

Liliane Aparecida Teixeira Arnaldi

Caracterização Molecular na Deficiência de Antitrombina

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

**Campinas
1999**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Liliane Aparecida Teixeira Arnaldi

Caracterização Molecular na Deficiência de Antitrombina

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 Farmacologia

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

Campinas
1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	39517
PREC.	229199
C	☐
D	☒
PREÇO	2.611,00
DATA	24-11-99
q.º CPD	

CM-00137127-2

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

Ar61c

Arnaldi, Liliâne Aparecida Teixeira

Caracterização molecular na deficiência de antitrombina / Liliâne Aparecida Teixeira Arnaldi. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Joyce Maria Anicchino-Bizzacchi

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

1. Tromboses. 2. Genética molecular. I. Joyce Maria Anicchino-Bizzacchi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Membros:

1. Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

2. Profa. Dra. Sara T. O. Saad

3. Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

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

Data: 15/10/99

Aos meus pais, Antonio e Nilza, de quem eu tanto me orgulho, pelo amor e carinho dedicados, e por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Débora e Júnior, que sempre estiveram ao meu lado com seus olhares carinhosos e amigos.

À minha avó Lavinia, por ter dedicado grande parte de seu tempo cuidando de mim.

Ao Leonardo, a quem eu tenho um enorme carinho e a mais profunda admiração e que compartilhou deste meu ideal, sempre me incentivando a prosseguir, fossem quais fossem os obstáculos.

À Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, por ter orientado este trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade construída neste período de convívio.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a DEUS, todo poderoso, por ter me concedido este momento.

Este trabalho, é o fruto do empenho e da dedicação de um grande número de pessoas, com as quais, eu tive o privilégio de trabalhar.

Nominar indivíduos nessa hora é muito difícil, mas seria injusto não tornar pública a minha gratidão e o reconhecimento àquelas pessoas que tornaram este estudo possível.

Esta lista, certamente ficará incompleta, mas eu a utilizo como veículo para apresentar a minha sincera gratidão às pessoas nominadas abaixo e àqueles anônimos contribuintes para o sucesso deste trabalho:

À amiga *Luciana Pugliese da Silva*, pela grande colaboração, ensinamentos e sugestões a mim oferecidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Valder R. Arruda*, pelo seu amor à pesquisa, pela contribuição no desenvolvimento deste.

À Profa. Dra. *Sara T. O. Saad*, pela grande sabedoria e colaboração em ricas orientações durante todo este trabalho.

Ao Dr. *Newton C. Polimeno*, Dr. *Fernando Pretti* e Dr. *Zampieri*, pela colaboração ao cederem amostras de DNA.

À amiga *Adriana C. O. Carvalho*, pela sua companhia diária, passeios, paciência, apoio.

Ao *Robinson*, pelo apoio de sempre.

Às amigas *Yajaira* e *Kira*, pela serenidade transmitida.

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

Aos colegas *Jeferson, Dalva, Jorge, Simone e Pio*, pela convivência agradável.

À *Andréia, Tânia e Satiko*, pelo auxílio na realização deste trabalho.

À secretária *Arlete*, pelos inúmeros favores prestados.

À *Sandrinha e Rosana*, pelo carinhoso apoio e paciência que sempre nos proporcionam e nos ajudam a manter o padrão estético e didático dos nossos trabalhos.

À *Mônica, Ângela e Natasha*, pelas valorosas orientações técnicas.

Ao Sr. *Celso App. Silva*, pelo amparo oferecido durante o meu curso de graduação.

A todos os funcionários administrativos e de apoio do Hemocentro pelo carinho dispensado, *Lúcia, Reginaldo, Eliseu, Lindomar, Rosana, Maria Luíza e Sr. Gerino*.

A todos os pacientes e seus familiares, pela colaboração, pois sem os mesmos este trabalho não seria possível.

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

RESUMO	i
SUMMARY	v
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Coagulação Sangüínea	2
1.1.1. Via Intrínseca da Coagulação	2
1.1.2. Via Extrínseca da Coagulação	5
1.2. Inibidores da Coagulação	5
1.2.1. Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI)	6
1.2.2. Via Anticoagulante da Proteína C	6
1.3. Antitrombina	8
1.3.1. Histórico	8
1.3.2. Proteína Primária	10
1.3.3. Mecanismo de Ação	11
1.3.4. Interação da AT e heparina	12
1.3.5. Estrutura gênica	13
1.3.6. Classificação da deficiência	15
1.3.7. Deficiência hereditária	16
1.3.8. Base Molecular da Deficiência de AT	18
2 - OBJETIVOS	21
3 - CASUÍSTICA	23
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Coleta de Sangue	28
4.2. Dosagem de Antitrombina	28
4.2.1. Imunoeletroforese tipo "rocket"	28

4.2.2. Imunoeletroforese bidimensional	29
4.2.3. Método cromogênico.....	30
4.3. Extração de DNA.....	31
4.4. Amplificação pela PCR	32
4.5. Métodos de Triagem de Mutações	34
4.5.1. SSCP	34
4.5.2. CSGE.....	35
4.6. Seqüenciamento.....	36
5 - RESULTADOS	40
6 - DISCUSSÃO	56
7 - CONCLUSÕES	63
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Figura 1: Via Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea	04
Figura 2: Estrutura Gênica da AT	15
Figura 3: Imunoeletroforese tipo rocket	41
Figura 4: Imunoeletroforese bidimensional	41
Figura 5: Heredograma da família da paciente TR 216	44
Figura 6: Análise de SSCP e seqüenciamento do exon 4 da paciente TR 216	45
Figura 7: Heredograma da família da paciente TR 253	47
Figura 8: Análise de SSCP, CSGE e seqüenciamento do exon 5 da paciente TR 253....	47
Figura 9: Heredograma da família do paciente TR 303	49
Figura 10: Análise de CSGE e seqüenciamento do exon 1 do paciente TR 303	49
Figura 11: Análise de CSGE e seqüenciamento do exon 5 do paciente TR 303	50
Figura 12: Heredograma da família do paciente TR 491	52
Figura 13: Análise de SSCP e seqüenciamento do exon 6 do paciente TR 491	52
Figura 14: Heredograma da família da paciente TR 702	54
Figura 15: Análise de SSCP e CSGE e seqüenciamento do exon 3A da paciente TR 491	55

Tabela 1: Seqüência dos pares iniciadores utilizados para amplificação do gene da AT...	32
Tabela 2: Níveis de AT e classificação da deficiência dos pacientes estudados.....	42
Tabela 3: Padrões eletroforéticos encontrados no SSCP e CSGE e resultado do seqüenciamento dos 5 pacientes	43
Tabela 4: Análise laboratorial da paciente TR 216	44
Tabela 5: Análise laboratorial da paciente TR 253	46
Tabela 6: Análise laboratorial do paciente TR 303	48
Tabela 7: Análise laboratorial da família e do paciente TR 491	51
Tabela 8: Análise laboratorial da paciente TR 702	54
Quadro 1: Alinhamento de aminoácidos da AT de diferentes espécies	53

AT	Antitrombina
CSGE	Eletroforese em gel sensível a conformação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Kb	kilobases
Pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
RNA	Ácido ribonucléico
SSCP	Polimorfismo de conformação de hélice simples
TBE	Tampão Tris borato EDTA
TEMED	(N, N, N', N'-tetrametilenodiamino)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTE	Tampão Tris Taurina EDTA
TVP	Trombose venosa profunda

Resumo

A AT é o mais importante inibidor da trombina, além de inativar todos os outros fatores ativos da coagulação, com uma menor atividade sobre o fator VII ativado. O grau de inibição da trombina, do fator X ativado e do fator IX ativado é muito lenta. Esta inibição é dramaticamente aumentada na presença de heparina, tornando-se virtualmente instantânea, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

A deficiência de AT está associada a fenômenos tromboembólicos em humanos. De fato, a deficiência de AT foi a primeira causa descrita de trombofilia hereditária. A importância da manutenção de níveis normais de AT na circulação pode ser avaliada pelo fato de que, indivíduos heterozigotos para deficiência de AT podem apresentar quadro de tromboembolismo de repetição.

A frequência de deficiência congênita de AT não é incomum, estando por volta de 1/5000 e 1/2000 na população geral. Contudo, dependendo do tipo de deficiência, esta frequência pode ser de 1/500. A incidência de deficiência de AT em pacientes com trombofilia é de aproximadamente 3%. O modo de herança é autossômico dominante, e os heterozigotos apresentam concentração plasmática de AT ao redor de 40 - 70% do normal. A deficiência de AT foi classificada em 2 tipos: Tipo I é caracterizada pela redução da atividade e dos níveis de antígeno; Tipo II é caracterizada pela alteração da atividade associada a níveis normais de antígeno. O tipo II se subdivide em 3: Subtipo RS - anormalidade do sítio ativo, Subtipo HBS - anormalidade do sítio de ligação com a heparina, Subtipo PE - anormalidade do sítio ativo e do sítio de ligação com a heparina.

O gene da AT está localizado no cromossomo 1, na região 1q23→1q25 e inclui 7 exons, numa extensão de 13.480 pb. De acordo com o "database" de mutações no gene da AT, publicado em 1997 por LANE *et al.*, foram descritas 127 mutações, sendo que 60 das substituições nucleotídicas encontradas nos propósitos eram mutações "missense", 8 eram mutações "nonsense", e 7 eram mutações em sítio de clivagem. Dentre estas mutações 16 ocorreram em dinucleotídeos CpG. Foram descritas 12 inserções e 40 deleções. Também foram descritos um total de 13 polimorfismos.

Neste trabalho foram estudados cinco pacientes com deficiência de AT que apresentaram trombose espontânea (3 pacientes) ou associada ao uso de anticoncepcional oral (2 pacientes). O estudo familiar também foi realizado, contribuindo para uma melhor identificação da deficiência hereditária de AT.

O rastreamento de alterações moleculares foi realizado pelo SSCP e CSGE, que se mostraram complementares.

Com o uso do método de SSCP detectou 4 padrões anormais: um padrão anormal referente a dois polimorfismos no exon 4 (7596G→A e 7626G→A) em 2 pacientes; outro padrão referente à mutação +1 IVS5 G→A em 1 paciente; outro referente à mutação 13328 G→A no exon 6, com a troca do aminoácido alanina por treonina na posição 404, em um paciente, e outro no exon 3A, provavelmente decorrente da inserção ou deleção na posição 5379.

O CSGE revelou 4 padrões anormais: um padrão referente a um polimorfismo no IVS5 - 9893 G→C, em 2 pacientes; outro padrão correspondente à mesma mutação também determinada pelo SSCP, +1 IVS5 G→A em 1 paciente; outro padrão referente à mutação +5 IVS1 G→A em 1 paciente, e outro padrão anormal, também rastreado pelo SSCP, localizado no exon 3A, provavelmente decorrente da inserção ou deleção na posição 5379.

Todos os polimorfismos identificados já foram descritos anteriormente, e não parecem ter relação com a deficiência de antitrombina.

A mutação 13328 G→A no exon 6 já havia sido descrita em 3 outras famílias com deficiência de antitrombina, e parece interferir com o sítio de ligação com a heparina e com o sítio reativo. Em nosso paciente esta foi uma mutação *de novo*, confirmada por estudo de paternidade.

As outras 2 mutações ainda não foram descritas e ocorreram em sítios de clivagem do RNA, com troca de um G por um A nas posições +1 e +5, nos introns 5 e 1, respectivamente. Estas regiões são altamente conservadas no gene, conhecidas com regiões consenso. Mutações que ocorrem nesse região, em outros genes são responsáveis por outras doenças, como a hemofilia A, hemofilia B, deficiência de proteína C e S, e β -talassemia. Além disso, o estudo familiar mostrou que houve segregação da mutação com a deficiência.

Apesar da deficiência de antitrombina em heterozigose apresentar um risco relativo de trombose de 5 vezes, este estudo mostrou que muitos familiares são portadores assintomáticos, o que favorece a hipótese de que outros fatores ainda não identificados devem contribuir para a clínica de trombose. Outros fatores de risco para trombofilia como deficiência de proteína C, proteína S, e mutações no gene da protrombina, não estavam presentes em nenhum dos pacientes. As mutações no gene do fator V (fator V Leiden) e da MTHFR estavam presentes apenas no paciente com a mutação *de novo*.

Summary

AT is the most important thrombin inhibitor, also inactivate all the other coagulation active factors, with a little activity on activated factor VII. The inhibition is dramatically increased in the presence of heparin, becoming virtually instantaneous, even *in vivo* as *in vitro*.

AT deficiency is associated to thromboembolic phenomenons in humans. In fact, AT deficiency was the first described cause of hereditary thrombophilia. The importance of maintenance of normal At levels in the circulation can be evaluated by the fact that, heterozygous AT deficient individuals can present recurrent thromboembolism.

The frequency of congenital AT deficiency is not uncommon, being about 1/2000 to 1/5000 in the general population. However, depending on the deficiency type, this frequency can be of 1/500. The incidence of AT deficiency in patients with thrombophilia is approximately 3%. The inheritance way is autosomic dominant, and the plasmatic AT concentration in heterozygous is about 40 to 70% of the normal. AT deficiency was classified in 2 types: Type 1 is characterized by the reduction of the activity and of the levels of antigen; Type II is characterized by the alteration of the activity associated to normal levels of antigen. The type II is subdivided in 3: Subtype RS - abnormality of the active site, Subtype HBS - abnormality of the heparin binding site, Subtype PE - abnormality of the active site and of the heparin binding site.

