

**Luciana Pugliese da Silva**

---

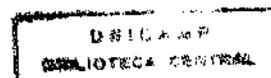
**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA  
DEFICIÊNCIA DE PROTEÍNA S**

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 área de Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Campinas

1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Luciana Pugliese da Silva
	Si38c
V	Ex.
P.º 35102	35102
PREC.º	395,98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	16/09/98
N.º CPD	

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

CM-00116037-9

Si38c

Silva, Luciana Pugliese da  
Caracterização molecular da deficiência de proteína S / Luciana  
Pugliese da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi  
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Trombose. 2. Mutação (Biologia) . 3. Doenças Hereditárias. 4.  
Genética Humana. I. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.



UNICAMP

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

**Orientador:**

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

**Membros:**

1. Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

2. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

3. Profa. Dra. Dayse Maria Lourenço

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

Data: 01/07/98

*À minha mãe Silvia e ao meu pai Vani, pelo amor,  
carinho, compreensão, educação, apoio, incentivo a  
estudar sempre e principalmente paciência.*

*Ao meu irmão André por sua inteligência e bom humor constante.*

*Ao Luiz Cláudio, pois desde o início deste trabalho tenho  
seu amor e carinho, ótimos momentos, alegria, idéias,  
palavras, compreensão, paciência e por ter  
feito de mim uma pessoa melhor.*

*À Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, por ter orientado  
este trabalho, pela grande amizade, longas conversas  
e por fazer parte de um sonho realizado.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Christine Hackel por despertar o meu gosto pelo estudo da Genética; pela amizade e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres, da Universidade de São Paulo, por me mostrar o prazer da arte de ensinar.

Ao Prof. Dr. Valder R. Arruda por sua dedicação à pesquisa, pela colaboração e sugestões oferecidas a este trabalho.

À Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves da Universidade Federal da Bahia, aos Drs. Manoel C. P. Soares e Raimundo Menezes, do Instituto Evandro Chagas, Belém-PA, pela colaboração ao cederem amostras de DNA.

À Profa. Dra. Mary Luci de S. Queiroz pelo apoio, amizade e convivência agradável.

À Profa. Dra. Sara T. O. Saad, pela grande sabedoria, dedicação à pesquisa e por incentivar a sabermos sempre mais.

À todos os professores da pós-graduação, em especial ao Prof. Dr. Adilson Leite, pela minha formação acadêmica.

À amiga Eneida, que desde o início serviu-me de exemplo de dedicação ao estudo e à pesquisa.

À amiga Dulcinéia pela sua companhia até tarde da noite, passeios, paciência e grandes discussões sobre ciência.

À amiga Cristina C. R. Ramos (Cris), pela disposição em manter o laboratório sempre organizado e funcionando; por sua companhia e grandes conversas.

À Ucha, Devanira e Helena, pelo auxílio técnico, dedicação, compreensão e paciência.

À Lucia e Anderson que fazem um trabalho que não aparece, mas que é crucial para o andamento da pesquisa.

À Andréa e Tânia, do Laboratório de Hemostasia, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos funcionários Elizeu e Lindomar, pela colaboração na busca de dados sobre as pastas dos pacientes e ao Sr. Gerino, pelo carinho e incontável paciência em xerocar.

Às assistentes Sociais Rosana e Maria Luiza, pela disposição em colaborar.

À Sandra e Rosana, pela amizade e por darem um toque especial em nossos trabalhos.

À Secretária Arlete, pela amizade e pelos inúmeros favores prestados.

À Secretária da pós-graduação, Gislaine, pela capacidade e disposição em solucionar todos problemas.

Aos colegas de laboratório Paula, Jeferson, Liliane, Yajaira, Dalva e Jorge, pela convivência agradável e amizade.

Aos colegas de pós-graduação Carlos, Daniela, Tita, Silvana e Elizabete e, em especial à Mônica, por terem contribuído com minha formação e pelas dicas valiosas.

À todos os colegas e funcionários do Hemocentro, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela contribuição financeira através da concessão de bolsa de mestrado.

Enfim à todos os pacientes e seus familiares, pois sem a colaboração dos mesmos, este trabalho não seria possível.

## ÍNDICE GERAL

ABREVIACÕES .....	i
RESUMO .....	ii
INTRODUÇÃO.....	1
Coagulação Sangüínea .....	2
Via Intrínseca da Coagulação.....	2
Via Extrínseca da Coagulação.....	4
Mecanismos Controladores da Coagulação .....	7
Inibidor da Via do Fator Tecidual .....	8
Antitrombina .....	10
Via Anticoagulante da Proteína C .....	10
Proteína S.....	13
Síntese .....	13
Estrutura.....	14
O peptídeo sinal.....	17
A região vitamina K-dependente.....	18
A região sensível à trombina.....	19
Os domínios EGF .....	20
A região SHBG .....	22
Função .....	23
Interação com a proteína de ligação C4b.....	27
Os genes da proteína S .....	29
Bases hereditárias da trombose venosa.....	38
Deficiência de proteína S.....	39
Classificação das deficiências de proteína S hereditárias .....	41

<i>OBJETIVOS</i> .....	43
<i>CASUÍSTICA</i> .....	45
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	51
Dosagem de proteína S .....	52
Imunoelektroforese .....	52
Método de coagulação .....	53
Extração de DNA de sangue periférico .....	54
Amplificação pela PCR .....	55
SSCP .....	58
CSGE.....	59
Seqüenciamento .....	61
Estudo de polimorfismos.....	66
<i>RESULTADOS</i> .....	69
Dosagens de Proteína S .....	70
PCR, SSCP e CSGE.....	70
Mutações identificadas nos pacientes com deficiência de proteína S. Estudo familiar. Análise de polimorfismos .....	71
Análise de polimorfismos em diferentes populações .....	90
<i>DISCUSSÃO</i> .....	94
<i>CONCLUSÕES</i> .....	108
<i>SUMMARY</i> .....	110
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	114

## **ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS**

<b>Figura 1:</b> Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea .....	6
<b>Figura 2:</b> Via anticoagulante do Inibidor da Via do Fator Tecidual .....	9
<b>Figura 3:</b> Vias anticoagulantes da Antitrombina e da Proteína C e S .....	12
<b>Figura 4:</b> Estrutura secundária da Proteína S .....	16
<b>Figura 5:</b> Mecanismos de inativação dos fatores V e VIII ativados .....	25
<b>Figura 6:</b> Exons do gene da proteína S .....	33
<b>Figura 7:</b> Localização das mutações no gene da proteína S .....	37
<b>Figura 8:</b> Análise de CSGE do exon 2 e seqüenciamento direto do exon 2 do paciente 3 .....	73
<b>Figura 9:</b> Heredograma da família do paciente 3 .....	75
<b>Figura 10:</b> Análise de SSCP do exon 2 e seqüenciamento direto do exon 2 do paciente 4 .....	77
<b>Figura 11:</b> Heredograma da família do paciente 4 .....	78
<b>Figura 12:</b> Análise de CSGE do exon 2 e seqüenciamento direto do exon 2 do paciente 6 .....	80
<b>Figura 13:</b> Heredograma da família do paciente 6 .....	82
<b>Figura 14:</b> Análise de CSGE do exon 10 e seqüenciamento direto exon 10 do paciente 5 .....	84
<b>Figura 15:</b> Análise de CSGE do exon 2 e seqüenciamento direto do exon 2 do paciente 7 .....	87
<b>Figura 16:</b> Heredograma da família do paciente 7 .....	88
<b>Figura 17:</b> Análise do polimorfismo Heerlen .....	92
<b>Figura 18:</b> Análise do dismorfismo neutro CCA/CCG .....	92
<b>Tabela 1:</b> Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene da proteína S .....	56

<b>Tabela 2:</b> Análise dos níveis de proteína S dos pacientes estudados.....	70
<b>Tabela 3:</b> Análise do polimorfismo e mutação na família do paciente 3.....	75
<b>Tabela 4:</b> Análise do polimorfismo e mutação na família do paciente 4.....	78
<b>Tabela 5:</b> Análise do polimorfismo e mutação na família do paciente 6.....	82
<b>Tabela 6:</b> Análise do polimorfismo e mutação na família do paciente 5.....	85
<b>Tabela 7:</b> Análise do polimorfismo e mutação na família do paciente 7.....	88
<b>Tabela 8:</b> Resumo das alterações moleculares dos cinco pacientes estudados.....	89
<b>Tabela 9:</b> Frequência do polimorfismo Heerlen em diferentes populações brasileiras .....	93
<b>Tabela 10:</b> Frequência do dimorfismo neutro CCA/CCG em diferentes populações brasileiras .....	93
<b>Quadro 1:</b> Alinhamento entre diferentes proteínas S e proteínas vitamina K- dependentes .....	81
<b>Quadro 2:</b> Alinhamento entre diferentes proteínas S e proteínas ABP de rato e SHBG humana .....	85

## **ABREVIações**

<b>AVCI</b>	Acidente vascular cerebral isquêmico
<b>CSGE</b>	Eletroforese em gel sensível a conformação
<b>DGGE</b>	Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EP</b>	Embolia pulmonar
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kD</b>	Kilo Dalton
<b>kd</b>	Coefficiente de dissociação
<b>μCi</b>	Microcurie
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molar
<b>MID</b>	Membro inferior direito
<b>MIE</b>	Membro inferior esquerdo
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>(p/v)</b>	Peso por volume
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reação de polimerização em cadeia
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PS c</b>	Proteína S coagulante
<b>PS L</b>	Proteína S livre
<b>PS T</b>	Proteína S total
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	PCR com transcriptase reversa
<b>SSCP</b>	Polimorfismo de conformação de fita simples
<b>TBE</b>	Tampão Tris borato EDTA
<b>TEMED</b>	(N, N, N', N'-tetrametilenodiamino)
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>TTE</b>	Tampão Tris Taurina EDTA
<b>TVP</b>	Trombose venosa profunda
<b>V</b>	Volt
<b>V/h</b>	Volt por hora
<b>(v/v)</b>	Volume por volume

**RESUMO**

## RESUMO

A proteína S humana é uma glicoproteína plasmática vitamina K-dependente que age como cofator não enzimático da proteína C ativada na Via Anticoagulante da Proteína C. Além disso, a proteína S desempenha um papel independente da proteína C ativada inativando os fatores V e X ativados.

A concentração plasmática da Proteína S é regulada por uma proteína de ligação que atua na Via Clássica do Complemento, a C4b. A proteína C4b forma complexos inativos com aproximadamente 60% da proteína S total, e somente a proteína S na sua forma livre pode exercer sua atividade de cofator da proteína C ativada.

A deficiência hereditária de proteína S é uma causa comum de trombose venosa recorrente, e ocorre pela diminuição da atividade anticoagulante da proteína S. É uma doença relativamente rara e tem padrão de herança autossômico dominante.

O gene que controla a produção da proteína S (*PROS1*) está localizado no cromossomo 3, próximo à região do centrômero, na posição 3p11.1 - 3q11.2. É constituído por 15 exons e 14 introns, abrangendo uma região de mais de 80 kb, que origina um mRNA de 3,5 a 4,0 kb. Nesta mesma região do cromossomo 3 há um pseudogene (*PROS2*) que possui 97% de homologia com a região codificadora do gene ativo.

De acordo com um "database" de mutações no gene da proteína S, publicado em 1997 por GANDRILLE et al., foram descritas 71 diferentes mutações de ponto sendo 19,8% mutações nonsense, 65,3% mutações missense, 12,8% mutações em

sítio de “splicing” e 2% aboliem o codon de terminação natural da proteína. Foram também descritas 16 diferentes inserções/deleções e duas grandes deleções. Um total de doze polimorfismos raros foram descritos, incluindo o polimorfismo Heerlen, além de um polimorfismo freqüente, o dimorfismo neutro CCA/CCG.

Os métodos de SSCP e CSGE possibilitam o rastreamento rápido e eficaz de mutações. O seqüenciamento de DNA permite a determinação precisa da alteração molecular responsável pela doença. No presente trabalho, estes métodos foram empregados no estudo do gene da proteína S (*PROS1*) de 8 pacientes com deficiência de proteína S que apresentaram trombose espontânea. Outras deficiências que predisõem à trombose foram avaliadas e não detectadas nestes pacientes.

Com o emprego dessa estratégia metodológica foi possível detectar e identificar sete mutações de ponto em quatro dos oito pacientes estudados, incluindo uma mutação silenciosa, além de um polimorfismo em outro paciente. Das mutações encontradas somente uma foi detectada pelo método de SSCP.

Considerando-se o quadro clínico/laboratorial dos pacientes estudados e a análise familiar, os resultados deste estudo sugerem que as mutações identificadas seriam responsáveis pela deficiência hereditária de proteína S. A identificação das mutações e sua correlação com o quadro clínico dos pacientes estudados neste trabalho contribuem para a compreensão da relação estrutura-função desta proteína.

Também foram determinadas as freqüências, em diferentes grupos da população brasileira (recém-nascidos, caucasóides, negróides, índios e pacientes com trombose) do polimorfismo Heerlen e do dimorfismo neutro CCA/CCG.

Os resultados obtidos nos diferentes grupos estudados, para polimorfismo Heerlen, não diferiram significativamente dos descritos anteriormente na literatura por BERTINA et al., 1990. Este polimorfismo não foi identificado em nenhum dos pacientes estudados.

As frequências alélicas do dimorfismo neutro CCA/CCG não diferiram significativamente dos descritos na literatura por DIEPSTRATEN, et al., 1991 e GANDRILLE et al., 1995. Nossos resultados revelaram que na população negróide pode ter ocorrido um grau de miscigenação, já que a frequência de heterozigotos foi elevada. A população indígena, apesar de ser considerada um isolado genético, mostrou um predomínio do genótipo heterozigoto. O polimorfismo CCA/CCG também foi empregado para análise de segregação nas famílias com deficiência de proteína S, e mostrou-se informativo em três famílias analisadas.

# INTRODUÇÃO

# **INTRODUÇÃO**

## **Coagulação Sangüínea**

O processo da coagulação sangüínea é formado por várias substâncias ativadoras, pelas plaquetas, e pelo endotélio vascular. A cascata da coagulação sangüínea humana ocorre através de uma série de interações enzimáticas, aceleradas por cofatores que convertem precursores inativos, zimógenos, em suas formas ativas, culminando com a produção de trombina e coagulação do fibrinogênio (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

A coagulação pode ser ativada por duas vias diferentes: pela via extrínseca, que é iniciada pela liberação de fator tecidual dos tecidos adjacentes ao vaso lesado, ou pela via intrínseca, que se inicia pela ligação do fator XII a uma superfície ativadora, o colágeno exposto do subendotélio. Estas duas vias convergem em uma via comum, após a ativação do fator X. Em ambas as vias - extrínseca e intrínseca - uma série de proteínas plasmáticas, os fatores de coagulação sangüínea, em sua grande maioria formas inativas de enzimas proteolíticas, são convertidas em sua forma ativa, e desencadeiam as reações enzimáticas sucessivas, conhecidas como cascata da coagulação (TUDDENHAM & COOPER, 1994) (Figura 1).

### **Via Intrínseca da Coagulação**

A Via Intrínseca se inicia quando o fator XII se liga a superfícies carregadas negativamente (via de ativação por contato), como vidro, caolim, carbonato da bário,

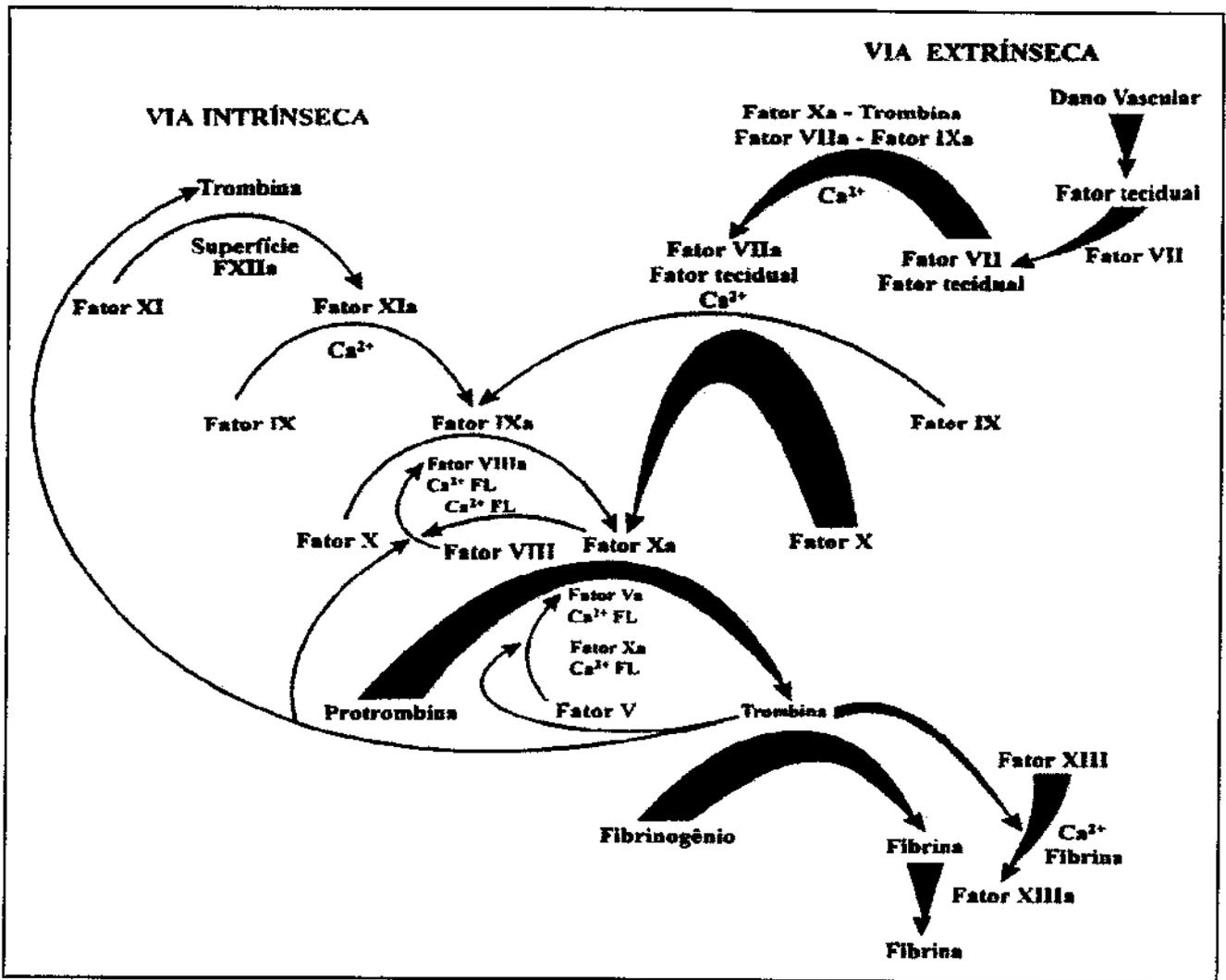
celite, asbestos, etc, *in vitro*, sofrendo um rearranjo e ficando mais suscetível à ativação pela calicreína (TANS & ROSING, 1987). A calicreína cliva o fator XII em dois sítios, e está presente na circulação como um zimógeno, a pré-calicreína, que por sua vez é clivada pelo fator XII ativado e convertida em sua forma ativa, a calicreína. O início do processo ainda não é conhecido, já que não se sabe se a conversão da pré-calicreína em calicreína é que ativa o fator XII, ou vice-versa. Uma vez gerado o fator XII ativado, este cliva o fator XI, ativando-o. Esta reação é facilitada pelo cininogênio de alto peso molecular que se liga ao fator XII e promove sua ligação a superfícies carregadas negativamente (KURACHI & DAVIE, 1977). O fator XI ativado deixa a superfície a qual estava ligado e ativa o fator IX. Nesta etapa forma-se um complexo trimolecular constituído pelo fator VIII ativado, após seu desligamento do fator de von Willebrand, pelo fator X e o próprio fator IX ativado. Na presença de íons cálcio e de uma superfície plaquetária, o fator VIII ativado acelera a ativação do fator X pelo fator IX ativado, sendo conhecido como complexo tenase. O fator X, portanto é clivado pelo fator IX, resultando no fator X ativado. A forma ativada do fator V, o fator X ativado e a protrombina (fator II) formam outro complexo, denominado protrombinase. O fator V é clivado pela trombina ou pelo fator X ativado. Com esta clivagem o fator V agora ativado, se liga a superfícies de plaquetas ativadas acelerando a ativação da protrombina pelo fator X ativado, originando portanto trombina. Nesta etapa há também necessidade de íons cálcio livres. A trombina participa da ativação dos fatores V, VII, VIII e XI ("feedback" positivo), para a rápida formação de grandes quantidades da própria trombina (MANN & LORAND, 1993) que atua sobre o fibrinogênio, liberando 4 pequenos fibrinopeptídeos. Os monômeros de fibrina gerados se polimerizam formando a rede de fibrina que compõe o coágulo. Este coágulo é relativamente instável e é convertido na sua forma estável pela

ação do fator XIII. O fator XIII circula na forma de um precursor inativo, que passa à sua forma ativada quando é clivado pela trombina. O fator XIII é a única proteína não-serina protease da coagulação, sendo classificada como uma transamidase, que age formando ligações covalentes  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina entre dois monômeros de fibrina, garantindo a estabilização do coágulo. Esse mesmo fator promove a ligação de proteínas plasmáticas como fibronectina e  $\alpha$ 2-antiplasmina às cadeias de fibrina, resultando na incorporação das mesmas ao coágulo (LORAND et al., 1993).

### **Via Extrínseca da Coagulação**

A Via Extrínseca da coagulação leva somente alguns segundos para produzir o coágulo, ao contrário da via intrínseca, que leva alguns minutos. Por ser acionada a partir de um componente externo ao sangue, é chamada portanto de Via Extrínseca. O fator responsável pelo início da Via Extrínseca é o fator tecidual, uma apoproteína integrada à superfície das membranas de diferentes tipos celulares, e particularmente evidente nas células sub-endoteliais da parede vascular, cérebro e placenta (TUDDENHAM & COOPER, 1994). O fator tecidual, na coagulação, é totalmente ativo na sua forma nativa, não necessitando de modificações para seu papel de cofator. Isto somente é possível já que em condições normais ele não está exposto na circulação. O rompimento da parede vascular permite que o fator VII presente no plasma se ligue aos sítios do fator tecidual, originando o complexo fator VII/fator tecidual. Observa-se também a formação de um complexo entre o fator VII ativado e o fator tecidual, que circula no sangue em menor proporção, e este complexo cliva o fator X da mesma forma que é clivado no complexo tenase. O fator X ativado gerado a partir desta via é

responsável pela ativação do fator VII complexado com o fator tecidual, amplificando a resposta do organismo aos danos do sistema vascular (RAO E RAPAPORT, 1988). O complexo fator VII ativado/fator tecidual ativa o fator IX que quando ativado, age no complexo tenase, na via intrínseca. O fator X ativado interage com o fator V ativado no complexo protrombinase que é responsável pela formação de trombina e polimerização dos monômeros de fibrina.



**Figura 1: Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea.** A ativação da via extrínseca da coagulação ocorre após dano vascular e exposição do fator tecidual ao sangue. A via intrínseca se inicia a partir da ativação do fator XII e também pode ser iniciada quando a trombina gerada, levando à ativação do fator XI. As duas vias convergem na ativação do fator X. Os fatores ativados são indicados pela letra "a" (XIa, Xa, IXa, etc) e FL são fosfolípidios. Retirado de DAVIE et al., 1991.

## **Mecanismos controladores da coagulação**

As células endoteliais que revestem as paredes dos vasos têm um papel ativo nos mecanismos de anticoagulação: (i) produção de prostaciclina, um inibidor da ativação plaquetária, (ii) síntese do ativador do plasminogênio e seu inibidor, ambos reguladores do sistema fibrinolítico, (iii) síntese de moléculas tipo-heparina, que aumentam a inativação das serina proteases pró-coagulantes, via antitrombina, (iv) síntese de trombosmodulina e proteína S, ambos reguladores positivos da Via Anticoagulante da Proteína C (ESMON, 1987a; NAWROTH & STERN, 1987; ESMON, 1987b; ESMON & ESMON, 1984).

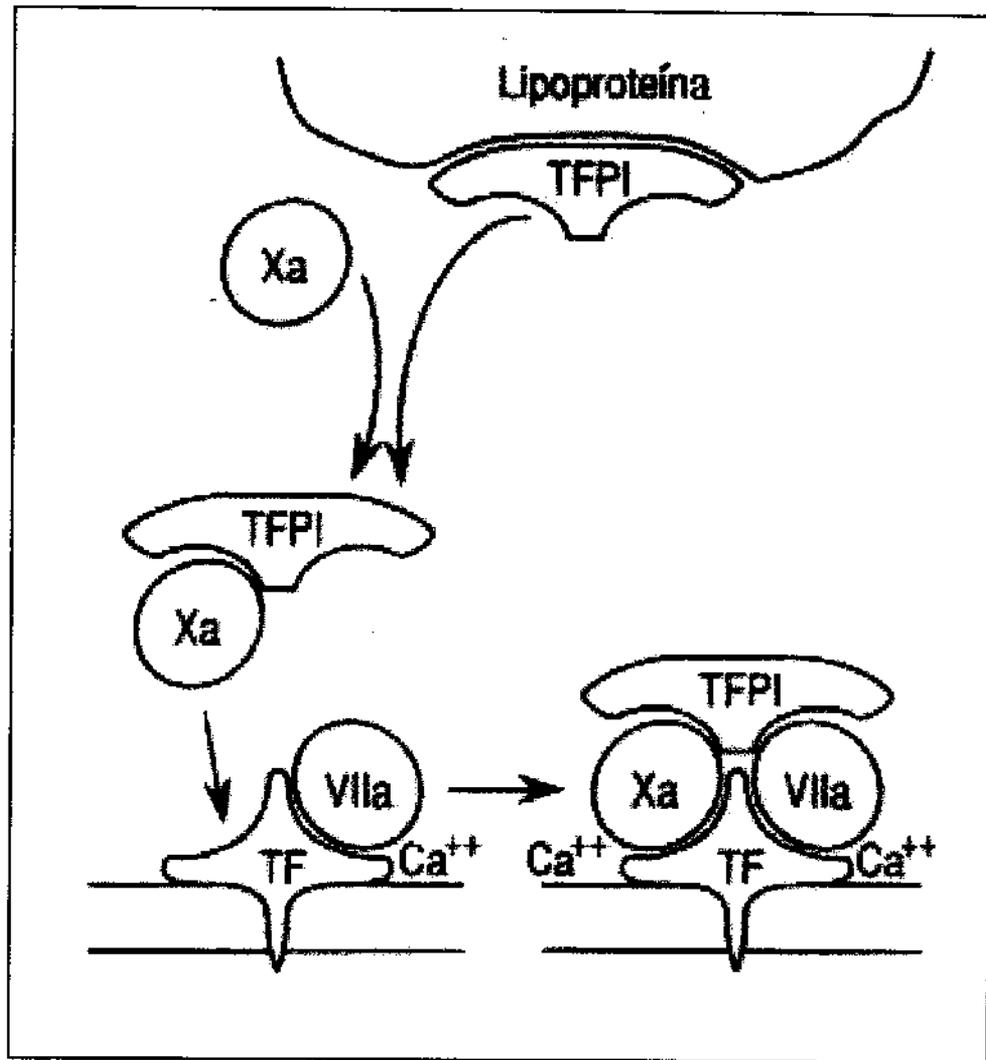
A coagulação sangüínea, em condições normais, é regulada por vários mecanismos naturais de anticoagulação para a manutenção da hemostasia e integridade do sistema vascular. A presença de moléculas regulatórias é essencial para a manutenção da estabilidade da coagulação, que é controlada por diferentes inibidores das proteases que atuam no processo de coagulação ou pela Via da Proteína C. Os inibidores dessas proteases podem ser divididos em dois grupos principais: as serpinas e as kuninas (SALVESEN & PIZZO, 1994), tendo como seus principais representantes a antitrombina e o inibidor do fator tecidual (TFPI), respectivamente. Um terceiro mecanismo de anticoagulação é a Via da Proteína C Anticoagulante. A importância dessas moléculas reguladoras é evidenciada pela tendência ao desenvolvimento de trombooses, quando de sua deficiência (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Outros inibidores plasmáticos de proteases como o cofator II da heparina, a  $\alpha$ 1-

antiplasmina, a  $\alpha$ 2-antiplasmina, o inibidor do ativador do plasminogênio 1, o inativador de C1, o inibidor da proteína C ativada e o inibidor da via extrínseca, têm papel significativo na regulação da coagulação sanguínea.

### **Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI)**

O inibidor do fator tecidual foi originalmente denominado inibidor da Via Extrínseca por RAO & RAPAPORT (1987) e inibidor da coagulação associado à lipoproteína (LACI - "Lipoprotein-associated coagulation inhibitor") por BROZE et al. (1988). O TFPI é uma proteína que foi classificada, por sua estrutura, como um inibidor do tipo Kunitz. Os inibidores desta família – kuninas – atuam por um mecanismo comum no qual o inibidor simula a forma do substrato da protease e subseqüentemente promove a clivagem desta enzima. Em termos cinéticos, os inibidores tipo Kunitz tipicamente produzem uma inibição lenta, forte, competitiva e reversível (BROZE et al., 1990). O TFPI é um inibidor de serina protease que contém uma seqüência amino-terminal ácida seguida de três domínios do tipo Kunitz e uma região carboxi-terminal básica (WUN et al., 1988). A ação do TFPI está relacionada com a formação de um complexo inibitório com o fator X ativado. Este complexo se liga ao complexo fator tecidual/fator VII ativado formando portanto um complexo inibitório quaternário com perda da atividade catalítica do complexo fator VII ativado/fator tecidual (Figura 2). Dois dos domínios tipo Kunitz estão envolvidos neste complexo, um para a ligação com o fator X ativado e outro para o fator VII ativado, mas o terceiro é aparentemente dispensável (TUDDENHAM & COOPER, 1994).



