a terceira geração, eram descendentes apenas de indivíduos da raça branca. O grupo negróide também foi selecionado levando-se em conta os mesmos critérios. Apesar desse cuidado, não se pode afastar totalmente um certo grau de miscigenação.

Na fase seguinte, quando se analisou as raças negroíde e caucasóide separadamente, verificou-se também uma maior frequência de heterozigotos: CT-57%, AG-59%; e AT-64% nos caucasóides e CT-65%, AG-60% e AT-77% nos negróides. A conjugação dos 3 polimorfismos, de acordo com a raça revelou que o genótipo heterozigoto CT/AG/AT foi o mais frequente, com uma frequência de 26,1% e 28,3% nos caucasóides e negróides, respectivamente. Não houve nenhum genótipo com uma frequência significativamente diferente entre os caucasóides e negróides, nesta população. Tais dados não apresentam diferença entre si.

Contudo, observou-se diferenças estatisticamente significantes entre as frequências dos genótipos mais comuns encontrados na população holandesa estudada por Spek *et al* (1995), com os da população de doadores deste estudo. Apesar do genótipo CT/AG/AT ser predominante em ambas as populações, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a sua

frequência na população caucasóide brasileira (26.1%) e a caucasóide holandesa (40%). Isto talvez possa ser explicado pela presença de outros genótipos na população brasileira, com uma frequência até considerável, como CC/AG/AA, CT/AG/AA, CC/AA/AT e CT/AA/AT, e que não estão presentes na população holandesa. Isto novamente talvez seja um reflexo da maior miscigenação que ocorre em nossa população.

Por outro lado, o genótipo CC/GG/TT, verificado com uma frequência de 15% na população holandesa (SPEK *et al.*; 1995), somente está presente em 1% (PC: 112,5%) dos caucasóides e em nenhum negróide brasileiro, o que indica a raridade do haplótipo CGT na nossa população. É importante ressaltar que esse genótipo inclusive foi considerado um fator de risco para trombose na população holandesa.

A dosagem da atividade de PC no plasma de doadores deste estudo variou de 70 a 150%, com uma média de 102%, o que é semelhante ao descrito em outras populações (SPEK *et al.*; 1995). Por outro lado, 9 doadores apresentaram níveis de PC inferiores a 75%, e não pode ser descartado que esses indivíduos sejam heterozigotos para deficiência de PC, pois como já discutido anteriormente, pode haver uma superposição entre os níveis inferiores da normalidade com os níveis encontrados na deficiência de PC. É importante ressaltar que essa dosagem foi confirmada, pois os doadores foram convocados para uma nova coleta de sangue e nova dosagem de PC.

Nesta situação seria muito interessante que houvesse a ligação entre algum dos genótipos e o nível diminuído de PC, pois auxiliaria na discriminação entre os indivíduos normais e deficientes, já que a dosagem sérica de PC apresenta limitações na sua interpretação. Entretanto isto não pode ser demonstrado, já que estes indivíduos estavam distribuídos entre 7 genótipos.

Nesta situação, o estudo familiar também contribuiria para a confirmação do diagnóstico, mas infelizmente não conseguimos obter as amostras de sangue dos familiares.

Uma outra hipótese seria a deficiência dos fatores dependentes da vitamina K ou até uma insuficiência hepatocítica. A deficiência de vitamina K pode ser afastada pela dosagem dos outros fatores dependentes da vitamina K, como a proteína S e o fator VII, que estavam dentro dos limites da normalidade. Com esses resultados normais a hipótese de insuficiência hepática também fica praticamente excluída.

Spek *et al* (1995) relataram que o genótipo CC/GG/TT está associado a uma redução de 22% nos níveis de PC, em relação ao genótipo TT/AA/AA, tanto em indivíduos normais como em pacientes com trombose. Caso também tivéssemos encontrado esse resultado em nossa população, confirmaríamos o papel desses polimorfismos sobre os níveis de PC, pois o que se esperaria é que, independente da nacionalidade, houvesse reprodutibilidade dos achados. Infelizmente, a frequência desses genótipos, tanto em nosso grupo de pacientes como de doadores foi praticamente nula, não permitindo esta análise. O que obviamente, não exclui a possibilidade de que os dados de Spek (1995), estejam corretos.

Quando comparamos a média da atividade de PC dos 2 genótipos mais frequentes na população de doadores brasileiros e de holandeses (CT/AG/AT e CC/AG/AT), não verificamos diferença entre eles.

Entretanto, em nossa população de doadores, foi detectada uma diferença significativa no polimorfismo 3, entre AA e AT ($p=0,015$), em relação aos níveis de PC. Na sequência, foram analisados conjuntamente 2 polimorfismos e, novamente pode-se notar diferença significativa entre CC/AA e CC/AT ($p=0,004$). Isto poderia sugerir que a presença do polimorfismo 1 em homozigose para o C influencia na diferença dos níveis de PC, em relação ao polimorfismo 3. Como os dados obtidos na população holandesa apontam para resultados opostos aos nossos, pois naquela amostra os indivíduos com o genótipo CC/AT exibem níveis de PC mais elevados

que os com o genótipo CC/AA, isto evidencia a fragilidade da tentativa de se fazer qualquer associação entre o genótipo e o nível de PC.

VI.3. População com Trombose

Na população com trombose, houve predominância do sexo feminino, já que em nossa casuística haviam 35 homens e 88 mulheres. Quanto a raça, também houve uma predominância de indivíduos caucasóides (n=108) sobre os negróides (n=15).

A frequência dos genótipos no grupo de pacientes foi inicialmente avaliada sem levar em consideração a raça, e novamente verificou-se uma maior frequência de heterozigotos (C/T-65,5%, A/G-54% e A/T-55,5%), como no grupo de doadores. Quando conjugamos os três polimorfismos, notamos a predominância do genótipo heterozigoto CT/AG/AT em 21,1% dos casos, semelhante ao verificado nos doadores.

A avaliação do grupo de pacientes separado por raça, também demonstrou um predomínio de heterozigozidade nos 3 polimorfismos: CT-64%, AG-52.3% e AT-54% nos caucasóides e CT-75%; AG-66.7% e AT-77.7% nos negróides. Tais dados não apresentam diferença significativa entre si.