AT gene is located on chromosome 1, in 1q23→1q25 and includes 7 exons, in an extension of 13.480 pb. In agreement with the database of mutations in the AT gene, published in 1997 by LANE *et al.*, 127 mutations were described, and 60 of the nucleotides substitutions were missense mutations, 8 were nonsense mutations, and 7 were splice site mutations. Sixteen mutations occurred at dinucleotides CpG. Twelve insertions and 40 deletions were also described. A total of 13 polymorphisms were identified.

We studied five patients with AT deficiency who presented spontaneous thrombosis (3 patients) or thrombosis associated to oral contraceptive use (2 patients). The family study was also accomplished, contributing to a better identification of the hereditary AT deficiency.

The molecular alterations were initially identified by SSCP and CSGE, and the results showed that they were complementary methods.

Using SSCP method, it was possible to detect 4 abnormal patterns: an abnormal pattern regarding two polymorphisms in the exon 4 (7596G→A and 7626G→A) in 2 patients; another related to the mutation +1 IVS5 G→A in 1 patient; and another regarding mutation 13328 G→A in the exon 6, with the change of the amino acid alanine for threonine in the position 404, in one patient. The last abnormal pattern is located in the exon 3A, and probably is related to a insertion or deletion in position 5379.

The CSGE revealed 4 abnormal patterns: a pattern regarding a polymorphism in the IVS5 - 9893 G→C, in 2 patients; another corresponding to the same mutation also determined by SSCP, +1 IVS5 G→A in 1 patient; and another pattern regarding the mutation +5 IVS1 G→A in 1 patient. The last one, also identified by SSCP, located in the exon 3A, and probably is related to a insertion or deletion in position 5379.

All the identified polymorphism was already described previously, and no relationship was found with AT deficiency.

The mutation 13328 G→A in the exon 6 had already been described in 3 other families with antithrombin deficiency, and it seems to interfere with the heparin binding site and the reactive site. In our patient it was a *de novo* mutation confirmed by paternity study.

The other two mutations were not described yet, and were located at splice sites, with the change of a G to A, in the +1 and +5 positions, in the introns 5 and 1, respectively. These consensus areas are highly conserved in the gene. Mutations localized in other genes at the same areas are responsible for other diseases, like hemophilia A, hemophilia B, protein C or protein S deficiency and β -thalassemia. Besides, the family study showed that there was segregation of the mutation with the deficiency.

Heterozygous AT deficiency have a five-fold increased risk for venous thrombosis. In this study a number of relatives are asymptomatic carriers, that favors the hypothesis that thrombosis is a multifactorial disease. The other alterations associated with a risk for thrombosis, like protein C and protein S deficiency, and prothrombin (20210 G→A) gene

mutation were not present in any patient. Mutation in the gene of factor V (factor V Leiden) and MTHFR were present only in the patient with AT *de novo* mutation.

Introdução

1.1. COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

A hemostasia é o sistema responsável pela manutenção do sangue fluido dentro dos vasos, participando o endotélio vascular, as plaquetas, os fatores e inibidores da coagulação sangüínea, e a fibrinólise.

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 do sangue ocorre por duas vias diferentes: a via intrínseca, que se inicia pela ligação do fator XII a uma superfície ativadora, o colágeno exposto do subendotélio; ou a via extrínseca, que é iniciada pela liberação de fator tecidual dos tecidos adjacentes ao vaso lesado. Estas duas vias convergem em uma via comum, após a ativação do fator X (TUDDENHAM & COOPER, 1994) (Figura 1).

1.1.1. Via Intrínseca da Coagulação

O papel iniciador foi destinado ao fator XII, uma proteína plasmática, o qual além de se ligar às superfícies carregadas negativamente (via de ativação por contato), como vidro, caolim, carbonato de bário, entre outros, sofre um rearranjo, tornando-se mais sensível à ativação pela calicreína. Esta circula como um zimógeno, a pré-calicreína, a qual 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. O cininogênio de alto peso molecular atua como cofator nesta reação, promovendo a ligação da calicreína e pré-calicreína às superfícies carregadas negativamente. O fator XII ativado, uma vez produzido, cliva o fator XI, ativando-o (TUDDENHAM & COOPER, 1994). Após desligar-se da superfície a qual estava ligado e na presença de íons cálcio, o fator XI ativado 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. O fator VIII ativado acelera a ativação do fator X pelo fator IX ativado, sendo conhecido como complexo tenase. O fator X é clivado pelo fator IX, resultando no fator X ativado. O fator X ativado então promove a formação do complexo protrombinase que compreende os fatores V ativado, X ativado e protrombina (fator II) (COOPER & KRAWCZAK, 1997). O fator V é clivado pela trombina ou pelo fator X ativado. Com esta clivagem o fator V agora ativado, se liga às superfícies plaquetárias ativadas, na presença de íons cálcio livres, acelerando a ativação da protrombina pelo fator X ativado, originando portanto trombina. Esta 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 ativado. O fator XIII circula como 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 classificado como uma transamidase, que age formando ligações covalentes ϵ -(γ -glutamil)lisina entre dois monômeros de fibrina, garantindo a estabilização do coágulo. Esse mesmo fator promove a ligação de proteínas plasmáticas como fibronectina e α 2-antiplasmina às cadeias de fibrina, resultando na incorporação das mesmas ao coágulo (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

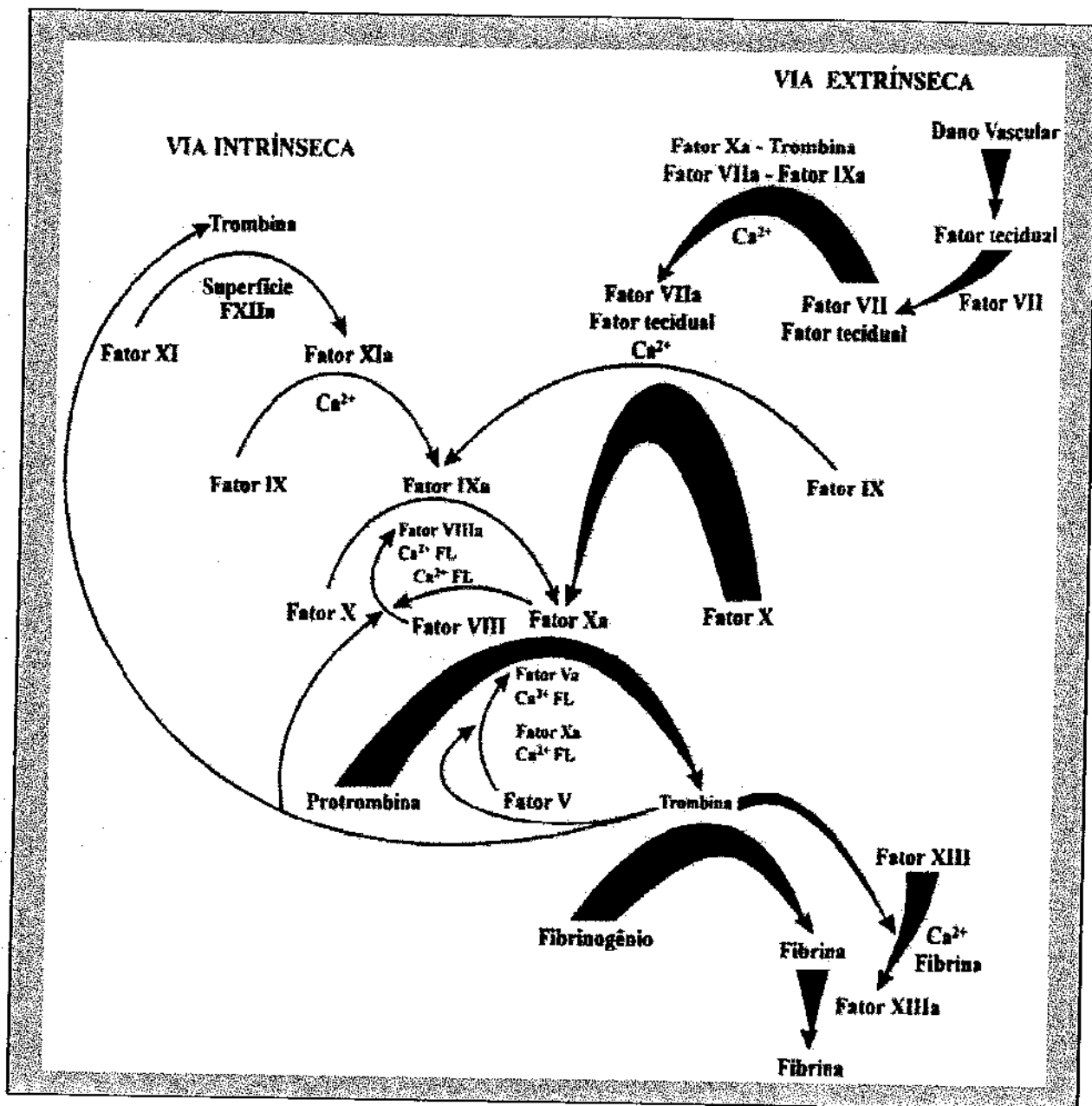


Figura 1: Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea. A ativação da via intrínseca da coagulação se inicia a partir da ativação do fator XII e também pode ser iniciada quando a trombina gerada, leva à ativação do fator XI. A ativação da via extrínseca da coagulação ocorre após dano vascular e exposição do fator tecidual ao sangue. 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.

1.1.2. Via Extrínseca da Coagulação

A Via Extrínseca da coagulação pode produzir um coágulo em segundos, ao contrário da Via Intrínseca, que leva alguns minutos. É chamada de Via Extrínseca, uma vez que é acionada a partir de um componente externo ao sangue. 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 subendoteliais da parede vascular, cérebro e placenta (TUDDENHAM & COOPER, 1994). Na coagulação, é completamente ativo no estado natural, não precisando de modificações para desempenhar seu papel de cofator. Isto somente é possível pelo fato de não estar normalmente exposto na circulação. O rompimento da parede vascular permite que o processo de ativação se inicie. O fator tecidual funciona como um cofator na ativação dos fatores VII e X. Os fatores VII ativado e X ativado são capazes de ativação recíproca, e esse processo pode ser engatilhado pela presença de uma quantidade diminuta de fator X ativado ou fator VII ativado. O fator VII ativado cliva o fator X da mesma maneira que o fator IX ativado no complexo tenase, conduzindo à convergência das vias intrínseca e extrínseca. O complexo fator VII/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 (COOPER & KRAWCZAK, 1997).

1.2. INIBIDORES DA COAGULAÇÃO

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: antitrombina, proteína C, proteína S e inibidor da via do fator tecidual. Os inibidores dessas proteases podem ser divididos em dois grupos principais: as serpinas e as kuninas (SALVESEN & PIZZO, 1994). As serpinas são inibidoras de serina proteases, e as kuninas inibem a tripsina pancreática, tendo como seus principais representantes a antitrombina e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), respectivamente. A

importância dessas moléculas reguladoras é evidenciada pela tendência ao desenvolvimento de trombozes, quando de sua deficiência (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Outros inibidores plasmáticos de proteases como o cofator II da heparina, a α 1-antiplasmina, a α 2-antiplasmina, o inibidor do ativador do plasminogênio 1, o inativador de C1 e o inibidor da proteína C ativada têm papel significativo na regulação da coagulação sanguínea.

1.2.1. Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI)

O plasma contém um inibidor do fator tecidual, originalmente denominado inibidor da coagulação associado à lipoproteína por BROZE *et al.* (1988), e Inibidor da Via Extrínseca por RAO & RAPAPORT (1987) e atualmente é chamado de Inibidor da Via do Fator Tecidual. O TFPI é uma proteína que foi classificada, por sua estrutura, como um inibidor do tipo Kunitz, caracterizado por 58 aminoácidos com os resíduos de cisteína conservados. A inibição pelas kuninas caracteriza-se por ser lenta, competitiva, reversível e de forte ligação à protease. Sua ação está relacionada com a formação de um complexo inibitório com 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. O TFPI é um inibidor de serina protease que contém uma sequência amino-terminal ácida seguida de três domínios do tipo Kunitz, e uma região do tipo carboxi-terminal básica. 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).

1.2.2. Via Anticoagulante da Proteína C

A trombina tem um papel importante na anticoagulação, pois participa da Via Anticoagulante da proteína C. A ativação da proteína C requer a presença de um receptor, a trombomodulina, que é expresso na superfície das células endoteliais e tem alta afinidade pela trombina. A proteína C é ativada pelo complexo trombomodulina-trombina e liberada como uma serina protease, proteína C ativada, com especificidade para os fatores V e VIII, dando início a Via Anticoagulante da proteína C. A proteína C requer um cofator para sua ação nos fatores V e VIII, chamado proteína S, uma proteína sintetizada por células endoteliais assim como pelo fígado (TUDDENHAM & COOPER, 1994).

Além disso, a proteína C ativada tem uma ação pró-fibrinolítica, tanto pela diminuição da atividade do inibidor do plasminogênio (produzido pelas plaquetas), quanto pela redução nos níveis de formação de trombina (COMP & ESMON, 1981).

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 (DI SCIPIO *et al.*, 1977).

1.3. ANTITROMBINA

1.3.1. Histórico

Em 1905 Morawitz descreveu pela primeira vez a existência de um anticoagulante, caracterizado pela capacidade do plasma humano de neutralizar lentamente a trombina, introduzindo o termo "atividade progressiva de AT" (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; COSGRIFF *et al.*, 1983)

Em 1918, Howell and Holt (COSGRIFF *et al.*, 1983) descrevem que com a descoberta e a utilização da heparina como anticoagulante, logo ficou evidente que o tratamento somente era eficaz na presença de um componente plasmático (BLAJCHMAN *et al.*, 1992). Esta atividade foi chamada 20 anos mais tarde por Quick, Brinkhous e colaboradores (COSGRIFF *et al.*, 1983) de cofator de heparina.