**Figura 2: Representação esquemática do Inibidor da Via do Fator Tecidual.**

O TFPI forma um complexo inibitório com o fator Xa que se liga ao complexo FT/fator VIIa levando a perda da atividade catalítica deste complexo. Os fatores ativados são indicados pela letra "a" (Xa, VIIa) e FT significa fator tecidual. Retirado de TUDDENHAM & COOPER, 1994.

## **Antitrombina**

O plasma humano contém uma família de inibidores de serina proteases, conhecidos como serpinas, cuja função é neutralizar enzimas ativas de vários sistemas fisiológicos, como a coagulação, o sistema complemento e a fibrinólise, e limitar os danos autopatológicos.

A serpina mais importante que atua na coagulação é a antitrombina. Esta proteína forma um complexo estequiométrico com a trombina (fator IIa) e também com outras enzimas ativas da coagulação (fatores XIa, IXa, Xa e o complexo fator VIIa/fator tecidual). Uma vez formados, esses complexos são estáveis e totalmente inativos, sendo removidos da circulação (Figura 3). A taxa de formação desses complexos é substancialmente aumentada pela heparina mucopolissacarídica sulfatada. Uma região específica da antitrombina se liga a um domínio da heparina resultando em modificações conformacionais que aumentam a interação da antitrombina com as proteases alvo. A heparina se liga tanto à trombina quanto à antitrombina e deve ser importante para a aproximação da protease com a serpina (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

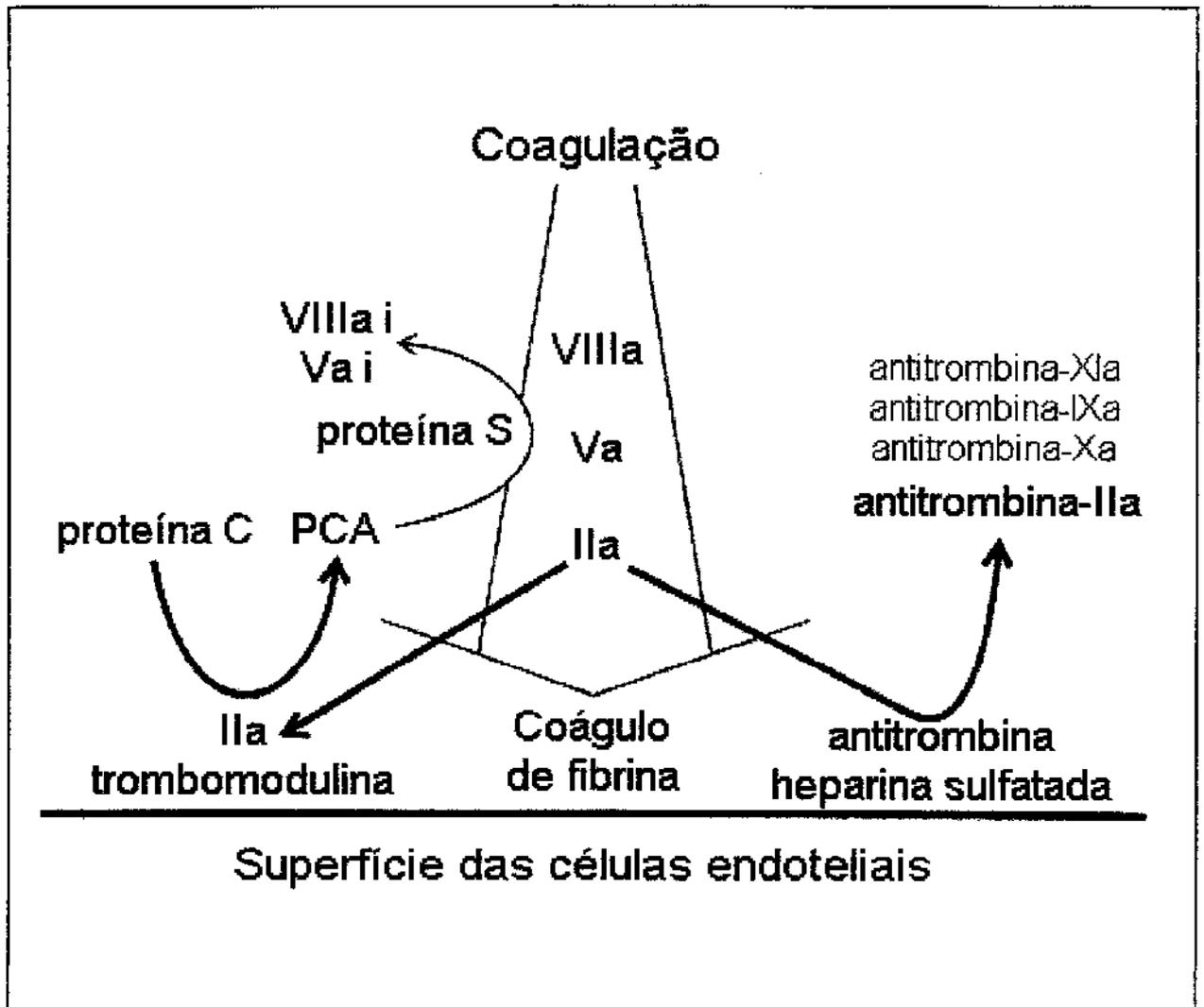
## **Via Anticoagulante da Proteína C**

A formação de trombina também tem um papel importante na anticoagulação já que esta participa da Via Anticoagulante da Proteína C. Nesta etapa é necessária a presença de um receptor, a trombosmodulina, que é expresso na superfície das células endoteliais e tem alta afinidade pela trombina (ESMON, 1987b; ESMON & OWEN,

1981). Quando a trombina se liga a esse receptor, sua atividade procoagulante é perdida e ao mesmo tempo, esse complexo trombina-trombomodulina ativa a anticoagulação através da ativação do zimógeno da proteína C em uma potente serina protease anticoagulante, a proteína C ativada, com especificidade pelos fatores V e VIII ativados, dando início a Via Anticoagulante da Proteína C (ESMON & OWEN, 1981; ESMON & ESMON, 1984) (Figura 3).

A proteína C ativada é uma serina protease vitamina K-dependente que exerce sua atividade anticoagulante na presença de íons cálcio e fosfolipídios carregados negativamente, para então degradar proteoliticamente os fatores pró-coagulantes V ativado (KISIEL et al., 1977) e VIII ativado (VEHAR & DAVIE, 1980). Além disso, essa enzima estimula a fibrinólise, provavelmente tanto pela diminuição da atividade do inibidor do ativador do plasminogênio (produzido pelas plaquetas), quanto pela redução nos níveis de formação de trombina (COMP & ESMON, 1981).

Notou-se que a atividade anticoagulante e pró-fibrinolítica da proteína C podia ser aumentada na presença de uma outra proteína vitamina K-dependente: a proteína S (WALKER, 1980; GARDINER et al., 1984; WALKER, et al., 1987; DE FOUW, et al., 1986).



**Figura 3: Representação esquemática das Vias Anticoagulantes da Antitrombina e Proteína C e S.** O balanço hemostático é direcionado em favor da anticoagulação quando o endotélio está intacto devido a ambas Vias Anticoagulantes serem mantidas por moléculas na superfície das células endoteliais. Os fatores ativados são indicados pela letra "a" (VIIIa, Va, IIa, etc). A letra "i" indica que os fatores VIIIa e Va foram inativados pela PCA (proteína C ativada) na presença da proteína S. Retirado de APPLEBY & OLDS, 1997.

## **Proteína S**

### **Síntese**

A proteína S é sintetizada principalmente pelos hepatócitos (FAIR & MARLAR, 1986), mas também pelas células endoteliais (FAIR et al., 1986; STERN et al., 1986a), pelas células testiculares de Leydig (MALM, et al., 1994), pelos megacariócitos (SCHWARZ et al., 1985; OGURA et al., 1987) e no cérebro (HE et al., 1995).

A concentração da proteína S total no plasma humano é de aproximadamente 20 a 25 µg/ml (0,26 a 0,33 µM), em indivíduos normais (BERTINA et al., 1985). A redução dos níveis plasmáticos de proteína S em indivíduos com doença hepática (BERTINA et al., 1985) foi consideravelmente menor do que a redução de outras proteínas plasmáticas vitamina K-dependentes, sugerindo sítios extra hepáticos para a síntese de proteína S, mencionados anteriormente. A concentração de proteína S é 10 a 15% mais alta no sexo masculino, e a concentração aumenta em ambos os sexos com a idade (SCHWARZ et al., 1986).

As superfícies das células endoteliais e plaquetas são sítios de regulação da via da proteína C anticoagulante e a síntese da proteína S por essas duas células pode evidenciar o papel das células endoteliais (STERN et al., 1986b) e das plaquetas (HARRIS & ESMON, 1985) na localização dos processos de anticoagulação.

## **Estrutura**

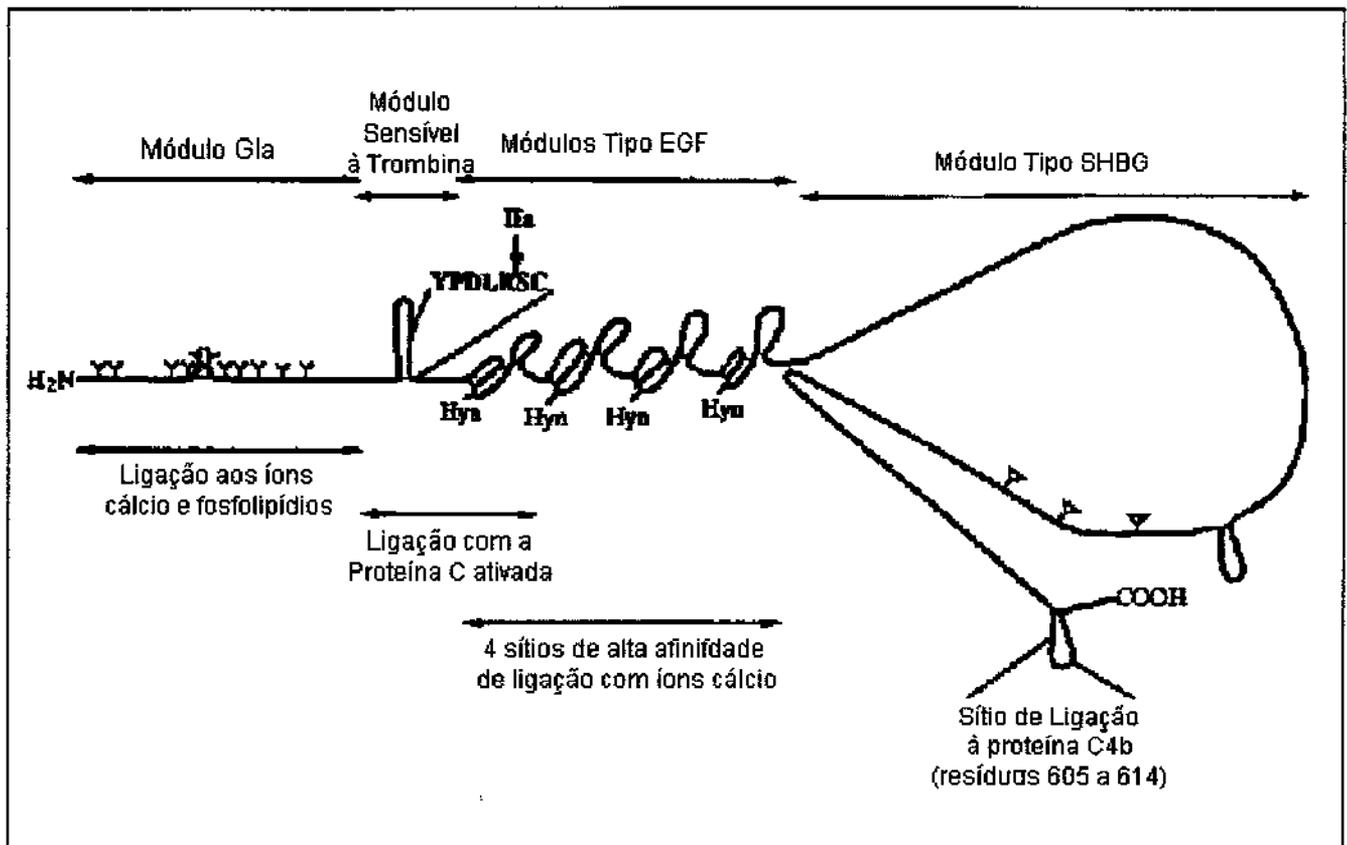
A proteína S humana é uma glicoproteína plasmática, vitamina K-dependente. Seu peso molecular, calculado pela composição dos aminoácidos, é de 70.690 Da. A proteína S foi identificada pela primeira vez em 1977 pela adsorção com sulfato de bário, um método clássico para isolar proteínas vitamina K-dependentes (DI SCIPIO et al., 1977). Ao mesmo tempo uma proteína similar foi isolada de plasma bovino (DI SCIPIO & DAVIE, 1979; STENFLO & JÖNSSON, 1979).

A identidade entre as seqüências de ácidos nucléicos da proteína S humana e bovina é de 87,5%, e da seqüência de aminoácidos é de 81,6%. A funcionalidade da proteína S é espécie-específica, isto é, a proteína S humana não funciona como cofator na via da proteína C bovina (WALKER, 1981a; DAHLBÄCK, 1986).

A proteína S humana é sintetizada a partir de uma proteína precursora com 676 aminoácidos que pode ser considerada um mosaico, já que é composta por unidades protéicas ou módulos que são estruturalmente e funcionalmente distintos (PATTHY, 1985): um peptídeo sinal, uma região vitamina K-dependente, um pequeno "loop" sensível à clivagem pela trombina, um domínio homólogo ao fator de crescimento epidérmico e um domínio homólogo à globulina de ligação de hormônios esteróides (Figura 4).

A proteína S é uma glicoproteína de cadeia única, com aproximadamente 7,8% do seu peso molecular total constituído de carboidratos. Durante o processamento pós-traducional, três tipos de aminoácidos são modificados na proteína S humana (Glu, Asp

e Asn), bem como são adicionadas cadeias laterais de carboidratos N-ligadas (DI SCIPIO et al., 1977; DI SCIPIO & DAVIE, 1979; STENFLO & JÖNSSON, 1979). A proteína S contém 11 resíduos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) (DAHLBÄCK et al., 1986a) e quatro resíduos de ácido aspártico (Hya) / asparagina (Hyn)  $\beta$ -hidroxilados (FERNLUND & STENFLO, 1983; STENFLO et al., 1987) (Figura 4).



**Figura 4: Representação esquemática da estrutura secundária da proteína S humana.** A proteína S humana é uma molécula de cadeia única com 635 aminoácidos, composta de diferentes módulos. O sítio de clivagem à trombina (Ila), que é conservado na proteína S humana e bovina, está detalhado. As posições dos resíduos Hya e de três resíduos Hyn são mostradas. A proteína S humana contém 11 resíduos Gla (Y) e três potentes sítios de glicosilação N-ligados (Y). Retirado de DAHLBÄCK et al., 1986b.

## ***1. O peptídeo sinal***

As proteínas vitamina K-dependentes tem uma seqüência líder que consiste de um peptídeo sinal, ou prepeptídeo, e um pequeno propeptídeo, que foi primeiramente identificado pelo isolamento do cDNA codificador para a molécula de fator IX humano (KURACHI & DAVIE, 1982). As seqüências sinalizadoras, pré- e propeptídeo, compostas por 41 aminoácidos, são removidas da molécula, por clivagem proteolítica, antes da secreção da proteína S madura para a circulação.

O peptídeo sinal (resíduos -41 a -18) contém uma seqüência hidrofóbica, responsável pelo transporte da proteína através do retículo endoplasmático (GIERASCH, 1989). O peptídeo sinal é encontrado em todas as proteínas secretórias de procariotos e eucariotos. Esse peptídeo consiste de três estruturas em forma de bloco: uma extremidade amino-terminal básica, uma região hidrofóbica central e uma região carboxi-terminal polar (VON HEYNE, 1986).

O propeptídeo contém muitos resíduos (Phe<sup>-16</sup>, Ala<sup>-10</sup>, Leu<sup>-6</sup>, Arg<sup>-1</sup>) que são conservados na região propeptídica da maioria das proteínas vitamina K-dependentes. Devido à conservação de muitos desses resíduos no propeptídeo das proteínas da coagulação vitamina K-dependentes e no esqueleto da proteína Gla, há hipótese de que ele esteja envolvido no processo de  $\gamma$ -carboxilação (PAN & PRICE, 1985).

O aminoácido -17 da cadeia propeptídica (resíduos Asn-17 a Arg-1) contém um sítio que é necessário para o reconhecimento pela  $\gamma$ -carboxilase vitamina K-dependente, responsável pela  $\gamma$ -carboxilação. Esse sítio de reconhecimento é

homólogo a estruturas correspondentes em outras proteínas vitamina K-dependentes.

## ***II. A região vitamina K-dependente***

A proteína S madura consiste então de 635 aminoácidos e se inicia com uma seqüência de Ala-Asn-Ser (Alanina-Asparagina-Serina) (DAHLBÄCK et al., 1986a; LUNDWALL et al., 1986; HOSKINS et al., 1987; PLOOS VAN AMSTEL et al., 1987a).

A região vitamina K-dependente das proteínas vitamina K-dependentes, protrombina (DEGEN et al., 1983), fator VII (HAGEN et al., 1986), fator IX (VON HEINE, 1986), fator X (LEYTUS et al., 1986), proteína C (FOSTER & DAVIE, 1984; LONG et al., 1984), proteína Z (HOJRUP et al., 1982), proteína S (HOSKINS et al., 1987; PLOOS VAN AMSTEL et al., 1987b), da matriz da proteína Gla (PRICE et al., 1987) e do esqueleto da proteína Gla (PAN & PRICE, 1985) demonstram alta homologia. Com o isolamento dos cDNAs que codificam para essas proteínas verificou-se que todas elas são sintetizadas como precursores que contêm um peptídeo sinal que é clivado.

A porção amino-terminal da proteína madura é composta por um domínio Gla (ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado) formado pelos resíduos Ala 1 a Thr 37. Esse domínio contém 11 ácidos  $\gamma$ -carboxiglutâmicos modificados pós-traducionalmente (resíduos Gla) onde se ligam múltiplos íons cálcio, formando uma estrutura estável que possui alta afinidade por fosfolípidios da membrana carregados negativamente (SCHWALBE et al., 1990; NELSESTUEN et al., 1978; SCHWALBE et al., 1989).

Modificações químicas nos resíduos de ácido glutâmico da proteína S levam a

perda não só da capacidade de ligação a fosfolipídios, bem como da atividade de cofator (WALKER, 1986a). Dentre as proteínas vitamina K-dependentes, a proteína S é a que tem maior afinidade por fosfolipídios carregados negativamente.

Em todas as proteínas da coagulação, após o domínio Gla há um pequeno trecho hidrofóbico com alta concentração de resíduos aromáticos (resíduos 38 a 45) então chamada de região hidrofóbica.

Esses dois domínios estão presentes em todas as proteínas vitamina K-dependentes, enquanto que, um outro domínio, chamado de região sensível a trombina (resíduos 46 a 75), está presente somente na proteína S.

### ***III. A região sensível à trombina***

A região sensível à trombina forma um domínio que contém dois resíduos de cisteína (Cys 47 e 72) ligados por uma ponte de dissulfeto. Neste "loop" duas pontes peptídicas (Arg 70-Ser 71 e Arg 49-Ser 50) são sensíveis à proteólise pela trombina (MEIJER-HUIZINGA et al., 1994; CHANG et al., 1994a). Quando essas pontes são clivadas pela trombina, o domínio Gla permanece ligado ao restante da molécula da proteína S pela ponte de dissulfeto (Cys 47-Cys 72). A clivagem pela trombina de 2 Arg-Ser/Ala na segunda volta de dissulfeto, resulta na liberação de um peptídeo contendo os resíduos 53 a 70. Assim, o domínio Gla não pode mais adquirir a conformação mediada pelos íons cálcio na concentração fisiológica, que é necessária para sua atividade biológica, a proteína S não pode se ligar aos fosfolipídios, e sua atividade como cofator da proteína C ativada é perdida (SUZUKI et al., 1983; WALKER, 1984).

Isto sugere que este "loop" sensível à trombina está intimamente envolvido no dobramento do domínio Gla (DAHLBÄCK, 1983a; DAHLBÄCK et al., 1986b) e na interação com a proteína C ativada (DAHLBÄCK et al., 1990a).

Em concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (por volta de 2mM), a proteína S clivada pela trombina não se liga a fosfolipídios da membrana carregados negativamente, enquanto numa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  cinco vezes mais alta, a proteína S se liga a fosfolipídios com a mesma afinidade da proteína S não clivada (SCHWALBE et al., 1989). Esta observação sugere que a região sensível à trombina interage com a proteína C ativada na superfície fosfolipídica; uma interação confirmada por achados experimentais que utilizaram anticorpos monoclonais (DAHLBÄCK et al., 1990a).

#### ***IV. Os domínios EGF***

A proteína S é a única entre as proteínas vitamina K-dependentes que contém quatro domínios tipo EGF (homólogo ao fator de crescimento epidérmico), que são formados pelos resíduos 76 a 242 e são adjacentes a região sensível à trombina. Esses domínios são homólogos à seqüência repetida rica em cisteína, composta de cinquenta aminoácidos presente no precursor do EGF de rato (DOOLITTLE et al., 1984).

O domínio EGF-1 contém um resíduo de Asp  $\beta$ -hidroxilado (ácido  $\beta$ -hidroxiaspártico - Hya, resíduo 95), enquanto os outros três domínios contém um resíduo de Asn  $\beta$ -hidroxilado ( $\beta$ -hidroxiasparagina - Hyn, resíduos 136, 178, 217) (STENFLO et al., 1987). O sucesso da hidroxilação ocorre somente quando esses resíduos estão localizados dentro de uma região consenso CysXAsp/AsnXXXXPhe/ThrXCysXCys (STENFLO et al., 1988). No entanto, esses resíduos não são exigidos para a

atividade de cofator da proteína C, ou mesmo para a ligação com a proteína C4b (NELSON et al., 1991).

Os domínios EGF são comuns entre várias proteínas, mas sua função ainda é desconhecida. Parece estar envolvido nas interações proteína-proteína. O efeito anticoagulante da proteína C pode ser inibido por um fragmento isolado da proteína C bovina que contém o módulo Gla e dois domínios EGF, sugerindo que a interação entre a proteína C ativada e seu cofator, a proteína S, pode ocorrer através do domínio EGF (ÖHLIN et al., 1990). Também, utilizando-se um anticorpo monoclonal diretamente contra a região homóloga à EGF da proteína C, inibiu-se a interação entre a PC ativada e a proteína S (ÖHLIN et al., 1988). A formação do complexo trombina-trombomodulina, o primeiro evento da Via da Proteína C Anticoagulante, parece ocorrer pela interação da trombina com o quinto e sexto domínios EGF da trombomodulina (SUZUKI et al., 1989).

O efeito estimulante do cálcio na ligação entre a proteína S e a proteína de ligação C4b sugere que os módulos tipo EGF da proteína S podem estar envolvidos nesta interação. Os módulos tipo EGF que contém Hyn têm altíssima afinidade por  $\text{Ca}^{2+}$  nos seus sítios de ligação ( $K_d$  abaixo do nível nanomolar) (DAHLBÄCK et al., 1990b). A ligação com  $\text{Ca}^{2+}$  é importante para a resistência da proteína S à proteólise pela trombina e manutenção de sua conformação nativa. Isto também parece ser importante para a interação com a proteína de ligação C4b, porque a afinidade de interação aumenta 100 vezes na presença de concentrações micromolares de cálcio (DAHLBÄCK et al., 1990c; SCHWALBE et al., 1990).

## **V. A região SHBG**

A metade carboxi-terminal da proteína S é formada por uma grande seqüência homóloga à globulina de ligação de hormônios esteróides - SHBG (sex hormone binding globulin) (GERSHAGEN et al., 1987; GERSHAGEN et al., 1991; BAKER et al., 1987). Esse módulo contém dois pequenos "loops" formados por duas pontes internas de dissulfeto (Cys 408 a Cys 434 e Cys 597 a Cys 625) e não liga esteróides, mas, por outro lado, contém pelo menos dois potentes sítios de interação com a proteína de ligação C4b (resíduos 420 a 433 e 583 a 635) (NELSON & LONG, 1992; FERNANDEZ et al., 1993; FERNANDEZ & GRIFFIN, 1994; CHANG et al., 1994b).

A região SHBG também sofre modificações pós-traducionais já que no centro desta região são encontrados três potentes sítios de glicosilação em resíduos de asparagina agrupados (Asn 458, 468 e 489), mas não se sabe se todos são ocupados por cadeias laterais de carboidratos (WALKER, 1989). A porção carboxi-terminal da região SHBG é importante para a ligação da proteína S com a proteína de ligação C4b e para sua atividade anticoagulante junto a proteína C ativada.

Baseado em resultados experimentais usando peptídeos sintéticos, sugeriu-se que os resíduos 605 a 614, situados dentro do "loop" entre Cys 597 e Cys 625 contém o sítio para a ligação da proteína C4b. Um mutante em que toda essa região foi deletada ainda se liga a proteína C4b, embora com afinidade menor que a da proteína S nativa (CHANG et al., 1991). Este achado sugere que a localização do sítio de ligação da proteína C4b está na região Cys 597 a Cys 625, mas indica que a ligação pode ser complexa e envolve mais de um sítio da molécula da proteína S. Isto também sugere

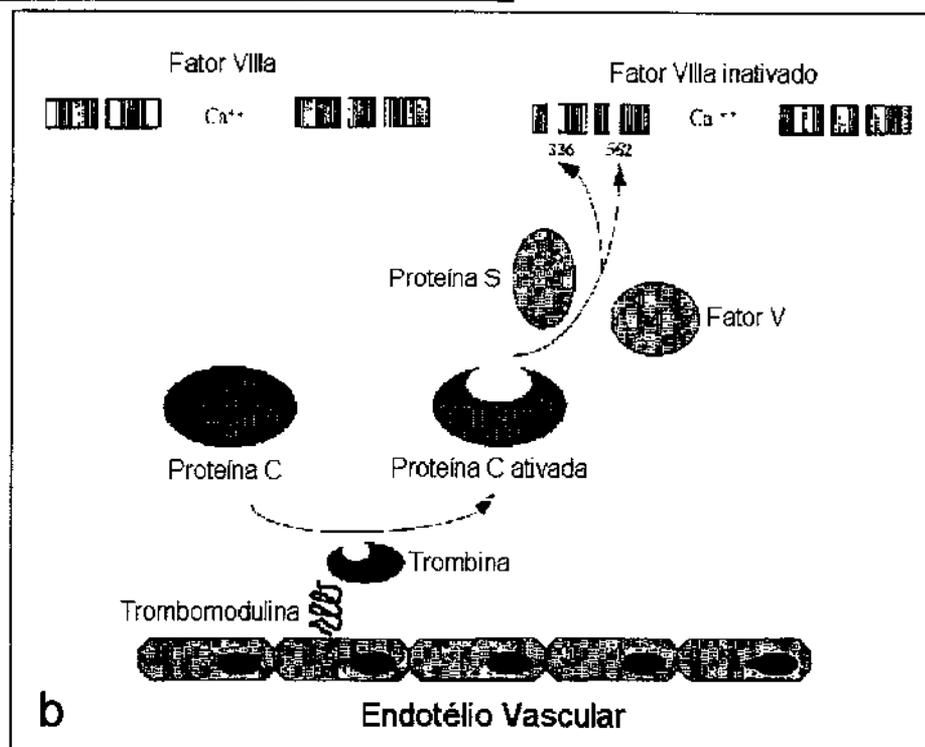
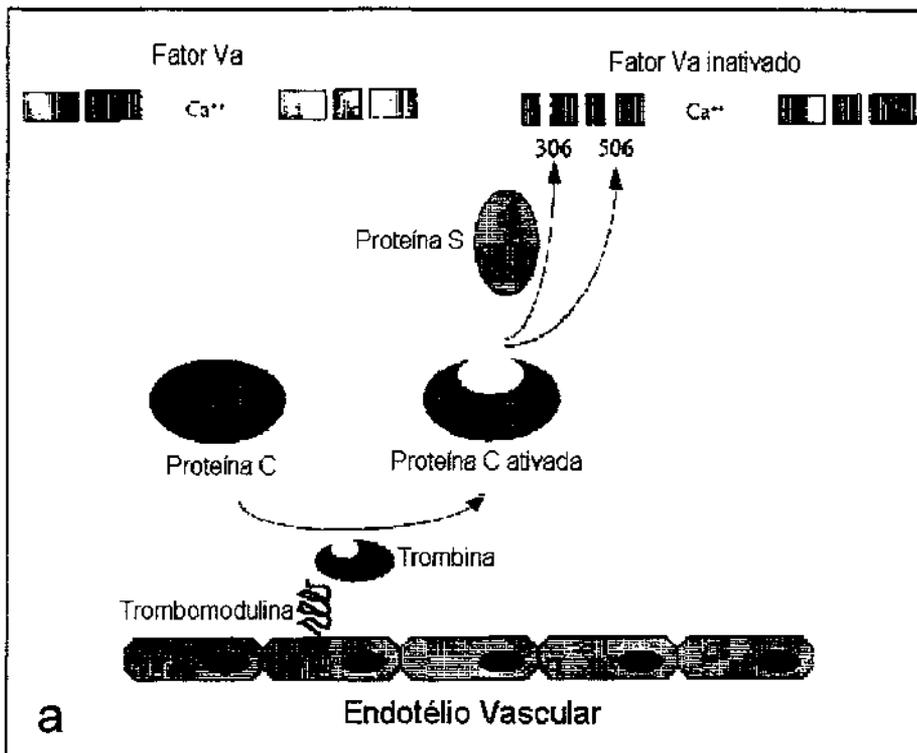
que o sítio de ligação para a proteína C4b está localizado próximo do meio do módulo tipo SHBG (FERNÁNDEZ & GRIFFIN, 1991).