A análise da frequência do polimorfismo 2 (A/G) revelou um aumento estatisticamente significativo do genótipo AA na população com trombose, quando comparada à população de doadores ($p=0.005$), e que se confirmou somente na raça caucasóide ($p=0.01$). Para verificar se o genótipo AA estava associado com maior risco de trombose que os genótipos AG e GG, comparou-se o número de pacientes e controles em cada um dos genótipos. Os resultados revelaram que ter o genótipo AA é um fator de risco para trombose (OR 1.93, 95% CI, 1.11 a 3.24). Contudo, esse genótipo não está associado a níveis diminuídos de PC, o que favoreceria muito a hipótese de ser considerado um fator de risco.

A dosagem da atividade da PC foi analisada na população com trombose brasileira como um todo, já que a análise por raças não apresentou diferenças significativas, sendo que foi de 103%, quase idêntica à média de 105% de PC na população trombótica holandesa.

A média de PC para o genótipo mais frequente, CT/AG/AT foi de 107.7%, praticamente semelhante a verificada nos pacientes holandeses, que foi de 108%.

O genótipo CC/GG/TT foi considerado um fator de risco com uma chance de 50 a 100%, para o desenvolvimento de trombose, na população trombótica holandesa. Contudo, como discutido anteriormente, praticamente não encontramos esse genótipo em nossos pacientes com trombose (em nossa amostra tivemos o cuidado de excluirmos os pacientes com deficiência de PC). Apesar de se tratar de 2 populações diferentes, esperaríamos um maior número de casos de pacientes com esse genótipo, em nossa população, uma vez que o mesmo é considerado um fator de risco para trombose. Isto porque a prevalência de outras alterações genéticas relacionadas a trombose, como o fator V de Leiden, a mutação do gene da protrombina, a mutação no gene da metilenotetrahidrofolato redutase, entre outros, que são comuns em pacientes europeus com trombose, também foram frequentes em nossos pacientes com trombofilia (Arruda *et al* 1995, 1997, 1997 in press).

A frequência dos genótipos com maior e menor concentração de PC não é diferente entre doadores e pacientes com trombose ($p>0.39$). Portanto estes dados nos alertam para o fato de que os polimorfismos podem não estar diretamente ligados ao risco de trombose. Talvez outros fatores que não genéticos, ou sua associação com fatores ambientais possam influenciar na diminuição dos níveis de PC.

Fatores como idade avançada, sexo masculino, raça, o uso de contraceptivos e tabagismo, poderiam contribuir para a variação nos níveis de PC, associado ao genótipo. No grupo de doadores não houve influência desses fatores. Por outro lado, os pacientes com trombose com os

genótipos CC/AG/AT e CT/AA/AA, tiveram seus níveis de PC influenciados pelo tabagismo e sexo.

O resultado deste estudo mostrou que na nossa população a variação na distribuição normal dos níveis de PC praticamente não está relacionada aos polimorfismos presentes na região promotora do gene da PC.

Estes achados se contrapõem aos resultados obtidos por Spek *et al* (1995). Talvez somente com um trabalho em que se analisasse a expressão da produção de PC nos diferentes genótipos é que isso realmente pudesse ser elucidado ou talvez pelo sequenciamento de pacientes com deficiência de PC, pois se houvesse um desequilíbrio de ligação, como parece haver, estaria comprovado os achados nossos achados ou os de Spek (1995).

Também nossos resultados alertam para o fato da diversidade genética das populações humanas, mesmo quando se comparam grupos étnicos semelhantes. Portanto, a análise de qualquer polimorfismo, deve sempre antes ser precedida de uma análise da população em estudo, para que conclusões corretas possam ser bem fundamentadas.

VII - Summary

Protein C (PC) is one of the major inhibitors of blood coagulation. After activation by thrombin-thrombomodulin complex in the endothelium, PC inhibits activated factors V and VIII. It also exerts a profibrinolytic activity, through neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).

PC deficiency is associated with clinical thromboembolic disease. The incidence of PC deficiency in patients with thrombosis is 2-5%. However, since the physiological significance of the PC anticoagulant activity, a decreased plasmas concentration, even in the normal range, could be a factor contributing for thrombosis in patients without a congenital PC deficiency.

Recently, Spek et al (1993) described 3 polymorphisms in the promoter region of PC gene: A/T in the position 1476; C/T in the position 1654 and A/G in the position 1641. The genotypic variation of these polymorphisms were associated with plasma PC levels and thrombotic risk (Spek et al 1995).

We determined the frequency of these polymorphisms in 3 ethnic groups of the Brazilian population (caucasian, black and indian) and in patients with thrombosis disease, without PC deficiency. We also verified if there is an association between genotype and PC concentration, and with thrombotic risk.

The indian group comprised 87 individuals. Homozygosity was prevalent in all polymorphisms (CC-52.9%, GG-54% and AA-70.1%) and in the genotype (CC/GG/AA-21.8%). These results suggest that this group was not miscegeneous, a finding very common in Brazilian population, probably because the tribe of these indians is isolated from the civilization.

Caucasian and black population comprised 216 men and 50 women; there was 188 Caucasians (147 men and 41 women) and 78 Blacks (69 men and 9 women). Heterozygous polymorphism was more frequent in caucasian and black, as well as complete heterozygote CT/AG/AT (26.1% and 30.1%, respectively). Although before blood collection the individuals

were selected only if until the third ancestry were from the same origin, our results favour a high genetic flow.

Mean PC activity levels in caucasian and blacks was 102%. However there was no correlation between the genotypic variation and PC concentration. Individuals with the 2 more frequent genotype (CT/AG/AT and CC/AG/AT) had mean PC levels similar to that described in the Dutch study.

There was a difference in mean PC levels in A/T polymorphism, between AA and AT ($p=0.015$), that also was significative between CC/AA and CC/AT ($p=0.004$). This could suggest that the first polymorphism homoizogous for C influence the difference in PC concentration related to A/T polymorphism. However, in the Dutch population the results are in opposite, since the individuals with CC/AT genotype showed increased PC levels.