Em 1943, Astrup e Darling demonstraram que a "antitrombina progressiva", que inativa a trombina lentamente na ausência de heparina, e o cofator de heparina, que produz uma rápida perda da atividade da trombina na presença de heparina eram componentes plasmáticos diferentes (COSGRIFF *et al.*, 1983).

Em 1954, Seegars e colaboradores (SEEGARS *et al.*, 1954) propuseram uma classificação numérica para as várias AT ativas: a AT I representava a capacidade de um coágulo de fibrina de absorver trombina e então neutralizar sua atividade; a AT II representava a atividade do cofator de heparina; a AT III foi o termo usado para descrever a atividade da AT progressiva inicialmente descrita por Morawitz; a AT IV representava a atividade inibidora de trombina vista na associação com ativação da protrombina; a AT V foi designada para a atividade de AT encontrada no plasma de um paciente com hipergamaglobulinemia, na qual a globulina patológica inibia a trombina; e a AT VI representava a inibição de trombina produzida pelos produtos de degradação da fibrina (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

Com o isolamento de uma proteína plasmática por Abildgaard (ABILDGAARD *et al.*, 1968; COSGRIFF *et al.*, 1983) em 1968, que estava associada com atividade progressiva da AT, foi compreendido que esta proteína (AT III) era o maior anticoagulante plasmático e que ela também tinha atividade de cofator de heparina (AT II) (ROSENBERG *et al.*, 1973; BLAJCHMAN *et al.*, 1992)

Posteriormente, a disponibilidade de uma grande quantidade desta proteína, proporcionou a evidência convincente de que o componente plasmático envolvido na atividade progressiva de AT e que a produção de atividade de cofator de heparina eram os mesmos (BLAJCHMAN *et al.*, 1992), sendo que em 1973, foi chamada de Antitrombina III (AT III) por Rosenberg e Damus (ROSENBERG *et al.*, 1973; COSGRIFF *et al.*, 1983).

Foram realizadas várias tentativas de mudar a nomenclatura, e a partir de 1994, de acordo com recomendações do Comitê da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose (ISTH), a nomenclatura Antitrombina (AT) foi implantada (LANE *et al.*, 1997).

O possível papel da AT no desenvolvimento da trombose foi percebido por Howell em 1914 (COSGRIFF *et al.*, 1983).

A existência de uma deficiência envolvendo a AT foi reconhecida primeiramente por Egberg em 1965 (EGEBERG *et al.*, 1965; COSGRIFF *et al.*, 1983; HATHAWAY, 1991; BLAJCHMAN *et al.*, 1992), quando descreveu uma família, onde alguns membros sofriam de episódios de tromboembolismo recorrente. O plasma dos membros afetados desta família apresentava uma redução tanto na atividade progressiva da AT como na atividade de cofator de heparina (HATHAWAY, 1991; BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

Após esta primeira descrição da deficiência de AT, muitas outras famílias com deficiência clássica de AT foram descritas em diversas localizações geográficas do mundo, com uma prevalência de 1:2000 a 1:5000 (THALER *et al.*, 1981; COSGRIFF *et al.*, 1983; GRUNDY *et al.*, 1991)

Uma década após a descrição inicial da deficiência clássica de AT, Sas *et al.* (1975) descreveram o primeiro caso de uma família com uma deficiência qualitativa de AT, causada pela presença na circulação de uma proteína mutante: AT Budapest (SAS *et al.*, 1974; BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

Outra década se passou até que o estudo molecular permitiu a determinação da sequência completa de nucleotídeos do cDNA da AT humana (BOCK *et al.*, 1982; PROCHOWNIK *et al.*, 1983; STACKHOUSE *et al.*, 1983; CHANDRA *et al.*, 1983; OLDS *et al.*, 1993).

1.3.2. Proteína primária

A AT é um membro da família dos inibidores de serina proteases, também designadas de serpinas (COOPER & KRAWCZAK, 1997).

O grau de homologia entre as serpinas sugere que elas se desenvolveram de uma molécula de ancestral comum, cerca de 300 a 600 milhões de anos atrás (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; PROCHOWNIK *et al.*, 1985). As serpinas consistem de cadeias simples de moléculas de glicoproteína, de aproximadamente 400 aminoácidos de extensão (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

Embora a maior parte das serpinas funcionem como inibidoras de serina proteases, nem todas tem conservado tal função. Algumas tem desenvolvido outros papéis, tais como carreadoras de moléculas lipofílicas, como precursoras de hormônios ou ainda sem função reconhecida (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

Cada inibidor serpina tem um centro reativo semelhante, que atua como um pseudosubstrato para as proteases alvo (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

A inativação de proteases pelos inibidores serpinas ocorre pela formação de um complexo covalente estequiométrico 1:1 entre o sítio ativo da serina protease e o sítio reativo da serpina (designados sítios P1 e P1', respectivamente) (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; COOPER & KRAWCZAK, 1997; BOCK & PROCHOWNIK, 1987). Na AT o sítio peptídico P1 – P1' está localizado entre Arg 393 e Ser 394 (PERRY *et al.*, 1998).

A AT humana derivada do plasma é sintetizada pelos hepatócitos (VIDAUD *et al.*, 1991) e sua meia-vida é de 2 a 4 dias. Inicialmente a AT é sintetizada como uma glicoproteína de cadeia simples que compreende 464 resíduos de aminoácidos. Após a clivagem entre a cisteína -1 e a histidina +1 com a liberação do peptídeo sinal de 32 aminoácidos, a proteína plasmática madura de 432 aminoácidos é secretada (JOCHOMANS *et al.*, 1998; PERRY *et al.*, 1998). Destes aminoácidos, 6 são cisteínas que formam 3 pontes dissulfídicas, ligando Cys 8-Cys 128, Cys 21-Cys95 e Cys 247-Cys430 (LANE & BAYSTON, 1997; SUN & CHANG, 1989; TOMONARI *et al.*, 1992). O peso molecular da AT é de 58.200 daltons.

A molécula também contém 4 sítos de glicosilação, os resíduos Asn 96, Asn 135, Asn 155 e Asn 192, onde se ligam os oligossacarídeos, e compreendem aproximadamente 15% do peso molecular (LANE & BAYSTON, 1997; BLAJCHMAN *et al.*, 1992). Uma forma subglicosilada de AT plasmática, que representa aproximadamente 10% da concentração de AT do plasma total, é glicosilada em somente 3 dos 4 resíduos de Asn, não incluindo Asn 135 (LANE & BAYSTON, 1997; BLAJCHMAN *et al.*, 1992). Esta glicosilação parcial é atribuída à presença de uma Ser na terceira posição da sequência consenso de N-glicosilação (LANE & BAYSTON, 1997; PICARD *et al.*, 1995).

1.3.3. Mecanismo de Ação

A AT é o maior inibidor fisiológico de trombina e desempenha um papel na inibição de outras serina proteases, incluindo fatores X, IX, XI e XII ativados. A AT também atua como um inibidor fisiológico do fator VII, ao acelerar a dissociação do complexo fator VII ativado/fator tecidual, e impedindo sua reassociação (LANE & BAYSTON, 1997; RAO *et al.*, 1993). A inibição fisiológica mais importante é a inibição de trombina, que é relativamente lenta sob condições fisiológicas, mas grandemente acelerada na presença de heparina (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

A inativação das proteases pela AT envolve a formação de um complexo molar 1:1 entre o sítio ativo da serina e o centro reativo da AT. O centro reativo Arg 393 - Ser 394 da AT está situado no domínio carboxi-terminal da molécula (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; BJORK *et al.*, 1982).

Quando a trombina interage com AT, as duas moléculas formam um complexo estequiométrico covalente estável, que é rapidamente removido da circulação. A formação deste complexo estável covalente inicialmente envolve a clivagem da ligação peptídica Arg 393 - Ser 394 pelo sítio ativo da trombina e posterior associação entre o sítio ativo da serina e a Arg 393 (P1) da AT clivada (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; LANE & BAYSTON, 1997; BJORK *et al.*, 1982; BJORK *et al.*, 1981).

A inibição da trombina, assim como de outras serina proteases da via da coagulação pela AT é relativamente lenta na ausência de heparina, mas pode ser muito potencializada na presença desta. Este aumento é mediado pela ligação da heparina com a AT, resultando

na sua mudança conformacional, que a torna mais ativa na inibição das proteases (BLAJCHMAN *et al.*, 1992, OSLON & SHORE, 1981).

1.3.4. Interação da AT e heparina

Um efeito acelerador na formação do complexo AT-protease é causado pela heparina. A formação do complexo AT-trombina é acelerado em pelo menos 2000 vezes na presença de heparina (LANE & BAYSTON, 1997).

O domínio de ligação com a heparina está localizado em 2 regiões, entre os aminoácidos 41-49 e 107-156 (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; LANE & BAYSTON, 1997). Ambas regiões consistem de grupos de aminoácidos localizados na região amino-terminal da molécula.

Os estudos que indicam que a região entre os aminoácidos 41-49 está envolvida na ligação da heparina, mostraram que a modificação química do Trp 49 resulta numa ligação prejudicada entre a heparina e a AT (GETTINS *et al.*, 1992; BLACKBURN & SIBLEY, 1980), e que as mutações que envolvem a Arg 24, Pro 41 e Arg 47 interferem direta ou indiretamente nessa ligação (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; LANE & BAYSTON, 1997).

A segunda região de ligação com heparina consiste de resíduos de aminoácidos carregados positivamente na superfície da molécula de AT: Lys 107, Lys 114, Lys 125, Arg 129, Arg 132 e Lys 133 (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; LANE & BAYSTON, 1997).

Foi mostrado recentemente, que a ponte dissulfídica Cys 8-Cys 128, localizada dentro do segundo domínio de ligação com a heparina, é necessária para a integridade da ligação da heparina com a AT (BORG *et al.*, 1988).

Os aminoácidos Arg 24, Arg 47, Lys 125 e Arg 129 são resíduos essenciais na interação da AT com a heparina. Já, os aminoácidos Pro 41, Leu 99, Ser 116 e Gln 118, apesar de não participarem diretamente na ligação da AT com a heparina, são importantes na manutenção da estrutura da região inicial de contato, e sua substituição resulta numa ligação prejudicada (MILLE *et al.*, 1994).

A região hidrofóbica na porção C-terminal é também essencial para a manutenção da estrutura tridimensional da molécula assim como para a propagação da mudança conformacional da AT induzida pela heparina (LANE & BAYSTON, 1997).

1.3.5. Estrutura gênica

A clonagem molecular permitiu a determinação da sequência completa de nucleotídeos do cDNA da AT humana (BOCK *et al.*, 1982; PROCHOWNIK *et al.*, 1983; STACKHOUSE *et al.*, 1983). Quase simultaneamente, 3 grupos de pesquisa descreveram o isolamento do cDNA da AT humana e identificação do gene (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

O gene da AT humana está localizado no cromossomo 1q23-25 e sua sequência completa contém 13480 pares de base (OLDS *et al.*, 1993) do sítio de iniciação de transcrição até o último nucleotídeo do AATAAA da cauda de poli A (LANE *et al.*, 1997).

O RNA mensageiro (RNAm) contém 1392 nucleotídeos, dos quais 96 formam os 32 aminoácidos do peptídeo sinal, e 1296 formam os 432 aminoácidos da AT plasmática circulante (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; BAYSTON & LANE, 1997) (Figura2).

O gene da AT humana consiste de 7 exons, 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 e 6 (OLDS *et al.*, 1993, BLAJCHMAN *et al.*, 1992) e 6 sequências intrônicas. Inicialmente 6 exons foram identificados, mas a análise posterior revelou um intron de 1 kb dentro do exon 3, o que demonstrou que na verdade tratavam-se de 2 exons, chamados então de exons 3A e 3B (BOCK *et al.*, 1988) (Figura2).

O sítio de início da transcrição encontra-se aproximadamente 70 nucleotídeos acima do codon de iniciação ATG. Na região 3' do gene, o codon de terminação e a cauda de poli-A estão separados por 87 nucleotídeos, contendo uma sequência de poliadenilação sinalizadora, AATAAA, 54 nucleotídeos abaixo do codon de terminação (BAYSTON & LANE, 1997; BOCK *et al.*, 1982; STACHOUSE *et al.*, 1983).

Dentro do gene da AT, 9 sequências completas e 1 sequência parcial de repetições *Alu* foram identificadas nos introns 1, 2, 3B, 4 e 5; e com exceção de uma delas, todas as outras estão orientadas no sentido inverso (COOPER & KRAWCZAK, 1997). Juntas, essas repetições *Alu* compreendem aproximadamente 22% da sequência intrônica (COOPER & KRAWCZAK, 1997). Duas das repetições *Alu* (5 e 8) dentro do intron 4 tem, na sua porção final, repetições polimórficas do trinucleotídeo ATT (BAYSTON & LANE, 1997).

Os polimorfismos identificados incluem um polimorfismo localizado na região promotora na posição -76; um sítio para a enzima *Pst* I no codon 305; um sítio para a enzima *Nhe* I no intron 4; e um sítio para a enzima *Dde* I no intron 5 (BAYSTON & LANE, 1997).