### **Função**

A proteína S humana funciona como cofator não enzimático da proteína C ativada, que atua na inibição dos fatores V e VIII ativados. Ela forma um complexo estequiométrico 1:1 com a proteína C ativada, em superfícies fosfolipídicas, na presença de íons cálcio (WALKER, 1981b). A proteína S exerce seu papel de cofator aumentando em 10 vezes a afinidade da proteína C ativada pelas membranas fosfolipídicas, que normalmente é muito baixa (NELSESTUEN et al., 1978). A formação deste complexo ocorre em superfícies lipídicas, como as células endoteliais (STERN et al., 1986b; HACKENG et al., 1993), plaquetas (SUZUKI et al., 1984; HARRIS & ESMON, 1985) ou micropartículas plaquetárias (DAHLBÄCK et al., 1992).

O mecanismo de inibição do fator V ativado foi extensivamente estudado pela resistência à proteína C ativada devido à mutação de ponto que resulta na troca do resíduo Arg 506 por Gln (Fator V de Leiden) (BERTINA et al., 1994). A inativação do fator V ativado ocorre numa reação bifásica, com a clivagem rápida no resíduo Arg 506 seguida de uma clivagem lenta em Arg 306. A primeira clivagem afeta parcialmente a atividade do fator V ativado sendo que a inativação completa é conseguida após a segunda clivagem. A proteína S estimula drasticamente a segunda fase do processo de inativação já que sua interação com a proteína C resulta num aumento de 20 vezes na hidrólise de Arg 506 do fator V ativado (ROSING et al., 1995) (Figura 5a).

O mecanismo de inibição do fator VIII ativado pela proteína C ativada também é bifásico, com clivagens no resíduo Arg 562 e uma clivagem subsequente em Arg 336. A inativação do fator VIII ativado pela proteína C ativada é aumentada na presença da proteína S e do fator V (mas não do fator V ativado); essas duas proteínas agem sinergicamente como cofatores para esta reação (SHEN & DÄHLBACK, 1994) (Figura 5b).



**Figura 5: Mecanismos propostos para a inativação dos fatores Va e VIIIa.** O fator V ativado (a) e fator VIII ativado (b) são clivados pela proteína C ativada por intermédio de um cofator, a proteína S. A proteína C é ativada pela trombina ligada à trombomodulina. Retirado de AIACH et al., 1997.

Mais recentemente foram demonstradas outras funções da proteína S, independentes da Proteína C ativada. Neste caso, a proteína S inibe a atividade protrombinase nas células endoteliais e plaquetas. Nas células endoteliais, a proteína S clivada pela trombina bem como a proteína S em complexo com a proteína de ligação C4b inibiram a atividade protrombinase da mesma forma que a proteína S nativa. Em ensaios de ligação em fase sólida foi observada somente a ligação da proteína S livre diretamente com o fator V e fator V ativado. Também foi observada uma inibição direta da atividade do fator X ativado tanto pela proteína S livre quanto por sua forma ligada com a C4b. A proteína S clivada pela trombina perde sua atividade inibitória, sugerindo que as mudanças conformacionais induzidas pela clivagem no "loop" sensível à trombina resultam na perda do sítio de ligação da proteína S com o fator X ativado (HACKENG et al., 1994).

A inibição do complexo protrombinase pelas diferentes formas da proteína S é um importante mecanismo de regulação de formação de trombina na coagulação sangüínea. A importância da ação anticoagulante da proteína S, independente da proteína C ativada, foi verificada pela adição da proteína a um plasma normal, que resultou no prolongamento do tempo de coagulação no ensaio do tempo de tromboplastina parcial ativada diluída (TTPAd) (HACKENG et al., 1994).

O efeito anticoagulante da proteína S pode ser também explicado pela sua interferência na ligação dos complexos tenase e protrombinase de se ligarem aos fosfolipídios da superfície das membranas. A alta afinidade de interação da proteína S por essas superfícies é essencial para sua atividade anticoagulante direta e a inibição dos complexos tenase e protrombinase pela proteína S é uma consequência da

ocupação das superfícies fosfolipídicas pelas moléculas de proteína S (VAN WIJNEN et al., 1996). Sua ligação às superfícies de membranas também é essencial para sua atividade de cofator da proteína C ativada, sendo que pelo menos duas regiões da proteína S (domínio Gla e região sensível à trombina) estão envolvidas na expressão de atividade de cofator (HACKENG et al., 1993).

Assim o papel da proteína S é de um anticoagulante, tanto por sua ação direta, como participando da Via Anticoagulante da proteína C, e sua deficiência predispõe à fenômenos tromboembólicos (ENGESSER et al., 1987).

### **Interação com a proteína de ligação C4b**

A proteína S circula no plasma em duas formas: 40% está na forma livre e os 60% restantes formam um complexo com a proteína de ligação C4b, uma grande glicoproteína plasmática multimérica (570 kD) que atua na regulação da via clássica do complemento (DAHLBÄCK & STENFLO, 1981; DAHLBÄCK, 1991). A interação entre a proteína S e a proteína de ligação C4b é não covalente, na proporção 1:1 e reversível (DAHLBÄCK, 1983a; DAHLBÄCK, 1983b; NELSON & LONG, 1991; NELSON & LONG, 1992). O Kd é de aproximadamente  $10^{-7}$  M na ausência de cálcio, e aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M na sua presença (DAHLBÄCK et al., 1990b; SCHWALBE et al., 1990). O cálcio aumenta principalmente a taxa de associação, enquanto que a taxa de dissociação, tanto na presença como na ausência de cálcio, é baixa. Apesar do efeito potencializador do cálcio na afinidade entre a proteína S e a proteína C4b, a média de proteína S livre para se ligar é similar no plasma e no soro, indicando que outros fatores estão envolvidos na regulação da interação da proteína S com a proteína C4b *in vivo*

(DAHLBÄCK et al., 1990c). Esta idéia baseia-se em casos de deficiência hereditária de proteína S, caracterizados por concentrações normais de proteína S total e níveis subnormais de proteína S livre (COMP et al., 1984; COMP et al., 1986a; CHAFA et al., 1989; IJIMA et al., 1989; LAUER, 1990).

Uma vez formado o complexo com uma sub-unidade da proteína C4b, a molécula de proteína S perde sua atividade. Somente a proteína S na sua forma livre é biologicamente ativa e pode exercer sua atividade de cofator da proteína C ativada (DAHLBÄCK, 1986). Deste modo a proteína C4b funciona também como um regulador da Via da Proteína C Anticoagulante.

Também foram identificadas outras proteínas que atuam na regulação da via da proteína C anticoagulante. A própria proteína C ativada, a calicreína, a  $\alpha$ -quimiotripsina e o veneno de Agkistrodon contortrix contortrix, em altas concentrações, e principalmente a trombina, podem clivar a proteína S dentro do "loop" de dissulfeto, na região sensível à trombina (DAHLBÄCK, 1983c; WALKER, 1984; MORITA et al., 1986; SUZUKI et al., 1983). A clivagem da proteína S reduz a capacidade de ligação com íons cálcio nas superfícies fosfolipídicas, e há perda da sua atividade de cofator.

No plasma bovino foi identificada uma proteína de ligação que forma complexos com a proteína S, que, em contraste à proteína C4b, aumenta a atividade de cofator da proteína S bovina (WALKER, 1986b). Contudo não foi identificada nenhuma atividade deste tipo para a proteína S humana.

Recentemente foi sugerido que os resíduos 447 a 460 da proteína S constituem

uma região importante para a interação com a proteína de ligação C4b. Este achado pode ter implicações para os pacientes que sofrem de trombose por diminuição de proteína S livre, já que é possível “desenhar” drogas que interrompem a ligação da proteína S com a proteína C4b (LINSE et al., 1997).

### **Os genes da proteína S**

O genoma humano contém dois genes da proteína S:  $PS\alpha$  e  $PS\beta$ . Somente o gene  $PS\alpha$  (ou *PROS1*) é expresso, enquanto o gene  $PS\beta$  (ou *PROS2*) é um pseudogene (SCHMIDEL et al., 1990; PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990; EDENBRANDT et al., 1990). Ambos os genes estão localizados no cromossomo 3, próximo a região do centrômero (banda 3p 11.1-3q11.2) (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1987a; WATKINS et al., 1988; LONG et al., 1988), e estão a uma distância de 4 centi Morgan um do outro (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1989a).

A identidade entre a seqüência dos exons dos dois genes é de 97%, e entre os introns é de 95,4%. O gene *PROS1* tem mais de 80 kb de comprimento e contém 15 exons e 14 introns, os quais contêm seis seqüências repetidas “Alu”. Somente o *PROS1* é transcricionalmente ativo; toda a proteína S encontrada na circulação é, portanto, produto do gene *PROS1* (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1988).

O *PROS2* é um genuíno pseudogene, já que perdeu o sítio de início da transcrição (metionina), tem mutações em sítios de “splicing”, “stop codons” e mutações “frameshift” (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990). O *PROS2* tem mais de 55 kb de comprimento e mostra ausência do exon 1, bem como muitas substituições de

nucleotídeos na parte codificadora do gene como inserções e deleções resultando em mutações "frameshift" no exon 10, e também em "stop codons" (codons 61, 299, 410 e 522 do gene *PROS1*), impedindo a presença de um quadro aberto de leitura (SCHMIDEL et al., 1990; PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990; EDENBRANDT et al., 1990).

A estrutura primária da proteína S humana foi determinada por clonagem de cDNA. O tamanho do mRNA está entre 3,5 a 4,0 kb, incluindo dois sinais de poliadenilação na extremidade 3' (HOSKINS et al., 1987).

Três tipos de mRNA foram isolados (LUNDWALL et al., 1986; HOSKINS et al., 1987; PLOOS VAN AMSTEL et al., 1987b). O maior deles tem aproximadamente 4 kb e contém uma região 5' não traduzida (112 pb da região 5' do exon 1), a região codificadora de proteína (correspondente à extremidade 3' do exon 1, exons 2 a 14 e uma parte 5' do exon 15) e uma região 3' não traduzida de 1139 pb (HOSKINS et al., 1987; SCHMIDEL et al., 1990). A região regulatória do gene da proteína S ainda não está definida (HALL et al., 1995).

O alto grau de homologia entre os dois genes da proteína S indica que a duplicação de um gene ancestral da proteína S provavelmente aconteceu recentemente na escala evolucionária (10 a 30 milhões de anos atrás), durante a evolução dos primatas. Essa duplicação parece ter ocorrido após a ramificação entre os gorilas e os orangotangos (13 a 17 milhões de anos atrás), baseado em estimativas de índices de substituição de nucleotídeos e na observação de que gorilas e chimpanzés, como o homem, têm os dois genes, enquanto os macacos verdes africanos, macacos Rhesus e

orangotangos têm apenas um (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990).

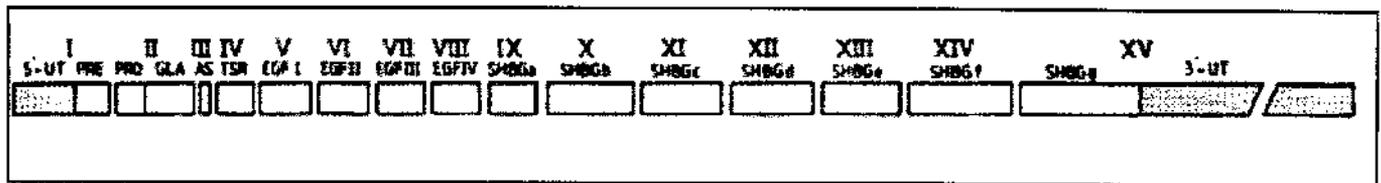
A extensão da divergência entre os genes *PROS1* e o *PROS2* indica que não foi exercida nenhuma pressão seletiva para prevenir a ocorrência de mutações no gene *PROS2*. Há uma hipótese de que logo após o momento da duplicação do gene ancestral da proteína S, um dos dois genes foi silenciado (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990).

A estrutura dos genes das proteínas vitamina K-dependentes mostra que os domínios estruturais dessas proteínas refletem a organização intron-exon desses genes. Cada exon codifica para uma unidade funcional ou estrutural da proteína (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990) (Figura 6).

A região do gene da proteína S que codifica a região 5' não-traduzida, o propeptídeo e a região vitamina K-dependente da proteína S é organizada similarmente às regiões correspondentes dos precursores de serina proteases vitamina K-dependentes (fatores VII, IX, X, proteína C e protrombina). Os introns dos genes dessas seis proteínas vitamina K-dependentes estão em mesma fase e localizados em posições idênticas. Desse modo pode-se dizer que a organização dos exons corresponde aos domínios estruturais dessas proteínas. O propeptídeo que está envolvido no transporte da proteína pelo retículo endoplasmático é codificado pelo exon 1. O propeptídeo que contém um sítio de reconhecimento para a  $\gamma$ -carboxilase e o domínio Gla, que contém resíduos de ácido glutâmico que são o substrato para a carboxilase, são codificados pelo exon 2. O pequeno trecho de resíduos aromáticos, localizados próximo ao domínio Gla, é codificado por um exon separado (exon 3) nas

seis proteínas vitamina K-dependentes. Após o trecho de resíduos aromáticos, a proteína S tem uma região sensível à proteólise pela trombina. Dentre as proteínas da coagulação esta região é encontrada somente na proteína S, sendo codificada pelo exon 4 e flanqueada por introns de fase 1. Os quatro domínios EGF da proteína S são codificados por exons separados (exons 5 a 8). A fase e posição dos introns que separam esses exons são idênticas aos dos genes dos fatores VII, IX, X e proteína C, que contém dois domínios EGF cada um. A protrombina perdeu as estruturas EGF e no seu lugar há dois domínios Kringle. Um intron de fase 0 separa o exon que codifica o quarto domínio EGF da proteína S dos exons que codificam a região homóloga à SHBG (globulina de ligação de hormônios esteróides). Os genes das serina proteases vitamina K-dependentes mostram, nesta posição, os exons responsáveis por codificar o peptídeo de ativação e o domínio serina protease catalítico. A região SHBG da proteína S humana é codificada pelos exons 9 a 15 (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990) (Figura 6).

A região codificadora do domínio SHBG é homóloga aos genes codificadores da ABP (proteína de ligação de andrógenos) de rato e da SHBG humana. Esses genes demonstram uma organização intron-exon homóloga ao gene da proteína S. As posições e fases dos introns são similares entre os exons 2 a 8 dos genes ABP e SHBG, e os exons 9 a 15 do gene da proteína S. É interessante notar que os pequenos "loops" formados pelas pontes internas de dissulfeto são codificados por um único exon e os três potentes sítios de glicosilação N-ligados são também codificados por um exon separado (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990).



**Figura 6: Representação esquemática dos exons do gene da proteína S.**

Os exons são numerados de I a XV e estão desenhados de acordo com o tamanho. As partes em cinza indicam as regiões 3' e 5' não traduzidas do mRNA. 5' UT - região 5' não traduzida; PRE – prepeptídeo; PRO – propeptídeo, GLA – domínio Gla; AS – seqüência de resíduos aromáticos; TSR – região sensível à trombina; EGF – região homóloga ao fator de crescimento epidérmico; SHBG – região homóloga à globulina de ligação de hormônios esteróides; 3' UT – região 3' não traduzida. Retirado de PLOOS VAN AMSTEL et al., 1990.

Os três tipos de fase de introns estão presentes na região codificadora do domínio SHBG (0, II, 0, 0, I, 0, I, respectivamente). Há uma hipótese de que o emprego não-aleatório de diferentes fases de introns é um indício da “montagem” de um gene ter ocorrido por embaralhamento dos exons. Este processo, através do qual novos genes devem ser formados, necessita de módulos de mesma fase. A ocorrência das três fases de introns na região codificadora do domínio SHBG do gene da proteína S parece sugerir que esta região não foi “montada” por embaralhamento dos exons e sim que esta região inteira (exons 9 a 15) deve ser considerada como um módulo único (PLOOS VAN AMSTEL, et al., 1990).

A organização intron-exon do gene da proteína S reflete a divisão estrutural dos domínios protéicos e pode ser considerada o produto de um processo evolutivo de “montagem”. Os exons 1 a 8 da proteína S, que codificam módulos bem determinados, como o peptídeo sinal, o domínio Gla e os domínios EGF, reuniram-se por embaralhamento de exons, os quais também codificam unidades protéicas estruturais/funcionais de outras proteínas da coagulação vitamina K-dependentes (exceto o exon 4), e foram colocados “upstream” ao gene ancestral da proteína de ligação de hormônios esteróides (PLOOS VAN AMSTEL, et al., 1990).

Já foram descritas as seqüências dos cDNAs da proteína S bovina (DAHLBÄCK et al., 1986b), de coelho, de porco, de macaco Rhesus (GREENGARD et al., 1995) e de camundongo (LU et al., 1994). Eles compartilham em cerca de 59% de homologia da seqüência de aminoácidos.

Com a publicação do primeiro “database” de mutações no gene da proteína S,

foram encontradas 126 mutações e 19 polimorfismos. Dentre estas mutações, 71 eram diferentes mutações de ponto, sendo que 19,8% eram mutações nonsense, 65,3% eram mutações missense, 12,8% eram mutações em sítio de "splicing" e 2% aboliam o codon de terminação natural da proteína. Dentre estas mutações, somente 5,5% ocorreram em dinucleotídeos CpG. A existência de dois genes que são altamente homólogos sugere a possibilidade de rearranjos gênicos, mas, no entanto, nenhuma recombinação entre o *PROS1* e o *PROS2* foi descrita (GANDRILLE et al., 1997) (Figura 7).

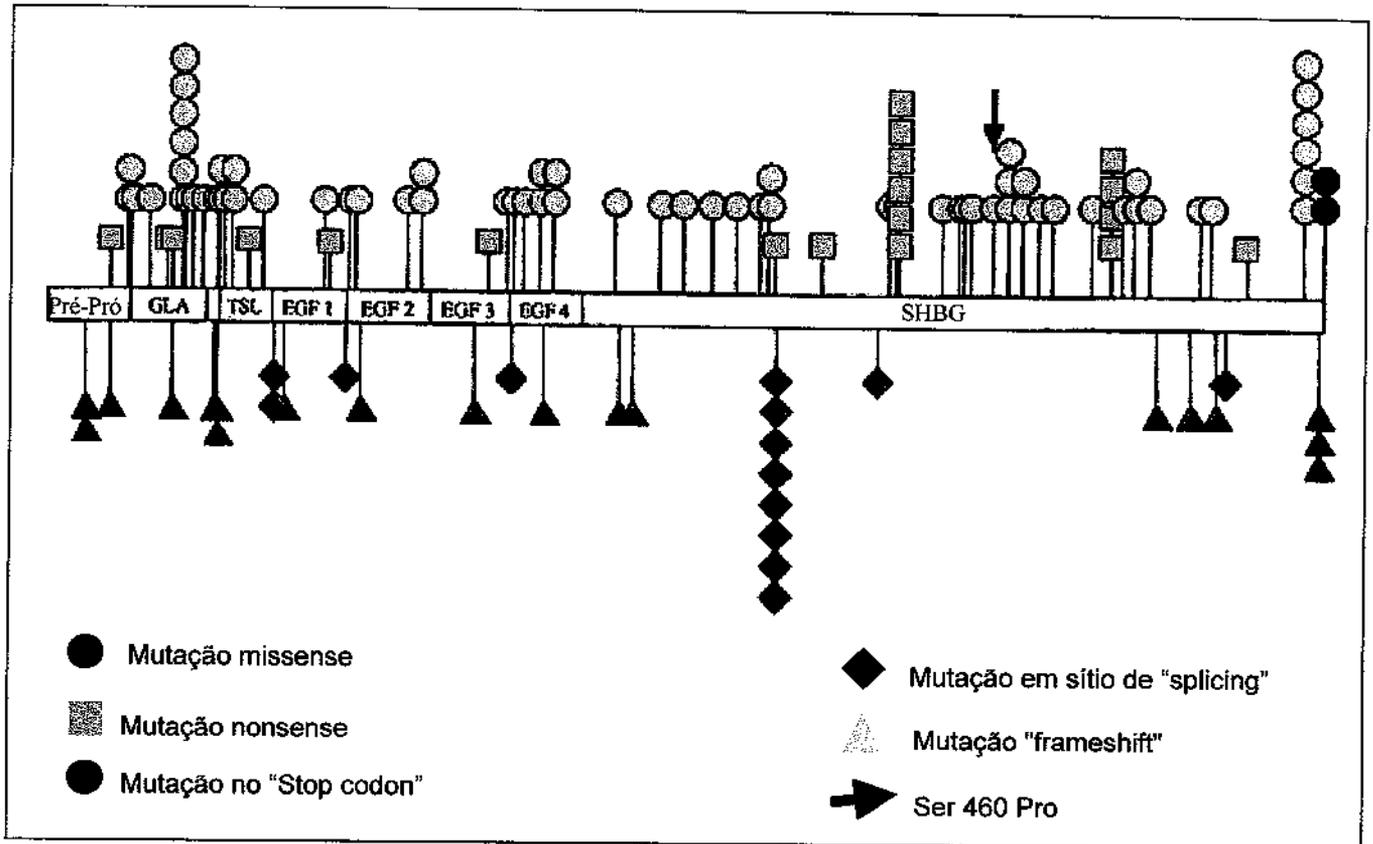
Somente três famílias apresentaram dois tipos de grandes deleções: uma deleção de 5,3 kb incluindo o exon 13 (PLOOS VAN AMSTEL et al., 1989b) e a outra, incluindo a região entre os exons 7 e 12 (SCHMIDEL et al., 1991). Ainda, foram descritas 16 diferentes inserções/deleções menores que 7 nucleotídeos em 20 propósitos. Um total de doze diferentes polimorfismos raros foram descritos, incluindo o polimorfismo Heerlen que é muito estudado; além do polimorfismo freqüente CCA/CCG na posição 626, chamado de dimorfismo neutro (GANDRILLE et al., 1997).

O polimorfismo Heerlen foi primeiramente descrito por BERTINA et al. (1990) como uma molécula de proteína S variante, devido a uma transição de T→C que resulta na substituição do resíduo Serina 460 por Prolina num potente sítio de glicosilação, originando uma proteína S circulante com peso molecular menor que a proteína S normal. Esta mutação foi considerada como um polimorfismo, já que parecia não afetar os níveis de proteína S total e sua atividade de cofator para a proteína C ativada, e porque a freqüência de 0,67% do alelo Heerlen em pacientes holandeses com trombofilia não diferia significativamente da freqüência de 0,52% encontrada em

doadores de sangue.

Recentemente, DUCHEMIN et al. (1995) descreveu que 18,8% de pacientes franceses com deficiência de proteína S e 0,8% de pessoas sadias eram heterozigotos para este polimorfismo. Porém, o fato mais importante é que 15/16 pacientes que tinham o alelo Heerlen tinham o fenótipo de deficiência de proteína S tipo III (níveis normais de proteína S total e níveis reduzidos de proteína livre). Estes mesmos autores mostraram que a proteína de ligação C4b era capaz de ligar duas moléculas de proteína S Heerlen, variando o complexo estequiométrico normal 1:1 entre a proteína C4b e a proteína S, e assim podendo explicar a deficiência de proteína S livre nos pacientes que possuem essa mutação. O risco de trombose associado ao polimorfismo Heerlen deve ser melhor avaliado, já que em 26 pacientes sintomáticos que possuíam o alelo Heerlen, 42% tinham uma outra anormalidade genética, entre elas, o Fator V de Leiden, mutações no gene da proteína C ou mesmo outras mutações no gene da proteína S (BORGEL et al., 1996).

O polimorfismo CCA/CCG na posição 626 foi primeiramente descrito por DIEPSTRATEN et al. (1991) e chamado de dismorfismo neutro, pois não altera o aminoácido prolina. Este autor demonstrou que numa população caucasóide européia a frequência alélica encontrada foi de 48% e 52%, para os alelos CCG e CCA respectivamente. Em uma população francesa, as frequências encontradas foram de 57% para o alelo CCA e de 43% para o alelo CCG (GANDRILLE et al., 1995). Este dismorfismo neutro foi caracterizado como um polimorfismo freqüente já que ambos alelos estão presentes com frequências similares a estas em diferentes populações mundiais já estudadas.



**Figura 7: Localização das mutações na seqüência de cDNA.** A correspondência entre os exons e os domínios estruturais ou funcionais é indicada na barra. As mutações missense e nonsense estão indicadas em cima da barra, as mutações "frameshift" e em sítios de "splicing" estão indicadas abaixo da barra.

Pré-Pro – Pré e Pró-peptídeos; GLA – domínio Gla; TSL – "loop" sensível à trombina; EGF – domínios homólogos ao fator de crescimento epidérmico; SHBG – domínio homólogo à proteína de ligação de hormônios esteróides. Retirado de GANDRILLE et al., 1997.

## **Bases hereditárias da trombose venosa**

A forma fluída do sangue é mantida por um balanço das atividades coagulante, anticoagulante e fibrinolítica. Enquanto o balanço hemostático previne tanto a hemorragia quanto a coagulação inapropriada, a coagulação descontrolada pode levar à doença tromboembólica. Uma variedade de anormalidades tanto adquiridas como hereditárias predispõe ao tromboembolismo venoso. A trombose venosa deve ser considerada uma desordem poligênica, com interações entre os defeitos em um único gene que predispõe à trombose, bem como variações genéticas normais nos níveis das proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes (APPLEBY & OLDS, 1997).

A freqüência da trombose venosa foi estimada em aproximadamente 1/1000 da população em geral. A trombose venosa profunda (TVP) em membros inferiores e a tromboflebite são os eventos primários mais comuns. A embolia pulmonar ocorre subseqüentemente, sendo uma complicação com maior risco de vida. A trombose venosa em membros superiores, visceral e cerebral, são menos freqüentes. O primeiro episódio de trombose nos indivíduos com tendência hereditária à trombofilia, ocorre normalmente entre 15 e 40 anos de idade, embora não seja incomum em idades mais tardias. Mais de 50% dos indivíduos afetados apresentam mais de um episódio trombótico. História familiar de trombose é facilmente reconhecida, indicando que os fatores genéticos têm um importante papel na patogênese da doença. Fatores de risco adquiridos como cirurgias, fraturas, estados inflamatórios, imobilizações, gravidez e uso de contraceptivos orais, podem interagir com a predisposição genética, sendo responsáveis por desencadear o primeiro episódio trombótico em metade dos pacientes com uma tendência hereditária à trombofilia (DE STEFANO et al., 1994).

Mutações nos genes da antitrombina, proteína C e proteína S são causas bem estabelecidas de doença tromboembólica venosa, apresentando frequências de 5,5%, 6,9% e 6,6%, respectivamente, em pacientes com menos de 45 anos de idade que apresentaram algum tipo de trombose. Alterações no fibrinogênio e plasminogênio podem também levar à trombose, mas a frequência dessas alterações é muito baixa (APPLEBY & OLDS, 1997).

### **Deficiência de proteína S**

A deficiência hereditária da proteína S é de transmissão autossômica dominante, e é uma doença genética relativamente rara. As primeiras deficiências foram descritas em 1984 (COMP & ESMON, 1984; COMP et al., 1984; SCHWARZ et al., 1984) e sabe-se hoje ser uma causa importante de trombofilia hereditária. A prevalência de heterozigotos está estimada em 1:20.000 numa população normal, sendo responsável por até 10% dos casos de trombofilia hereditária (BERTINA, 1988); e  $1:10^9$  para homozigotos ou duplo heterozigotos (GOMEZ et al., 1994). Os heterozigotos para a deficiência de proteína S possuem risco de desenvolver doença tromboembólica em idade relativamente jovem, por apresentarem uma completa mudança no equilíbrio hemostático que favorece a formação de fibrina (ENGESSER et al., 1987). A via anticoagulante que a proteína S participa é crucial para a hemostasia normal. Foram descritos somente dois casos de pacientes homozigotos, ou heterozigotos compostos, em que há praticamente uma falta completa da proteína S no plasma. Esses indivíduos sofreram de graves complicações trombóticas, como púrpura fulminante severa, com risco de vida, logo após o nascimento (MAHASANDANA et al., 1990; PEGELOW et al., 1992).

A maioria das manifestações clínicas da deficiência hereditária de proteína S são similares às da deficiência dominante de proteína C e caracterizadas por trombose venosa profunda, tromboflebite superficial e embolia pulmonar (BROEKMANS et al., 1985). Mas, diferentemente da deficiência de outras proteínas que participam da anticoagulação, esse tipo de deficiência pode causar, raramente, doença trombótica arterial (ALAART et al., 1990; MANUCCI et al., 1986; GIROLAMI et al., 1989). Alguns casos de necrose de pele induzida por warfarina associada com deficiência de proteína S foram descritos (GRIMAUDDO et al., 1989; GOLDBERG et al., 1991).

A identificação dos indivíduos heterozigotos com deficiência de proteína S é baseada na avaliação dos níveis plasmáticos de antígenos da proteína S (livre ou total) e da sua atividade, através de exames quantitativos e qualitativos, respectivamente (COMP, 1990). Existe uma dificuldade no diagnóstico laboratorial de um indivíduo heterozigoto, em relação ao normal, uma vez que existe uma faixa de sobreposição dos níveis de proteína S, entre os dois grupos. Deve-se evitar o diagnóstico de deficiência de proteína S durante o uso de anticoagulantes orais, uma vez que há uma diminuição da síntese de todas as proteínas  $\gamma$ -carboxiladas vitamina K-dependentes.