Thrombotic population comprised 35 men and 88 women, 108 caucasian and 15 black.

The complete heterozigous CT/AG/AT was the more frequent genotype (21-1%), and not differ from the black and caucasian population. Even when they were separated according to the race, there was no difference between the frequency in the groups.

When the polymorphisms were analysed individually, the second polymorphism homoizogous for A was significantly more frequent in caucasian patients with thrombosis related to the caucasian normal population ($p=0.005$). To ascertain whether this polymorphism genotype was associated with a higher risk for thrombosis, we compare the number of patients and control caucasian subjects with the AA and AT or TT genotypes. The results indicated that having the AA genotype yields an OR of 1.93 (95% CI, 1.11 to 3.24) compared to the other genotypes. However, AA genotype is not associated with decrease in PC levels. Indeed, this finding was not verified in Dutch population.

On the other hand, in Dutch study a clear correlation between PC promoter genotype and PC plasma levels was found; individuals with CGT haplotype exhibited a PC activity 22% lower than individuals with TAA haplotype. They also considered CGT haplotype a risk factor for thrombosis.

Although Brazilian and Dutch populations, we should expected that CGT genotype being a risk factor for thrombosis was more prevalent in our population, like factor V Leiden, variant prothrombin gene and methylene tetrahydrofolate reductase mutation, wich were increased in our and in Europe thrombotic patients.

In conclusion, our results demonstrated that in our population these polymorphisms were not related to PC concentration.

It is also important to point out the great genetic variety in human populations, even in the same ethnyic groups, rising the importance to analyse individually each population.

VIII - Referências Bibliográficas

- ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; REITSMA, P.H.; Factor V Leiden (FVQ 506) is common in Brazilian population. *American Journal of Hematology*. 49: 242-243, 1995.
- ARRUDA, V.R.; VON ZULEN, P.H.; CHUPARINI, L.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, COSTA, F.F. The mutation Ala 677→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 77:818-21, 1997.
- ARRUDA, V.R.; VON ZULEN, P.H.; GONÇALVES, M.S.; ANNICHINO-BIZZACCHI, COSTA, F.F. Prevalence of prothrombin gene variant (nt 20210 A) in venous thrombosis and arterial diseases. *Thrombosis and Haemostasis*. *in press*.
- BECKMANN, R. J.; SCHMIDT, R. J.; SANTERRE, R. F.; PLUTZKY, J.; CRABTREE, G. L. (1985) The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs. *Nucleic Acids Research*. 13:5233-47.
- BERTINA, R. M.; BRIËT E.; ENGESSER, L.; REISTMA, P. H. (1988) Protein C deficiency and risk of thrombosis. *New England Journal of Medicine*. 318:931.
- BOVILL, E.G.; BAUER, K.A.; DICKEMAN, J.D.; CALLAS, P.; WEST, B. (1989) The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England Kindred. *Blood* 73:712-17.
- BROEKMANS, A. W.; van der LINDEN, I. K.; VELTKAMP, J. J.; BERTINA, R. M. (1983) Prevalence of isolated protein C deficiency in patients with venous thrombotic disease and in the population. *Thrombosis and Haemostasis*. 50:350.

- BROEKMANS, A. W. (1985) Hereditary protein C deficiency. *Haemostasis*. **15**:233-40
- BROEKMANS, A. W.; BERTINA, R. M.; REINALDA-POOT, J. (1985) Hereditary protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thromb and Haemost.* **53**:273.
- BROEKMANS, A. W.; CONARD, J. (1988) Hereditary protein C deficiency. Chap 10 in *Protein C and related proteins*. Ed R.M. Bertina, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- COMP, P. C.; ESMON, C. T. (1981) Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *Journal of Clinical Investigations*. **68**:1221-28.
- CONARD, J.; HORELLOU, M. H.; van DREDEN, P.; SAMAMA, M.; REITSMA, P. H.; POORT, S.; BERTINA, R. M. (1992) Homozygous protein C deficiency with late onset and recurrent coumarin-induced skin necrosis. *Lancet*. **339**:743-44.
- CORDEN, J.; WASYLYK, B.; BUCHWALDER, A.; SASSONE-CORSI, P.; KEDINGER, C.; CHAMBON, P. (1980) Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* **209**:1406-14.
- DAHLBÄCK, B. (1986) Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine proteins by C4b-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. **261**:12022-27.
- DITTMAN, W. A.; MAJERUS, P. W. (1990) Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant. *Blood*. **75**:329-36.
- DITTMAN, W.A.; KUMADA, T.; SADLER, J.E.; MAJERUS, P.W. (1991) The structure and function of mouse thrombomodulin: Phorbol myristate acetate stimulates degradation and synthesis of thrombomodulin without affecting mRNA levels in hemangioma cells. *Journal of Biological Chemistry*. **263**:15815

- DRAKENBERG, T.P.; FERNLUND, P.; ROEPSTORFF, P.; STENFFLOFF, J. (1983): β -Hydroxyaspartic acid in vitamin k-dependent protein C. *Proceedings of the National Academic of Sciences. USA.* **80**:1802.
- DOLAN, G.; BALL, J.; PRESTON, F. E. (1989) Protein C and protein S. Chap 10 in *Baillière's Clinical Haematology*, vol 2, n°4, pp 999-1042. Baillière Tindall, London.
- ESPANA, F.; ESTELLÉS, A.; AZNAR, J.; GILABERT, J. (1986) Assay of protein C in human plasma: Comparison of amidolytic, coagulation and immunochemical assay. *Thrombosis Research* **44**:771-82.
- ESMON, C. T. (1989) The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *Journal of Biological Chemistry.* **264**: 4743-46.
- ESMON, C. T.; OWEN, W.G. (1980) Formation and functions of the anticoagulant protein, activated protein C. In: *Plasma and cellular modulatory protein S*. Center for Blood Research Inc. Bonston, Mass. pp:203-14.
- ESMON, C. T.; OWEN, W.G. (1981) Identification of an endothelial cell co-factor for thrombin-catalysed activation of protein C. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA.* **78**:2249-52.
- ESMON, N. L. (1989) Thrombomodulin. pp. 29-56 In *Progress in hemostasis and thrombosis*, vol 9. Coller, B. S. (Ed.) W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- FAIR, D. S.; MARLA, R. A. (1986) Biosynthesis and secretion of factor VIII, protein C, protein S and protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood.* **67**:64-70.
- FORD, V.A.; STRINGER, C.; KENNEL, S.J. (1992) Thrombomodulin is preferentially expressed in BALB/C lung microvessels. *Journal of Biological Chemistry* **267**:5446-50.