Recentemente, identificaram-se 2 seqüências repetidas semelhantes aos VNTR (variable number tandem repeat) do genoma humano, no intron 4 do gene da AT (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

Elementos reguladores foram identificados na região promotora e no intron 1 do gene da AT. O primeiro está localizado entre a posição -150 a +68, e na verdade é subdividido em 3 elementos de ligação proteica: elemento A (-126 a -100), elemento B (-92 a -68) e elemento C (-14 a +37). Em experimentos com a linhagem celular HepG2, o receptor nuclear HNF4 liga-se às regiões A e C do gene da AT. A proteína de ligação C/EBPa, rica em zíper de leucina, interage com a região B. Uma outra região reguladora está localizada entre +300 a +700, no intron 1, e aumenta a expressão somente no sentido inverso. Quando os 2 elementos reguladores estão presentes, a região reguladora do intron 1 atua em oposição à primeira região, reduzindo a expressão (BAYSTON & LANE, 1997).

Uma região semelhante à seqüência consenso "TATA box" está localizada a -155 do sítio de início de transcrição. Também identificou-se um elemento iniciador consenso (CCACCC) localizado na posição -43 a -38. Parece haver uma região "GAGA box" localizada entre -14 a +1, que é controlada pelo hormônio de crescimento (BAYSTON & LANE, 1997).

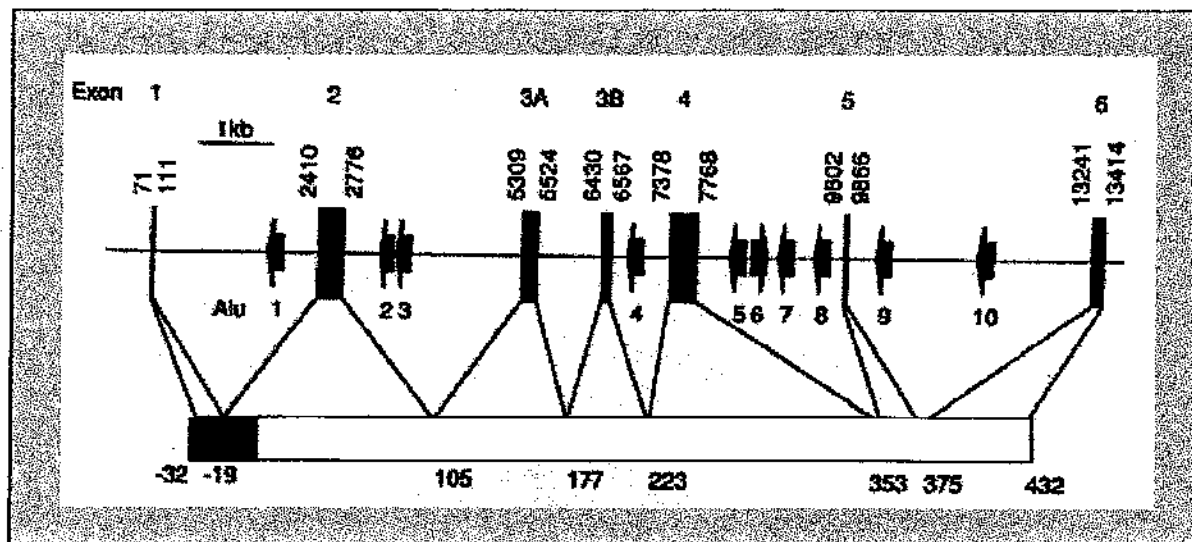


Figura 2: Organização estrutural do gene (acima) e da proteína AT. No gene estão representadas as regiões codificadoras (exons 1-6), as repetições (setas). Na proteína, o retângulo em preto representa o peptídeo sinal.

1.3.6. Classificação da deficiência

Tentando uma classificação para a deficiência de AT, um número de dificuldades surgiram, como por exemplo, o nome do inibidor progressivo de trombina, esquemas múltiplos de classificação, nomenclatura para descrever defeitos específicos, homoziguidade ou heteroziguidade, descrições repetidas do mesmo defeito molecular, numeração dos exons da AT humana (BLAJCHMAN *et al.*, 1992).

A ausência de um Comitê Internacional que estabelecesse o nome apropriado para o inibidor de trombina foi a primeira dificuldade. Várias opiniões surgiram como Antitrombina, AT III, cofator de heparina I, serpina I e outros mais. O indicado recentemente pelo ISTH foi o termo Antitrombina (BLAJCHMAN *et al.*, 1992; LANE *et al.*, 1997).

Uma segunda dificuldade ocorreu devido a diferentes esquemas de classificação propostos para descrever os vários tipos de deficiência de AT. Alguns pesquisadores preferiram classificar a AT em somente 2 tipos, enquanto outros classificaram a deficiência em 5 tipos diferentes (PROCHROWNIK, 1989). O sistema de classificação a seguir é amplamente usado (NAKAGAWA *et al.*, 1991; JOCHMANS *et al.*, 1998) e a deficiência de AT

é dividida em 2 categorias, baseada na quantidade relativa do antígeno de AT e de sua atividade no plasma:

Tipo I: a redução da atividade é acompanhada pela diminuição da concentração antigênica de AT (deficiência clássica).

Tipo II: diminuição da atividade e nível antigênico normal de AT. É subdividido em 3 subgrupos:

RS: defeito no sítio ativo

HBS: defeito no sítio de ligação com a heparina

PE: pleiotrópico (defeito combinado RS e HBS)

A classificação tem importância clínica, uma vez que o tipo de alteração tem relação com o risco tromboembólico. Assim, os indivíduos heterozigotos para uma mutação HBS tem um risco reduzido de episódios tromboembólicos, e a trombose pode as vezes ser explicada pela co-existência do Gln506 fator V (IRELAND *et al.*, 1996). Por outro lado, indivíduos homozigotos para o tipo II HBS, apresentam claramente um risco aumentado de trombose, exibindo uma herança autossômica recessiva (LANE *et al.*, 1997).

1.3.7. Deficiência hereditária

A deficiência de atividade plasmática de AT resulta num aumento do risco de tromboembolismo, principalmente venoso. Como já citado anteriormente, o primeiro caso de deficiência de AT em heterozigose foi descrito por Egeberg em 1965, e desde então inúmeros casos de deficiência têm sido relatados. A maioria dos estados de deficiência hereditária de AT é caracterizada por uma redução de 50% na atividade e/ou concentração de AT (LANE & BAYSTON, 1997).

A deficiência de AT normalmente apresenta um modo de herança autossômico dominante (OLDS *et al.*, 1990; JOCHMANS *et al.*, 1994; NAKAHARA *et al.* 1997), com a maior parte dos indivíduos afetados sendo heterozigotos para a deficiência e com nível de AT plasmática entre 40% e 70% do normal. Nos estudos clínicos, o nível é normalmente expresso como uma porcentagem em relação a um "pool" de plasmas normais utilizado para

a elaboração de uma curva padrão. Os valores normais encontram-se na faixa de 70-130 U/dl (COOPER & KRAWCZAK, 1997).

Na população em geral, a prevalência da deficiência hereditária de AT foi estimada entre 1:2000 a 1:5000 (GRUNDY *et al.*, 1991; JOCHMANS *et al.*, 1994). Contudo, recentemente numa pesquisa que avaliou mais de 4000 escoceses doadores de sangue, verificou-se uma prevalência de 1:250, utilizando uma técnica sensível a deficiências associadas a um defeito de ligação com a heparina. Na verdade, essa diferença pode ser explicada quando os indivíduos portadores da deficiência foram separados de acordo com o tipo de alteração: somente um doador apresentava deficiência tipo 1 (1/4200), 2 doadores com deficiência tipo 2 RS (1/2100) e 13 doadores com deficiência do tipo 2 HBS (1/350). Esses resultados sugerem que a população normal inclui indivíduos que tem anormalidades bioquímicas de AT com muito baixo risco trombótico, conforme entendimentos atuais da doença tromboembólica venosa (LANE & BAYSTON, 1997).

A deficiência de AT em heterozigose na literatura parece estar associada a um alto risco de trombose, e aproximadamente 50% dos afetados irão desenvolver um episódio trombótico por volta da terceira a quarta década de vida. Contudo os estudos de famílias com trombofilia evidenciam uma baixa frequência de deficiência de AT, 10 a 20 vezes menor que o esperado. Como é pouco provável que a deficiência de AT em famílias trombofílicas tenha sido subestimado, o mais provável é que tanto o risco de trombose associado a deficiência de AT como a frequência na população geral, ou ambos, tenham sido superestimados. Outra possibilidade é quanto a diferença dos métodos empregados para o diagnóstico de deficiência de AT. Assim, quando os métodos são sensíveis para a detecção de deficiências do tipo 2 HBS, essa frequência aumenta. Contudo, este subtipo não está associado a um risco elevado de trombose (MILETICH, 1998).

A prevalência da deficiência hereditária de AT em pacientes trombofílicos tem sido discutida em vários estudos. Numa análise cumulativa de pacientes jovens (< 45 anos) com trombose venosa, a prevalência da deficiência de AT foi de 4.5% (LANE & BAYSTON, 1997). Por outro lado, outros estudos mostraram incidências de 0.5% (TABERNERO *et al.*, 1991) e 1.1% (HEIJBOER *et al.*, 1990).

O quadro clínico de deficiência de AT caracteriza-se por trombose venosa, e os sítios mais comuns são as veias profundas dos membros inferiores. Outros sítios encontrados

frequentemente incluem veia pélvica, veia cava inferior, vasos mesentéricos, veia hepática e portal (HATHAWAY, 1991; LANE & BAYSTON, 1997; THALER & LECHNER, 1981). A trombose arterial não é comum, mas também tem sido descrita (LANE & BAYSTON, 1997).

A associação da deficiência de AT e do Gln 506-fator V têm sido relatada em famílias com alta prevalência de trombose, ou em indivíduos com quadro tromboembólico precoce. Uma característica única dessa associação é que 2 padrões de herança são possíveis: primeiro, uma segregação independente, no qual os defeitos dos genes segregam em gerações sucessivas; e segundo, uma cossegregação, no qual ambos os defeitos genéticos estão no mesmo cromossomo e são passadas simultaneamente para sucessivas gerações (LANE & BAYSTON, 1997).

1.3.8. Base Molecular da Deficiência de AT

Numerosos casos de deficiência de AT tem sido agora caracterizados. A deficiência tipo I pode ser produzida por grandes deleções do gene ou por mutações de ponto, incluindo pequenas inserções ou deleções que interrompem a produção da proteína no alelo afetado. As deleções podem incluir todo o gene, como descrito em 5 famílias independentes, ou regiões menores, como a deleção da região 5' até o exon 2, ou do exon 6 até a região 3'. A substituição de uma única base na região codificadora do gene da AT leva a síntese de uma proteína variante, que é a base para todos os tipos de deficiência tipo II descritos até o momento. A natureza e a localização do aminoácido substituído na AT são determinantes críticos do fenótipo resultante (LANE & BAYSTON, 1997).

Deficiência Tipo I (clássica):

A maioria dos casos de deficiência tipo I são devido a mutações de ponto (substituição de uma única base) ou pequenas inserções ou deleções dentro do gene da AT. Essas mutações parecem causar uma redução na síntese de AT por uma variedade de mecanismos: pequenas inserções ou deleções que levam a uma modificação na estrutura de leitura da tradução e numa terminação prematura ("frameshifts"); substituição de nucleotídeos que produzem um codon de terminação prematuro; mutações que afetam o processamento do RNA e mutações que produzem AT instáveis que então não são secretadas eficientemente ou que apresentam uma meia-vida plasmática encurtada (LANE & BAYSTON, 1997).

A maior parte das mutações de ponto que ocorrem na deficiência tipo I são únicas, com exceção da mutação CGA para TGA no codon 129 e a deleção de 6 pb nos codons 106-108. A primeira pode ser explicada por se tratar de uma região hot spot (dinucleotídeo CpG), e a segunda pelo sítio de deleção estar flanqueado por uma sequência repetitiva de T (TTT), favorecendo mecanismos que envolvem o escorregamento e mispairing do DNA.

Deficiência Tipo II:

RS (defeito no sítio reativo):

As variantes tipo II RS não são capazes de inativar os fatores de coagulação ativados. Para um melhor entendimento, o tipo II RS pode ser classificado em 3 subgrupos: o primeiro, é aquele com substituições de aminoácidos que impedem a ação do sítio ativo. Substituições no sítio reativo P1 ou nos sítios P1'e P2 impedem ou diminuem a interação da AT com trombina. O segundo subgrupo envolve mutações que ocorrem na região P12-P10, que é altamente conservada em todas as serpinas e crucial para a inserção rápida de um "loop" reativo durante a inativação da trombina. Essas variantes da AT são clivadas em seu sítio ativo mas não formam um complexo com a trombina. O terceiro subgrupo é composto por uma única variante, Asn187 → Asp, que tem um aumento de afinidade pela heparina e formação de polímeros, com perda da função do sítio ativo, causada pela desestabilização da região molecular mutante (LANE & BAYSTON, 1997).

HBS (defeito no sítio de ligação com a heparina):

A maioria das variantes tem mutações dentro da primeira região de ligação da AT com a heparina (resíduos 41 e 47). Porém, algumas dessas variantes foram caracterizadas com mutações afetando diferentes resíduos. Um exemplo é a substituição Ile7 → Asn (BRENNAN *et al.*, 1988), que resulta na produção de um novo sítio de glicosilação na posição 7. Nesta situação não está claro se o que altera a ligação com a heparina é a substituição do aminoácido ou a geração deste novo sítio de glicosilação. Uma outra mutação, a substituição Arg24→Cys (BORG *et al.*, 1990), envolve a perda de um aminoácido básico, sugerindo que este faz parte de um sítio principal de ligação inicial da AT à heparina. A Leu 99 espacialmente está localizada logo abaixo do domínio de interação da AT com a heparina, e

a mutação Leu99→Phe (OLDS *et al.*, 1992) altera a ligação com a heparina, uma vez que modifica a geometria deste domínio. Um mecanismo parecido pode explicar a redução na afinidade com a heparina que ocorre com as substituições recentemente descritas da Ser116→Pro (OKAJIMA *et al.*, 1993), Leu99→Val (CHOWDURY *et al.*, 1994) e Gln118→Pro (CHOWDURY *et al.*, 1994).