Além disso, deve-se considerar sempre uma deficiência adquirida de proteína S, que pode estar associada ao uso de anticoagulante oral, uso de contraceptivo oral, doenças hepáticas, síndrome nefrótica, coagulação intravascular disseminada, e gravidez (D'ANGELO et al., 1988; MALM et al., 1988). Nas síndromes nefróticas a concentração da proteína C4b está aumentada, uma vez que seu peso molecular não permite filtração glomerular, e a concentração da proteína S na forma ligada com C4b está aumentada (VIGANO D'ANGELO et al., 1987). A proteína S na forma livre é

perdida pela urina, resultando numa diminuição do nível de proteína S livre. Durante a gravidez normal, a concentração plasmática tanto da forma total quanto da forma livre diminui e atinge níveis encontrados nos pacientes heterozigotos para deficiência de proteína S (COMP et al., 1986b; MALM et al., 1988). A contribuição da diminuição dos níveis de proteína S livre para a tendência aumentada à trombose, verificada durante a gravidez, ainda não está bem determinada.

### **Classificação das deficiências hereditárias de proteína S**

A deficiência hereditária da proteína S, baseada nas características fenotípicas plasmáticas, é classificada em três tipos. Como ainda não há um consenso em relação à nomenclatura da deficiência, foi aqui utilizada a classificação proposta por BERTINA, durante o encontro do Subcomitê Científico da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia, em Munique, Alemanha, 1991.

A deficiência tipo I é caracterizada pela redução nos níveis plasmáticos da proteína S tanto na sua forma total como na sua forma livre; a deficiência é tipicamente quantitativa (COMP & ESMON, 1984; BROEKMANS et al., 1985; BERTINA, 1985; KAMIYA et al., 1986).

A deficiência tipo II, que é a mais rara, é devida a um funcionamento anômalo da molécula, onde os níveis de antígeno da proteína S total e livre são normais, mas a atividade da proteína S está abaixo da faixa normal; a deficiência é tipicamente qualitativa (MANUCCI et al., 1989).

A deficiência tipo III é caracterizada por uma distribuição anormal da proteína S entre a forma livre e o complexo formado com a proteína C4b. A concentração da proteína S livre é bastante baixa nestes casos, enquanto a concentração de proteína S total é normal. Tipicamente, estes pacientes têm concentrações normais de proteína C4b. Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por esse desequilíbrio não são totalmente conhecidos e não se determinou se tal deficiência é devido a mutações no gene da proteína S ou no gene da proteína C4b, ou a um defeito em outro gene (COMP et al., 1984; COMP et al., 1986a; CHAFA et al., 1989; LAUER et al., 1990; IJIMA et al., 1989).

ZÖLLER et al. (1995) demonstrou que a deficiência de proteína S tipo I e do tipo III são fenótipos variantes da mesma doença genética, pois coexistem em 14 de 18 famílias deficientes em proteína S estudadas.

**OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

Tendo em vista:

- A importância da proteína S como anticoagulante natural, cuja deficiência predispõe a fenômenos tromboembólicos;
- A importância de se compreender os mecanismos genéticos relacionados à deficiência de proteína S;
- A ausência de estudos sobre as alterações moleculares em pacientes deficientes de proteína S no Brasil;

Este trabalho teve por objetivo identificar as mutações no gene da proteína S em pacientes brasileiros com trombofilia deficientes em proteína S. Além disso, determinar a prevalência do polimorfismo Heerlen e do dimorfismo neutro CCA/CCG da proteína S em diferentes grupos raciais da população brasileira e em pacientes com doença tromboembólica.

**CASUÍSTICA**

## **CASUÍSTICA**

A casuística inicial compreendia 16 pacientes com provável diagnóstico de deficiência de proteína S, acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP. Apesar do diagnóstico prévio, todos os pacientes foram reconvocados para a confirmação da deficiência de proteína S. Somente 8 pacientes foram selecionados, nos quais o diagnóstico foi estabelecido com certeza. Os familiares destes pacientes também foram convocados para avaliação.

O diagnóstico de deficiência de proteína S foi concluído a partir de dados clínicos e laboratoriais, através das dosagens de proteína S total e livre por imunoeletroforese tipo "rocket" (LAURELL, 1966) e sua atividade pelo método de coagulação (WOLF et al., 1989). Outras alterações que predispõem à trombose foram investigadas através da dosagem de proteína C, antitrombina, fator XII, anticoagulante lúpico, fibrinogênio, pesquisa do fator V de Leiden (BERTINA et al., 1994), mutação 20210 G→A no gene da protrombina (POORT et al., 1996) e mutação no gene da metilenotetraidro folato redutase (MTHFR) Ala 677→Val (FROOST et al., 1995).

### **Paciente 1**

A paciente 1 (MAFA, 35 anos, branco, sexo feminino) apresentou TVP em MIE e embolia pulmonar em uso de anticoncepcional oral, aos 30 anos. Os níveis de proteína S, avaliados durante a gravidez, foram: PS c 45% e em uma outra amostra PS c 51%. Seu pai teve AVCi. Seus filhos com 8 e 4 anos, tiveram níveis de PS c de 51% e 77%, respectivamente, e seu sobrinho de 6 anos teve PS c de 46%.

## **Paciente 2**

A paciente 2 (EPC, 29 anos, branco, sexo feminino) apresentou TVP íleo-femoral em MID aos 23 anos sob repouso e uso de anticoncepcional oral. As dosagens de proteína S foram: PS c 45%, PS L 42% e PS T 79%. Não apresenta antecedente familiar para trombose. Seu único irmão não pode ser estudado e seus pais apresentaram as seguintes dosagens de proteína S: PS c 60%, PS L 100% e PS T 66% (mãe) e PS c 71%, PS L 75% e PS T 83% (pai).

## **Paciente 3**

O paciente 3 (CJA, 25 anos, branco, sexo masculino) apresentou TVP espontânea em MID, proximal, aos 20 anos e também teve trombose de veia cava inferior aos 22 anos. As dosagens de proteína S foram: PS c 36%, PS L 31%, PS T 73%. Revelou história familiar positiva, já que seu pai teve TVP aos 62 anos e as dosagens foram: PS c 36%, PS L 0% e PS T 84%. Uma de suas irmãs teve TVP e as dosagens foram: PS c 69%, PS L 0% e PS T 45%. O irmão tem níveis normais de proteína S com dosagens de PS c 80%, PS L 51% e PS T 102%. A outra irmã possui deficiência de proteína S assintomática e suas dosagens foram: PS c 26%, PS L 20% e PS T 50%.

## **Paciente 4**

O paciente 4 (JRS, 39 anos, branco, sexo masculino) apresentou linfoma não Hodgkin e durante o terceiro ciclo de quimioterapia apresentou quadro clínico de TVP aos 32 anos. Suas dosagens de proteína S foram: PS c 49%, PS L 25%, PS T 61,5%.

Revelou história familiar positiva, já que sua mãe morreu aos 32 anos de um provável AVCi e trombose arterial em MIE, o qual foi posteriormente amputado. Este paciente tem dois irmãos e uma irmã que apresentaram TVP. Um dos irmãos teve embolia pulmonar após trauma em MID aos 26 anos e teve outro episódio de TVP em MIE pós-reposo. Sua dosagem de PS c foi de 22%. Sua irmã teve TVP em MID na 3ª gestação aos 28 anos. O terceiro irmão teve TVP e embolia pulmonar aos 26 anos e suas dosagens de proteína S foram: PS c 60%, PS L 0%, PS T 77,5%. Duas filhas e uma sobrinha foram também avaliadas, sendo que uma das filhas e a sobrinha demonstraram serem deficientes em proteína S, mas são assintomáticas.

#### **Paciente 5**

O paciente 5 (AP, 63 anos, branco, sexo masculino) apresentou TVP em MID aos 57 anos. As dosagens de proteína S foram: PS c 40%, PS L 50% e PS T 77%. Infelizmente este paciente tem somente um irmão vivo na sua família, mas não foi possível investigar seus níveis de proteína S.

#### **Paciente 6**

O paciente 6 (JCG, 56 anos, branco, sexo masculino) apresentou TVP espontânea aos 52 anos, em MID e MIE. Suas dosagens de proteína S foram: PS c 56%, PS L 0%. Revelou história familiar positiva, já que uma irmã teve AVCi e suas dosagens foram: PS L 25% e PS T 107%. Sua outra irmã tem níveis normais de proteína S com dosagens de PS c 80%, PS L 50% e PS T 66%. Também foram investigados os dois filhos do paciente, sendo que sua filha apresentou deficiência de

proteína S com dosagens de PS L 40% e PS T 66% e seu filho tem níveis normais de proteína S: PS L 93% e PS T 72%. Dois de três sobrinhos, filhos de sua irmã deficiente, foram investigados e não apresentaram deficiência de proteína S: PS c 100% e 98%.

### **Paciente 7**

O paciente 7 (JRF, 48 anos, branco, sexo masculino) apresentou TVP de repetição em MID aos 44 e 46 anos. Seus níveis de proteína S foram de PS c 78%, PS L 50% e PS T 66%. Nesta família nenhum outro membro apresentou quadro trombótico. Seus pais e dois irmãos foram investigados. As dosagens de proteína S dos seus familiares foram: mãe, PS c 140%; pai, PS c 76%; irmão, PS c 107% e irmã, PS c 88%.

### **Paciente 8**

A paciente 8 (RFT, 22 anos, branco, sexo feminino) teve TVP espontânea em MIE aos 16 anos. Apresentou um segundo episódio no segundo trimestre da gravidez. A dosagem de PS c foi de 23%. Sua irmã apresentou TVP, espontânea aos 12 anos e sua dosagem foi de: PS c 20%. Não foi possível a investigação dos pais.

### **Análise de diferentes populações**

Para a análise de dois polimorfismos no gene da proteína S foram estudadas diferentes populações brasileiras. Uma população de 103 recém-nascidos no CAISM (Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher) da UNICAMP, sendo que esta representa uma população totalmente aleatória e representativa da região; uma população de 108 estudantes ou funcionários de origem negróide do Hospital

Universitário de Salvador – Bahia, uma população descendente de 100 caucasóides colhidos em nosso laboratório, tendo como critério de seleção não apresentarem mistura racial conhecida até a 3ª geração, uma população de 84 índios da Tribo Tupi - Parakanã do Estado do Pará e uma população de 581 pacientes que apresentaram trombose venosa, formada por pacientes com trombofilia adquirida, secundária a neoplasia, anticoagulante lúpico ou anticardiolipina, e trombofilia hereditária, idiopática ou não, seguidos no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Dosagem de proteína S**

Para as dosagens de proteína S foram colhidos 4,5 ml de sangue com 0,5 ml de citrato de sódio a 3,8%. Logo após a coleta o sangue foi centrifugado a 4000 rpm, e o plasma aliquoteado foi rapidamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Imunoelektroforese**

Para a imunoelektroforese tipo "rocket" (LAURELL, 1966) utilizou-se soro de coelho anti proteína S humana (Diagnostica Stago) em gel de agarose tipo I a 1% (Low EEO Sigma) diluída em tampão Tris-Glicina EDTA (Tris 20 mM pH 6,8, Glicina 23,2 mM, e EDTA 25 mM). O soro foi usado na concentração de 0,38 unidades por  $\text{cm}^2$  de placa. Os géis de agarose foram distribuídos em placas de vidro que foram deixadas por 10 minutos em geladeira para polimerização. Para a dosagem da proteína S total, o plasma foi diluído na proporção 1/2 em tampão Tris-Glicina EDTA (Tris 26,6 mM pH 6,8, Glicina 31 mM, e EDTA 33,3 mM). Desta mistura foram aplicados 4  $\mu\text{l}$  em cada poço do gel. Para a dosagem da proteína S livre, foi feita uma precipitação da proteína S ligada a proteína C4b, diluindo-se o plasma em polietilenoglicol a 25%, na proporção de 1/7. Deixa-se a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e centrifuga-se a 3000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, foram aplicados 4  $\mu\text{l}$  do sobrenadante em cada poço do gel. A corrida eletroforética foi realizada durante 4 horas a 14 mA, correspondendo a aproximadamente a 50 V. Após a corrida a placa foi colocada em solução salina a 0,9% por 2 a 4 horas. Após esse período, foi colocada sobre a placa uma folha de papel de

filtro umedecida em água e deixou-se secar em estufa 37°C. Após a secagem da placa, a mesma foi corada com azul brilhante de Comassie 0,25% em solução descorante (metanol/água destilada/ácido acético 5:5:1 v/v/v) até que os picos fossem visualizados. As placas foram secas à temperatura ambiente. Para uma melhor visualização dos picos, se necessário, descora-se rapidamente em solução descorante. Seca-se novamente à temperatura ambiente. A corrida eletroforética foi medida do início até o final de cada pico em milímetros e as concentrações de proteína S total e livre foram determinadas por comparação com um padrão aplicado para cada corrida eletroforética (mistura de plasmas de 10 doadores normais considerado como 100% e um padrão de referência - Diagnostica Stago). Os resultados foram expressos em porcentagem e o valor considerado normal em nosso laboratório é de 60 a 120%.

### **Método de coagulação**

Para a determinação da atividade da proteína S utilizou-se o “kit” Staclot protein S (Diagnostica Stago). Uma curva padrão foi realizada com um “pool” de plasmas de 10 doadores normais, que quando diluído em tampão de Owren (tampão veronal pH 8,6 - dietilbarbiturato de sódio 0,03 M, NaCl 0,1 M e HCl 1 M) na proporção de 1/10, corresponde a 100%, 1/20 - 50% e 1/40 - 25%. Os plasmas dos pacientes foram diluídos na proporção de 1/10 utilizando-se o mesmo tampão. Para a realização do teste foi feita uma mistura com 50 µl de plasma dos pacientes ou de plasmas controles, previamente diluídos com 50 µl de plasma humano deficiente em proteína S, 50 µl de proteína C humana ativada e 50 µl de fator V bovino ativado, que foi incubada a 37°C por 3 minutos. A esta mistura foram acrescentados 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,025 M e

imediatamente o cronômetro foi acionado. Misturou-se novamente e observou-se a formação do coágulo. Os tempos foram plotados numa curva padrão e os resultados foram expressos em porcentagem. O valor considerado normal em nosso laboratório é de 65 a 140%.

### **Extração de DNA de sangue periférico**

Foram coletados 20 ml de sangue periférico com anticoagulante EDTA (10%). Após centrifugação por 10 minutos a 2.500 rpm a 4°C, descartou-se o plasma. Ao precipitado foram adicionados 5 volumes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  144 mM e 1/2 volume de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM, sendo misturados por inversão, para lisar as hemácias. Após 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras a 2000 rpm por 20 minutos.

O sobrenadante foi descartado e a 5 ml do sedimento obtido adicionou-se tampão TKM 1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 0,2 mM) e 125  $\mu\text{l}$  de Triton-X100 (Sigma), também para lisar hemácias, misturou-se por inversão, e o material foi centrifugado a 2200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em 5 ml de tampão TKM 1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspenso em 0,8 ml de tampão TKM 2 (NaCl 400 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6,  $\text{MgCl}_2$  10 mM) e 50  $\mu\text{l}$  de SDS a 10% (dodecil sulfato de sódio), para lisar os leucócitos, e incubado em banho-maria a 55°C por 20 minutos. Após esse período foi acrescentado 300  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M, para a precipitação de proteínas, misturado por inversão e então centrifugado novamente por 10 minutos a 12000 rpm.

O sobrenadante recolhido foi submetido à extração através da adição de 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v) e 500 µl de fenol redestilado e saturado com Tris-HCl pH 8,0, seguida de centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm. Este procedimento foi repetido com 1 ml de clorofórmio/álcool isoamílico. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 2 volumes de etanol a 100% e 0,2 volumes de acetato de sódio 3 M para a precipitação do DNA. Incubou-se a -20°C por aproximadamente 2 horas, sendo centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 1 ml de etanol a 70% gelado, sendo centrifugado novamente. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado de DNA obtido à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em quantidade apropriada de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) e deixado durante a noite a 4°C para total dissolução. Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro através do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm.

### **Amplificação pela PCR**

A amplificação do DNA genômico dos pacientes estudados pela PCR (SAIKI, et al., 1988), foi feita utilizando-se os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos diferentes exons do gene da Proteína S

OLIGO	REGIÃO	SEQÜÊNCIA*	POSIÇÃO	Tamanho
PS-1-5	exon 1	<u>TTCCGCCGAGGCTCGCTGGG</u>	-146 a -127	320 pb
PS-1-3	exon 1	<u>TAGGAGCTGCAGCTCTAGAG</u>	79 a 98	
PS-2-5	exon 2	GTC <u>A</u> TACAATTCATAGGCAG	-108 a -89	350 pb
PS-2-3	exon 2	CAGAAAGGAAGT <u>A</u> CAGGCTGG	64 a 83	
PS-3-5	exon 3	GTGAAAATGATGGTTATATG	-125 a -106	228 pb
PS-3-3	exon 3	AGGTGGAGAGTTAGACAGGA	78 a 97	
PS-4-5	exon 4	CC <u>A</u> TGAATTCAGATCAAGTA	-63 a -44	210 pb
PS-4-3	exon 4	GGTGTACTTTACCTACAGAG	41 a 60	
PS-5/6-5	exon 5 e 6	GGCTTCAGGATTTTTATT <u>A</u> AGT <u>A</u>	-87 a -64	506 pb
PS-5/6-3	exon 5 e 6	CTAACTGGGATTATTCTC <u>A</u> CAT	37 a 58	
PS-7-5	exon 7	CA <u>C</u> AAATCAAGGGTTCTTTGG	-75 a -55	230 pb
PS-7-3	exon 7	GATCAGTAATGATACCACCA	9 a 28	
PS-8-5	exon 8	ATAAGATTGAACATTTAGGG	-59 a -40	214 pb
PS-8-3	exon 8	CAGGTGAGAAGTTAAGC <u>A</u> TT	14 a 33	
<sup>a</sup> PS 9A	exon 9	AAA <u>A</u> ATGCATGACCTCACACAA	-86 a -64	251 pb
<sup>a</sup> PS 9B	exon 9	CCCTTATCTGCTTAACCTCT	31 a 52	
PS-10-5	exon 10	AGC <u>I</u> TTCTGTATTTCTT <u>A</u> CT <u>C</u>	-50 a -30	288 pb
PS-10-3	exon 10	ACAG <u>A</u> CTGCATCAAAGTGGG	29 a 48	
<sup>a</sup> PS 11A	exon 11	TACTTTACAGAAGTATTTTTATTGG	-112 a -87	372 pb
<sup>a</sup> PS 11B	exon 11	AACTTCTATTGATTCTCAGAA <u>A</u> CA	69 a 93	
PS-12-5	exon 12	CCTATACTCATAATCGAGCC	-69 a -50	348 pb
PS-12-3	exon 12	TGGGCACACAGTAGATACTC	91 a 110	
<sup>a</sup> PS 13A	exon 13	TTCCTTCTGATGCACTTTAGGAG	-60 a -37	289 pb
<sup>a</sup> PS 13B	exon 13	GAGGTAATACTGCTATGTAT <u>A</u> C	55 a 78	
PS-14-5	exon 14	GCTTATATTGAATCTTTGCTCT <u>G</u>	-31 a -19	414 pb
PS-14-3	exon 14	ATATGCCAATAAATGTCGGT	138 a 157	
PS-15-5	exon 15	CAAGATGCTAAAAGTCTTGG	-49 a -30	415 pb
PS-15-3	exon 15	GATAGCAAGAGAAGT <u>A</u> AGAATTTC	182 a 205	

\*Os nucleotídeos sublinhados demonstram as diferenças entre o *PROS1* e o *PROS2*.

Os oligonucleotídeos foram baseados em REISTMA et al., 1994.

<sup>a</sup>PS - oligonucleotídeos de acordo com SIMMONDS et al., 1996.

A amplificação do DNA genômico pela PCR, dos exons 2 a 15, foi realizada a partir de aproximadamente 0,5 µg de DNA, 40 pmoles de cada oligonucleotídeo, 330 µM de dNTP (mistura de dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, 25°C; KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM) e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL), para um volume final de 100 µl. Para o exon 1 foram usados 32 pmoles de cada oligonucleotídeo e 13% de DMSO, sendo que os demais reagentes foram usados como para os outros exons.

As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho ciclador de temperatura "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer Cetus).

As reações de amplificação dos exons 2, 3, 5 e 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, e 15 foram incubadas a 94°C durante 5 minutos para a desnaturação do DNA seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para anelamento dos oligonucleotídeos com a fita de DNA molde, e 1 minuto a 72°C para extensão da cadeia de DNA. Após esses ciclos, para finalização da extensão, incubou-se por 7 minutos a 72°C. Os exons 5 e 6 foram amplificados em um único fragmento devido ao fato de estarem separados apenas por uma curta seqüência intrônica correspondente ao intron 5.

Para os demais exons, foi usado protocolo semelhante, apenas alterando-se a temperatura de anelamento para 61°C para o exon 1, 59°C para o exon 4, 60°C para o exon 9 e 62°C para o exon 14.

Os produtos de amplificação pela PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo, sendo visualizados em transiluminador de luz ultra violeta.

### **SSCP**

O método de análise de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP) foi utilizado para o rastreamento de possíveis mutações (ORITA et al., 1989) em todos os exons amplificados pela PCR. Esse método pressupõe a análise de fragmentos de 200 a 300 pares de bases. Os mutantes são identificados por seu padrão eletroforético anormal.

O produto da PCR foi diluído 1/8 em uma solução contendo 95% de formamida, EDTA 10mM, pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol. Essa mistura foi desnaturada por 5 minutos a 94°C e 1,0 µl foi submetido a eletroforese no sistema automático "Phastsystem® Pharmacia" (Pharmacia, Uppsala, Suécia). A corrida eletroforética foi desenvolvida em gel homogêneo de poli-acrilamida a 20%, de tamanho 43 mm x 50 mm x 0,45 mm, em tampão acetato 0,112 M e Tris 0,112 M, pH 6,5, utilizando-se o tampão L-Alanina 0,88 M, Tris 0,25 M, pH 8,8 em 3% de agarose para isoeletrofocalização. As condições de corrida foram: Pré corrida: 400 V, 5,0 mA, 1,0 W, 15°C, 10 V/h; Aplicação das amostras: 25V, 5,0 mA, 1,0 W, 15°C, 2V/h e Corrida: 400 V, 5,0 mA, 1,0 W, 15°C, 430 V/h a 500 V/h.

Os fragmentos de DNA foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata em programa automático, nas condições descritas a seguir:

- 1- Ácido tricloroacético a 20% por 5 minutos a 20°C
- 2- Glutaraldeído a 5% por 5 minutos a 50°C
- 3- Água destilada por 2 minutos a 50°C (2 vezes)
- 4- Nitrato de prata a 0,4% por 8 minutos a 40°C
- 5- Água destilada por 0,5 minutos a 30°C (2 vezes)
- 6- Carbonato de sódio a 5%, formaldeído 0,0375% por 0,5 minutos a 30°C
- 7- Carbonato de sódio a 5%, formaldeído 0,0375% por 4 minutos a 30°C
- 8- Ácido acético a 5% por 2 minutos a 50°C
- 9- Glicerol a 13% por 3 minutos a 50°C

### **CSGE**

Como o SSCP pressupõe a análise de fragmentos entre 200 e 300 pb, foi utilizado um outro método, considerado de alta sensibilidade, para triagem de mutações (GANGULY et al., 1993; WILLIAMS et al., 1995). Este método pressupõe a análise de fragmentos de 200 a 800 pares de bases.

O CSGE é feito a partir de amostras de DNA amplificadas pela PCR. Este método de análise é usado para detectar pequenas alterações como inserções, deleções e mutações de ponto no DNA pela formação de heteroduplex, entre uma fita normal e uma fita alterada. O CSGE utiliza um sistema de solventes desnaturantes que parece amplificar a tendência da alteração de produzir mudanças conformacionais e conseqüentemente aumentar a migração diferencial dos heteroduplexes e

homoduplexes de DNA durante a eletroforese. Este método pode ser aplicado a qualquer produto de PCR de 200 a 800 pb e não requer equipamentos especiais ou preparação prévia das amostras.

Nesta técnica os mutantes foram identificados pelo aparecimento de heteroduplexes (DNA dupla fita híbrido com padrão de eletroforese anormal) ou migração de uma única banda em posição anormal.

Antes da eletroforese, de cada amostra amplificada pela PCR, uma alíquota de 20  $\mu$ l foi submetida à desnaturação a 98°C por 5 minutos, seguida de uma incubação a 68°C por 1 hora, para favorecer a formação de heteroduplexes. Após esta incubação, retirou-se uma alíquota de 5  $\mu$ l de cada amostra e misturou-se com 5  $\mu$ l de tampão de amostra contendo 20% de etilenoglicol (v/v), 30% de formamida (v/v), 0,4% de xilenocianol (p/v), 0,4% de azul de bromofenol(p/v). O volume total desta mistura foi aplicado em uma canaleta do gel.

Estas amostras foram submetidas à uma corrida eletroforética utilizando-se um aparato para seqüenciamento (Gibco-BRL) em gel de poliacrilamida a 10%, na proporção de 99:1 acrilamida/bis-acrilolpiperazina (Fluka), contendo 10% de etilenoglicol (v/v), 15% de formamida (v/v), 1 X TTE (Tris 72 mM, taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,0), persulfato de amônio a 10% e TEMED, de dimensões 31 cm X 38,5 cm X 0,8 mm e 32 poços.

Foi realizada uma pré-corrida a 300 volts durante 30 minutos e as amostras foram submetidas a eletroforese a 300 volts durante 16 horas. O tampão de corrida

utilizado para esta corrida eletroforética foi TTE 0,25 X para a parte superior da cuba, e TTE 1 X para a parte inferior da cuba.

Após a eletroforese, uma das placas foi removida e o gel foi então submetido à coloração com uma solução de brometo de etídeo 2,83 mg/l durante 10 minutos, seguida por uma descoloração com água desionizada por 10 minutos. As bandas foram visualizadas através de iluminação com luz ultra-violeta manual, e a região onde se localizavam as bandas foi cortada e transferida para um transiluminador de luz ultra violeta, onde foi fotografada.

## **Seqüenciamento**

Após o rastreamento de possíveis alterações moleculares pelos métodos de SSCP e CSGE, a determinação precisa da mutação foi realizada pelo seqüenciamento direto dos fragmentos de PCR que apresentaram padrão eletroforético anormal nessas análises.

O produto de PCR foi purificado para a aplicação dos protocolos de seqüenciamento apresentadas nos manuais dos "kits" da United States Biochemical - Amersham Life Science: "Sequenase PCR Product Sequencing kit" e "Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit", ambos baseados no método de SANGER (1977).

### **a. Sequenase PCR Product Sequencing Kit**

#### **1. Purificação dos produtos de PCR**

As reações de amplificação de fragmentos pela técnica de PCR requerem dois oligonucleotídeos que delimitam as regiões de interesse e dNTPs para a síntese das cadeias de DNA. Parte desses oligonucleotídeos e dNTPs permanecem intactos após a reação de PCR e deste modo, acabam por interferir nas reações de seqüenciamento dos produtos obtidos por este método. Para a remoção dos oligonucleotídeos e dNTPs remanescentes foram usadas duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão, respectivamente. Deste modo, a uma alíquota de 5  $\mu$ l de reação de PCR foram adicionadas 10 unidades da enzima exonuclease I em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 5mM e 50% de glicerol e 2 unidades de fosfatase alcalina de camarão em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM e 50% de glicerol. Esta mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos para a ação das enzimas e em seguida a 80°C por 15 minutos para inativação das mesmas.

## 2. Reação de anelamento do oligonucleotídeo

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado cerca de 0,5 pmol de DNA, correspondente a 2 ou 3  $\mu$ l da alíquota tratada, em função do número de pares de bases do fragmento analisado. Ao DNA tratado foram adicionados 5 pmoles do oligonucleotídeo selecionado referente ao exon a ser seqüenciado, em um volume final de 10  $\mu$ l. Esta mistura foi submetida a temperatura de 100°C durante 3 minutos e rapidamente resfriada em banho de gelo e álcool por 5 minutos, de modo a permitir a hibridação do oligonucleotídeo à seqüência de DNA e evitando a re-hibridação da dupla fita do DNA.

### 3. Reação de marcação

Aos 10  $\mu\text{l}$  da mistura de DNA hibridado ao oligonucleotídeo foram adicionadas as seguintes soluções: tampão de reação (concentração final de Tris-HCl 23 mM, pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  11 mM e NaCl 28,5 mM), solução de ditiotreitol (concentração final de 5,7 mM), mistura de marcação (concentração final de 0,17  $\mu\text{M}$  de dGTP, 0,17  $\mu\text{M}$  de dCTP e 0,17  $\mu\text{M}$  de dTTP); 5  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$  (Du Pont) e 3,2 unidades de Sequenase versão 2.0 T7 DNA polimerase em um volume final de 17,5  $\mu\text{l}$ . Esta mistura foi levemente agitada, centrifugada e incubada à 20°C por 5 minutos.