- FOSTER, D.; DAVIE, E. W. (1984) Characterization of cDNA coding for human protein C. *Proceeding of the National Academic of Sciences USA*. **81**:4766-70.
- FOSTER, D. C.; YOSHITAKE, S.; DAVIE, E. W. (1985) The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proceeding of the National Academic of Sciences USA*. **82**:4673-77.
- FOSTER, D. C.; RUDINSKI, M. S.; SCHACH, B. G.; BERKNER, K. L.; KUMAR, A. A.; HANGEN, F. S.; SPRECHER, C. A.; INSLEY, M. Y.; DAVIE, E. W. (1987a) Propeptide of human protein C is necessary for γ -carboxylation. *Biochemistry*. **26**:7003-11.
- FURIE, B.; FURIE, B. C. (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. **53**:505-18.
- GLADSON, C.L.; SCHARRER, I.; HACH, V.; BECK, K.H.; GRIFFIN, J.H. (1988): The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* **59**:18.
- GRIFFIN, J.H.; EVATT, B.; ZIMMERMAN T.S.; KLEISS, A.I.; WIDEMAN, C. (1981): Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *Journal Clinical Investigation*. **68**: 1370.
- GRUNDY, C.; CHITOLIE, A.; TALBOT, S.; BEVAN, D.; KAKKAR, V.; COOPER, D. N. (1989) Protein C London 1: Recurrent mutation at Arg 169 (CGG→TGG) in the protein C gene causing thrombosis. *Nucleic Acids Research*. **17**:10513.
- GRUNDY, C.; MELISSARI, E.; LINDO, V.; SCULLY, M. F.; KAKKAR, V.; COOPER, D. N. (1991d) The molecular basis of lateonset homozygous protein C deficiency. *Lancet*. **338**:575-76.

- GRUNDY, C.; CHISHOLM, M.; KAKKAR, V. V.; COOPER, D. N. (1992c) A novel homozygous minissense mutation in the protein C (PROC) gene causing recurrent venous trombosis. *Human Genetics*. **89**:683-84.
- GRUNDY, C.; SCHULMAN, S.; KOBOSKO, J.; KAKKAR, V. V.; COOPER, D. N. (1992d) Protein C deficiency and thromboembolism: Recurrent mutation at Arg 306 in the protein C gene. *Human Genetics*. **88**:586-88.
- HASSAN, H. J.; LEONARDI, A.; CHELUCCI, C.; MATTIA, G.; MACIOCE, G.; GUERRIERO, R.; RUSSO, G.; MANNUCCI, P. M.; PESCHLE, C. (1990) Blood coagulation factors in human embryonic-fetal development: Preferential expression of the FVII/tissue factor pathway. *Blood*. **76**:1158-64.
- HEEB, M.J.; GRUBER, A.; GRIFFIN, J.H. (1991) Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and copmparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *Journal of Biological Chemistry* **266**:17606.
- KATO, A.; MIURA, O.; AOKI, N. (1988) Assingment of the human protein C gene to chromossome region 2q14-q21 by *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*. **47**:46-47.
- KISIEL, W (1979) Human protein C. Isolation, characterization and mechanism of ativation by α -thrombin. *Journal Clinical Investigation*. **64**:761
- LEYTUS, S. P.; CHUNG, D. W.; KISIEL, W.; KURACHI, K.; DAVIE, E. W.; (1984) Characterization of a cDNA coding for human factor X. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. **81**:3699-3702.

- LINTEL-HEKKERT, W. te; BERTINA, R. M.; REITSMA, P. H. (1988) Two RLFPs ~7kb 5' of the human protein C gene. *Nucleic Acids Research*. **16**:11849.
- LONG, G. L. MARSHALL, A.; GARDNER, J. C.; NAYLOR, S. L. (1988) Cgenes for human vitamin K-dependent plasma proteins C and S located on chromosome 2 and 3 respectively. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. **14**:93-98.
- MACFARLANE, A.S.; TODD, D.; CROMWELL, S. (1964) Fibrinogen catabolism in humans. *Clinical Science* **26**:41-20.
- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. (1990) *Molecular Cloning*. cap. 6 (Agarose Gel Electrophoresis) CSH:6.3
- MARLA, R. A.; MONTGOMERY, R. R.; BROEKMANS, A. W. (1989) Diagnosis and treatment of homozygous protein C deficiency. *Journal of Pediatrics*. **114**: 528-34.
- MATSUDA, M.; SUGO, T.; SAKATA.; MURAYAMA, H.; MIMURO, J.; TANABE, S.; YOSHITAKE, S. (1988) A thrombotic state due to an abnormal protein C. *New England Journal of Medicine* **319**:1265-68.
- MILETICH, J.; SHERMAN, L.; BROZE, G. (1987) Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *New England Journal of Medicine*. **317**: 991-96.
- MORAWITZ, P. (1905) Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie and experimentalen Pharmakologie*. **4**: 307-16.
- O'HARA, P.J.; GRANT, F. J.; HALDEMAN, B. A.; GRAY, C. L.; INSLEY, M. Y.; HAGEN, F. S.; MURRY, M. J. (1987) Nucleotide sequence of gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **84**:5158-62.