Outra variante do tipo II HBS, a Arg129 → Gln, envolve uma segunda região de ligação com a heparina, (GANDRILLE *et al.*, 1990). Os aminoácidos Lys125, Arg129, Arg132, Lys133, Lys136 e Lys139 constituem uma parte essencial do sítio de contato de ligação com a heparina (GANDRILLE *et al.*, 1990; CHURCH *et al.*, 1989).

PE (defeito combinado RS e HBS):

As mutações da AT tipo II PE foram inicialmente classificadas como tipo I; contudo, posteriormente demonstrou-se uma diminuição desproporcional da atividade em relação à concentração antigênica, caracterizando um novo subtipo. A primeira dessas variantes foi a AT Utah, Pro407→Leu (BOCK *et al.*, 1988). Outras variantes deste subtipo incluem aquelas com substituições de aminoácidos nos codons 402, 404, 405, 406, e 407. É interessante que quase todos as variantes neste subgrupo envolvem substituições no exon 6 na região P9'-P14'. Essas AT variantes não são capazes de inativar a trombina e apresentam redução na afinidade de ligação com a heparina. As substituições podem induzir uma mudança conformacional no sítio de ligação com a heparina, ou podem impedir a mudança conformacional do centro reativo induzido pela heparina.

Recentes estudos de transfecção celular tem demonstrado que o principal mecanismo envolvido na diminuição da AT no subtipo PE, é uma redução na síntese da proteína, e não um aumento do clearance.

Objetivos

Visto que:

- A deficiência de antitrombina é uma etiologia importante de trombofilia primária;
- É importante se compreender os mecanismos genéticos relacionados à deficiência de antitrombina;
- No Brasil, até o momento, as alterações moleculares em famílias deficientes em antitrombina não foram descritas;

Este trabalho teve por objetivo analisar em pacientes brasileiros com trombofilia e deficientes em AT:

- as mutações no gene da antitrombina
- a transmissão familiar das mutações identificadas
- a presença de outros fatores de risco para trombofilia hereditária, verificando se há alguma relação com a expressão clínica de trombose.

Casuística

A casuística compreendeu 5 pacientes portadores de deficiência de Antitrombina, sendo que 3 pacientes eram acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro/Unicamp, Campinas, 1 paciente no Hospital Heliópolis, São Paulo e 1 paciente no Hospital Universitário de Vitória, Espírito Santo. Os familiares também foram convocados para avaliação.

O quadro clínico de cada um deles segue abaixo:

Paciente de Vitória, ES

Registro: TR 253.

Idade: 29 anos.

Sexo: Feminino.

Dados Clínicos: Apresentou embolia pulmonar sem quadro clínico de trombose venosa profunda (TVP), na ausência de fatores de risco. A paciente pertence a uma família de 7 irmãos, todos com TVP e deficiência congênita de AT. Os pais eram assintomáticos, mas a mãe era portadora de deficiência de AT. A paciente e todos os familiares não apresentavam nenhuma outra deficiência ou mutação associada a trombofilia hereditária ou adquirida. Atualmente, a paciente estava em anticoagulação oral.

Paciente do Hospital Heliópolis, SP

Registro: TR 491.

Idade: 33 anos.

Sexo: Masculino.

Dados Clínicos: O paciente apresentou um quadro de TVP espontânea em membro inferior pela primeira vez aos 15 anos, juntamente com embolia pulmonar. Começou então o uso de anticoagulante oral. Aos 26 anos parou de usar anticoagulante por conta própria, apresentando após 2 anos, quadro de trombose venosa mesentérica, sendo necessária a realização de extensa ressecção de intestino delgado. Nenhum dos familiares apresentava história de tromboembolia. Durante a internação, foi avaliado pela Hematologia, que

identificou deficiência de AT. A investigação de outros fatores relacionados a trombofilia mostrou que o pai, a irmã e o paciente também eram portadores heterozigotos do Fator V de Leiden. Além disso, o paciente também era homozigoto para a mutação da MTHFR.

Pacientes da UNICAMP - Campinas

Registro: TR 702.

Idade: 18 anos.

Sexo: Feminino.

Dados Clínicos: A paciente apresentou quadro de TVP em membro inferior esquerdo e embolia pulmonar, aos 16 anos, associado ao uso de anticoncepcional oral. Relatava que uma tia-avó também tivera TVP e infarto do miocárdico aos 51 anos. O estudo laboratorial mostrou deficiência de AT. A mãe e o irmão da paciente também eram portadores da deficiência, mas assintomáticos. Tanto a paciente como os familiares estudados não apresentavam nenhuma outra alteração relacionada à trombofilia. Atualmente a paciente estava sob anticoagulação oral.

Registro: TR 216.

Idade: 33 anos.

Sexo: Feminino.

Dados Clínicos: A paciente apresentou TVP distal em membro inferior esquerdo, aos 23 anos, associado ao uso de anticoncepcional oral. Após 6 anos apresentou novo episódio de trombose, desta vez proximal, em membro inferior esquerdo, espontânea. Nenhum dos familiares apresentava história de trombembolia. Contudo, mesmo após convocação, nenhum deles compareceu para estudo laboratorial.

Registro: TR 303.

Idade: 32 anos.

Sexo: Masculino.

Dados Clínicos: O paciente aos 26 anos apresentou quadro espontâneo de dor torácica em base de hemitorax esquerdo, diagnosticado e tratado como pneumonia. Evoluiu com

dispnéia, derrame pleural e escarro hemoptóico. Um mês após a alta hospitalar apresentou quadro de dor em região glútea D, irradiada para membro inferior e região inguinal direitos, tendo sido feito o diagnóstico de TVP. O estudo quanto à trombofilia revelou apenas deficiência de AT. O pai e a tia paterna eram falecidos, com história de TVP. O estudo familiar revelou que um irmão e seu filho (seu sobrinho) eram portadores assintomáticos de deficiência de antitrombina.

Materiais e Métodos

O diagnóstico laboratorial da deficiência em antitrombina foi concluído a partir da dosagem de antitrombina pelo método do substrato-cromogênico e imunológico. Outras alterações que predisõem à trombose já tinham sido investigadas, como dosagem de proteína C, proteína S, fator XII, anticoagulante lúpico, fibrinogênio, pesquisa do Arg506Gln no fator V (BERTINA et al., 1994), mutação 20210 G→A no gene da protrombina (POORT et al., 1996) e mutação no gene da metilenotetrahidro folato redutase (MTHFR) Ala677Val (FROOST ET AL, 1995).

A análise molecular foi realizada por métodos de triagem que incluíram o SSCP e CSGE, seguidos do seqüenciamento.

4.1. COLETA DE SANGUE

Para dosagem de antitrombina foram colhidos 4,5 ml de sangue com 0,5 ml de citrato de sódio a 3,8%. Após a coleta o sangue foi centrifugado a 4000 rpm, e o plasma foi aliquoteado e congelado a - 80°C.

Para obtenção do DNA foram coletados 20 ml de sangue periférico com anticoagulante EDTA (10%). Após lise das hemácias, o pellet de leucócitos foi separado e armazenado a - 80°C, até que o DNA fosse extraído.

4.2. DOSAGEM DE ANTITROMBINA

4.2.1. Imunoeletroforese tipo "rocket"

Este método permite a dosagem quantitativa da antitrombina, através da precipitação de complexos entre antígeno-anticorpo, que se formam durante sua migração por uma corrente elétrica. O tamanho do pico de precipitação numa concentração fixa de anticorpo, depende diretamente da quantidade de antígeno presente na amostra.

Para a imunoeletroforese (LAURELL, 1966) utilizou-se soro de coelho anti-antitrombina (Dako) em gel de agarose tipo I a 1% (Low EEO Sigma), diluída em tampão Barbitol (Sigma) pH 8,6. O soro foi usado na concentração de 0,75 unidades por cm² de placa. O gel de agarose foi distribuído sobre a placa de vidro, que foi deixada por 10 minutos em geladeira para polimerização. Para a dosagem de AT o plasma foi diluído na proporção 1/2 em tampão Barbitol (Sigma) pH 8,6. Desta mistura foram aplicados 5 µl em cada poço do gel. A eletroforese foi realizada durante 5 horas a 28 mA, correspondendo a aproximadamente 60 V. Após a corrida a placa foi colocada em solução salina 0,9% por 2 a 4 horas. Sobre a placa colocou-se uma folha de papel de filtro umedecida em água e deixou-se secar em estufa a 37°C. A placa 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. Após a secagem à temperatura ambiente e para uma melhor visualização dos picos, se necessário, descorou-se rapidamente em solução descorante. A corrida foi medida do início até o final de cada pico em milímetros e as concentrações de AT 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 - Dako). Os resultados foram expressos em porcentagem e o valor considerado normal em nosso laboratório é de 70 a 120%.

4.2.2. Imunoeletroforese bidimensional

Este método permite a análise da heterogeneidade molecular, com a detecção de formas e/ou complexos proteicos anormais. As proteínas inicialmente são separadas de acordo com seu peso molecular e carga eletrostática, por meio de eletroforese em gel de agarose. Posteriormente, proteínas/complexos são reconhecidos por meio de eletroforese em gel contendo anticorpos específicos.

Para realização da imunoeletroforese bidimensional foram utilizadas placas de vidro de 80 mm (horizontal) x 100 mm (vertical), que permitem a análise de 3 amostras. Para avaliação da ligação da antitrombina com a heparina, foram montadas placas com e sem heparina.

Para a primeira corrida eletroforética foram montadas 2 placas, uma contendo heparina (Roche) numa concentração de 33 U/mL de gel de agarose tipo I a 0,8% (Low EEO Sigma), diluída em tampão barbitol (Sigma) pH 8,6 e a outra contendo apenas o gel de

agarose 0,8%. As placas de vidro com os géis com e sem heparina foram deixadas por 10 minutos em geladeira para polimerização. Foram aplicados 6 µl de plasma em um poço do gel, localizado, a aproximadamente 10 mm de uma das extremidades verticais da placa. A corrida eletroforética foi realizada durante 2 horas a 150 V à temperatura de 4°C. Para a realização da segunda corrida eletroforética, tipo "rocket" (LAURELL, 1966) foram cortadas e retiradas 3 áreas de 60 x 20 mm, no sentido horizontal, colocando-se 4 ml de gel de agarose tipo I a 0,8%, diluída em tampão barbital (Sigma) pH 8,6, contendo 35 µl do soro de coelho anti-antitrombina (Dako). O soro foi usado na concentração de 0,75 unidades por cm² de placa. As placas de vidro foram deixadas por 10 minutos em geladeira para polimerização do gel. Para a dosagem de AT o plasma foi diluído na proporção 1/3 em tampão barbital (Sigma) pH 8,6. Desta mistura foram aplicados 6 µl em um poço do gel, desta vez localizado a 10 mm da outra extremidade vertical da placa, dentro da região que continha o anticorpo. A eletroforese foi realizada durante 2 horas a 60 V à temperatura de 4°C. Após a corrida a placa foi colocada em solução salina 0,9% por 2 a 4 horas. Sobre a placa colocou-se uma folha de papel de filtro umedecida em água e deixou-se secar em estufa a 37°C. Após ficar totalmente seca, a placa 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. Deixou-se secar a temperatura ambiente e para uma melhor visualização dos picos, se necessário, descorou-se rapidamente em solução descorante. Secou-se novamente a temperatura ambiente. Os resultados foram determinados por comparação entre uma placa e outra usando um padrão para cada corrida eletroforética (mistura de plasmas de 10 doadores normais, considerado como 100% e um padrão de referência - Dako).

4.2.3. Método cromogênico

Para a determinação da atividade da antitrombina utilizou-se o "Kit" Chromostrate™ (Organon Teknika), que mede os níveis de atividade de AT no plasma, através de um método amidolítico, utilizando um substrato cromogênico (H-D-CHT-Abut-Arg-pNA). O princípio deste método baseia-se na formação de complexos entre a trombina, a antitrombina e a heparina. Após a adição de trombina em excesso, ao plasma diluído 1/40 em tampão contendo heparina, misturou-se o substrato cromogênico. Após 30 segundos de incubação, a reação foi bloqueada pela adição de ácido acético. A trombina remanescente, que não formou complexos, irá catalizar a liberação de pNA do substrato cromogênico. A liberação de

pNA foi medida após um tempo definido de incubação, a 405 nm. A absorbância obtida é inversamente proporcional à concentração de antitrombina na amostra, e pode ser calculada pela interpolação na curva padrão. A curva padrão foi realizada com um "pool" de plasmas de 10 doadores normais diluídos em tampão na proporção de 1/40 (100%), 1/80 (50%) e 1/160 (25%). Os valores considerados normais no laboratório estão entre 85-125%, intervalo este obtido pela dosagem de AT de 80 doadores normais.