### 4. Reação de terminação

A mistura de marcação foi distribuída em quatro tubos (3,5  $\mu\text{l}$  em cada tubo), cada um contendo 2,5  $\mu\text{l}$  de uma mistura dos desoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e um didesoxinucleotídeo nas concentrações indicadas:

Tubo G: 8  $\mu\text{M}$  de ddGTP e 80  $\mu\text{M}$  de cada dGTP, dATP, dTTP e dCTP e 50 mM de NaCl

Tubo A: 8  $\mu\text{M}$  de ddATP e 80  $\mu\text{M}$  de cada dGTP, dATP, dTTP e dCTP e 50 mM de NaCl

Tubo T: 8  $\mu\text{M}$  de ddTTP e 80  $\mu\text{M}$  de cada dGTP, dATP, dTTP e dCTP e 50 mM de NaCl

Tubo C: 8  $\mu\text{M}$  de ddCTP e 80  $\mu\text{M}$  de cada dGTP, dATP, dTTP e dCTP e 50 mM de NaCl

Estes tubos foram então incubados a 37°C por 10 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 4  $\mu\text{l}$  de solução de bloqueio contendo 95% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol.

## **Thermo Sequenase Sequencing Kit**

### **1. Purificação dos produtos de PCR**

Este segundo “kit” utilizado no seqüenciamento daqueles fragmentos que apresentaram padrão eletroforético anormal em um dos dois métodos de triagem, também exige a purificação dos produtos de PCR descrita no método anterior e que garante a remoção dos oligonucleotídeos e dNTPs. Este método difere daquele descrito anteriormente por utilizar uma DNA polimerase termoestável que permite o emprego de um termociclador nas reações de seqüenciamento.

### **2. Reação de marcação do oligonucleotídeo**

Em um tubo de reação foram adicionados 25 pmoles do oligonucleotídeo referente ao exon a ser seqüenciado, tampão da T4 polinucleotídeo quinase na concentração final de Tris-HCl 60 mM, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM; KCl 0,2 M, 25 pmoles de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (Du Pont) e 10 unidades da enzima T4 polinucleotídeo quinase em um volume final de 10  $\mu$ l. Após breve agitação suave centrifugação a mistura de reação foi incubada a 37° por 10 minutos. Para a desnaturação da enzima e conseqüente término da reação, o tubo foi incubado a 95°C por 5 minutos.

### **3. Reação de seqüenciamento no termociclador**

Em cada tubo de microcentrífuga adicionou-se 15 a 20 ng de DNA, correspondentes a 1 ou 2  $\mu$ l da alíquota de PCR tratado; tampão de reação

(concentração final de Tris-HCl 30 mM, pH 9,5 e MgCl<sub>2</sub> 7,4 mM), 0,5 pmoles de oligonucleotídeo marcado; e 8 unidades de Thermo Sequenase DNA polimerase juntamente com 0,0012 unidades de pirofosfatase inorgânica de *Thermoplasma acidophilum*, em um volume final de 17,5 µl. Esta mistura de reação foi, então distribuída em quatros tubos (4 µl em cada) contendo 4µl das seguintes soluções:

Tubo G: 1,5 µM de ddGTP e 150 µM de cada dATP, dTTP e dCTP e 7-deaza-dGTP

Tubo A: 1,5 µM de ddATP e 150 µM de cada dATP, dTTP e dCTP e 7-deaza-dGTP

Tubo T: 1,5 µM de ddTTP e 150 µM de cada dATP, dTTP e dCTP e 7-deaza-dGTP

Tubo C: 1,5 µM de ddCTP e 150 µM de cada dATP, dTTP e dCTP e 7-deaza-dGTP

Foram, então, adicionados cerca de 10µl de óleo mineral sobre cada reação de terminação. Após uma breve centrifugação, foi iniciado o programa no termociclador que consistiu de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C a 62°C dependendo da temperatura de anelamento do oligonucleotídeo usado, por 30 segundos e 72°C por 45 segundos para extensão.

Após o término dos ciclos, foram adicionados 4 µl de solução de bloqueio contendo 95% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol.

### **c. Eletroforese em gel desnaturante**

A corrida eletroforética dos tubos de reação (G, A, T e C), obtidos a partir de ambos os protocolos acima descritos, foi realizada em gel de poli(acrilamida) a 6% na proporção de 19:1 acrilamida/bis acrilamida, em tampão TTE, uréia 7 M, persulfato de

amônio a 10% e 0,04% de TEMED. O gel foi preparado em placas de dimensões 38 cm X 50 cm com espaçadores de 0,4 mm de espessura e de gradiente de espessura com 0,25 mm até 0,4 mm. Foi utilizado como tampão de corrida, o tampão TTE (Tris 72 mM, pH 8,0, taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM).

Para a separação dos fragmentos marcados radioativamente o gel foi submetido a uma corrida eletroforética com potência constante de 80W (aproximadamente 50 mA e 1800 V), mantendo uma temperatura média de 50°C para melhores resultados. Para o aquecimento prévio do sistema de eletroforese foi feita uma pré corrida durante aproximadamente 2 horas nas mesmas condições.

Foram aplicados 4 µl de cada amostra previamente desnaturadas por 5 minutos a 94°C. A duração da corrida variou de 2 até 7 horas dependendo da região do DNA que se pretendia ler. Por fim, transferiu-se o gel para um papel de filtro 3MM que foi seco em secadora de gel a vácuo (Bio-Rad) durante 2 horas a 80°C. O gel foi mantido em contato com um filme de raio X, a temperatura ambiente, durante 3 a 5 dias quando usado [<sup>35</sup>S] e durante 1 dia quando usado [<sup>32</sup>P] e então revelado. As leituras foram feitas e as seqüências de DNA foram comparadas com a seqüência já descrita do gene (SCHMIDEL et al., 1990).

### **Estudo de polimorfismos**

Foram investigadas as prevalências de dois polimorfismos no gene da proteína S humana: o polimorfismo Heerlen e o dimorfismo neutro CCA/CCG Pro 626.

O polimorfismo Heerlen ocorre pela troca de uma única base T→C ocasionando a substituição de Ser 460→Pro no exon 13, criando um sítio de restrição para a enzima *Rsa I*, que reconhece a seqüência 5' GT↓AC 3' (BERTINA et al., 1990). Usando-se os primers do exon 13 descritos anteriormente, o fragmento amplificado é formado por 289 pares de bases. Na presença do nucleotídeo polimórfico C (GTAC), este fragmento é então digerido pela enzima *Rsa I* resultando em dois fragmentos, com 67 e 222 pares de bases. Conseqüentemente, na presença do nucleotídeo T (GTA↓), o fragmento de 289 pares de bases é mantido.

Foi feita a reação de digestão usando-se a enzima de restrição *Rsa I* (Pharmacia), misturando-se 8 µl do produto de PCR do exon 13 com 3 unidades de enzima *Rsa I* e tampão de reação (concentração final de Tris acetato 10 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM e acetato de potássio 50 mM). Incubou-se a 37°C durante a noite. As reações foram aplicadas em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta.

O outro polimorfismo estudado é considerado um dimorfismo neutro CCA/CCG em Pro 626 do exon 15 (DIEPSTRATEN et al., 1991), que cria um sítio de restrição para a enzima *BstX I*, a qual reconhece a seqüência 5' CCANNNNN↓NTGG 3'. Usando-se os primers do exon 15 descritos anteriormente, o fragmento amplificado é formado por 415 pares de bases. Na presença do trinucleotídeo CCA este fragmento é então digerido pela enzima *BstX I*, resultando em dois fragmentos, com 230 e 185 pares de bases. Conseqüentemente, na presença do trinucleotídeo CCG, o fragmento de 415 pares de bases é mantido.

Foi feita a reação de digestão usando-se a enzima de restrição *BstX I* (Gibco-BRL), misturando-se 8  $\mu$ l de produto de PCR do exon 15 com 3 unidades da enzima *BstX I* e tampão de reação (concentração final de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM). Incubou-se a 55°C durante a noite. As reações foram aplicadas em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta.

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

### Dosagens de proteína S

A avaliação dos níveis da proteína S dos pacientes estudados está demonstrada na tabela abaixo:

Pacientes	PS L	PS T	PS c	Classificação
1	N.A.	N.A.	46%	--
2	42%	79%	28%	Tipo I
3	31,5%	73,6%	26%	Tipo I
4	25%	61,5%	49%	Tipo I
5	50%	77%	50%	Tipo I
6	0%	71%	56%	Tipo I
7	50%	66,5%	78%	Tipo I
8	N.A.	N.A.	23%	--

**Tabela 2: Níveis de proteína S e classificação da deficiência dos pacientes estudados. (N.A. - não avaliado)**

### PCR, SSCP e CSGE

Para os oito pacientes estudados foram feitas as amplificações dos 15 exons incluindo as regiões intrônicas flanqueadoras.

A análise pelo SSCP dos oito pacientes estudados, demonstrou apenas um padrão eletroforético anormal no exon 2 do paciente 4, que foi confirmado pela presença de uma mutação que será melhor descrita posteriormente (Figura 10).

Com o emprego do CSGE, foram encontrados padrões eletroforéticos alterados no exon 2 dos pacientes 3 e 4 e a formação de heteroduplexes no exon 2 do paciente 6 e 342 e no exon 10 do paciente 5. Estas alterações foram confirmadas pela presença de mutações em todos esses pacientes, que serão discutidas posteriormente.

### **Mutações identificadas nos pacientes com deficiência de proteína S. Estudo familiar. Análise de polimorfismos.**

Os fragmentos que apresentaram um padrão eletroforético anormal em ambas as técnicas de triagem empregadas foram seqüenciados para a identificação da alteração molecular responsável por sua deficiência.

O seqüenciamento foi realizado a partir de novos produtos de PCR, com o intuito de se evitar que o padrão de migração anormal e a alteração molecular correspondente fossem resultado da incorporação errônea de nucleotídeos durante a amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR. Além disso, os seqüenciamentos foram repetidos mais de uma vez com amostras obtidas de produtos de PCR diferentes para a confirmação das mutações encontradas.

O seqüenciamento dos fragmentos com padrão anormal permitiu a identificação de sete mutações de ponto: seis mutações na região codificadora do gene da proteína

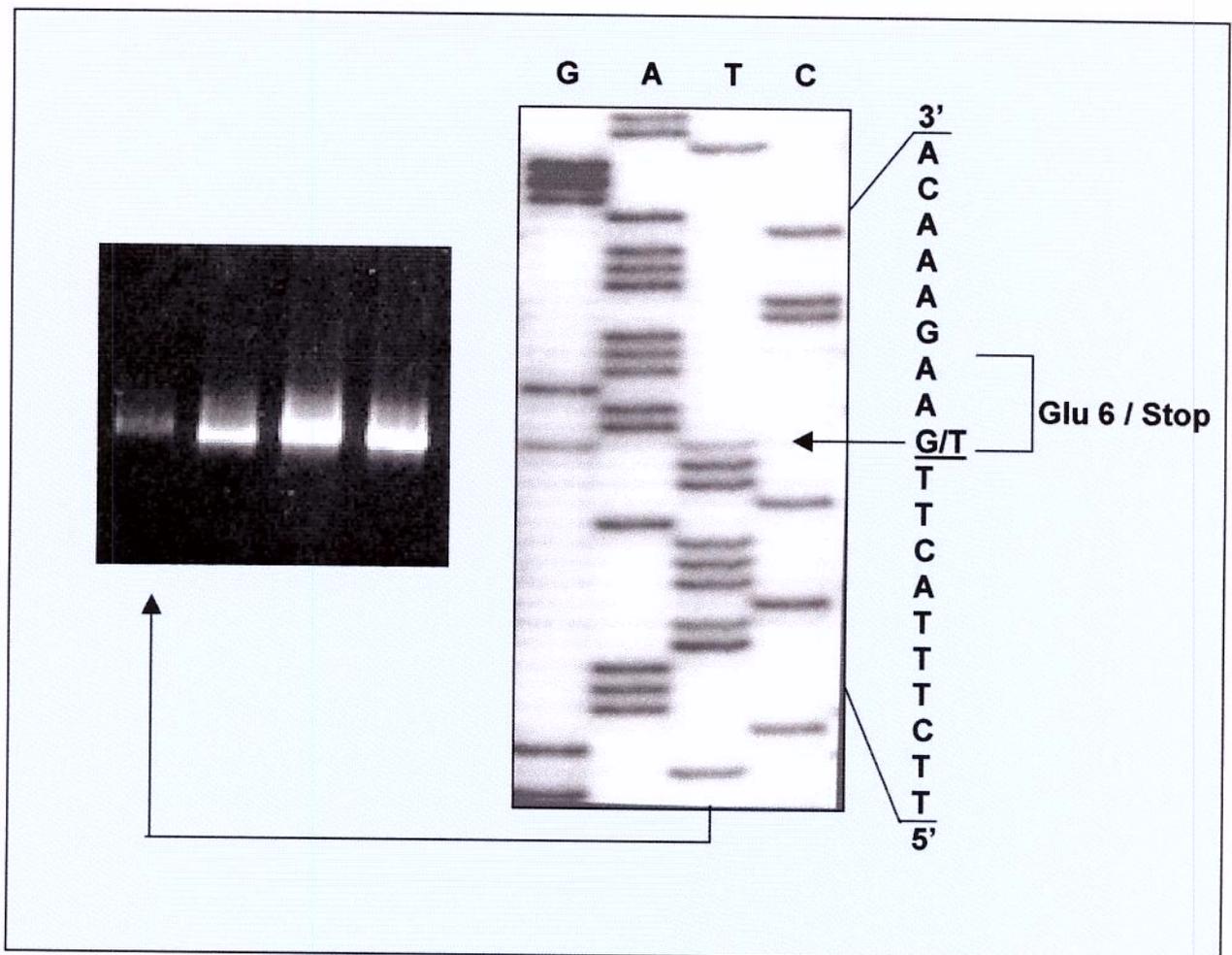
S (*PROS1*), incluindo uma mutação silenciosa, em quatro dos oito pacientes estudados e um polimorfismo num outro paciente. Não foi observada nenhuma deleção ou inserção nos pacientes estudados.

Alguns familiares dos pacientes foram estudados. Foram realizadas as dosagens de proteína S e foram feitas análises do DNA pelo seqüenciamento direto do produto de PCR. Foram feitas também as análises de dois polimorfismos: do exon 13 (polimorfismo Heerlen) e do exon 15 (polimorfismo neutro CCA/CCG) do gene da proteína S, nos pacientes e familiares.

Todos os pacientes estudados, bem como seus familiares, não apresentaram o polimorfismo Heerlen.

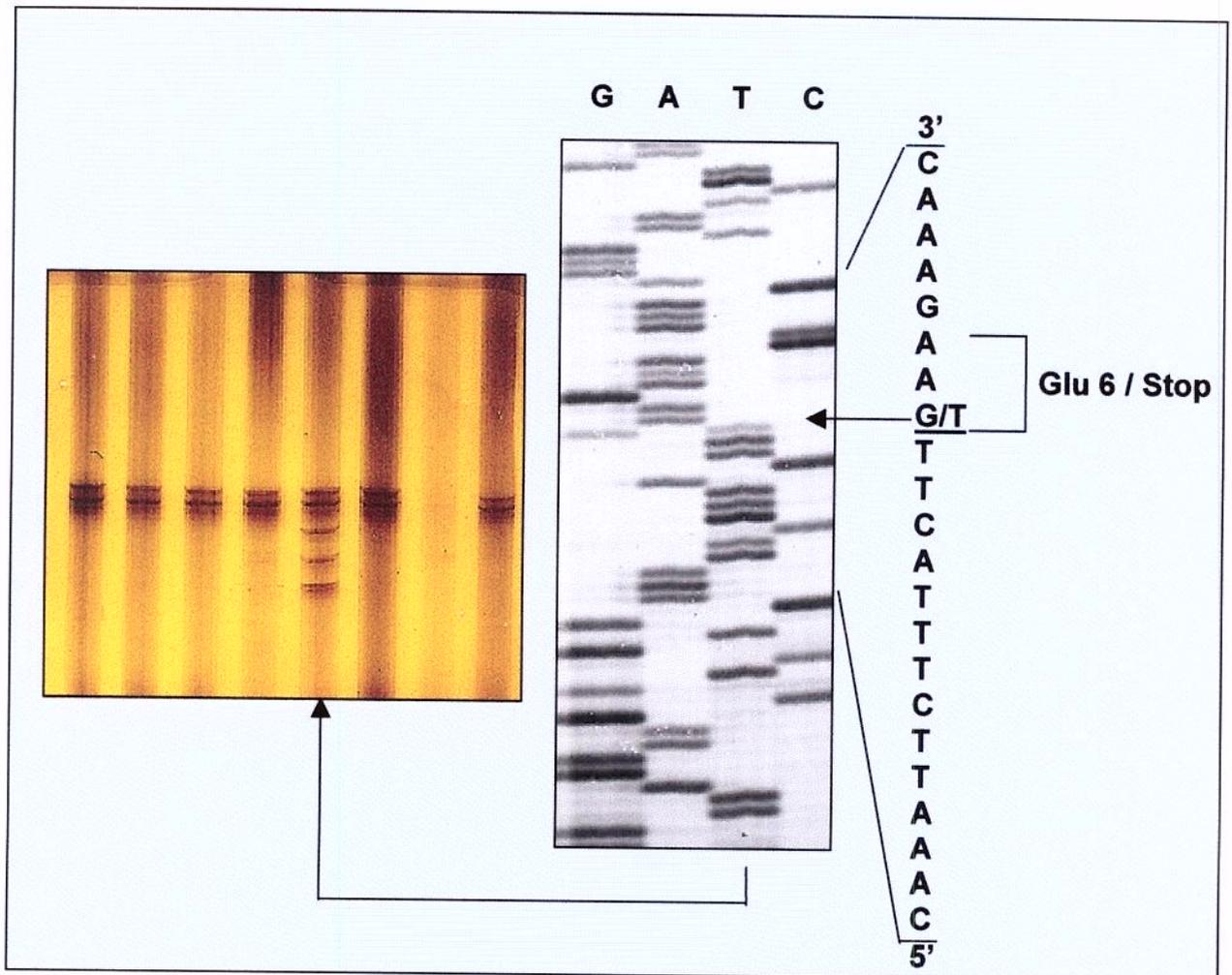
### **Paciente 3**

O paciente 3 apresentou uma mutação caracterizada por uma transversão G→T no primeiro nucleotídeo do codon correspondente ao aminoácido 6 no exon 2, levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico (GAA) por um codon de terminação precoce (TAA) (Figura 8). Esta é uma mutação nonsense, que interrompe a tradução precocemente. Este ácido glutâmico localizado na região vitamina K-dependente é o primeiro dos onze que são modificados pela  $\gamma$ -carboxilase para a formação do domínio Gla.



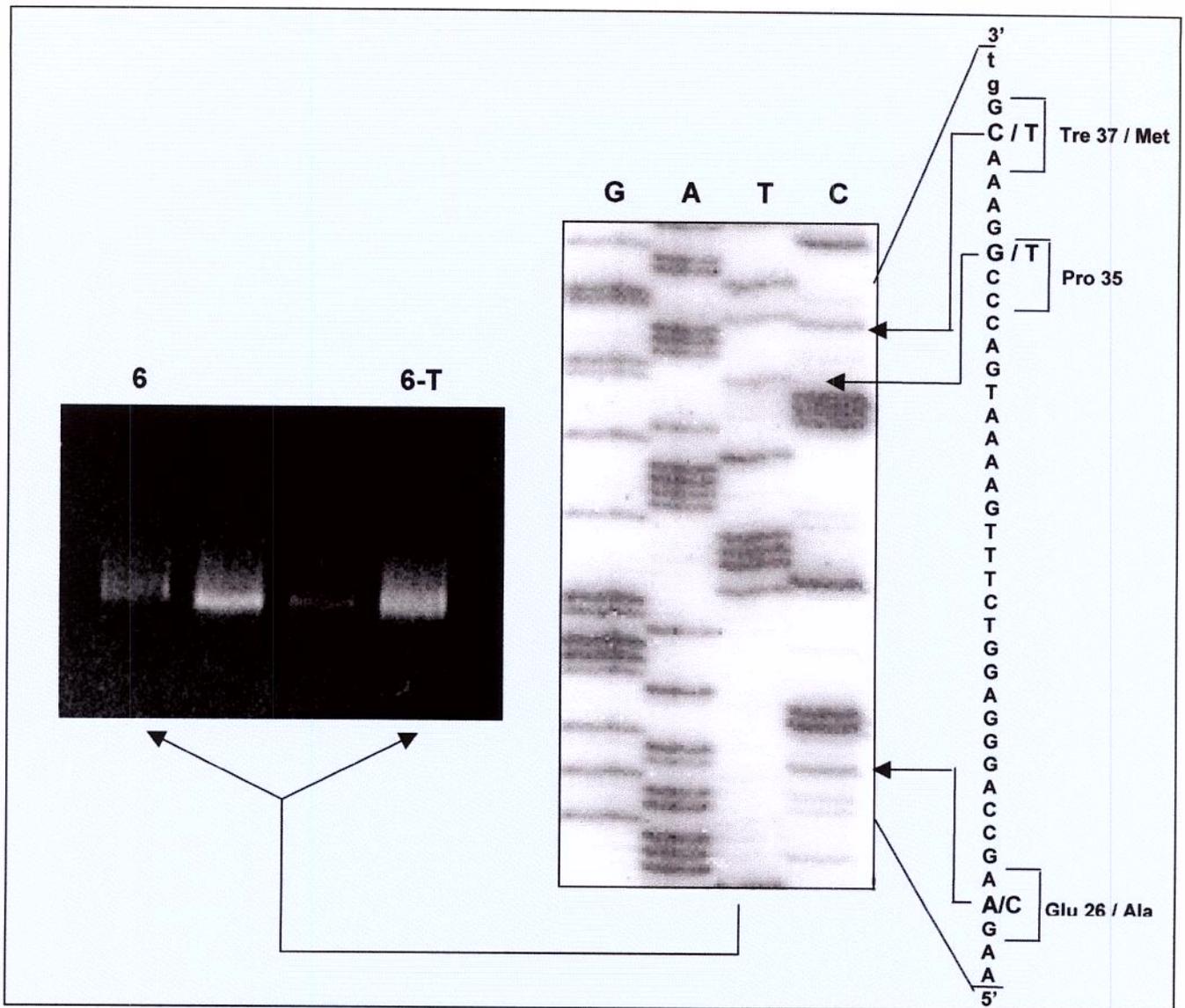
**Figura 8: Análise de CSGE do exon 2 e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR**

À esquerda, gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 2 do gene da proteína S, corado com brometo de etídeo. O fragmento de DNA do paciente 3, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, auto-radiografia de parte da seqüência nucleotídica do exon 2 do gene da proteína S do paciente 3. Esta alteração também foi encontrada no paciente 4. O seqüenciamento revelou a transversão G→T que resulta na formação de um codon de terminação precoce (TAA) na posição 6 correspondente ao resíduo ácido glutâmico (GAA).



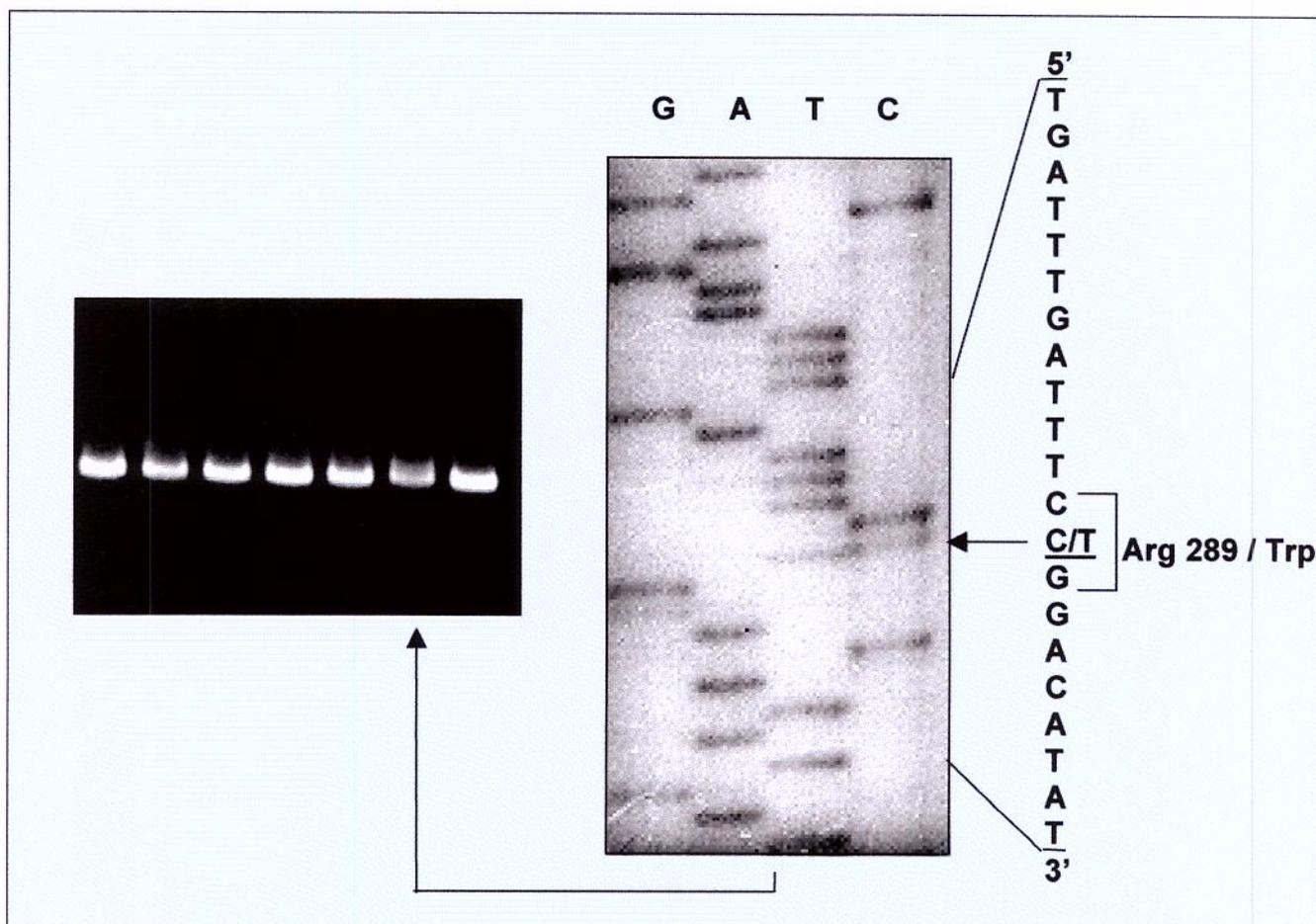
**Figura 10: Análise de SSCP do exon 2 e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR**

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 2 do gene da proteína S, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente 4, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, auto-radiografia de parte da seqüência nucleotídica do exon 2 do gene da proteína S do paciente 4. Esta mesma alteração foi encontrada no paciente 3. O seqüenciamento revelou a transversão G→T que resulta na formação de um codon de terminação precoce (TAA) na posição 6 correspondente ao resíduo ácido glutâmico (GAA).



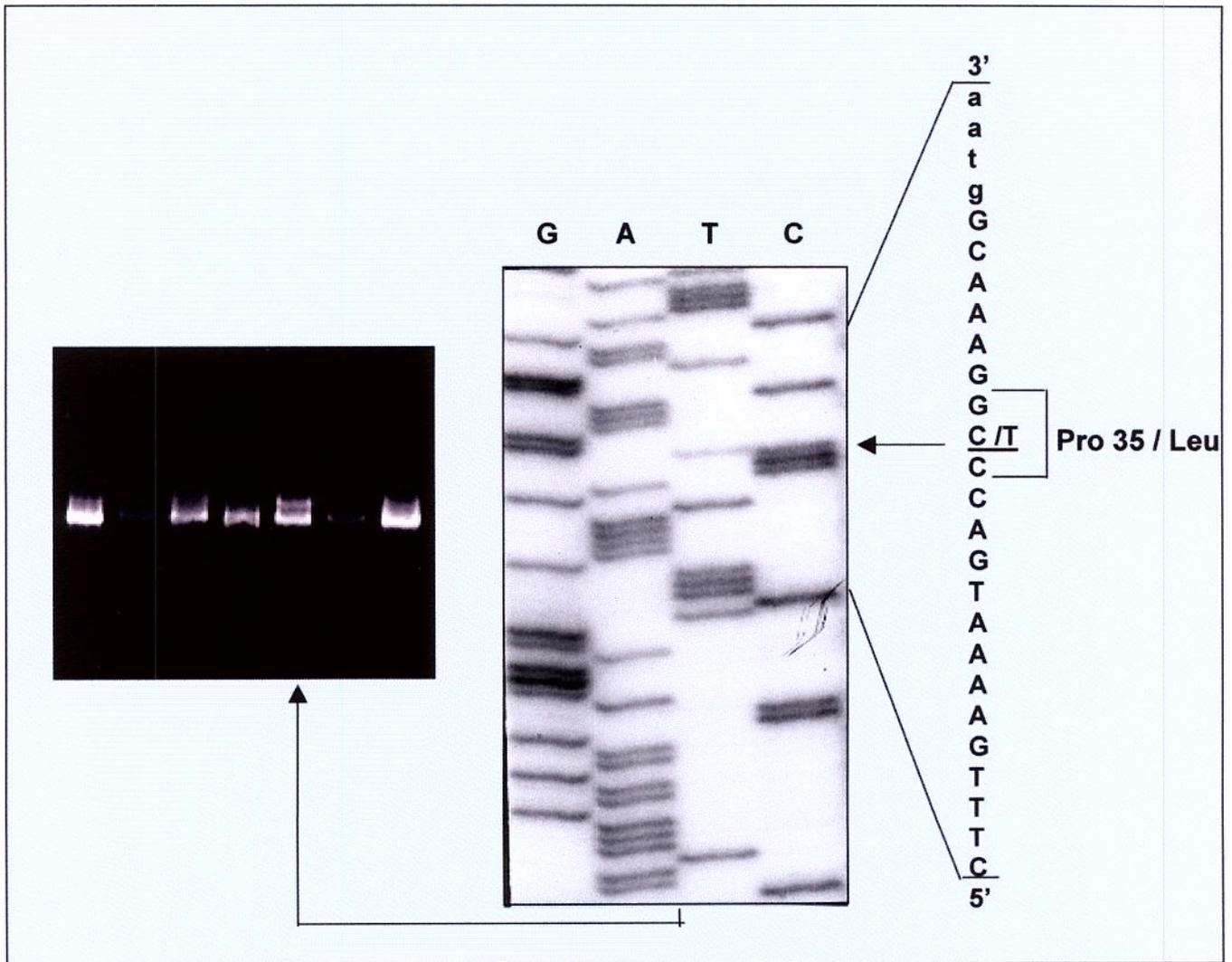
**Figura 12: Análise de CSGE do exon 2 e identificação das alterações moleculares por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR**

À esquerda, gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 2 do gene da proteína S corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA do paciente 6 e de sua irmã 6-T, apresentaram padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 2 do gene da proteína S do paciente 6. O seqüenciamento revelou três alterações nucleotídicas. Uma transversão A→C levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico (GAA) por alanina (GCA), uma transição C→T levando à substituição do aminoácido treonina (ACG) por metionina (ATG) e uma tranversão G→T no codon correspondente ao aminoácido Prolina 35 (CCG→CCT), caracterizada como uma mutação silenciosa.