- PARKINSON, J.F.; VRAHOS, C.J.; YAN, S.C.; BANG, NU. (1992) Recombinant human thrombomodulin. Regulation of cofactor activity and anticoagulant function by a glycosaminoglycan side chain. *Biochem Journal*. **283**:151
- PARKINSON, J.F.; NAGASHIMA, M.; KUHN, I.; LEONARD, J.; MORSER, J. (1992) Structure-function studies of the epidermal growth factor domains of human thrombomodulin. *Biochem Biophys Res. Commun J*. **185**:576.
- PATRACCHINI, P.; AIELLO, V.; PALAZZI, P.; CALZOLARI, E.; BERNARDI, F. (1989a) Sublocalization of human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Human Genetics*. **81**:191-92.
- PATTHY, L. (1985) Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*. **41**:657-63.
- PLUTZKY, J.; HOSKINS, J. A.; LONG, G. L.; CRABTREE, G. R. (1986) Evolution and organization of the human protein C gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **83**:546-50.
- REITSMA, P. H.; LINTEL-HEKKERT, W.; KOENHEN, E.; van der VELDEN, P. A.; ALLAART, C. F.; DEUTZ-TERLOUW, P. P.; POORT, S. R.; BERTINA, R. M. (1990) Application of two neutral MspI DNA polymorphisms in the analysis of hereditary protein C deficiency. *Thrombosis and Haemostasis*. **64**:239-44.
- REITSMA, P. H.; POORT, S. R.; ALLAART, C. F.; BRIËT, E.; BERTINA, R. M. (1991) The spectrum of genetic defects in a panel of 40 Dutch families with symptomatic protein C deficiency type I: Heterogeneity and founder effects. *Blood*. **78**:77-84.

Anexos

Tabela 2. Caracterização da população indígena:

INDIOS	SEXO	IDADE	ALDEIA
1	F	14	MARO
2	M	25	PARA
3	F	16	MARO
4	M	21	MARO
5	F	33	PARA
6	F	14	MARO
7	M	61	MARO
8	M	15	MARO
9	F	32	MARO
10	F	17	MARO
11	F	11	MARO
12	M	18	MARO
13	F	18	PARA
14	M	37	PARA
15	M	16	PARA
16	M	18	PARA
17	F	33	MARO
18	M	19	PARA
19	F	16	PARA
20	F	16	PARA
21	M	26	PARA
22	M	43	PARA
23	M	25	MARO
24	M	23	MARO
25	M	28	MARO
26	M	25	PARA
27	M	19	MARO
28	M	20	MARO
29	F	36	MARO
30	F	36	PARA
31	F	39	PARA

INDIOS	SEXO	IDADE	ALDEIA
32	F	20	PARA
33	F	22	PARA
34	F	43	PARA
35	M	29	PARA
36	M	32	PARA
37	M	18	MARO
38	F	38	MARO
39	F	38	MARO
40	M	19	PARA
41	F	36	PARA
42	M	46	APIT
43	F	35	IGAR
44	M	40	IGAR
45	F	36	IGAR
46	M	51	IGAR
47	F	51	IGAR
48	M	70	IGAR
49	F	41	IGAR
50	M	37	IGAR
51	F	43	IGAR
52	M	36	IGAR
53	F	70	IGAR
54	M	31	IGAR
55	F	20	IGAR
56	M	27	IGAR
57	F	36	IGAR
58	M	34	IGAR
59	F	49	IGAR
60	M	68	IGAR
61	F	66	IGAR
62	M	31	IGAR

INDIOS	SEXO	IDADE	ALDEIA
63	F	22	IGAR
64	M	31	IGAR
65	F	36	IGAR
66	M	33	XINGÚ
67	F	16	XINGÚ
68	M	65	XINGÚ
69	F	50	XINGÚ
70	M	40	XINGÚ
71	F	28	XINGÚ
72	M	50	XINGÚ
73	F	35	XINGÚ
74	M	30	XINGÚ
75	F	37	XINGÚ
76	M	69	XINGÚ
77	F	33	XINGÚ
78	M	52	XINGÚ
79	F	49	XINGÚ
80	M	43	XINGÚ
81	F	13	XINGÚ
82	M	34	XINGÚ
83	M	39	XINGÚ
84	F	23	XINGÚ
85	F	17	XINGÚ
86	M	25	XINGÚ
87	F	15	XINGÚ

MARO-Maroxewara

PARA-Paranatinga

API.-Apiterewa

IGAR-Igarapé

XINGÚ-Rio Xingú

Questionário

Nome: HC:

Idade:

Sexo: M ☐ F ☐Raça: C ☐ N ☐Fumante: sim ☐ não ☐Anticoncepcional: sim ☐ não ☐*Possui casos na família de:*Trombose: sim ☐ não ☐Derrame: sim ☐ não ☐Infarto: sim ☐ não ☐Diabeates: sim ☐ não ☐Hipertensão Arterial: sim ☐ não ☐*Toma algum medicamento ?*sim ☐ não ☐. Qual ?

Tabela 4. Caracterização da população de doadores:

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
1	C	M	26	N	S	N	N	N	N
2	C	M	28	N	N	N	N	N	N
3	C	M	23	S	N	N	N	N	N
4	C	M	29	S	S	N	N	N	S
5	C	M	40	N	N	N	N	N	N
6	C	M	26	N	N	N	N	N	N
7	C	F	25	N	N	N	N	N	N
8	C	F	30	S	S	N	N	N	N
9	C	M	43	S	N	N	N	N	N
10	N	F	37	N	N	N	s	N	N
11	C	M	37	N	N	N	N	N	N
12	C	M	47	N	N	N	N	s	N
13	C	F	34	N	N	N	N	N	N
14	C	M	46	N	N	N	N	N	N
15	N	M	29	N	N	N	N	N	N
16	C	M	32	N	N	N	N	N	N
17	C	M	21	N	N	N	N	N	N
18	N	M	46	N	N	N	N	N	N
32	C	M	39	N	N	N	N	N	N
33	C	F	44	N	N	N	N	N	N
34	C	F	36	N	N	N	N	N	N
35	C	M	40	N	N	N	N	N	N
36	C	M	29	N	N	N	N	s	N
37	C	M	52	N	N	N	N	N	N
38	N	F	22	N	N	N	N	N	N
39	C	F	19	N	N	N	S	N	N