4.3. EXTRAÇÃO DO DNA

Para lise e separação do pellet, os 20 ml de sangue colhidos com EDTA foram centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm a 4°C, descartando-se o plasma. Foram adicionados 5 volumes de cloreto de amônia 144 mM e 1/2 volume de bicarbonato de amônia 10 mM, sendo misturados por inversão, para lisar as hemácias. Após 15 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras por 20 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a partir de 5 ml do sedimento obtido adicionou-se o tampão TKM 1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0,2 mM) e 125 µl de Triton-X100 (Sigma); misturou-se por inversão e então o material foi centrifugado a 2.200 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 ressuspensão em 0,8 ml de tampão TKM 2 (NaCl 400 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM) e 50 µl de SDS 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 µl de NaCl 5M, para a precipitação de proteínas, misturando-se por inversão e então centrifugando-se novamente por 10 minutos a 12.000 rpm.

O sobrenadante recolhido foi submetido à extração com 500 µl de clorofórmio/álcool isamílico na proporção 24:1 (v/v) e 500 µl de fenol redestilado e saturado com Tris-HCl pH 8,0, e então centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. Este procedimento foi repetido somente com 1.000 µl de clorofórmio/álcool isoamílico. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo com 2 volumes de etanol 100% e 0,2 volumes de acetato de sódio 3 M para então ocorrer a precipitação do DNA. Incubou-se a -20°C por aproximadamente 2 horas, e centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com 1 ml de etanol 70% gelado, centrifugando-se novamente. Descartou-se o

sobrenadante e secou-se o precipitado de DNA obtido à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA obtido foi ressuspense em quantidade apropriada de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) e deixado durante a noite a 4°C para dissolução total. Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro através do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm.

4.4. AMPLIFICAÇÃO PELA PCR (Polymerase Chain Reaction)

A amplificação do DNA genômico pela PCR (SAIKI, et al., 1987) dos pacientes estudados, foi feita utilizando-se os iniciadores descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Seqüência dos pares de iniciadores utilizados na amplificação dos diferentes exons e da região promotora do gene da AT, posição e tamanho do fragmento amplificado.

Exon	Pares iniciadores	Localização	Fragmento
P	P1: 5'CTATGAGAGAGGGAATTACAC 3' P2: 5'CTCAAAGGTGTTGGAGGTCA 3'	-396 a 200 181 a 200	596 bp
1	P1: 5'CGAGATTTAGAGGAAAGAAC 3' P2: 5'CTCAAAGGTGTTGGAGGTCA 3'	-19 a +1 181 a 200	219 pb
2	P1: 5'TTGCAGCCTAGCTTAACCTTG 3' P2: 5'GGTGCTCCTAACAAGGTGGC 3'	2371 a 2390 2801 a 2820	450 pb
3a	P1: 5'ACCCATGTTAAGTAGGCAGC 3' P2: 5'TGGACCTCCTCAATCTCTGA 3'	5251 a 5270 5571 a 5590	340 pb
3b	P1: 5'AATGGAGAAGCCAATTGAAT 3' P2: 5'GGTAAGCTGAAGAGCAAGAG 3'	6373 a 6392 6605 a 6624	252 pb
4	P1: 5'GTGTCAATAACTATCCTCCT 3' P2: 5'TGGTCAGACTACCTTGCGGG 3'	7320 a 7339 7802 a 7821	502 pb
5	P1: 5'TTAATCCAACTGAATTCCC 3' P2: 5'GCCTTAACACTGGAAACAGG 3'	9721 a 9740 9939 a 9958	238 pb
6	P1: 5'TGGATGATTACCTGCCAAA 3' P2: 5'ATGTGAGATGGAAGTAGTTT 3'	13173 a 13192 13491 a 13500	328 pb

A amplificação do DNA genômico dos 7 exons e da região promotora da AT foi realizada individualmente pelo aparelho ciclador de temperatura (Perkin Elmer Cetus) a partir da reação com aproximadamente 0,5 µg de DNA, 40 pmoles de cada iniciador, específico para a região, 330 µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão de enzima (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, 25°C; KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM) e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL), em um volume final de 100 µl.

Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (as temperaturas utilizadas para cada iniciador segue abaixo), e extensão (72°C) no aparelho ciclador de temperatura. O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos.

Programas utilizados:

Para padronização dos Exons 1, 3A, 5 e 6:

Desnaturação: 94°C por 5 minutos
35 ciclos: 94°C - 1 minuto para desnaturação
55°C - 1 minuto para anelamento
72°C - 1 minuto para extensão
Finalização: 72°C - 7 minutos

Para padronização da Região Promotora:

Desnaturação: 94°C por 5 minutos
35 ciclos: 94°C - 1 minuto para desnaturação
56°C - 1 minuto para anelamento
72°C - 1 minuto para extensão
Finalização: 72°C - 7 minutos

Para padronização do Exon 3B:

Desnaturação: 94°C por 5 minutos
35 ciclos: 94°C - 1 minuto para desnaturação
58°C - 1 minuto para anelamento
72°C - 1 minuto para extensão
Finalização: 72°C - 7 minutos

Para padronização do Exon 4:

Desnaturação: 94°C por 5 minutos
35 ciclos: 94°C - 1 minuto para desnaturação
59°C - 1 minuto para anelamento
72°C - 1 minuto para extensão
Finalização: 72°C - 7 minutos

Os produtos de amplificação pela PCR foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

4.5. MÉTODOS DE TRIAGEM DE MUTAÇÕES

4.5.1. SSCP (Análise de polimorfismo de conformação em hélice simples)

Após a amplificação dos exons e região promotora, foi realizado o método de análise de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP) não-radioativo (IOLASCON et al, 1994) para o rastreamento de possíveis mutações. Esse método é adequado para a análise de fragmentos de 200 a 300 pares de bases. Apesar do exon 4 apresentar o tamanho de 502 bp, este método também foi utilizado para o seu rastreamento. O produto da PCR foi diluído 1/2 em uma solução contendo formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,1% e xileno cianol 0.1%. Esta mistura foi desnaturada por 5 minutos a 94°C, mantida em gelo até o momento da aplicação e 10 µl foram submetidos a eletroforese. A corrida eletroforética foi desenvolvida em gel de poliacrilamida a 8%, em tampão TEB 1X.

As corridas eletroforéticas foram realizadas a 130 V, temperatura ambiente e o tempo de corrida variou de 3 a 4 1/2 horas.

O gel de poliacrilamida foi então submetido à coloração pela prata seguindo as etapas:

1. fixação em solução com ácido acético 0,5%, etanol 10% em água deionizada por 20 minutos;
2. impregnação em solução de prata (AgNO_3 0,15% dissolvido em água deionizada) por 10 minutos;
3. lavagem em água deionizada por 3 minutos;

4. revelação da imagem em solução de NaOH 30 g/l, formaldeído 0,6% por 10 minutos;
5. interrupção da revelação usando a solução de fixação já descrita acima por 3 a 5 minutos;
6. lavagem em água deionizada por alguns segundos.

Diferentes condições de temperatura, voltagem e relação voltagem/hora foram testadas para cada exon e região promotora. As condições relatadas acima foram as que possibilitaram melhor padrão de migração eletroforética no SSCP.

4.5.2. CSGE (Eletroforese em Gel Sensível a Conformação)

Independente dos resultados obtidos pelo SSCP, foi utilizado um outro método, considerado de alta sensibilidade (GANGULY et al., 1993; WILLIAMS et al., 1995), para o rastreamento de mutações no gene da AT. O princípio de tal método é a detecção de pequenas alterações, como inserções, deleções e mutações de ponto, que quando presentes podem formar heteroduplexes de DNA. O CSGE utiliza um sistema de solventes desnaturantes que favorecem a tendência dessas mutações em produzir mudanças conformacionais e, conseqüentemente, aumentar a migração diferencial dos heteroduplexes e homoduplexes de DNA durante a eletroforese. Este procedimento pode ser aplicado a qualquer produto de PCR de 200-800 pb e não requer equipamentos especiais ou preparação das amostras.

Para o CSGE foi utilizado um aparato padrão para seqüenciamento de DNA (Gibco-BRL) de dimensões 31 cm X 38,5 cm X 0,8 mm e 32 poços. Uma solução estoque de 39.6g de acrilamida (Sigma) e 0,4g de 1,4-Bis(acryloyl)-piperazina (BAP; Fluka) foi preparada em 100 ml de água destilada e usada para preparar um gel de poliacrilamida 10%, contendo etilenoglicol 10% (v/v) (Sigma), formamida 15% (v/v) (Gibco/BRL), 1X TTE (Tris 72 mM, taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,0), persulfato de sódio 10% e TEMED.

Antes da eletroforese, 20 µl de cada amostra amplificada pela PCR foram aquecidos a 98°C por 5 minutos, seguido de incubação a 68°C por 1 hora para favorecer a formação de heteroduplexes. Após esta incubação, retirou-se uma alíquota de 5 µl de cada amostra e misturou-se com 5 µl de tampão de amostra (v/v) etilenoglicol 20% (v/v), formamida 30%

(v/v), xilenocianol 0,4% (p/v), azul de bromofenol 0,4% (p/v)) e o volume total desta mistura foi aplicado em uma canaleta do gel.

Foi realizada uma pré-corrida a 300 volts por 30 minutos e as amostras foram submetidas a eletroforese a 300 volts por 16 horas, usando como tampão de corrida TTE 0,25X para parte superior da cuba e TTE 1X para parte inferior da cuba.

Após a corrida eletroforética, uma das placas de vidro foi removida e o gel foi então submetido a coloração com uma solução de brometo de etídeo 2,83 mg/l por 10 minutos e em seguida descorado com água deionizada por 5 minutos. As bandas foram então visualizadas com um equipamento manual de luz ultravioleta e a região de interesse cortada e levada para o transiluminador, onde foi fotografada.

4.6. SEQÜENCIAMENTO

Para a confirmação das alterações de mobilidade eletroforética encontradas no gene da AT, pelos métodos de SSCP e CSGE, foi realizado seqüenciamento direto pelo método de Sanger (1977) dos fragmentos de PCR alterados, utilizando-se os mesmos pares de iniciadores da amplificação por PCR, e os kits de seqüenciamento Sequenase PCR Product Sequencing "Kit", United States Biochemical - Amersham Life Science ou Thermo-Sequenase Cycle Sequencing "Kit" - Amersham Life Science. Os iniciadores utilizados foram os mesmos da reação de PCR. As reações foram feitas acompanhadas de um controle normal, seguindo o protocolo:

Sequenase PCR Product Sequencing Kit:

1. Pré tratamento enzimático do produto de PCR

5 µl do produto da reação de PCR foram tratados com 1 µl de exonuclease I (10 U/µl) e 1 µl de fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl). Esta mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

As reações de amplificação de fragmentos pela técnica de PCR requerem dois oligonucleotídeos que delimitam as regiões de interesse e desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) para a síntese de 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 é que foram usadas as duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão.

2. *Reação de anelamento*

Em geral foram utilizados 2 µl do DNA tratado enzimaticamente, adicionando-se 1 µl do oligonucleotídeo, a uma concentração de 5-10 pmol/µl e água deionizada estéril para completar o volume final de 10 µl. Esta mistura foi submetida a temperatura de 100 °C por 3 minutos e transferida para um banho de gelo e etanol absoluto durante 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*

Adicionou-se ao tubo de anelamento 2 µl de tampão para sequenase 10X, 1 µl de ditionitritol (DTT), 2 µl da mistura de marcação (concentração final de 0,17 µM dGTP, 0,17 µM dCTP e 0,17 µM dTTP), 5 µCi de [α -³⁵S]dATP (Du Pont) e 2 µl de Sequenase Polimerase em um volume final de 17,5 µl. Esta mistura foi levemente agitada, centrifugada e incubada por 5 minutos a 20°C.

4. *Reação de terminação*

A seguir, à uma temperatura de 37°C, 3,5 µl da reação de marcação foram acrescentados aos tubos Eppendorf, previamente identificados e pré-aquecidos, contendo 2,5 µl dos dNTPs com cada um dos didesoxirribonucleotídeos de terminação (ddGTP, ddATP, ddTTP ou ddCTP). Os tubos foram mantidos a 37°C por 10 minutos, interrompendo-se a reação com adição de 4 µl de solução de bloqueio (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%) em cada um dos 4 tubos (G,A,T,C)

Thermo-Sequenase Cycle Sequencing Kit:

1. Pré tratamento enzimático do produto de PCR

Cinco microlitros do produto da reação de PCR foram tratados com 1 µl de exonuclease I (10 U/µl) e 1 µl de fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl). Esta mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

2. Reação de marcação

Em um tubo de reação foram adicionados 25 pmoles do iniciador referente ao exon a ser seqüenciado, tampão de T4 polinucleotídeo quinase na concentração final de Tris-HCl 60 mM, pH 7,8, MgCl₂ 10 mM; KCl 0,2 M, 25 pmoles de [γ -³²P] dATP (Du Pont) e 10 unidades da enzima T4 polinucleotídeo quinase em um volume final de 10 µl. Incubou-se 10 minutos a 37°C e para a desnaturação da enzima e conseqüente término da reação, o tubo foi incubado por 4 minutos a 95°C.

3. Reação de seqüenciamento

Foram utilizados para a reação de seqüenciamento 2 µl do PCR tratado, 2 µl de tampão para Thermo-Sequenase 10X, 2 µl do iniciador marcado e 2 µl da enzima Thermo-Sequenase, em um volume final de 17,5 µl.

Quatro microlitros da mistura acima foram adicionados aos tubos previamente identificados e contendo 4 µl de cada uma das misturas de terminação (G, A, T, C). Acrescentou-se 1 gota de óleo mineral e as amostras foram submetidas a uma nova reação de PCR, utilizando-se as temperaturas de anelamento do PCR original. Após 35 ciclos a reação foi interrompida com a adição de 4 µl de solução de bloqueio contendo formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%.