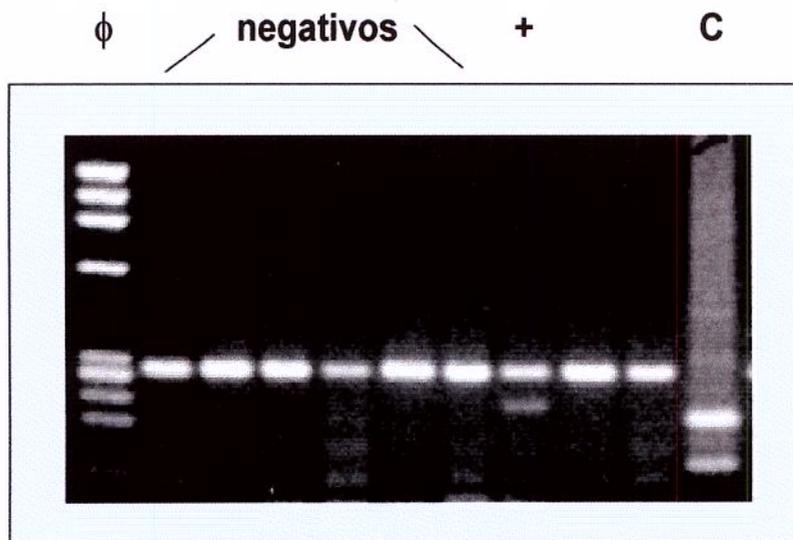
**Figura 14: Análise de CSGE do exon 10 e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR**

À esquerda, gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 10 do gene da proteína S corado com brometo de etídeo. O fragmento de DNA do paciente 5, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, auto-radiografia de parte da seqüência nucleotídica do exon 10 do gene da proteína S do paciente 5. O seqüenciamento revelou a transição C→T que resulta na substituição do resíduo de arginina (CGG) na posição 289 pelo resíduo triptofano (TGG).



**Figura 15: Análise de CSGE do exon 2 e identificação das alterações moleculares por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR**

À esquerda, gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 2 do gene da proteína S, corado com brometo de etídeo. O fragmento de DNA do paciente 7, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, auto-radiografia de parte da seqüência nucleotídica do exon 2 do gene da proteína S do paciente 7. O seqüenciamento revelou a transição C→T que resulta na substituição do resíduo prolina (CCG) na posição 35 para o resíduo leucina (CTG).



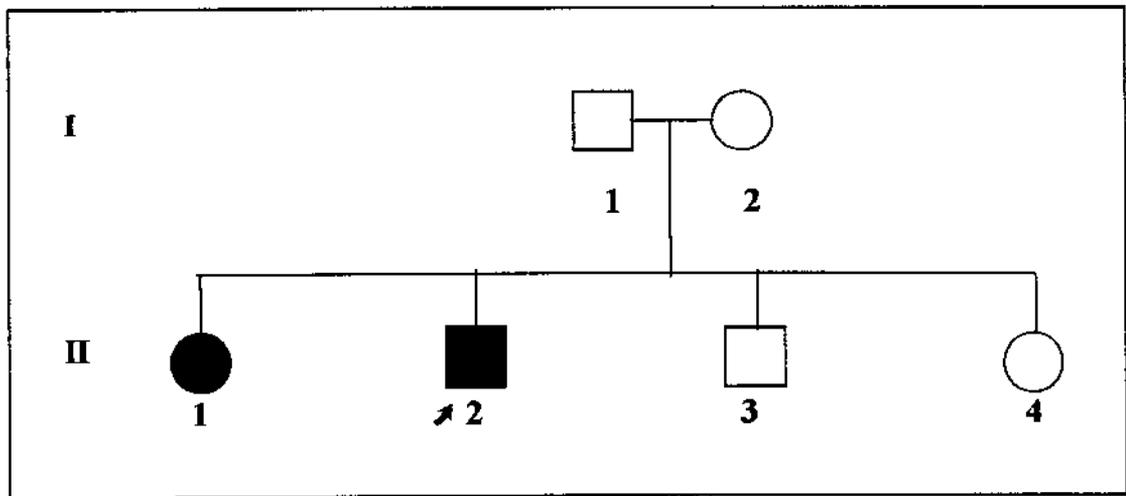
**Figura 17: Análise de restrição do exon 13, pela enzima *Rsa* I, demonstrando a presença (+) e a ausência do alelo Heerlen.  $\phi$  – marcador de peso molecular  $\phi$  X 174 digerido por *Hae* III. C – controle de digestão para a enzima *Rsa* I.**



**Figura 18: Digestão do exon 15 pela enzima *Bst*X I demonstrando os diferentes alelos do polimorfismo CCA/CCG.  $\phi$  marcador de peso molecular  $\phi$  X 174 digerido por *Hae* III.**

Alguns familiares do paciente 3 foram estudados e o seqüenciamento revelou que a mutação foi transmitida pela mãe a três de seus filhos (propósito, e suas duas irmãs) e somente um filho não possui a mutação (Figura 9). Nesta família foi verificada deficiência tipo I.

Com o estudo dos alelos CCA/CCG, foi possível saber que um dos alelos que contém o trinucleotídeo CCA é segregado com a doença, já que todos os membros da família que possuem a mutação possuem pelo menos um alelo CCA e a mãe que possui a mutação é homozigota para CCA e o pai que não possui a mutação tem os dois alelos com o trinucleotídeo CCG (Tabela 3).



**Figura 9: Heredograma da família do paciente 3.** (● ■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↯) Propósito

	PS c	Mutação	Polimorfismo Pro 626
I-1	N.E.	-	CCG/CCG
I-2	36%	+	CCA/CCA
II-1	69%	+	CCA/CCG
II-2	36%	+	CCA/CCG
II-3	80%	-	CCA/CCG
II-4	26%	+	CCA/CCG

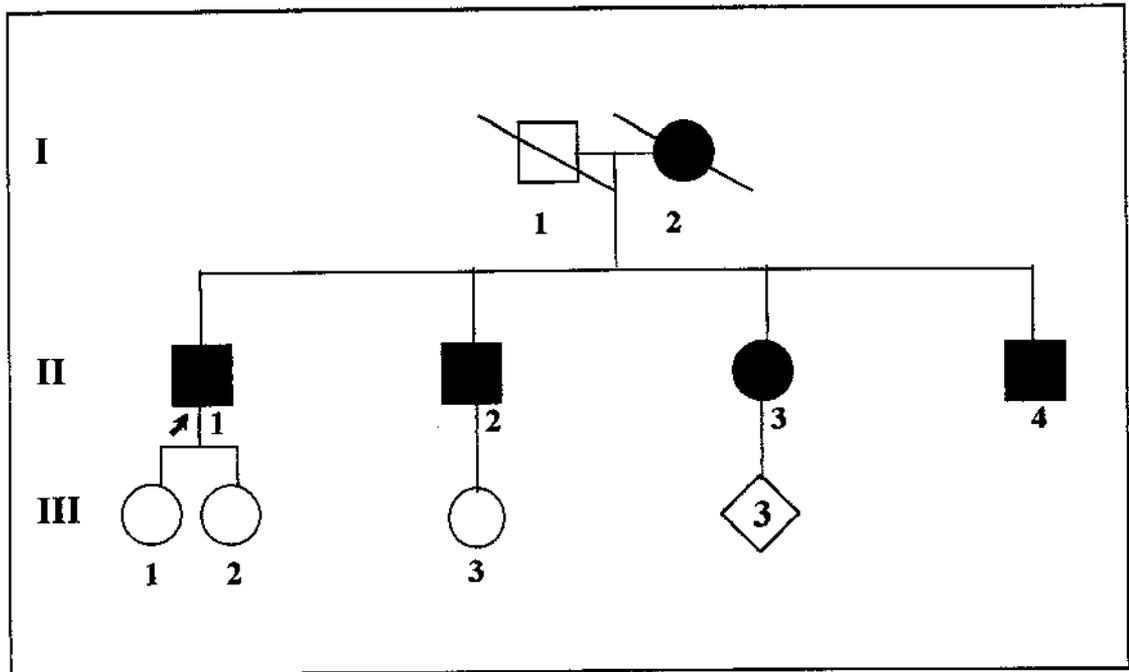
**Tabela 3: Polimorfismo e pesquisa da mutação na família do paciente 3.**  
(N.E. - não estudado)

#### **Paciente 4**

O paciente 4 apresentou a mesma mutação do paciente 3, caracterizada por uma transversão G→T no primeiro nucleotídeo do codon correspondente ao aminoácido 6 no exon 2, levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico (GAA) por um codon de terminação precoce (TAA). Esta é uma mutação nonsense, que interrompe a tradução precocemente (Figura 10).

No estudo familiar, o seqüenciamento revelou que todos os irmãos, os quais já tiveram episódios tromboembólicos, apresentavam a mesma mutação do paciente e eram deficientes em proteína S. Uma das filhas e uma sobrinha, embora apresentem a mutação e sejam deficientes em proteína S, ainda são assintomáticas. Somente uma outra filha, sem deficiência de proteína S, não apresentou a mutação (Figura 11). Nesta família foi verificada deficiência tipo I.

Com o estudo dos alelos CCA/CCG, foi possível determinar que o alelo que contém o trinucleotídeo CCA é segregado com a doença, já que todos os membros da família que possuem a mutação possuem pelo menos um alelo CCA e o único indivíduo normal tem os dois alelos com o trinucleotídeo CCG (Tabela 4).



**Figura 11: Heredograma da família do paciente 4.** (● ■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↗) Propósito

	PS c	Mutação	Polimorfismo Pro 626
II-1	49%	+	CCA/CCG
II-2	22%	+	CCA/CCG
II-3	N.E.	+	CCA/CCG
II-4	60%	+	CCA/CCG
III-1	N.E.	+	CCA/CCG
III-2	83%	-	CCG/CCG
III-3	42%	+	CCA/CCA

**Tabela 4: Polimorfismo e pesquisa da mutação na família do paciente 4.**  
(N.E. - não estudado)

## Paciente 6

O paciente 6 apresentou duas mutações (Figura 12): a primeira caracterizada por uma transversão A→C na segunda base do codon correspondente ao aminoácido 26 no exon 2, levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico (GAA) por alanina (GCA), a segunda mutação foi uma transição C→T na segunda base do codon correspondente ao aminoácido 37 no exon 2, levando à substituição do aminoácido treonina (ACG) por metionina (ATG). Estas duas alterações são mutações missense e o alinhamento entre as seqüências de proteínas S de diferentes espécies de mamíferos e das proteínas vitamina K-dependentes mostrou que estas mutações ocorreram em aminoácidos completamente conservados, sugerindo um papel estrutural ou funcional para esses resíduos, sendo relevante como a causa da deficiência (Quadro 1).

Além dessas duas mutações o paciente 6 também apresentou uma transversão G→T na terceira base do codon correspondente ao aminoácido 35, uma prolina (CCG→CCT), no exon 2, caracterizada como uma mutação silenciosa (Figura 12).

Alguns familiares do paciente 6 foram estudados e o seqüenciamento revelou que as três alterações moleculares estavam presentes somente no propósito e em uma irmã, a qual teve episódio tromboembólico e é deficiente em proteína S (Figura 13). Nesta família foi verificada deficiência tipo I.

Para esta família não foi possível avaliar se havia segregação do polimorfismo com a doença, uma vez que os pais do propósito não puderam ser estudados e nenhum dos filhos ou sobrinhos estudados apresentaram a mutação (Tabela 5).

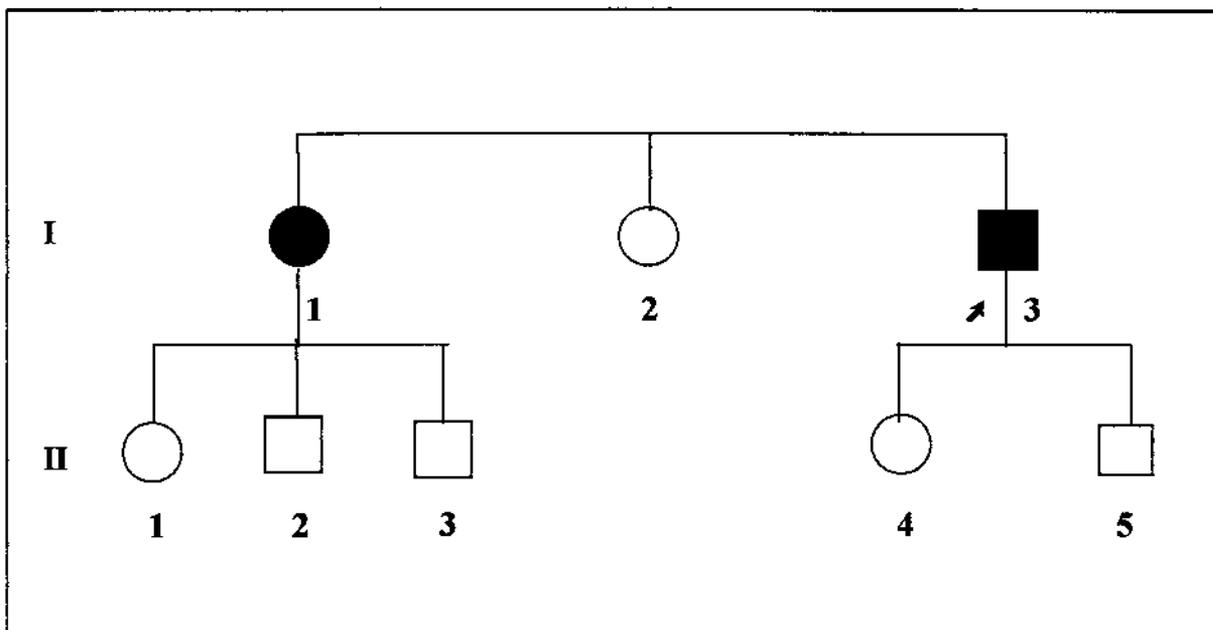
**Quadro 1: Alinhamento de aminoácidos de proteínas S de diferentes espécies e das proteínas vitamina K-dependentes**

	+ - * + + + * + - * * * - * * + - * + * *
Proteína S humana (aa 22-42)	CNKE <b>E</b> AREVFENDPE <b>T</b> DYFYP
Proteína S bovina (aa 22-42)	CNKE <b>E</b> AREIFENNPE <b>T</b> EYFYP
Proteína S de camundongo (aa 22-42)	CNKE <b>E</b> AREVFENNPE <b>T</b> DYFYP
Proteína S de macaco Rhesus (aa 22-42)	CNKE <b>E</b> AREVFENDPE <b>T</b> DYFYP
Proteína S de coelho (aa 22-42)	CNKE <b>E</b> AREVFENDPE <b>T</b> DYFYP
Proteína S de porco (aa 22-42)	CSKE <b>E</b> AREVFENDPE <b>T</b> EYFYP
Protrombina (aa 22-42)	CSYE <b>E</b> AFEALESSTA <b>T</b> DVFWA
Fator VII (aa 22-42)	CSFE <b>E</b> AREIFKDAER <b>T</b> KLFWI
Fator IX (aa 23-43)	CSFE <b>E</b> AREVFENTER <b>T</b> TEFWK
Proteína C (aa-22-42)	CDFE <b>E</b> AKEIFQNVDD <b>T</b> LAFWS
	<b>G l u 2 6 A l a      T h r 2 7 M e t</b>

(\*) Aminoácidos conservados entre as seis espécies de mamíferos alinhadas

(+) Aminoácidos conservados entre as seis espécies de mamíferos e SHBG e ABP

(-) Aminoácidos não conservados



**Figura 13: Heredograma da família do paciente 6.** (● ■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↗) Propósito

	PS c	Mutações	Polimorfismo Pro 626
I-1	N.E.	+	CCA/CCA
I-2	80%	-	CCA/CCA
I-3	56%	+	CCA/CCA
II-1	100%	-	CCA/CCA
II-2	N.E.	-	CCA/CCG
II-3	98%	-	CCA/CCA
II-4	N.E.	N.E.	N.E.
II-5	N.E.	-	CCA/CCG

**Tabela 5: Polimorfismos e pesquisa de mutações na família do paciente 6.**  
(N.E. - não estudado)

## Paciente 5

O paciente 5 apresentou uma mutação caracterizada por uma transição C→T no primeiro nucleotídeo do codon correspondente ao aminoácido 289 no exon 10 levando à substituição do aminoácido arginina (CGG) por triptofano (TGG) (Figura 14). Esta é uma mutação missense. Este nucleotídeo mutado está presente numa posição equivalente no pseudogene, contudo, está descartada a hipótese de termos amplificado o pseudogene, pois nesta região há outras bases diferentes que compõem o pseudogene, em relação ao gene, e que não estão presentes no seqüenciamento. Como o exon 10 codifica parte do domínio SHBG, foi feito o alinhamento entre proteínas S de diferentes espécies de mamíferos e também da proteína SHBG (globulina de ligação de hormônios esteróides) humana e a proteína ABP (proteína de ligação de andrógenos) de rato, que também é homóloga à SHBG humana. O alinhamento demonstrou que esta mutação ocorreu em um aminoácido completamente conservado, sugerindo um papel estrutural ou funcional para esse resíduo, sendo relevante como a causa da deficiência (Quadro 2).

Este paciente tem apenas um irmão vivo, dentre os seus familiares, cujo produto de PCR do exon 10 foi seqüenciado e demonstrou a mesma mutação apresentada pelo paciente. Este irmão, no entanto não teve nenhum episódio trombótico, mas infelizmente não pudemos dosar seus níveis de proteína S. A presença de mutação e análise do polimorfismo CCA/CCG, nesta irmandade se encontra na Tabela 6.

**Quadro 2: Alinhamento de aminoácidos de proteínas S de diferentes espécies, SHBG e ABP.**

	- - * * + * * + * * + + * + * - + + + * +
Proteína S humana (aa 279-299)	I S R F S A E F D F <b>R</b> T Y D S E G V I L Y
Proteína S bovina (aa 279-299)	T T R F S A E F D F <b>R</b> T Y D S E G V I L Y
Proteína S de camundongo (aa 279-299)	I T R F S A E F D F <b>R</b> T Y D S E G V I L Y
Proteína S de macaco Rhesus (aa 279-299)	I S R F S A E F D F <b>R</b> T Y D S Q G V I L Y
Proteína S de coelho (aa 279-299)	I T R F S A E F D F <b>R</b> T Y D S E G V I L Y
Proteína S de porco (aa 279-299)	I T R F S A E F D F <b>R</b> T Y D S E G V I L Y
SHBG humana (aa 37-57)	I T K T S S S F E V <b>R</b> T W D P E G V I F Y
ABP de rato (aa 37-57)	I S K P S S S F E F <b>R</b> T W D P E G V I F Y
	<b>A r g 2 8 9 T r p</b>

- (\*) Aminoácidos conservados entre as seis espécies de mamíferos alinhadas
- (+) Aminoácidos conservados entre as seis espécies de mamíferos e SHBG e ABP
- (-) Aminoácidos não conservados

	PS c	Mutação	Polimorfismo Pro 626
Paciente	40%	+	CCA/CCA
Irmão	N.E.	+	CCA/CCA

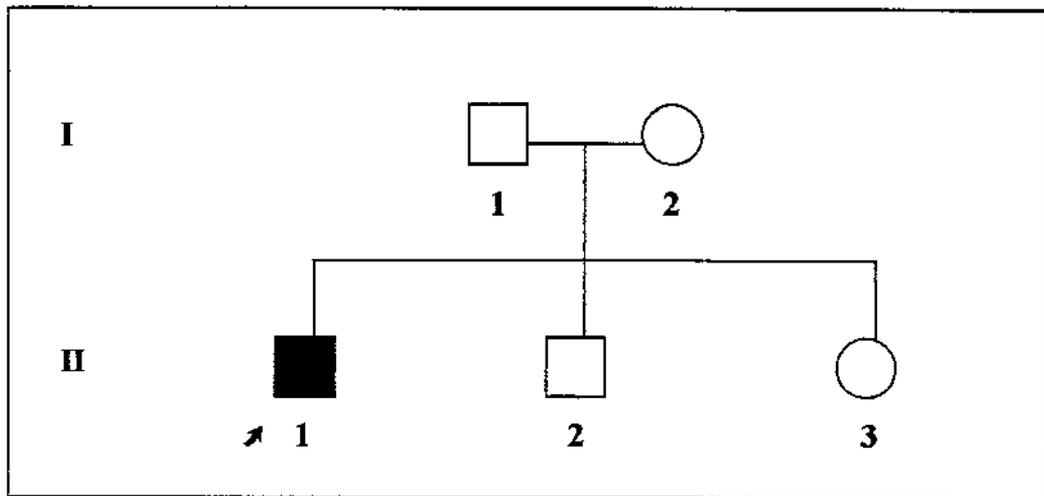
**Tabela 6: Polimorfismos e pesquisa da mutação na família do paciente 5.**  
(N.E. - não estudado)

## Paciente 7

O paciente 7 apresentou uma alteração nucleotídica caracterizada por uma transição C→T no segundo nucleotídeo do codon correspondente ao aminoácido 35 no exon 2, levando à substituição do aminoácido prolina (CCG) por leucina (CTG). Esta alteração foi classificada como um polimorfismo por estar presente em dois indivíduos de uma população de 100 indivíduos normais (GANDRILLE et al. 1995). (Figura 15).

Alguns familiares do paciente 7 foram estudados e o seqüenciamento revelou que este polimorfismo foi transmitido pelo pai somente para o propósito e que os dois têm níveis de proteína S coagulante reduzidos quando comparados com os demais membros da família (Figura 16). Nesta família foi verificada deficiência tipo I.

Com o estudo dos alelos CCA/CCG, foi possível saber que um dos alelos que contém o trinucleotídeo CCA é segregado com a doença, já que o pai, homozigoto para o alelo CCA possui a mutação transmitindo-a para seu filho, sendo que a mãe não possui a mutação e é homozigota para o alelo CCG (Tabela 7).



**Figura. 16: Heredograma da família do paciente 7. (● ■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↗) Propósito**

	PS c	Mutação	Polimorfismo Pro 626
I-1	76%	+	CCA/CCA
I-2	140%	-	CCG/CCG
II-1	78%	+	CCA/CCG
II-2	107%	-	CCA/CCG
II-3	88%	-	CCA/CCG

**Tabela 7: Polimorfismos e pesquisa da mutação na família do paciente 7.**

**Tabela 8: Alterações moleculares identificadas no gene da Proteína S.**

<b>Paciente</b>	<b>Alteração nucleotídica</b>	<b>Alteração no aminoácido</b>	<b>Domínio funcional</b>	<b>CpG</b>
<b>3</b>	G→T	6, Glu→Stop *	Gla	não
<b>4</b>	G→T	6, Glu→Stop *	Gla	não
<b>6</b>	A→C	26, Glu→Ala	Gla	não
	G→T	35, Pro→Pro *	Silenciosa	sim
	C→T	37, Tre→Met	Gla	sim
<b>7</b>	C→T	35, Pro→Leu	Gla	sim
<b>5</b>	C→T	289, Arg→Trp *	SHBG	sim

**(\*) mutações não descritas anteriormente**

## **Análise de polimorfismos em diferentes populações**

Foram estudadas as freqüências de dois polimorfismos do gene da proteína S, o polimorfismo Heerlen no exon 13 e o polimorfismo neutro CCA/CCG no exon 15, em vários grupos étnicos da população brasileira, uma vez que não há estudos prévios em nossa população. Também foi avaliado um grupo de pacientes com trombose, para verificar se esses polimorfismos se comportam como um fator de risco. As análises de restrição destes polimorfismos estão demonstradas nas Figuras 17 e 18.

Para a análise do polimorfismo Heerlen foram estudados 102 recém-nascidos, 108 negróides, 100 caucasóides, 78 índios e 573 pacientes que apresentaram trombose. As freqüências encontradas estão demonstradas na Tabela 9. Não houve diferença significativa na freqüência dos genótipos, entre as diversas populações estudadas.

Para a análise do polimorfismo CCA/CCG foram estudados 100 recém-nascidos, 100 negróides, 94 caucasóides, 85 índios e 450 pacientes que apresentaram algum tipo de trombose. As freqüências encontradas estão demonstradas na Tabela 10.

A comparação da freqüência genotípica entre as diversas populações mostrou diferenças significativas. Assim, a freqüência de pacientes heterozigotos com trombose foi significativamente maior quando comparada aos recém-nascidos ( $p=0,04$ ) e caucasóides ( $p=0,037$ ). A freqüência de heterozigotos no grupo negróide foi significativamente maior em relação ao grupo de caucasóides ( $p<0,01$ ), de recém-nascidos ( $p<0,01$ ) e de pacientes com trombose ( $p=0,03$ ). A freqüência de homozigotos

CCG no grupo de negróides foi significativamente maior , quando comparada ao grupo de caucasóides ( $p < 0,01$ ), de recém-nascidos ( $p < 0,01$ ) e de pacientes com trombose ( $p < 0,01$ ).

As freqüências e o teste do qui-quadrado para verificar se as populações estão ou não em equilíbrio de Hardy e Weinberg estão demonstradas na Tabela 10. O teste do  $\chi^2$  mostrou que apenas a população de recém nascidos e caucasóides estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg.

<b>População</b>	<b>T/T</b>	<b>T/C (Heerlen)</b>	<b>C/C</b>
<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>
<b>Recém-nascidos (103)</b>	99,03% (102)	0,97% (1)	--
<b>Caucasóides (100)</b>	100% (100)	0% (0)	--
<b>Negróides (108)</b>	99,08% (107)	0,92% (1)	--
<b>Índios (78)</b>	100% (78)	0% (0)	--
<b>Tromboses (581)</b>	98,6% (573)	1,4% (8)	--

**Tabela 9: Frequência do polimorfismo Heerlen em diferentes populações.**

<b>População</b>	<b>CCA/CCA</b>	<b>CCA/CCG</b>	<b>CCG/CCG</b>	<b>Freq. dos Alelos</b>		$\chi^2$
				<b>CCA</b>	<b>CCG</b>	
<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>			
<b>Recém-nascidos (101)</b>	35,64% (36)	48,51% (49)	15,84% (16)	0,599	0,401	0,0099
<b>Negróides (88)</b>	22,73% (20)	76,13% (67)	1,13% (1)	0,608	0,392	31,35
<b>Caucasóides (90)</b>	36,66% (33)	47,77% (43)	15,55% (14)	0,605	0,395	0,00023
<b>Índios (84)</b>	1,19% (1)	60,71% (51)	38,10% (32)	0,315	0,685	13,84
<b>Tromboses (432)</b>	26,62% (115)	59,72% (258)	13,65% (59)	0,565	0,435	19,92

**Tabela 10: Frequência do polimorfismo CCA/CCG em diferentes populações.**

**DISCUSSÃO**

## **DISCUSSÃO**

A proteína S humana é uma glicoproteína plasmática vitamina K-dependente que age como cofator não enzimático da proteína C ativada na Via Anticoagulante da Proteína C, que degrada proteoliticamente os fatores procoagulantes V e VIII ativados. Além disso a proteína S desempenha um papel independente da proteína C ativada inativando os fatores V ativado e X ativado. A proteína S desempenha um importante papel na anticoagulação natural, já que sua deficiência desencadeia complicações tromboembólicas.

A deficiência hereditária de Proteína S é uma causa comum de trombose venosa recorrente, e ocorre pela diminuição da atividade coagulante da proteína S. É uma doença relativamente rara e tem padrão de herança autossômico dominante. O diagnóstico de deficiência de proteína S foi concluído a partir de dados clínicos e laboratoriais, através das dosagens de proteína S total e livre por imunoelektroforese tipo "rocket" e de sua atividade pelo método de coagulação. Esses parâmetros classificam as deficiências de proteína S em três tipos: a deficiência Tipo I é caracterizada pela redução nos níveis plasmáticos da proteína S, tanto na sua forma total como na sua forma livre; deficiência tipicamente quantitativa; a Tipo II é caracterizado apenas pela redução da atividade, que significa a presença de uma variante funcional da proteína S; deficiência tipicamente qualitativa e a Tipo III é caracterizada por uma diminuição da concentração da proteína S livre enquanto a concentração de proteína S total é normal.