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
40	C	M	32	N	N	N	N	N	S
41	C	M	27	N	N	N	N	N	N
42	C	M	26	N	N	N	N	N	S
45	N	M	29	N	N	N	N	N	N
46	N	M	23	N	N	N	N	N	N
47	J	M	19	N	N	N	N	N	S
48	C	F	24	N	N	N	N	N	N
50	C	F	48	N	N	N	N	N	N
53	N	M	20	N	N	N	N	N	S
56	C	M	30	S	N	N	N	N	N
58	N	M	16	N	N	N	N	S	N
59	C	M	32	S	S	N	N	N	S
62	N	M	64	S	N	N	N	S	S
63	C	M	19	S	S	N	N	N	N
66	N	M	18	S	N	N	N	N	N
67	C	M	19	N	N	N	N	N	N
68	C	M	18	N	N	N	N	N	N
69	N	M	18	S	N	N	N	N	S
70	C	M	18	S	N	N	N	N	S
71	C	M	18	S	S	N	N	N	S
72	C	M	18	N	N	N	S	N	N
73	C	M	18	N	S	N	N	N	N
75	C	M	18	S	N	N	N	N	S
76	C	M	19	N	S	N	N	N	S
77	C	M	18	N	N	N	N	N	S
78	N	M	18	N	N	N	N	N	N
80	C	M	18	S	S	N	N	N	S
81	C	M	19	N	N	N	N	N	N
82	C	M	18	N	N	N	N	N	N

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
83	C	M	18	N	N	N	N	N	N
84	C	M	19	S	N	N	N	S	N
85	N	M	19	S	N	N	N	N	S
87	C	M	18	N	N	N	N	N	N
88	C	M	18	N	N	N	N	N	S
89	C	M	18	N	S	N	N	N	S
90	N	M	18	N	N	N	N	N	N
92	C	F	34	N	S	S	S	S	S
93	C	M	19	N	N	N	S	N	S
94	C	M	20	N	N	N	N	N	S
95	C	M	20	N	N	N	N	N	N
96	C	M	20	S	N	N	N	N	N
98	C	M	19	N	N	N	N	N	N
99	C	M	50	N	N	N	S	N	N
101	C	M	18	S	S	N	N	N	S
102	C	M	19	N	N	N	N	N	N
103	C	M	19	N	N	N	N	N	S
104	N	M	34	N	N	N	N	N	N
105	C	M	19	N	N	N	N	S	S
106	C	M	18	N	N	N	N	N	N
107	C	M	22	S	S	N	N	N	N
108	C	M	19	S	S	N	N	N	S
109	C	M	18	N	N	N	N	N	N
110	C	M	18	S	N	N	N	S	S
111	C	M	18	S	N	N	N	N	S
112	C	M	19	N	N	N	N	N	S
113	C	M	19	N	N	N	N	N	S
114	C	M	19	N	N	N	N	N	N
115	C	M	18	N	S	N	N	N	S
116	C	M	18	N	N	N	N	N	S
117	C	M	36	N	S	N	N	N	S
118	C	M	19	N	N	N	N	N	N

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
119	C	M	19	N	N	N	N	N	N
120	C	M	18	N	N	N	N	N	N
121	C	M	18	S	N	N	N	N	S
122	C	M	18	N	N	N	N	N	S
123	C	M	19	S	N	N	N	N	N
124	C	M	18	N	N	N	N	N	N
125	N	M	47	S	N	N	N	N	N
126	C	M	19	N	N	N	N	N	N
127	C	M	19	S	N	N	N	N	N
128	C	M	47	N	N	N	N	S	S
129	C	M	18	S	N	N	N	N	S
130	C	M	18	S	N	N	N	N	S
131	C	M	19	S	N	N	S	N	N
132	C	M	18	S	S	N	N	N	N
133	N	M	18	S	N	N	N	N	S
134	C	M	45	N	N	N	S	N	S
135	C	M	18	S	N	N	N	N	S
136	C	M	18	S	N	N	N	N	N
137	C	M	19	N	N	N	N	N	S
138	N	M	46	S	N	N	N	N	N
139	N	M	18	S	S	N	N	N	N
140	C	M	19	N	N	N	S	N	S
141	N	M	28	N	N	N	N	N	N
142	N	M	19	N	S	N	N	N	N
143	N	M	18	S	N	N	S	N	S
144	N	M	18	N	N	N	N	N	N
145	C	M	18	S	N	N	N	N	S
146	C	M	18	N	N	N	N	N	N
147	C	M	19	N	S	N	N	N	N
148	C	M	18	N	N	N	N	N	N
149	C	M	18	N	S	N	N	N	N

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
150	N	M	18	N	N	N	N	N	N
151	N	M	18	N	N	N	N	N	S
152	C	M	19	N	N	N	N	S	S
153	C	M	18	S	N	N	N	N	N
154	C	M	34	N	S	N	N	N	S
155	C	M	18	S	N	N	N	N	N
156	N	M	18	S	N	N	N	N	S
157	C	M	18	N	N	N	N	S	N
158	C	M	18	N	N	N	S	N	N
159	C	M	18	N	N	N	N	N	S
160	C	M	18	N	N	N	N	S	N
161	N	M	18	N	N	N	S	N	S
162	C	M	18	N	N	N	N	N	N
163	N	M	18	N	N	N	N	N	N
164	C	M	19	N	N	N	N	N	S
165	C	F	33	N	N	N	N	N	N
166	C	M	18	S	N	N	N	N	N
167	N	M	18	N	N	N	N	N	S
168	C	M	18	S	N	N	N	N	N
169	C	M	18	S	N	N	N	N	N
170	N	M	19	N	N	N	N	N	N
171	N	M	19	S	N	N	N	N	N
172	C	M	18	N	N	N	N	N	N
173	C	M	19	S	N	N	N	S	N
174	N	M	18	N	N	N	N	N	N
175	C	M	18	N	N	N	N	N	N
176	C	M	19	N	N	N	N	N	S
177	C	M	18	N	S	N	N	N	N
179	N	M	19	N	N	N	N	S	N
180	C	M	18	N	N	N	N	S	N
182	C	M	18	N	N	N	N	N	S