Eletroforese em gel desnaturante

A corrida eletroforética dos tubos de reação (G, A, T, C), obtidos a partir dos protocolos descritos anteriormente, foi realizada em gel de poliacrilamida 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 X 50 cm com espaçadores de 0.4 mm de espessura e de gradiente de espessura com 0,25 mm até 4 mm. Foi utilizado como tampão de corrida, o tampão TTE (Tris 72 mM, pH 8,0, Taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM).

As corridas eletroforéticas foram realizadas a uma potência constante de 80 W, (aproximadamente 50 mA e 1800 V), mantendo uma temperatura média de 50°C. Para o aquecimento prévio do sistema de eletroforese, foi feita uma pré corrida com a mesma potência durante aproximadamente 2 horas.

Quatro microlitros do produto da reação de seqüenciamento de cada amostra foram desnaturados por 4 minutos a 94°C. A duração da corrida variou de 2 até 6 horas dependendo da região do DNA que se pretendia ler. O sistema foi então desmontado e o gel foi transferido para um papel de filtro 3 MM e seco em secadora de gel a vácuo (Bio-Rad) durante aproximadamente 2 horas a 80°C. Após o gel estar completamente seco, este foi mantido em contato com um filme de raio X, à temperatura ambiente, durante 3 a 5 dias quando usado [α -³⁵S]dATP e durante 1 dia quando usado [γ -³²P]dATP e então revelado.

Resultados

A seguir apresentamos os resultados obtidos da dosagem de antitrombina, a classificação da deficiência de AT (Tabela 2), assim como da pesquisa das mutações no gene da AT₁ em cada um dos pacientes e suas respectivas famílias.

Dosagem de Antitrombina

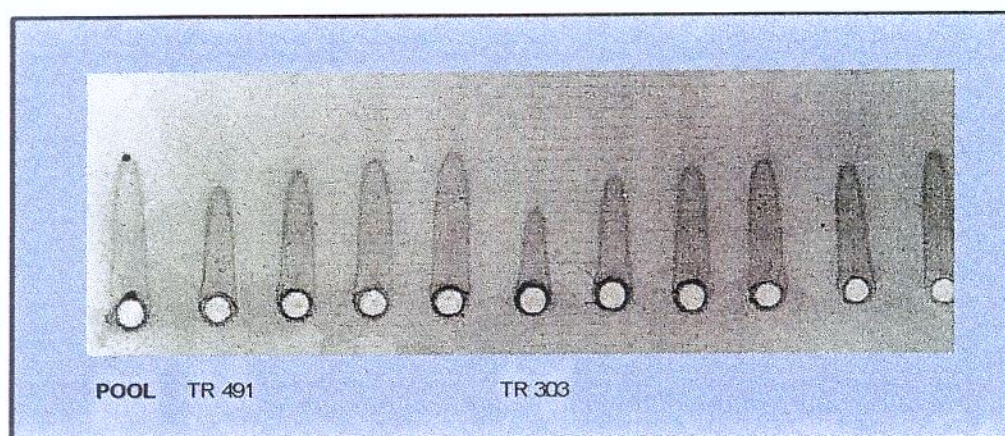


Figura 3: Dosagem de AT pela técnica de imunoeletroforese tipo rocket (Técnica de Laurell). Padrão obtido do pool de plasmas normais, TR 491, TR 303 e controles.

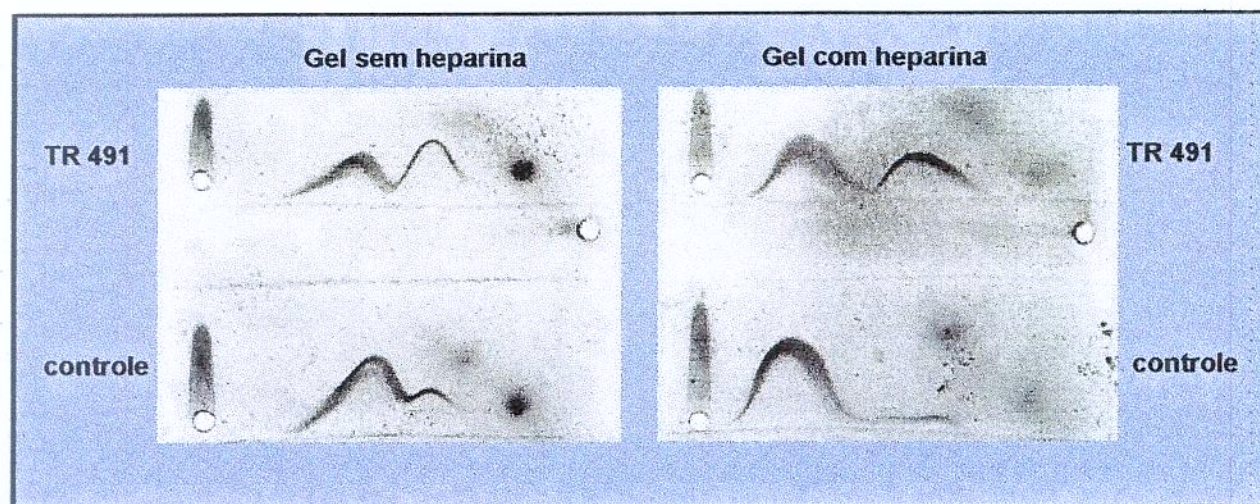


Figura 4: Imunoeletroforese bidimensional do paciente TR 491 e controle normal.

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

Pacientes	Imunoelektroforese	Substrato Cromogênico	Classificação
TR 216	N.A.	56%	-
TR 253	37%	69%	Tipo I
TR 303	57%	46%	Tipo I
TR 491	78%	59%	Tipo II PE
TR 702	N.A.	51%	-

PCR, SSCP, CSGE e Sequenciamento

Foram realizadas as amplificações dos 7 exons, incluindo também a região promotora e as regiões intrônicas flangeadoras, dos 5 pacientes estudados.

A análise pelo SSCP e CSGE dos cinco pacientes estudados, demonstrou padrões eletroforéticos alterados, quando comparados com os padrões normais (alterações descritas na tabela 3), sendo que 4 deles estão associados à presença de mutações. As mesmas serão discutidas posteriormente. Os fragmentos que apresentaram um padrão eletroforético anormal nas técnicas de triagem empregadas foram seqüenciados para a identificação da alteração molecular responsável pelo padrão anormal.

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 PCR diferentes para a confirmação das mutações encontradas.

O seqüenciamento dos fragmentos com padrão anormal permitiu a identificação de três mutações de ponto, sendo uma na região codificadora do gene da AT e duas em sítio de clivagem do RNA, uma provável inserção ou deleção na posição 5379 e também três polimorfismos já descritos, de acordo com o "database" de 1997 (LANE *et al.*, 1997).

Também foram realizados estudos de alguns familiares desses pacientes, com a dosagem de AT e análise do DNA pelo seqüenciamento direto do produto de PCR.

Tabela 3: Padrões eletroforéticos encontrados no SSCP e CSGE e resultado do sequenciamento dos padrões alterados dos 5 pacientes estudados.

PACIENTES	SSCP (padrão)	CSGE (padrão)	SEQUENCIAMENTO
TR 216	PROM – normal EX 1 - normal EX2 - normal EX 3A - normal EX 3B - normal EX 4 - <i>anormal</i> EX 5 - normal EX 6 - normal	PROM – normal EX 1 – normal EX2 – normal EX 3A – normal EX 3B – normal EX 4 – normal EX 5 – normal EX 6 – normal	EX 4 - 7596 (G → A) polimorfismo. 7626 (G → A) polimorfismo.
TR 253	PROM - normal EX 1 - normal EX 2 - normal EX 3A - normal EX 3B - normal EX 4 - <i>anormal</i> EX 5 - <i>anormal</i> EX 6 - normal	PROM – normal EX 1 – normal EX 2 – normal EX 3 ^A – normal EX 3B – normal EX 4 – normal EX 5 – <i>anormal</i> EX 6 – normal	EX 4 - 7596 (G → A) polimorfismo. 7626 (G → A) polimorfismo. EX 5 - +1 intron 5 (G → A) Muta��o em s��io de splice.
TR 303	PROM - normal EX 1 - normal EX 2 - normal EX 3A - normal EX 3B - normal EX 4 - normal EX 5 - normal EX 6 - normal	PROM – normal EX 1 – <i>anormal</i> EX 2 – normal EX 3A – normal EX 3B – normal EX 4 – normal EX 5 – <i>anormal</i> EX 6 – normal	EX 1 - +5 intron 1 (G → A). Muta��o em s��io de splice. EX 5 - 9893 (G → C) polimorfismo.
TR 491	PROM - normal EX 1 - normal EX 2 - normal EX 3A - normal EX 3B - normal EX 4 - normal EX 5 - normal EX 6 - <i>anormal</i>	PROM – normal EX 1 – normal EX 2 – normal EX 3A – normal EX 3B – normal EX 4 – normal EX 5 – <i>anormal</i> EX 6 – normal	EX 5 - 9893 (G → C) polimorfismo. EX 6 - 13328 (G → A) Muta��o missense
TR 702	PROM - normal EX 1 - normal EX 2 - normal EX 3A - <i>anormal</i> EX 3B - normal EX 4 - normal EX 5 - normal EX 6 - normal	PROM – normal EX 1 – normal EX 2 – normal EX 3A – <i>anormal</i> EX 3B – normal EX 4 – normal EX 5 – normal EX 6 – normal	EX 3A - 5379 = muta��o (inser��o ou dele��o)

Tabela 4: Avaliação de AT e de outros fatores relacionados à trombofilia hereditária.

Análise Laboratorial	
AT (substrato cromogênico)	56% (VN – 105% ± 20)
Proteína C	Normal
Proteína S	Normal
Fator V Leiden	Negativo
MTHFR	Negativo
Protrombina	Negativo

Análise Molecular

A paciente TR 216 não apresentou nenhuma mutação nas regiões estudadas. Foram encontrados dois polimorfismos já descritos (LANE *et al.*, 1997), um na posição 7596 caracterizada por uma transição G→A e o outro na posição 7626 caracterizado por uma transição G→A, ambos em heterozigose. Os dois polimorfismos estão localizados no exon 4 e foram detectados pela técnica de SSCP seguido do sequenciamento (Figura 6).

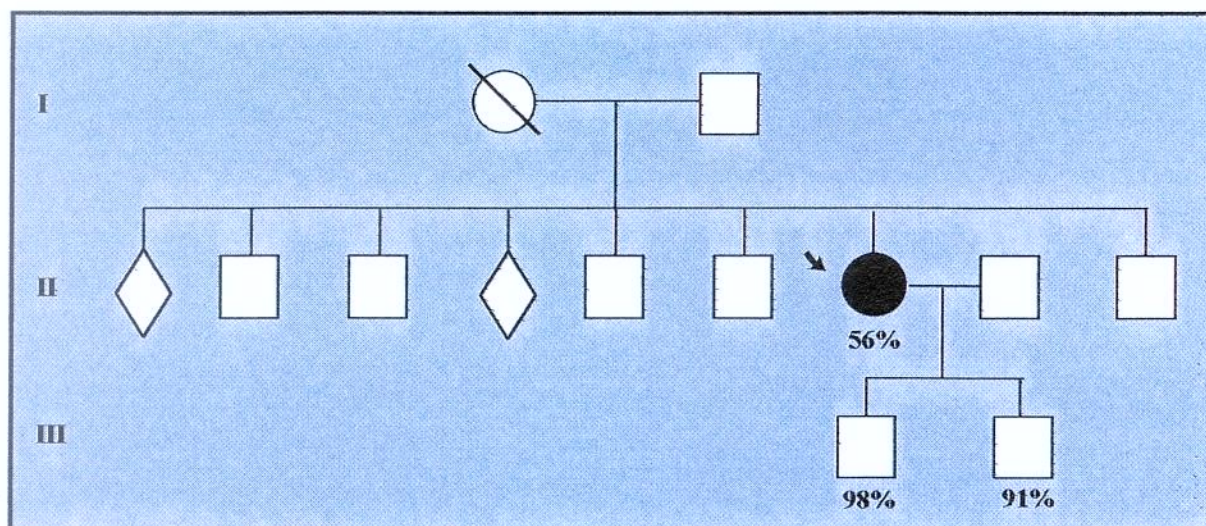


Figura 5: Heredograma da família da paciente TR 216. (●) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↘) Propósito. (...%) Dosagem de AT.