O gene que controla a produção da proteína S (*PROS1*) está localizado no cromossomo 3, próximo a região do centrômero na posição 3p11.1 - 3q11.2. É

constituído por 15 exons e 14 introns abrangendo uma região de mais de 80 kb. Nesta mesma região do cromossomo 3 há um pseudogene (*PROS2*) que possui 97% de homologia com a região codificadora do gene ativo.

A maior dificuldade de estudar o gene ativo da proteína S (*PROS 1*) é a discriminação do *PROS 1* do seu pseudogene *PROS 2*. Uma forma de se evitar o engano, é analisar o cDNA a partir do mRNA, que é produto somente do *PROS1*, e consome menos tempo que estudar os 15 exons separadamente.

A proteína S é sintetizada pelos megacariócitos, e as plaquetas contêm mRNA residual que tem sido usado para pesquisa de mutações. A estratégia de rastreamento utilizando RT-PCR pode identificar rapidamente mutações responsáveis pelas deficiências de proteína S tipo I e tipo II. No entanto, a exclusão alélica é freqüente em pacientes com deficiência tipo I. Portanto, a melhor maneira de detectar mutações responsáveis pela deficiência de proteína S tipo I, mesmo consumindo mais tempo, é a amplificação de cada exon usando oligonucleotídeos específicos para o gene ativo.

De acordo com o "database" de mutações no gene da proteína S, publicado em 1997 por GANDRILLE et al., foram descritas 71 mutações de ponto diferentes sendo que 19,8% das substituições nucleotídicas encontradas nos propósitos eram mutações nonsense, 65,3% eram mutações missense, 12,8% eram mutações em sítio de "splicing" e 2% aboliam o codon de terminação natural da proteína. Dentre estas mutações somente 5,5% ocorreram em dinucleotídeos CpG e eram transições C→T ou G→A, compatíveis com o modelo de desaminação mediado pela metilação (BIRD, 1986); esta porcentagem é muito baixa quando comparada com a proporção de 32%

em mutações responsáveis pela deficiência de proteína C (REITSMA et al., 1995). A distribuição das mutações não está correlacionada com a distribuição de CpG no gene *PROS 1*.

Neste trabalho foram estudados 8 pacientes com deficiência de proteína S que apresentaram trombose espontânea. Outras deficiências ou alterações que predispõem à trombose foram avaliadas e excluídas.

Para o rastreamento de mutações no gene da proteína S (*PROS 1*), a partir de produtos de PCR de todos os exons e regiões intrônicas flanqueadoras de todos os pacientes, foi feita a análise por SSCP e CSGE. Com o uso do método de SSCP foi possível detectar somente um padrão anormal entre os pacientes estudados. Como esta técnica não se mostrou eficaz no rastreamento de possíveis alterações moleculares, empregou-se a técnica de CSGE, que demonstrou ser um método mais sensível que o SSCP, já que foram identificados seis padrões anormais de eletroforese entre os oito pacientes estudados.

A variação do padrão eletroforético do SSCP é muito sensível a pequenas variações de temperatura. Como utilizamos sempre as mesmas condições de temperatura, talvez isto explique a baixa sensibilidade deste método para o rastreamento de alterações moleculares em nossos pacientes com deficiência de proteína S. Pode ser que se tivéssemos feito corridas eletroforéticas com outras temperaturas verificássemos padrões anormais. Contudo, o fator limitante deveu-se ao número de exons e de pacientes a serem estudados. Por outro lado, o CSGE, apesar de ser um método tecnicamente mais difícil que o SSCP, mostrou-se muito mais

sensível para detecção de alterações moleculares no gene da proteína S, constituindo-se no método de escolha para estudo posterior de outros pacientes do nosso serviço.

Para detecção de alterações moleculares no gene da proteína S, em grupos de pacientes previamente selecionados, vem sendo empregadas diferentes metodologias, entre elas, RT-PCR, DGGE, seqüenciamento direto e seqüenciamento direto em fase sólida. Com o emprego da RT-PCR foram identificadas mutações em 70% dos pacientes analisados; com o método de DGGE, 15%, embora não tenha sido analisada toda a região codificadora; o seqüenciamento direto foi a estratégia empregada por três autores diferentes, tendo 62,5%, 53% e 90% de eficiência, e com o seqüenciamento direto em fase sólida foram identificadas mutações em 42% dos pacientes analisados (revisto por SIMMONDS et al., 1996). Recentemente, um estudo utilizando o SSCP como método de triagem descreveu três novas alterações moleculares encontradas em cinco, de um total de seis famílias estudadas (BUSTORFF et al., 1997). Neste trabalho, com o emprego do CSGE, foi possível identificar mutações em 50% dos pacientes analisados, além de uma mutação silenciosa e um polimorfismo.

A diferença na porcentagem de mutações identificadas nos diversos trabalhos pode ser explicada pelo emprego de diferentes métodos de triagem, pelos critérios de seleção dos pacientes, além do diagnóstico confirmado de deficiência de proteína S. Nesta situação, o estudo familiar contribui para uma melhor identificação da deficiência hereditária de proteína S. É importante citar um artigo publicado recentemente por BRUNET et al. (1998), que demonstra as dificuldades para um diagnóstico preciso de deficiência de proteína S. Descreveu-se que pacientes classificados como deficientes em proteína S tipo II, nos quais não se verificou nenhuma mutação genética, em

avaliação posterior, apresentavam níveis normais de proteína S. Neste sentido, ao iniciarmos nosso trabalho, a casuística era composta por 16 pacientes com provável diagnóstico de deficiência de proteína S. Contudo, este diagnóstico só pode ser confirmado em 8 pacientes, que foram investigados neste estudo. Além disso, nenhum deles é portador do fator V de Leiden, que poderia levar a um falso diagnóstico de deficiência de proteína S.

Com o emprego do CSGE foram identificados cinco padrões anormais que foram caracterizados posteriormente pelo seqüenciamento. Estes padrões estavam presentes em cinco dos oito pacientes estudados e no seqüenciamento revelaram sete alterações moleculares (seis diferentes). Dentre elas, cinco possivelmente devem ser a causa da deficiência de proteína S de quatro pacientes.

Com o seqüenciamento, nos pacientes 3 e 4, não relacionados, foi encontrada uma mesma mutação, uma transversão G→T substituindo o aminoácido ácido glutâmico por um codon de terminação precoce (Glu 6 Stop). Esta mutação encontrada no exon 2, que é responsável pelo domínio Gla, ainda não foi descrita na literatura. Esta mutação, nonsense, pode ser considerada uma mutação deletéria já que interrompe a tradução precocemente caso este alelo seja expresso, a cadeia polipeptídica pode ser truncada e talvez nem seja secretada pelo retículo endoplasmático, devido a não-maturação conformacional. Talvez o estudo do mRNA elucidasse o que realmente acontece neste caso. Esta mutação pode explicar a deficiência tipo I nestas famílias já que codons de terminação prematuros têm efeitos deletérios graves na expressão gênica. A relação causal entre esta mutação e a deficiência de proteína S é clara, indicando a natureza dessa alteração, já que houve segregação entre a anormalidade

genética, os níveis reduzidos de proteína S e o quadro de trombose, nestes pacientes e seus familiares. As duas crianças, da família do paciente 49, portadoras desta mutação, embora deficientes em proteína S, são assintomáticas, confirmando que a deficiência hereditária de proteína S deve ser um fator de risco para trombose, principalmente em adultos.

Diante da presença da mesma mutação em dois pacientes, os mesmos foram interrogados quanto a um ancestral comum. Apesar de não ter sido possível a identificação concreta desse fato, esta hipótese não está descartada, já que um dos pacientes é do Estado de Minas Gerais e os avós maternos do outro paciente também moravam no mesmo Estado, indicando, talvez, um possível efeito do fundador.

No paciente 5 foi encontrada uma nova mutação Arg 289 Trp, causada por uma transição C→T, no exon 10, que é responsável pela codificação de parte do domínio SHBG, o maior domínio da proteína S. Esta mutação missense leva à troca de um aminoácido carregado (Arg) por um aminoácido apolar (Trp), que pode resultar na interrupção das interações eletrostáticas, levando à alteração da estrutura terciária da proteína. Além disso, o aminoácido arginina 289 é completamente conservado em todas as seqüências de proteína S descritas em outros mamíferos, e também se encontra conservado em proteínas evolutivamente mais distantes como a proteína SHBG humana e ABP de rato. Esta conservação reflete um papel funcional ou estrutural importante para este aminoácido. Por outro lado, embora esta mutação esteja presente neste paciente deficiente em proteína S, para verificarmos se esta mutação é a responsável por sua deficiência, seria importante a dosagem de proteína S de seu

único irmão, que é portador da mesma mutação para confirmar a segregação da alteração molecular com níveis diminuídos de proteína S e quadro de trombose.

O paciente 81 apresentou três alterações moleculares e duas delas são mutações missense. Uma transversão A→C ocasionando a troca Glu 26→Ala e uma transição C→T ocasionando a troca Thr 37→Met, que já haviam sido descritas na literatura por GANDRILLE et al. (1995) e SIMMONDS et al. (1996). Além destas duas mutações foi identificada uma alteração nucleotídica silenciosa, caracterizada por uma transição G→T no terceiro nucleotídeo do codon 35 no exon 2, correspondente ao aminoácido prolina (CCG→CCT). Nesta mesma posição foi descrita anteriormente uma transversão G→A, mantendo o aminoácido prolina (SIMMONDS et al., 1996).

As mutações Glu 26→Ala e Thr 37→Met demonstraram um efeito detrimental nos dois indivíduos desta família, já que foram segregadas com a deficiência de proteína S e quadro de trombose. No alinhamento da proteína S humana com outras proteínas S descritas e também com as proteínas vitamina K-dependentes, esses aminoácidos se mostraram completamente conservados e provavelmente têm um papel importante na estrutura, conformação e função dessas proteínas. Mutações de Glu 27 (Glu 27→Val) ou Thr 38 (Thr 38→Arg) do fator IX, que correspondem a Glu 26 e Thr 37 da proteína S, respectivamente, estão associadas a quadro de hemofilia B severa. Os aminoácidos Glu desta região são importantes, pois sofrem modificações pós-traducionais ( $\gamma$ -carboxilação), formando o domínio Gla, no qual se ligam múltiplos íons  $Ca^{2+}$ , necessários para que a proteína, então carregada positivamente, se ligue aos

fosfolipídios da superfície endotelial ou plaquetária, e possa exercer sua função de cofator para a proteína C ativada.

No paciente 342 a única alteração apresentada foi uma substituição nucleotídica caracterizada por uma transição C→T no segundo nucleotídeo do codon 35 no exon 2, correspondente ao aminoácido prolina (CCG) que foi substituído por uma leucina (CTG). Este aminoácido, embora conservado entre as proteínas S de diferentes espécies, não é conservado entre as diferentes proteína vitamina K-dependentes. Esta alteração, anteriormente descrita na literatura, foi encontrada em um paciente deficiente em proteína S, mas não deve ter efeito deletério, já que foi encontrada em dois indivíduos de uma população de 100 indivíduos normais, sendo classificada portanto como um polimorfismo (GANDRILLE et al. 1995).

Houve uma predominância de mutações no exon 2. Este exon é responsável por codificar o domínio Gla que se encontra na região vitamina K-dependente. Esta é uma região importante da proteína S, já que sofre modificações pós-traducionais importantes ( $\gamma$ -carboxilação) para que múltiplos íons  $Ca^{2+}$  se liguem à proteína S, a qual exerce sua atividade de cofator da proteína C ativada em superfícies carregadas negativamente. Nesta região foram previamente descritas na literatura 18 mutações, sendo 12 diferentes, em diversos grupos analisados. Entre as mutações descritas pelo Database, 14,3% estão no exon 2 (GANDRILLE et al., 1997).

Os dados acima, junto aos nossos resultados, evidenciam a importância do exon 2. Além disso, sinalizam que este talvez deva ser o primeiro exon a ser seqüenciado na pesquisa de mutações em pacientes com deficiência de proteína S.

A única alteração encontrada fora desta região foi uma mutação no exon 10 responsável por codificar parte do domínio SHBG que parece estar envolvido na ligação da proteína S com a proteína de ligação C4b.

Dentre as alterações moleculares descritas neste trabalho, quatro ocorreram em dinucleotídeos CpG, sendo que três delas eram transições C→T. Esses dinucleotídeos são considerados hipermutáveis ("hot spot"), já que são freqüentemente encontradas mutações associadas à transições C→T e G→A, sendo explicado através do modelo de desaminação mediado pela metilação. A reação de desaminação mais comum envolve citosinas metiladas; a desaminação da 5-metilcitosina, que resulta na formação de timina, aparentemente contribui para a alta porcentagem de mutações espontâneas em doenças humanas (BIRD, 1986).

A identificação de mutações no gene da proteína S não somente contribui para a melhor compreensão das mutações patogênicas, como auxilia a esclarecer os diagnósticos duvidosos. Isto é importante pelo fato de haver uma sobreposição entre os valores de proteína S livre e total em pacientes deficientes e plasmas controles, uma vez que é uma doença de herança autossômica dominante. Neste caso, o estudo genético torna-se um método adequado para a diferenciação entre o normal e o deficiente, principalmente quando há possibilidade de estudo familiar.

### **Análise de polimorfismos**

O polimorfismo Heerlen é caracterizado por uma substituição Ser 460 Pro, no exon 13. O aminoácido serina na posição 460 faz parte de uma seqüência consenso e

pertence a um potente sítio de glicosilação da proteína S. A troca por prolina exclui a glicosilação neste sítio, resultando numa proteína S circulante com peso molecular menor que a proteína S normal. Esta substituição foi classificada como polimorfismo e sua frequência alélica numa população com trombose (0,67%) não diferiu significativamente da frequência observada na população em geral (0,52%), além de não afetar os níveis plasmáticos de proteína S, bem como sua atividade de cofator da proteína C ativada (BERTINA et al., 1990).

Em 118 famílias francesas e 46 famílias espanholas deficientes em proteína S, o alelo Heerlen foi observado em 22% e 26%, respectivamente, enquanto que as frequências deste alelo na população normal destes países foram de 0,9% e 0,66% dos indivíduos analisados, respectivamente. Além disso, verificou-se um desequilíbrio de ligação entre o alelo Heerlen e a deficiência de proteína S tipo III. De 63 pacientes com deficiência tipo III, 24 apresentaram o alelo Heerlen, contra 2 entre 47 pacientes com deficiência tipo I, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Revisto por GANDRILLE et al., 1997). Os níveis de proteína S total não estão alterados ( $95 \pm 15\%$ ) quando comparados com indivíduos normais, mas os níveis de proteína S livre estão diminuídos ( $59 \pm 12\%$ ) sugerindo que a proteína S Heerlen tem maior afinidade pela proteína de ligação C4b que a proteína S normal, resultando numa distribuição anormal entre a proteína S mutada e a proteína S normal com a proteína C4b (DUCHEMIN et al., 1995).

Neste trabalho, entre os oito pacientes estudados e seus familiares, não foi identificado nenhum alelo Heerlen. Em amostras de diferentes populações brasileiras foram encontradas, em heterozigose, as seguintes frequências genotípicas: 0,97% em

recém-nascidos, que representam uma população aleatória, 0,92% em negróides da Bahia e 1,4% em pacientes que apresentaram algum tipo de trombose. Este polimorfismo não foi identificado entre 100 caucasóides e 78 índios estudados. Estes dados não diferem significativamente dos dados descritos previamente na literatura por BERTINA et al. (1990), tanto na população geral, aqui representada pelo grupo de recém-nascidos ( $p=1$ ), quanto na população com trombose ( $p=0,85$ ).

Talvez nenhum dos nossos pacientes com deficiência de proteína S seja portador desse polimorfismo, pelo fato de nenhum ser deficiente do tipo III e pelo pequeno número de casos estudados. Isto não pode ser explicado por uma frequência baixa em nossa população normal, uma vez que nossos resultados são semelhantes aos descritos em outros países.

O dimorfismo neutro CCA/CCG 626, no exon 15, foi primeiramente descrito por DIEPSTRATEN et al. (1991), e a frequência alélica encontrada numa população caucasóide européia foi de 48% e 52%, para os alelos CCG e CCA, respectivamente. Em uma população francesa as frequências foram de 57% para o alelo CCA e 43% para o alelo CCG (GANDRILLE et al., 1995).

O dimorfismo neutro CCA/CCG foi investigado em diferentes populações brasileiras, em todos os pacientes e seus familiares. No presente trabalho, através deste polimorfismo foi possível, na maioria das famílias, fazer análise de segregação entre o alelo carreador da mutação e a presença do polimorfismo. Quanto às populações, foi possível calcular as frequências gênicas e demonstrar se essas populações se encontram em equilíbrio de Hardy e Weinberg. As frequências gênicas,

para os alelos CCA e CCG, foram, respectivamente: em recém-nascidos, 59,9% e 40,1%; em negróides da Bahia, 60,8% e 39,2%; caucasóides, 60,5% e 39,5%; índios, 31,5% e 68,5% e numa população com trombose, 56,5% e 43,5%. O teste do qui-quadrado demonstrou que somente as populações de recém-nascidos e caucasóides estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg.

Apesar da população indígena estudada ser um isolado, uma vez que localiza-se em uma área geográfica de difícil acesso na floresta Amazônica, no Estado do Pará, sem contato direto com outras populações, o estudo desse polimorfismo mostrou resultados inesperados. Isto porque a maior frequência de heterozigotos não favorece a hipótese de um isolado genético. Por outro lado, 3 polimorfismos estudados nessa mesma população, localizados na região promotora do gene da proteína C, mostraram um predomínio de homozigotos (MENDES, et al., 1998).

Quanto a população negróide, o genótipo heterozigoto foi o mais freqüente, sugerindo que apesar do cuidado na seleção, pode ter ocorrido miscigenação com caucasóides, ou que esses indivíduos são originários de diferentes regiões da África.

O fato da população com trombose ser não aleatória, talvez explique o não equilíbrio de Hardy e Weinberg. Apesar da diferença nas frequências genótípicas, a população com trombose assemelha-se mais à população de recém-nascidos e caucasóides. A população de recém-nascidos, na verdade representa a população geral da região de Campinas, e entre eles há provavelmente um predomínio de caucasóides.

A maior diferença na frequência genotípica foi verificada na população negróide em relação a caucasóides, recém-nascidos e pacientes com trombose. Apesar de não estarmos comparando dois grupos negróides, poderia haver uma influência genética desse grupo, tanto na composição da população de recém-nascidos como na de pacientes com trombose. Portanto, essa diferença genotípica talvez possa ser explicada pelo fato dos negróides da Bahia serem diferentes dos negróides da região Sul-Sudeste.

**CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÕES**

A análise pelo método de PCR-CSGE se mostrou mais eficaz no rastreamento de alterações moleculares no gene da proteína S (*PROS 1*) em pacientes com deficiência de proteína S que o método de SSCP. Com o emprego do CSGE foi possível identificar alterações moleculares em 62% dos pacientes estudados (seis mutações, uma mutação silenciosa e um polimorfismo). As alterações identificadas que contribuem para a deficiência de proteína S, perfazem 50% dos pacientes analisados.

Em quatro dos oito pacientes, não relacionados, estudados, com deficiência de proteína S, foram identificadas sete mutações de ponto, três das quais não haviam sido descritas na literatura, e também foi identificado um polimorfismo em um outro paciente. Este estudo permitiu a identificação das mutações responsáveis pela deficiência de proteína S em 50% dos pacientes analisados. Estas alterações foram detectadas pelo método de CSGE que se mostrou muito eficaz quando comparado com o método de SSCP, que demonstrou somente uma das alterações descritas neste trabalho.

O predomínio de mutações no exon 2 dos pacientes deficientes em proteína S é similar àquele observado nas demais populações analisadas até o presente momento. A identificação das mutações e sua correlação com quadro clínico dos pacientes estudados neste trabalho contribui para a compreensão do efeito dessas alterações na atividade da proteína S.

As frequências do polimorfismo Heerlen e do dimorfismo neutro CCA/CCG, que ainda não tinham sido determinadas em populações brasileiras, estão de acordo com os dados descritos na literatura, em diferentes populações mundiais.

## SUMMARY

## **SUMMARY**

Human protein S is a plasmatic vitamin-K dependent glycoprotein that acts as a non-enzimatic cofactor of activated protein C in the protein C anticoagulant pathway. In addition to this protein S has an independent role that activated protein C, which is to inactivate factors Va and Xa.

The plasmatic concentration of protein S is regulated by a C4b binding protein that acts on the Complement Classical Pathway. C4b protein forms inactive complexes with approximately 60% of total protein S, and only the free form of protein S its can act as a cofactor of activated protein C.

The hereditary deficiency of protein S is a common cause of recurrent venous thrombosis, and occurs due to the decrease of the anticoagulant activity of protein S. It is a relatively rare disease and it has a dominant autossomic hereditary pattern.

The gene which controls the production of protein S (*PROS1*) is located in chromosome 3, near the centromer region at position 3p11.1 - 3q11.2. It is formed by 15 exons and 14 introns comprising a region of over 80kb, which originates a mRNA of 3,5 to 4,0 kb. In this same region of chromosome 3 there is a pseudogene (*PROS2*) which is 97% homologous to the codifying region of the active gene.

According to the protein S gene mutation database published by GANDRILLE et al., 71 different point mutations were described, 19.8% were nonsense mutations, 65.3% were missense mutations, 12.8% were splice site mutations, and 2% abolished the natural codon termination of the protein. Sixteen different insertions/deletions and two large deletions were also described. A total of twelve rare polymorphisms were described including the Heerlen polymorphism and a frequent polymorphism, the neutral polymorphism CCA/CCG.

The SSCP and CSGE analysis permit the quick and efficient screening of the mutations. Direct DNA sequencing permit the precise determination of the molecular alteration responsible for the disease. In this study these methods were used in the study of protein S gene (*PROS1*) of eight patients with protein S deficiency which presented spontaneous thrombosis. Other deficiencies which predispose to thrombosis were evaluated but were not detected.

With the use of this methodology it was possible to detect and identify seven point mutations in four of the eight patients studied, including a silent mutation in addition to a polymorphism in another patient. Of the mutation found only one was detected by the SSCP method.

Considering the clinical and laboratory data of the patients studied, together with the analysis of the family, the results of this study suggest that the mutations identified are responsible for the hereditary protein S deficiency. The identification of

the mutations and its correlation to the clinical data of the patients studied contribute to the comprehension of the structural-functional relation of this protein.

The frequencies of the Heerlen polymorphism and the neutral dimorphism CCA/CCG, in different groups of the Brazilian population (newborns, caucasoides, Black population, Indians and patients with thrombosis) were also determined.

The results obtained in the different groups studied, for Heerlen polymorphism, did not differ significantly from those described previously in the literature by BERTINA et al, 1990. This polymorphism was not identified in any of the patients studied.

The allelic frequencies of the neutral dimorphism CCA/CCG do not differ significantly from those described in literature by DIEPSTRATEN, et al., 1991 and GANDRILLE et al., 1995. Our results revealed that the miscigenation may have occurred in the Black population, in spite of being considered as a genetic isolate, showed a predomination of the heterozygous genotype. The CCA/CCG polymorphism was also used to analyse the segregation in families with protein S deficiency and was informative in three families that were analysed.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIACH, M.; BORGEL, D.; GAUSSEM, P.; EMMERICH, J.; ALHENC-GELAS, M. & GANDRILLE, S. – Protein C and protein S deficiencies. *Semin. Hematol.* **34**:205-17, 1997.
- ALLAART, C.F.; ARONSON, D.O.; RUYS, T.; ROSENDAAL, F.R.; VAN BOCKEL, J.H.; BERTINA, R.M. & BRIËT, E. - Hereditary protein S deficiency in young adults with arterial occlusive disease. *Thromb. Haemost.* **64**:206-10, 1990.
- APPLEBY, R.D. & OLDS, R.J. – The inherited basis of venous thrombosis. *Pathology* **29**:341-47, 1997.
- BAKER, M.E.; FRENCH, F.S. & JOSEPH, D.R. – Vitamin K-dependent protein S is similar to androgen-binding protein. *Biochem. J.* **243**:293-7, 1987.
- BERTINA, R. - Hereditary protein S deficiency. *Haemostasis* **15**:241-6, 1985.
- BERTINA, R.M.; VAN WIJNGAARDEN, A.; REINALDA-POOT, J.; POORT, S.R. & BOM, V.J.J. – Determination of plasma protein S, the protein cofactor of activated protein C. *Thromb. Haemost.* **53**:268-72, 1985.
- BERTINA, R.M. - Prevalence of hereditary thrombophilia and the identification of genetic risk factors. *Fibrinolysis* **2**:7, 1988.
- BERTINA, R.M.; PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; VAN WIJNGAARDEN, A.; COENEN, J.; LEEMHUIS, M.P.; DEUTZ-TERLOUW, P.P.; VAN DER LINDEN, I.K. & REITSMA, P.H. - Heerlen polymorphism of protein S, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 460. *Blood* **76**:538-48, 1990.
- BERTINA, R.M.; KOELEMAN, B.P.C.; KOSTER, T.; ROSENDAAL, F.R.; DIRVEN, R.J.; DE RONDE, H.; VAN DER VELDEN, P.A. & REITSMA, P.H. - Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **369**:64-67, 1994.
- BIRD, A.P. – CpG rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**:209-13, 1986.
- BORGEL, D.; DUCHEMIN, J.; ALHENC-GELAS, M.; MATHERON, C.; AIACH, M.; GANDRILLE, S. & The French Network INSERM on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S deficiencies. – Molecular basis for protein S

(PS) hereditary deficiency: genetic defects observed in 118 patients with type I (total PS) and type IIa (free PS) deficiencies. *J. Lab. Clin. Med.* **128**:218-27, 1996.

BROEKMANS, A.W.; BERTINA, R.M.; REINALDA POOT, J.; ENGESSER, L.; MULLER, H.P.; LEEUW, J.A.; MICHIELS, J.J.; BROMMER, E.J. & BRIËT, E. – Hereditary protein S deficiency and venous thromboembolism. A study in three Dutch families. *Thromb. Haemost.* **53**:273-7, 1985.

BROZE, G.J.; WARREN, L.A.; NOVOTNY, W.F.; HIGUCHI, D.A.; GIRARD, J.J. & MILETICH, J.P. – The Lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits factor VII-tissue factor complex also inhibits Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood* **71**: 335-43, 1988.

BROZE, G.D.; GIRARD, T.J. & NOVOTNY, W.F. – Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* **29**: 7539-46, 1990.

BRUNET, D.; BARTHET, M.C.; MORANGE, P.E.; ALESSI, M.C.; BORGEL, D.; GANDRILLE, S.; AILLAUD, M.F. & JUHAN-VAGUE, I. – Protein S deficiency: different biological phenotypes according to the assay used. *Thromb. Haemost.* **79**:446-7, 1998.

BUSTORFF, T.C.; FREIRE, I.; GAGO, T.; CRESPO, F. & DAVID, D. – Identification of three novel mutations in hereditary protein S deficiency. *Thromb. Haemost* **77**:21-5, 1997.

CHAFI, O.; FISHER, A.M.; MERIANE, F.; CHELLALI, F.; RAHAL, S.; STERNBERG, C. & BENABADJI, M. – A new case of "type II" inherited protein S deficiency. *Br. J. Haematol.* **73**:501-5, 1989.

CHANG, G.T.G.; MAAS, B.H.A.; PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. & BOUMA, B.N. – The carboxy terminal loop of human protein S is involved in the interaction with human C4b-binding protein. *Thromb. Haemost.* **65**:710, 1991.

CHANG, G.T.G.; AALDERING, L.; HACKENG, T.M.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. & BOUMA, B.N. – Construction and characterization of thrombin-resistant variants of recombinant human protein S. *Thromb. Haemost.* **72**:693-7, 1994a.

CHANG, G.T.G.; MAAS, B.H.A.; PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. & BOUMA, B.N. – Studies of the interaction between human protein S and human C4b-binding protein using deletion variants of recombinant protein S. *Thromb. Haemost.* **71**:461-7, 1994b.

- COMP, P.C. - Laboratory evaluation of protein S status. *Semin. Thromb. Haemost.* **16**:177-81, 1990.
- COMP, P.C & ESMON, C.T. – Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J. Clin. Invest.* **68**: 1221-28, 1981.
- COMP, P.C. & ESMON, C.T. – Recurrent thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *New Engl. J. Med* **311**:1525-8, 1984.
- COMP, P.C.; NIXON, R.R.; COOPER, M.R. & ESMON, C.T. - Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J. Clin. Invest.* **74**:2082-8, 1984.
- COMP, P.C.; DORAY, D.; PATTON, D. & ESMON, C.T. – An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood* **67**:504-8, 1986a.
- COMP, P.C.; THURNAU, G.R.; WELSH, J. & ESMON, C.T. - Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. *Blood* **68**:881-5, 1986b.
- DAHLBÄCK, B. – Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:3461-5, 1983a.
- DAHLBÄCK, B. - Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem. J.* **209**:847-56, 1983b.
- DAHLBÄCK, B. - Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. *Biochem. J.* **209**:837-46, 1983c.
- DAHLBÄCK, B. – Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* **261**:12022-7, 1986.
- DAHLBÄCK, B. - Protein S and C4b-binding protein: Components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb. Haemost.* **66**:49-61, 1991.
- DAHLBÄCK, B. & STENFLO, J. - High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2512-16, 1981.
- DAHLBÄCK, B.; LUNDWALL, A. & STENFLO, J. - Localization of thrombin cleavage sites in the amino-terminal region of bovine protein S. *J. Biol. Chem.* **261**:5111-5, 1986a.