	N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
183	C	M	18	N	N	N	N	N	N	S
184	C	M	19	N	N	N	N	N	N	N
185	C	M	18	N	N	N	N	N	N	N
186	N	M	18	N	N	N	N	N	N	N
188	C	M	18	N	N	N	N	S	S	S
189	N	M	19	N	S	S	N	N	N	S
190	N	M	19	N	S	S	N	N	N	N
191	N	M	18	S	N	N	N	N	N	N
192	C	M	18	S	N	N	N	N	N	N
193	N	M	18	N	N	N	N	N	N	S
194	C	M	18	N	N	N	N	N	N	S
195	C	M	18	S	N	N	N	S	S	S
196	C	M	18	S	S	N	N	N	N	S
197	C	M	19	S	N	N	N	N	N	N
198	C	M	18	N	N	N	N	N	N	N
199	C	M	18	S	N	N	N	N	N	S
200	C	M	19	N	N	N	N	N	N	S
201	C	M	18	N	N	N	N	N	N	N
202	N	M	18	N	N	N	N	N	N	N
203	N	M	18	N	N	N	N	N	N	N
204	C	M	18	N	N	N	N	N	N	N
205	C	M	19	N	N	N	S	N	S	S
206	C	M	18	S	N	N	N	N	N	S
207	N	M	18	N	N	N	N	N	N	S
208	C	M	19	N	N	N	N	N	N	S
209	C	M	19	S	N	N	N	N	N	S
210	N	M	18	S	N	N	N	N	N	S
211	C	M	18	N	S	N	N	N	N	N
212	N	M	18	N	N	N	N	N	N	S
213	C	M	18	N	N	N	N	N	N	N
214	C	M	18	S	N	N	N	N	N	N

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
215	N	M	23	N	N	N	N	N	N
216	C	M	18	S	N	N	N	N	S
217	N	M	19	S	N	N	N	N	N
218	C	M	18	S	N	N	N	N	S
220	C	M	18	S	N	N	N	N	S
221	N	M	18	N	N	N	N	S	S
222	I	M	18	S	S	N	N	N	N
223	N	M	19	N	N	S	N	N	N
224	C	F	24	N	N	S	N	N	N
226	N	M	30	N	N	N	N	N	N
230	N	M	18	N	N	N	S	N	N
231	N	M	19	N	N	N	N	N	S
232	N	M	19	S	N	N	N	N	N
233	N	M	19	N	N	N	N	N	N
234	N/J	M	19	N	S	N	N	N	S
235	N	M	30	S	N	N	N	N	N
236	C	M	18	N	S	N	N	N	S
238	N	M	19	N	N	N	N	N	N
239	N	M	18	S	N	N	N	N	S
240	N	M	42	N	N	N	N	N	S
241	N	M	18	N	S	N	S	S	S
242	C	M	18	N	N	N	N	N	N
243	N	M	23	N	N	N	N	N	N
244	C	M	19	N	S	N	N	N	N
245	N	M	18	S	N	N	N	N	S
246	N	M	18	S	N	N	N	S	N
247	N	M	19	S	S	N	N	N	N
248	N	M	18	N	N	S	N	S	S
249	C	F	25	N	N	N	N	N	N
250	C	M	19	N	N	N	N	N	N
251	C	M	19	N	N	N	N	N	N

N	RAÇA	SEXO	IDADE	TABAG	DIAB	TROMB.	IM	AVC	HA
252	C	M	18	N	N	N	N	N	N
253	C	F	23	S	S	N	S	N	S
254	C	M	18	N	N	N	N	N	N
255	C	M	18	N	S	N	N	N	N
256	N	M	18	N	N	N	N	N	N
257	N	M	18	N	N	N	N	N	S
258	C	M	19	N	N	N	N	S	S
259	C	M	18	S	N	N	N	N	N
260	C	M	34	N	S	N	N	N	S
261	C	M	18	S	N	N	N	N	N
262	N	M	18	S	N	N	N	N	S
263	C	M	18	N	N	N	N	S	N
264	C	F	30	S	S	N	N	N	N
265	C	M	43	S	N	N	N	N	N
266	N	F	37	N	N	N	s	N	N

TABAG: tabagismo

IM: infarto do miocárdio

HA: hipertensão arterial

TROMB: trombose

AVC: acidente vascular cerebral

DIAB: diabetes

Tabela 7. Caracterização da população com trombose:

TROMBOSE	TIPO	SEXO	IDADE	RAÇA
1	TVP MSE	F	30	C
2	TVP MSD	F	33	C
3	TROMBOFLEBITE	F	44	C
4	TVP MID	F	62	C
5	TVP EP	F	23	C
6	TVP EP	F	43	C
7	TVP MIE	F	36	C
8	TVP MIE	F	32	C
9	TPV MIE	F	43	C
10	TPV MIE	F	30	C
11	TVP MID	M	45	C
12	TVP M ID	F	29	C
13	TVP MID	F	25	C
14	AVC + EP	M	29	C
15	TVP MIE	F	42	C
16	TVP MIE	F	26	C
17	TVP MIE	F	32	C
18	TVP MID	F	49	C
19	TVP MID	M	49	C
20	TVP	M	26	C
21	TVP MID	F	41	C
22	TSS	F	31	C
23	TVP MID	M	38	C
24	TVP MSD	F	50	C
25	TVP MIE	F	61	N
26	TVP MIE	M	39	C
27	TVP MIE	M	35	C
28	TVP MIE	M	51	C
29	TVP MID e E	F	37	N
30	TVP MID e E	M	33	C
31	TVP MID	M	28	C

TROMBOSE	TIPO	SEXO	IDADE	RAÇA
32	TVP MSD	M	47	C
33	TVP MSD	F	34	C
34	TVP MSD	M	55	C
35	TVP MID e E	F	37	N
36	TVP MID	F	41	N
37	TVP MIE*	F	28	C
38	TVP MID*	F	26	C
39	TVP MIE	F	38	C
40	TVP MIE*	F	32	C
41	TVP MIE	M	33	N
42	TVP MIE	F	30	C
43	TVP MID	F	43	C
44	TVP MIE	F	24	N
45	TVP MIE	F	26	C
46	TVP MIE	F	35	C
47	TVP MID	M	33	N
48	TVP MIE	M	32	C
49	TVP MSE	F	40	C
50	TVP + EP	F	28	N
51	TVP MSD	M	10	C
52	TVP MSD	F	30	C
53	TVP MIE	F	20	C
54	TVP MID	M	44	C
55	TVP MIE	F	58	C
56	TVP MIE	F	37	C
57	TVP MID e E	F	28	C
58	TVP MIE	F	31	N
59	TVP MIE	F	28	C
60	TVP + EP	M	28	C
61	TVP MID	F	67	C
62	TVP MIE	F	29	C
63	TVP MIE	F	41	C