- DAHLBÄCK, B.; LUNDWALL, A. & STENFLO, J. – Primary structure of bovine vitamin K-dependent protein S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4199-203, 1986b.
- DAHLBÄCK, B.; HILDEBRAND, B. & MALM, J. - Characterization of functionally important domains in human vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **265**:8127-35, 1990a.
- DAHLBÄCK, B.; HILDEBRAND, B. & LINSE, S. - Novel type of very high affinity calcium-binding sites in  $\beta$ -hydroxyasparagine-containing epidermal growth factor-like domains in vitamin K-dependent protein S. *J. Biol. Chem.* **265**:18481-89, 1990b.
- DAHLBÄCK, B.; FROHM, B. & NELSESTUEN, G. - High affinity interaction between C4b-binding protein and vitamin K-dependent protein S in the presence of calcium. Suggestion of a third component in blood regulating the interaction. *J. Biol. Chem.* **265**:16082-7, 1990c.
- DAHLBÄCK, B.; WIEDMER, T. & SIMS, P.J. – Binding of anticoagulant vitamin K-dependent protein S to platelet-derived microparticles. *Biochemistry* **31**:12769-77, 1992.
- D'ANGELO, A.; VIGANO-D'ANGELO, S.; ESMON, C.T. & COMP, P.C. - Acquired deficiencies of protein S. Protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease, and in disseminated intravascular coagulation. *J. Clin. Invest.* **81**:1445-54, 1988.
- DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K. & KISIEL, W. – The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**:10363-70, 1991.
- DE FOUW, N.J.; HAVERKATE, F.; BERTINA, R.M.; KOOPMAN, J.; VAN WIJNGAARDEN, A. & VAN HINSBERGH, V.W.M. – The cofactor role of protein S in the acceleration of whole blood clot lysis by activated protein C in vitro. *Blood* **67**:1189-92, 1986.
- DEGEN, S.J.F.; MACGILLIVRAY, R.T.A. & DAVIE E.W. - Characterization of the cDNA and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry* **22**:2087-97, 1983.
- DE STEFANO, V.; LEONE, G.; MASTRANGELO, S.; TRIPODI, A.; RODEGHIERO, F. & CASTAMAN, G. – Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb. Haemost.* **72**:352-8, 1994.

- DIEPSTRATEN, C.M.; PLOOS VAN AMSTEL, J.K.; REITSMA, P.H. & BERTINA, R.M. - A CCA/CCG neutral dimorphism in the codon for Pro 626 of the human protein S gene PS $\alpha$  (PROS1). *Nucleic Acids Res.* **19**:5091, 1991.
- DI SCIPIO, R.G.; HERMODSON, M.A.; YATES, S.G. & DAVIE, E.W. - Comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **16**:698-706, 1977.
- DI SCIPIO, R.G. & DAVIE, E.W. - Characterization of protein S, a  $\gamma$ -carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry* **18**:899-904, 1979.
- DOOLITTLE, R.F.; FENG, D.F. & JOHNSON, M.S. - Computer based characterization of epidermal growth factor precursor. *Nature* **307**: 558-60, 1984.
- DUCHEMIN, J.; GRANDRILLE, S.; BORGEL, D.; FEURGARD, P.; ALHENC-GELAS, M.; MATHERON, C.; DREYFUS, M.; DUPUY, E.; JUHAN-VAGUE, I. & AIACH, M. - The Ser 460 to Pro substitution of the protein S  $\alpha$  (PROS 1) gene is a frequent mutation associated with free protein S (type IIa) deficiency. *Blood* **86**:3436-43, 1995.
- EDENBRANDT, C.M.; LUNDWALL, A.; WYDRO, R. & STENFLO, J. - Molecular analysis of the gene for vitamin K dependent protein S and its pseudogene. Cloning and partial gene organization. *Biochemistry* **29**:7861-68, 1990.
- ENGESSER, L.; BROEKMANS, A.W.; BRIËT, E.; BROMER, E.J.P. & BERTINA, R.M. - Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations. *Ann. Intern. Med.* **106**:677-82, 1987.
- ESMON, C.T. - The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* **235**:1348-52, 1987a.
- ESMON, N.L. - Thrombomodulin. *Semin. Thromb. Hemost.* **13**:454-63, 1987b.
- ESMON, C.T. & OWEN, W.G. - Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2249-52, 1981.
- ESMON, C.T. & ESMON, N.L. - Protein C activation. *Semin. Thromb. Hemost.* **10**:122-30, 1984.

- FAIR, D.S. & MARLAR, R.A. – Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S and the protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood* **67**:64-70, 1986.
- FAIR, D.S.; MARLAR, R.A. & LEVIN, E.G. – Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* **67**:1168-71, 1986.
- FERNÁNDEZ, J.A. & GRIFFIN, J.H. - Identification of regions of protein S essential for binding to C4b-binding protein. *Thromb. Haemost.* **65**:711, 1991.
- FERNÁNDEZ, J.A. & GRIFFIN, J.H. – A protein S binding site on C4b-binding protein involves  $\beta$  chain residues 31-45. *J. Biol. Chem.* **269**:2535-40, 1994.
- FERNÁNDEZ, J.A.; HEEB, M.J. & GRIFFIN, J.H. – Identification of residues 413-433 of plasma protein S as essential for binding to C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**:16788-94, 1993.
- FERNLUND, P. & STENFLO, J. -  $\beta$ -Hydroxyaspartic acid in vitamin K-dependent proteins. *J. Biol. Chem.* **258**:2509-12, 1983.
- FOSTER, D. & DAVIE E.W. - Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4766-70, 1984.
- FROOST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.H.J.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.J; VAN DEN HEUVEL, L.P. & ROZEN, R. – A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydro folate reductase. *Nature Genetics* **10**:111-3, 1995.
- GANDRILLE, S.; BORGEL, D.; ESCHWEGE-GUFFLET, V.; AILLAUD, MF.; DREYFUS, M.; MATHERON, C.; GAUSSEM, P.; ABGRALL, J.F.; JUDE, B.; SIE, P.; TOULON, P. & AIACH, M. – Identification of 15 different candidate causal point mutations and three polymorphisms in 19 patients with protein S deficiency using a scanning method for the analysis of the protein S active gene. *Blood* **85**:130-138, 1995.
- GANDRILLE, S.; BORGEL, D.; IRELAND, H.; LANE, D.A.; SIMMONDS, R.; REITSMA, P.H.; MANNHALTER, C.; PABINGER, I.; SAITO, H.; SUZUKI, K.; FORMSTONE, C.; COOPER, D.N.; ESPINOSA, Y.; SALA, N.; BERNARDI, F. & AIACH, M. - Protein S deficiency: A database of mutations. *Thromb. Haemost.* **77**:1201-14, 1997.
- GANGULY, A.; ROCK, M.J. & PROCKOP, D.J. - Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded

- PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:10325-29, 1993.
- GARDINER, J.E; MC GANN, M.A.; BERRIDGE, C.W.; FULCHER, C.A.; ZIMMERMAN, T.S. & GRIFFIN, J.M. – Protein S a cofactor for activated protein C in plasma and in the inactivation of purified factor VIII: C. *Circulation* **70**:205 (suppl II), 1984.
- GERSHAGEN, S.; FERNLUND, P. & LUNDWALL, A. - A cDNA coding for human sex hormone binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S. *FEBS Lett.* **220**:129-35, 1987.
- GERSHAGEN, S.; LUNDWALL, A. & FERNLUND, P. - Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res.* **17**:9245-58, 1989.
- GERSHAGEN, S.; FERNLUND, P. & EDENBRANDT, C.M. – The genes for SHBG/ABP and the SHBG-like region of vitamin K-dependent protein S have evolved from a common ancestral gene. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **40**:763-9, 1991.
- GIERASCH, L.M. – Signal sequences. *Biochemistry* **28**:923-30, 1989.
- GIROLAMI, A., SIMIONI, P., LAZZARO, A.R. & CORDIANO, I. - Severe arterial cerebral thrombosis in a patient with protein S deficiency (moderately reduced total and markedly reduced free protein S): a family study. *Thromb. Haemost.* **61**:144-7, 1989.
- GOLDBERG, S.L.; ORTHNER, C.L.; YALISOVE, B.L.; ELGART, M.L. & KESSLER, C.M. - Skin necrosis following prolonged administration of coumarin in a patient with inherited protein S deficiency. *Am. J. Hematol.* **38**:64-6, 1991.
- GOMEZ, E.; LEDFORD, M.R.; PEGELOW, C.H.; REITSMA, P.H. & BERTINA, R.M. - Homozygous protein S deficiency due to a one base pair deletion that leads to a stop codon in exon III of the protein S gene. *Thromb. Haemost.* **71**:723-6, 1994.
- GREENGARD, J.S.; FERNANDEZ, J.A.; RADTKE, K.P. & GRIFFIN, J.H. - Identification of candidate residues for interaction of protein S with C4b binding protein and activated protein C. *Biochem. J.* **305**:397-403, 1995.
- GRIMAUDO, V.; GUEISSAZ, F.; HAUERT, J.; SARRAJ, A.; KRUITHOF, E.K.O. & BACHMANN, F. – Necrosis of skin induced by coumarin in a patient deficient in protein S. *Br. Med. J.* **298**:233-4, 1989.

- HACKENG, T.M.; HESSING, M.; VAN'T VEER, C.; MEIJER-HUIZINGA, F.; MEIJERS, J.C.M.; DE GROOT, P.G.; VAN MOURIK, J.A. & BOUMA, B.N. – Protein S binding to human endothelial cells is required for expression of cofactor activity for activated protein C. *J. Biol. Chem.* **268**:3993-4000, 1993.
- HACKENG, T.M.; VAN'T VEER, C.; MEIJERS, J.C. & BOUMA, B.N. – Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va e Xa. *J. Biol. Chem.* **269**:21051-8, 1994.
- HAGEN, F.S.; GRAY, C.L.; O'HARA, P.; GRANT, F.J.; SAARI, G.C.; WOODBURY, R.G., HART, C.E.; INSLEY, M.; KISEL, W.; KURACHI, K. & DAVIE, E.W. - Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2412-6, 1986.
- HALL, A.J.; PEAKE, I.R. & WINSHIP, P.R. – Identification of multiple elements regulation transcription of the protein S gene. *Thromb. Haemost.* **73**:1257, 1995.
- HARRIS, K.W. & ESMON, C.T. – Protein S is required for bovine platelets to support activated protein C binding and activity. *J. Biol. Chem.* **260**:2007-10, 1985.
- HE, X.H.; SHEN, L.; BJARTELL, A. & DAHLBÄCK, B. – The gene encoding vitamin K-dependent anticoagulant proteins C is expressed in multiple rabbit organs as demonstrated by northern blotting, in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **43**:85-96, 1995.
- HOJRUP, P.; ROEPSTORFF, P. & PETERSEN, R.E. – Amino-acid sequence of the vitamin K-dependent part of protein Z. *Eur. J. Biochem* **126**: 343-8, 1982.
- HOSKINS, J.; NORMAN, D.K.; BECKMANN, R.J. & LONG G.L. – Cloning and characterization of human liver cDNA encoding a protein S precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:349-53, 1987.
- IIJIMA, K.; INOUE, N.; NAKAMURA, K.; FUKUDA, C.; OHGI, S.; OKADA, M.; MORI, T.; NISHIOKA, J.; HAYASHI, T. & SUZUKI, K. – Inherited deficiency of functional and free form protein S. *Acta Haematol. Jpn.* **52**:126-33, 1989.
- KAMIYA, T.; SUGIHARA, T.; OGATA, K.; SAITO, H.; SUZUKI, K.; NISHIOKA, J.; HASHIMOTO, S. & YAMAGATA, K. – Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. *Blood* **67**: 406-10, 1986.

- KISIEL, W.; CANFIELD, W.M.; ERICSSON, L.H. & DAVIE E.W. – Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* **16**:5824-31, 1977.
- KURACHI, K. & DAVIE, E.W. – Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry* **16**:5831-9, 1977.
- KURACHI, K. & DAVIE, E.W. – Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:6461-4, 1982.
- LAUER, C.G.; REID III, T.J.; WIDEMAN, C.S.; EVATT, B.L. & ALVING, B.M. – Free protein S deficiency in a family with venous thrombosis. *J. Vasc. Surg.* **12**:541-4, 1990.
- LAURELL, C-B. - Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* **15**:45-52, 1966.
- LEYTUS, S.P.; CHUNG, D.W.; KISIEL, W.; KURACHI, K. & DAVIE, E.W. - Characterization of a cDNA coding for human factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3699-702, 1984.
- LINSE, S.; HÄRDIG, Y.; SCHULTZ, D.A & DAHLBÄCK, B. – A region of vitamin K-dependent protein S that binds to C4b binding protein (C4BP) identified using bacteriophage peptide display libraries. *J. Biol. Chem.* **272**:14658-65, 1997.
- LONG, G.L.; BELAGAJE, R.M.; MAC GILLIVRAY, R.T.A. - Cloning and sequencing of liver cDNA coding for bovine protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5653-6, 1984.
- LONG, G.L.; MARSHALL, A.; GARDNER, J.C. & NAYLOR, S.L. – Genes for human vitamin K-dependent plasma protein C and S are located on chromosome 2 and 3, respectively. *Somat. Cell Mol. Genet.* **14**: 93-8, 1988.
- LORAND, L.; JEONG, J.M.; RADEK, J.T. & WILSON J. – Human plasma factor XIII: Subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol.* **222**:22-35, 1993.
- LU, D.; SCHMIDEL, D.K. & LONG, G.L. - Structure of mouse protein S as determined by PCR amplification and DNA sequencing of cDNA. *Thromb. Res.* **74**:135-42, 1994.
- LUNDWALL, A.; DACKOWSKI, W.; COHEN, E.; SHAFFER, M.; MAHR, A.; DAHLBÄCK, B.; STENFLO, J. & WYDRO R. – Isolation and sequence of the cDNA for human

- protein S, a regulator of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6716-20, 1986.
- MAHASANDANA, C., SUVATTE, V., MARLAR, R.A., MANCO-JOHNSON, M.J., JACOBSON, L.J. & HATHAWAY, W.E. - Neonatal purpura fulminans associated with homozygous protein S deficiency. *Lancet* **335**: 61-2, 1990.
- MALM, J.; LAURELL, M. & DAHLBÄCK, B. - Changes in the plasma levels of vitamin K-dependent protein C and S and of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br. J. Haematol.* **68**:437-43, 1988.
- MALM, J.; HE, X.H.; BJARTELL, A.; SHEN, L.; ABRAHAMSSON, P.A. & DAHLBÄCK, B. - Vitamin K-dependent protein S in Leydig cells of human testis. *Biochem. J.* **302**:845-50, 1994.
- MANN, K.G. & LORAND, L. - Introduction: Blood Coagulation. *Methods. Enzymol.* **222**:1-10, 1993.
- MANNUCCI, P.M.; TRIPODI, A. & BERTINA, R.M. - Protein S deficiency associated with "juvenile" arterial and venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* **55**:440, 1986.
- MANNUCCI, P.M.; VALSECCHI, C.; KRACHMALNICOFF, A.; FAIONI, E.M. & TRIPODI, A. - Familial dysfunction of protein S. *Thromb. Haemost.* **62**:763-6, 1989.
- MEIJER-HUIZINGA, F.; MERTENS, K. & VAN MOURIK, J.A. - Isolation and characterization of single-chain protein S. *Thromb. Haemost.* **72**:408-14, 1994.
- MENDES, C.P.O; HACKEL, C.; ARRUDA, V.R. & ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. - Determination of allelic frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene in three brazilian ethnic groups. *Hum. Hered.*, 1998. (no prelo).
- MORITA, T.; MIZUGUCHI, J.; KAWABATA, S. & IWANAGA, S. - Proteolytic cleavage of vitamin K-dependent bovine plasma protein S by  $\alpha$ -thrombin and plasma serine protease. *J. Biochem.* **99**:561-68, 1986.
- NAWROTH, P.P. & STERN, D.M. - Endothelial cell procoagulant properties and the host response. *Semin. Thromb. Hemost.* **13**:391-7, 1987.
- NELSESTUEN, G.L.; KISIEL, W. & DI SCIPIO, R.G. - Interaction of vitamin K dependent proteins with membranes. *Biochemistry* **17**:2134-38, 1978.

- NELSON, R.M. & LONG, G.L. - Solution-phase equilibrium binding interaction of human protein S with C4b-binding protein. *Biochemistry* **30**:2384-90, 1991.
- NELSON, R.M. & LONG, G.L. - Binding of protein S to C4b-binding protein. Mutagenesis of protein S. *J. Biol. Chem.* **267**:8140-5, 1992.
- NELSON, R.M.; VAN DUSEN, W.J.; FRIEDMAN, P.A. & LONG, G.L. -  $\beta$ -Hydroxyaspartic acid and  $\beta$ -hydroxyasparagine residues in recombinant human protein S are not required for anticoagulant cofactor activity or for binding to C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* **266**:20586-89, 1991.
- OGURA, M.; TANABE, N.; NISHIOKA, J.; SUZUKI, K. & SAITO, H. - Biosynthesis and secretion of functional protein S by a human megakaryoblastic cell line (MEG-01). *Blood* **70**:301-6, 1987.
- ÖHLIN, A.K.; LANDES, G.; BOURDON, P.; OPPENHEIMER, C.; WYDRO, R. & STENFLO, J. -  $\beta$ -Hydroxyaspartic acid in the first epidermal growth factor like domain of protein C. Its role in  $\text{Ca}^{2+}$  binding and biological activity. *J. Biol. Chem.* **263**:19240-8, 1988.
- ÖHLIN, A.K.; BJÖRK, I. & STENFLO, J. - Proteolytic formation and properties of a fragment of protein C containing the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid rich domain and the EGF-like region. *Biochemistry* **29**:644-51, 1990.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K. & SEKIYA, T. - Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2766-70, 1989.
- PAN, L.C. & PRICE, P.A. - The propeptide of rat bone  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6109-13, 1985.
- PATTHY, L. - Evolution of the proteases of the blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* **41**:657-63, 1985.
- PEGELOW, C.H.; LEDFORD, M.; YOUNG, J.N. & ZILLERUELO, G. - Severe protein S deficiency in a newborn. *Pediatrics* **89**:674-76, 1992.
- PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; VAN DER ZANDEN, A.L.; BAKKER, E.; REITSMA, P.H. & BERTINA, R.M. - Two genes homologous with human protein S cDNA are located on chromosome 3. *Thromb. Haemost.* **58**:982-7, 1987a.

- PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; VAN DER ZANDEN, A.L.; REITSMA, P.H. & BERTINA R.M. – Human protein S cDNA encodes Phe -16 and Tyr 222 in consensus sequences for the post-translational processing. *FEBS Lett.* **222**:186-90, 1987b.
- PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; REITSMA, P.H. & BERTINA, R.M. – The human protein S locus: identification of the PS $\alpha$  gene as a site of liver protein S messenger RNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**:1033-8, 1988.
- PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; HUISMAN, M.V.; REITSMA, P.H.; TEN CATE, J.W. & BERTINA, R.M. - Partial protein S gene deletion in a family with hereditary thrombophilia. *Blood* **73**:479-83, 1989a.
- PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; REITSMA, P.H.; HAMULYÁK, K.; DE DIE SMULDERS, C.E.M.; MANNUCCI, P.M. & BERTINA, R.M. - A mutation in the protein S pseudogene is linked to protein S deficiency in a thrombophilic family. *Thromb. Haemost.* **62**:897-901, 1989b.
- PLOOS VAN AMSTEL, H.K.; REITSMA, P.H.; VAN DER LOGT, C.P. & BERTINA, R.M. – Intron-exon organization of the active human protein S gene PS $\alpha$  and its pseudogene PS $\beta$ : Duplication and silencing during primate evolution. *Biochemistry* **29**:7853-61, 1990.
- POORT, S.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H. & BERTINA R.M. – A common genetic variant in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* **88**:3698-703, 1996.
- PRICE, P.A.; FRASER, J.D. & METZ-VIRCA, G. - Molecular cloning of the matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:8335-9, 1987.
- RAO, L.V.M. & RAPAPORT, S.I. – Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood* **69**:645-51, 1987.
- RAO, L.V.M. & RAPAPORT, S.I. – Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. of USA* **85**:6687-91, 1988.
- REITSMA, P.H.; PLOOS VAN AMSTEL, H.K. & BERTINA, R.M. - Three novel mutations in five unrelated subjects with hereditary protein S deficiency type I. *J. Clin. Invest.* **93**:486-92, 1994.

- REITSMA, P.H.; BERNARDI, F.; DOIG, R.G.; GANDRILLE, S.; GREENGARD, J.S.; IRELAND, H.; KRAWCZAK, M.; LIND, B.; LONG, G.L.; PORT, S.R.; SAITO, H.; SALA, N.; WITT, I. & COOPER, D.N. - Protein C deficiency: A database of mutations, 1995 Update. *Thromb. Haemost.* **73**:876-89, 1995.
- ROISING, J.; HOEKEMA, L.; NICOLAES, G.A.F.; THOMASSEN, M.C.L.G.D.; HEMKER, H.C.; VARADI, K.; SCHWARZ, H.P. & TANS, G. - Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor Va<sup>R506G</sup> by activated protein C. *J. Biol. Chem.* **270**:27852-8, 1995.
- SACCHI, E.; PINOTTI, M.; MARCHETTI, G.; MERATI, G.; TAGLIABUE, L.; MANNUCCI, P.M. & BERNARDI, F. - Protein S mRNA in patients with protein S deficiency. *Thromb. Haemost.* **73**:746-9, 1995.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUSHI, R.; HORN, G.T. & ERLICH, H.A. - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **139**:487-91, 1988.
- SALVESEN, G. & PIZZO, S.V. - Proteinase inhibitors:  $\alpha$ -macroglobulins, serpins and kinins. em **Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice**. 3<sup>a</sup> ed. Colman, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J. & SALZMAN, E.W. eds. J.B. Lippincott Company - Philadelphia. pp 241-258, 1994.
- SANGER, F.; NIKLEN, S. & COULSON, A.R. - DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-7, 1977.
- SCHMIDEL, D.K.; TATRO, A.V.; PHELPS, L.G.; TOMCZAK, J.A. & LONG, G.L. - Organization of the human protein S genes. *Biochemistry* **29**:7845-52, 1990.
- SCHMIDEL, D.K.; NELSON, R.M.; BROXSON JR, E.H.; COMP, P.C.; MARLAR, R.A. & LONG, G.L. - A 5,3 kb deletion including exon XIII of the protein S  $\alpha$  gene occurs in two protein S-deficient families. *Blood* **77**:551-9, 1991.
- SCHWALBE, R.A.; RYAN, J.; STERN, D.M.; KISIEL, W.; DAHLBÄCK, B. & NELSESTUEN, G.L. - Protein structural requirements and properties of membrane binding by  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing plasma proteins and peptides. *J. Biol. Chem.* **264**:20288-96, 1989.
- SCHWALBE, R.; DAHLBÄCK, B.; HILLARP, A. & NELSESTUEN, G. - Assembly of protein S and C4b-binding protein on membranes. *J. Biol. Chem.* **265**:16074-81, 1990.

- SCHWARZ, H.P.; FICHER, M., HOPMEIER, P., BATARD, M.A. & GRIFFIN, J.H. – Plasma protein S deficiency in a familial thrombotic disease. *Blood* **64**:1297-1300, 1984.
- SCHWARZ, H.P.; HEEB, M.J.; WENCEL-DRAKE, J.D. & GRIFFIN, J.H. – Identification and quantification of protein S in human platelets. *Blood* **66**:1452-5, 1985.
- SCHWARZ, H.P.; HEEB, M.J.; LÄMMLE, B.; BERRETTINI, M. & GRIFFIN, J.H. – Quantitative immunoblotting of plasma and platelet protein S. *Thromb. Haemost.* **56**:382-6, 1986.
- SHEN, L. & DÄHLBACK, B. – Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* **269**:18735-8, 1994.
- SIMMONDS, R.E.; IRELAND, H.; KUNZ, G.; LANE, D.A. AND THE PROTEIN S STUDY GROUP. – Identification of 19 protein S gene mutations in patients with phenotypic protein S deficiency and thrombosis. *Blood* **88**:4195-204, 1996.
- STENFLO, J. & JÖNSSON, M. – Protein S, a new vitamin K-dependent protein from bovine plasma. *FEBS Lett.* **101**:377-81, 1979.
- STENFLO, J.; LUNDWALL, A.; DAHLBÄCK, B. -  $\beta$ -Hydroxyasparagine in domains homologous to the epidermal growth factor precursor in vitamin K-dependent protein S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:368-72, 1987.
- STENFLO, J.; ÖHLIN, A.K.; OWEN, W.G. & SCHNEIDER, W.J. -  $\beta$ -Hydroxyaspartic acid or  $\beta$ -hydroxyasparagine in bovine low density lipoprotein receptor and in bovine thrombomodulin. *J. Biol. Chem.* **263**:21-4, 1988.
- STERN, D.M.; BRETT, J.G.; HARRIS, K. & NAWROTH, P.P. – Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J. Cell Biol.* **102**:1971-8, 1986a.
- STERN, D.M.; NAWROTH, P.P.; HARRIS, K. & ESMON, C.T. – Culture bovine aortic endothelial cells promote activated protein C - protein S – mediated inactivation of factor Va. *J. Biol. Chem.* **261**:713-8, 1986b.
- SUZUKI, K.; NISHIOKA, J. & HASHIMOTO, S. - Regulation of activated protein C by thrombin-modified protein S. *J. Biochem.* **94**:699-705, 1983.

- SUZUKI, K.; NISHIOKA, J.; MATSUDA, M.; MURAYAMA, H. & HASHIMOTO, S. – Protein S is essential for the activated protein C-catalyzed inactivation of platelet-associated factor Va. *J. Biochem.* **96**:455-60, 1984.
- SUZUKI, K.; HAYASHI, T.; NISHIOKA, J.; KOSAKA, Y.; ZUSHI, M.; HONDA, G. & YAMAMOTO, S. - A domain composed of epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin is essential for thrombin binding and for protein C activation. *J. Biol. Chem.* **264**:4872-6, 1989.
- TANS, G. & ROSING, J. – Structural and functional characterization of factor XII. *Semin. Thromb. Hemost.* **13**:1-14, 1987.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Introduction. em **The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. 1<sup>a</sup> ed. Oxford University Press Inc. – New York. pp 1-18, 1994.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Tissue factor pathway inhibitor. em **The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. 1<sup>a</sup> ed. Oxford University Press Inc. – New York. pp 204-211, 1994.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Antithrombin III. em **The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. 1<sup>a</sup> ed. Oxford University Press Inc. – New York. pp 284-298, 1994.
- VAN WIJNEN, M.; STAM, J.G.; VAN'T VEER, C.; MEIJERS, J.C.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. & BOUMA, B.N. – The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb. Haemost.* **76**:397-403, 1996.
- VEHAR, G.A. & DAVIE E.W. – Preparation and properties of bovine factor VIII (anti-hemophilic factor). *Biochemistry* **19**:401-410, 1980.
- VIGANO-D'ANGELO, S.; D'ANGELO, A.; KAUFMAN, C.E.Jr; SHOLER, C.; ESMON, C.T. & COMP, P.C. - Protein S deficiency occurs in the nephrotic syndrome. *Ann. Intern. Med.* **107**:42-7, 1987.
- VON HEYJNE, G. – A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**: 4683-90, 1986.
- WALKER, F.J. - Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J. Biol. Chem.* **255**:5521-4, 1980.

- WALKER, F.J. – Regulation of bovine activated protein C by protein S: The role of the cofactor protein in species specificity. *Thromb. Res.* **22**:321-7, 1981a.
- WALKER, F.J. – Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J. Biol. Chem.* **256**:11128-31, 1981b.
- WALKER, F.J. - Regulation of vitamin K-dependent protein S. Inactivation by thrombin. *J Biol. Chem.* **259**:10335-9, 1984.
- WALKER, F.J. - Properties of chemically modified protein S: Effect on the conversion of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid to  $\gamma$ -methylene glutamic acid on functional properties. *Biochemistry* **25**:6305-11, 1986a.
- WALKER, F.J. – Identification of a new protein involved in the regulation of the anticoagulant activity of activated protein C. Protein S-binding protein. *J Biol. Chem.* **261**:10941-4, 1986b.
- WALKER, F.J. - Characterization of a synthetic peptide that inhibits the interaction between protein S and C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* **264**:17645-48, 1989.
- WALKER, F.J.; CHAVIN, S.I. & FAY, P.J. – Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**:322-8, 1987.
- WATKINS, P.C.; EDDY, R.; FUKUSHIMA, Y.; BYERS, M.; COHEN, E.; DACKOWSKI, W.R.; WYDRO, R.M. & SHOWS T.B. – The gene for protein S maps near the centromere of human chromosome 3. *Blood* **71**:238-41, 1988.
- WILLIAMS, C.J.; ROCK, M.; CONSIDINE, E.; MC CARRON, S.; GOW, P.; LADDA, R.; MC LAIN, D.; MICHELS, V.M.; MURPHY, W.; PROCKOP, D.J. & GANGULY, A. - Three new point mutations in type II procollagen (COL2A1) and identification of a fourth family with the COL2A1 Arg 519→Cys base substitutions using conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum. Mol. Gen.* **4**:309-12, 1995.
- WOLF, M.; BOYER-NEUMANN, C.; MARTINOLI, J.L.; LEROY-MATHERON, C.; AMIRAL, J., MEYER; D. & LARRIEU, M.J. - A new functional assay for human protein S activity using activated factor Va as substrate. *Thromb. Haemost.* **62**:1144-5, 1989.
- WUN, T.C.; KRETZMER, K.K.; GIRARD, T.J.; MILETICH, J.P. & BROZE Jr, G.J. – Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J. Biol. Chem.* **263**:6001-4, 1988.

ZÖLLER, B.; GARCIA DE FRUTOS, P. & DAHLBÄCK, B. – Evaluation of the relationship between protein S and C4b binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be a phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* **85**:3524-31, 1995.