TROMBOSE	TIPO	SEXO	IDADE	RAÇA
64	EP	F	60	C
65	TVP MIE	F	43	C
66	TVP MIE	F	28	C
67	TVP MIE	M	31	C
68	TVP MIE	F	8	C
69	TVP MIE	F	40	C
70	AVCi / TVP MSE	F	55	C
71	TVP	F	60	C
72	TVP MSD	F	44	C
73	TVP + MIE	F	49	C
74	AVCi	F	23	C
75	TVP MSE	F	46	C
76	TVP MID	F	35	C
77	TVP MSE	F	30	C
78	AVCi	F	19	C
79	TVP MID	M	19	C
80	TVP MIE**	F	50	C
81	TVP MSE	F	51	N
82	TVP rep.	F	46	C
83	TVP MSD	F	49	C
84	TVP MSE	F	47	C
85	TVP MIE	M	35	C
86	AVCi	F	26	C
87	TVP MIE	F	28	C
88	TVP	M	11	C
89	AVCi	F	48	C
90	SBC	F	61	C
91	EP	F	22	C
92	TVP MID	F	27	N
93	TVP MIE	M	17	C
94	TVP VDR	M	24	C
95	TVP MIE	F	32	C

TROMBOSE	TIPO	SEXO	IDADE	RAÇA
96	TVP MIE	F	32	C
97	TVP MIE	F	49	C
98	TVP	F	37	C
99	TVP MIE	F	27	N
100	TVP MID	M	25	N
101	TVP MID e E	F	19	C
102	TVP MIE	F	69	C
103	TVP MID*	F	26	C
104	TVP MIE	F	35	C
105	TVP MSE	F	20	C
106	TVP MID e E	M	33	C
107	TVP MIE	M	38	C
108	TVP MID	F	43	C
109	TVP MIE*	F	30	C
110	TVP + EP	F	40	C
111	TVP MIE*	F	28	N
112	TVP MIE	F	16	C
113	TVP MIE	F	25	C
114	TVP MIE	F	51	C
115	TVP MID e E	M	34	C
116	TVP MID + EP	F	23	C
117	TROMBOFLEBITE	M	54	C
118	TVP MIE	M	47	C
119	TROMBOFLEBITE	M	35	C
120	TVP MIE	F	32	C
121	TVP rep	F	32	C
122	TVP MIE	M	31	C
123	TVP MID	M	34	N

TVP- trombose venosa profunda
 MSE- membro superior esquerdo
 MIE- membro inferior esquerdo
 EP -embolia pulmonar
 AVC -acidente vascular cerebral
 VRD- veia central da retina direita

* após aborto
 MSD- membro superior direito
 MID- membro inferior direito
 rep- de repetição
 TSS- trombose de seio sagital
 SBC- síndrome de Budd Chiari

Tabela 20. Níveis de PC encontrados na população estudada:

N	PC	N	PC	N	PC	N	PC	N	PC
1	85	26	111	51	115	76	91	101	102
2	103	27	105	51	120	77	120	102	95
3	77	28	120	53	130	78	80	103	135
4	80	29	79	54	105	79	135	104	140
5	80	30	85	55	90	80	110	105	138
6	100	31	80	56	85	81	110	106	79
7	100	32	95	57	70	82	100	107	135
8	78	33	120	58	104	83	145	108	90
9	70	34	116	59	120	84	90	109	120
10	98	35	105	60	80	85	100	110	124
11	104	36	85	61	120	86	105	111	85
12	114	37	80	62	80	87	131	112	110
13	115	38	95	63	79	88	119	113	135
14	127	39	95	64	105	89	90	114	105
15	88	40	95	65	85	90	105	115	101
16	130	41	110	66	79	91	135	116	90
17	100	42	120	67	90	92	90	117	130
18	100	43	115	68	85	93	115	118	115
19	85	44	80	69	72	94	80	119	100
20	140	45	115	70	110	95	80	120	80
21	80	46	95	71	80	96	120	121	115
22	120	47	90	72	130	97	100	122	130
23	82	48	85	73	131	98	110	123	120
24	125	49	110	74	130	99	118	124	85
25	115	50	105	75	90	100	135	125	130

126	80	151	95	176	87	201	80	226	111	251	105
127	81	152	80	177	140	202	120	227	106	252	90
128	90	153	90	178	105	203	80	228	121	253	90
129	95	154	83	179	92	204	150	229	79	254	73
130	108	155	87	180	100	205	105	230	85	255	78
131	85	156	82	181	120	206	110	231	80	256	82
132	130	157	75	182	98	207	73	232	95	257	79
133	95	158	70	183	110	208	115	233	121	258	90
134	85	159	90	184	120	209	95	234	116	259	90
135	110	160	95	185	95	210	119	235	105	260	95
136	102	161	88	186	95	211	131	236	81	261	100
137	130	162	90	187	115	212	81	237	81	262	91
138	101	163	124	188	110	213	115	238	91	263	74
1390	80	164	80	189	110	214	145	239	95	264	84
140	105	165	82	190	89	215	90	240	105	265	82
141	105	166	110	191	95	216	100	241	113	266	110
142	70	167	75	192	115	217	105	242	121		
143	124	168	82	193	130	218	131	243	115		
144	95	169	102	194	102	219	119	244	80		
145	120	170	102	195	140	220	90	245	115		
146	110	171	131	196	143	221	104	246	95		
147	105	172	131	197	125	222	125	247	99		
148	120	173	102	198	115	223	91	248	95		
149	90	174	110	199	124	224	115	249	110		
150	105	175	109	200	95	225	80	250	115		