OBS: a paciente e seus dois filhos foram os únicos avaliados laboratorialmente

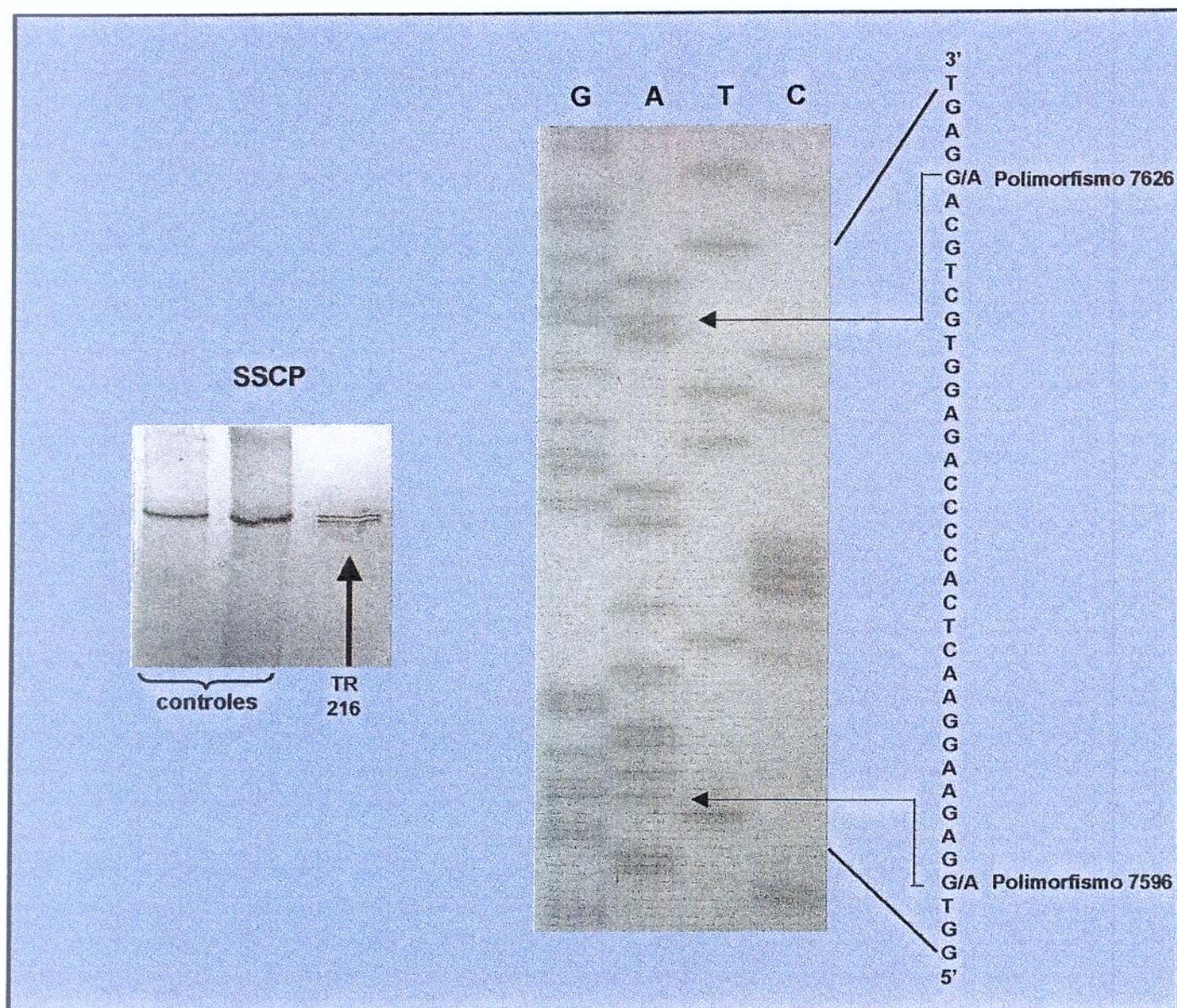


Figura 6: Análise de SSCP do exon 4 e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 4 do gene da AT, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA da paciente TR 216, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, auto-radiografia de parte da região seqüenciada do exon 4 do gene da AT, revelando as duas transições G→A nas posições 7596 e 7626.

Tabela 5: Avaliação de AT e de outros fatores relacionados à trombofilia hereditária.

Análise Laboratorial	
AT (imunoelektroforese)	37% (VN – 70 a 130%)
(substrato cromogênico)	69% (VN – 105% $\pm$ 20)
Proteína C	Normal
Proteína S	Normal
Fator V Leiden	Negativo
MTHFR	Negativo
Protrombina	Negativo

Análise Molecular

O gene da AT da paciente TR 253 revelou uma mutação (Figura 8) e dois polimorfismos (Figura 6). A primeira é caracterizada por uma transição G→A na posição +1 do intron 5. Esta é uma mutação ainda não descrita localizada em uma região consenso de sítio de clivagem. Esta alteração não foi detectada em 100 recém-nascidos, sugerindo ser uma mutação e não um polimorfismo.

Alguns familiares da paciente TR 253 foram estudados e o seqüenciamento revelou que a alteração molecular estava presente em 22 dos 34 membros analisados. Os que apresentaram a mutação eram deficientes em AT, mostrando assim que houve segregação da mutação com a deficiência.

Além dessa mutação, a análise molecular revelou os dois polimorfismos no exon 4, nas posições 7596 e 7626, descritos na TR 216, porém em homozigose.

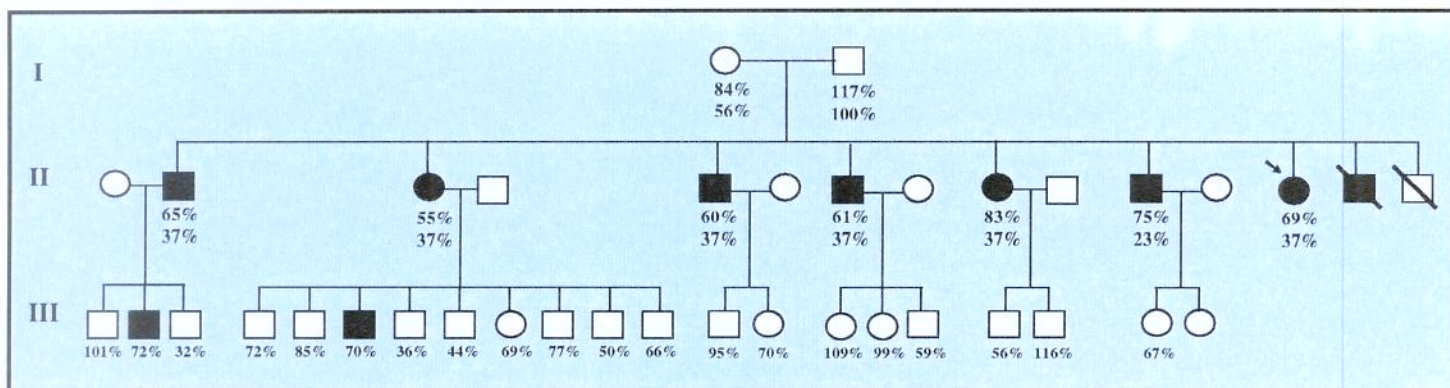


Figura 7: Heredograma da família da paciente TR 253. (● ■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↘) Propósito (...%) Dosagem de AT.

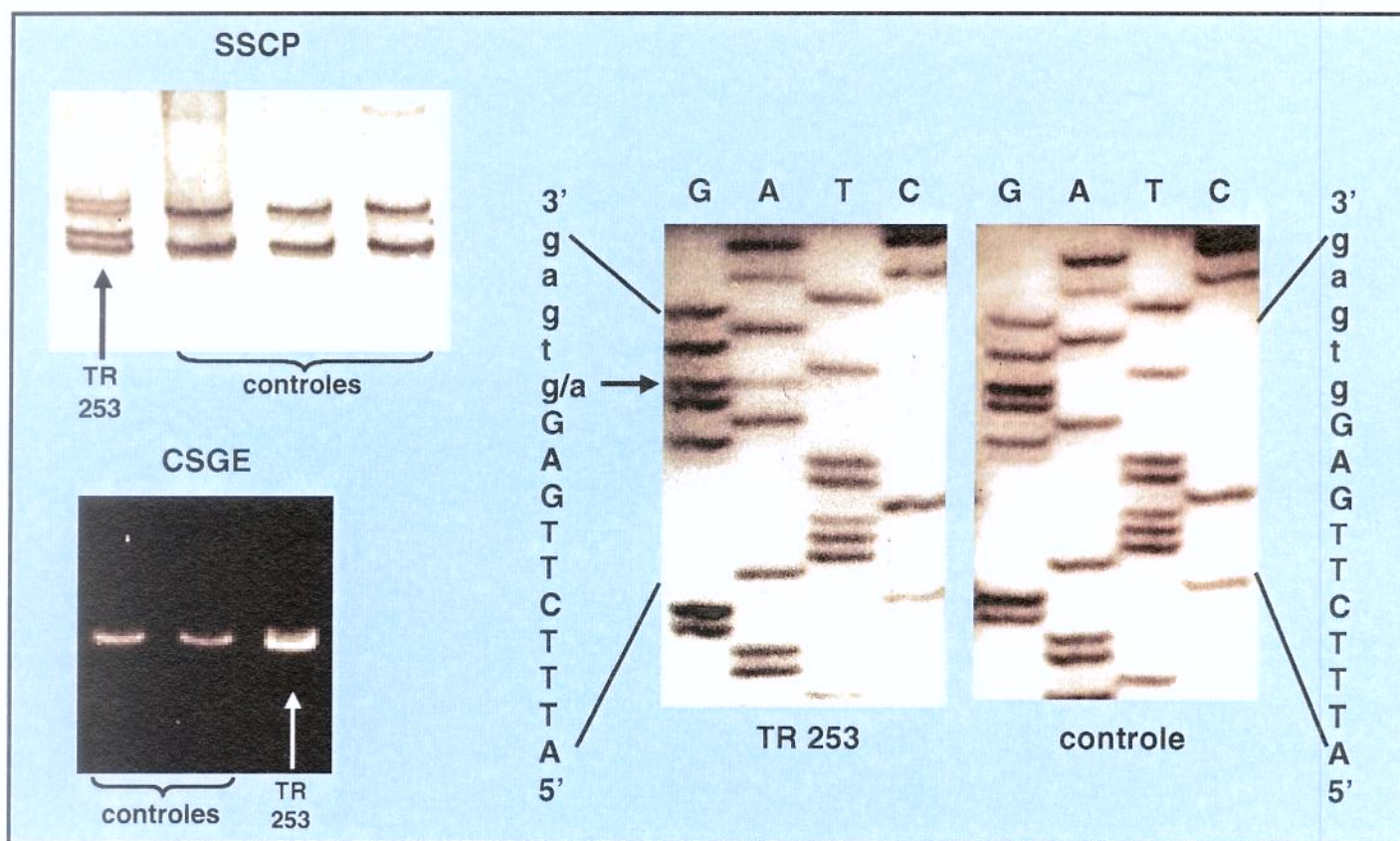


Figura 8: Análise de SSCP e CSGE do exon 5 e identificação da alteração molecular por sequenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

À esquerda, gel de SSCP e gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 5 do gene da AT, corados com nitrato de prata e brometo de etídio, respectivamente. A amostra da paciente TR 253 (indicado com a seta) apresentou um padrão de migração eletroforética diferente quando comparado com os controles. À direita, uma parte da autoradiografia da seqüência nucleotídica do exon 5 do gene da AT da paciente TR 253. O sequenciamento revelou uma transição G→A, na posição +1 do intron 5.

Tabela 6: Avaliação de AT e de outros fatores relacionados à trombofilia hereditária.

Análise Laboratorial	
AT (imunoeletroforese)	57% (VN – 70 a 130%)
(substrato cromogênico)	54% (VN – 105% $\pm$ 20)
Proteína C	Normal
Proteína S	Normal
Fator V Leiden	Negativo
MTHFR	Negativo
Protrombina	Negativo

Análise Molecular

O paciente TR 303 apresentou uma mutação caracterizada por uma transição G→A na posição +5 do intron 1, ainda não descrita, localizada em uma região consenso de sítio de clivagem (Figura 10). Foi realizada a pesquisa da mesma alteração molecular em 100 recém-nascidos, e a mesma não foi detectada, sugerindo ser uma mutação e não um polimorfismo.

Foram estudados 14 membros da família e o seqüenciamento revelou que a alteração molecular estava presente em um irmão e sobrinho do paciente, também deficientes em AT, mostrando assim que houve segregação da mutação com a deficiência.

O paciente também apresentou um polimorfismo já descrito G→C no exon 5, na posição 9893 (LANE *et al.*, 1997), em heterozigose (Figura 11).

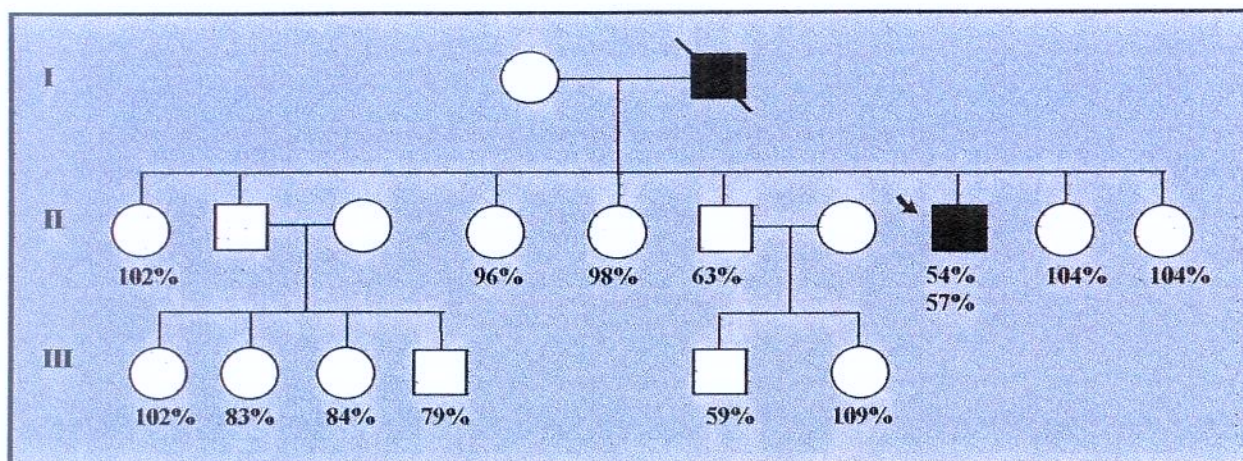


Figura 9: Heredograma da família do paciente TR 303. (● ■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↘) Propósito (...%) Dosagem de AT.

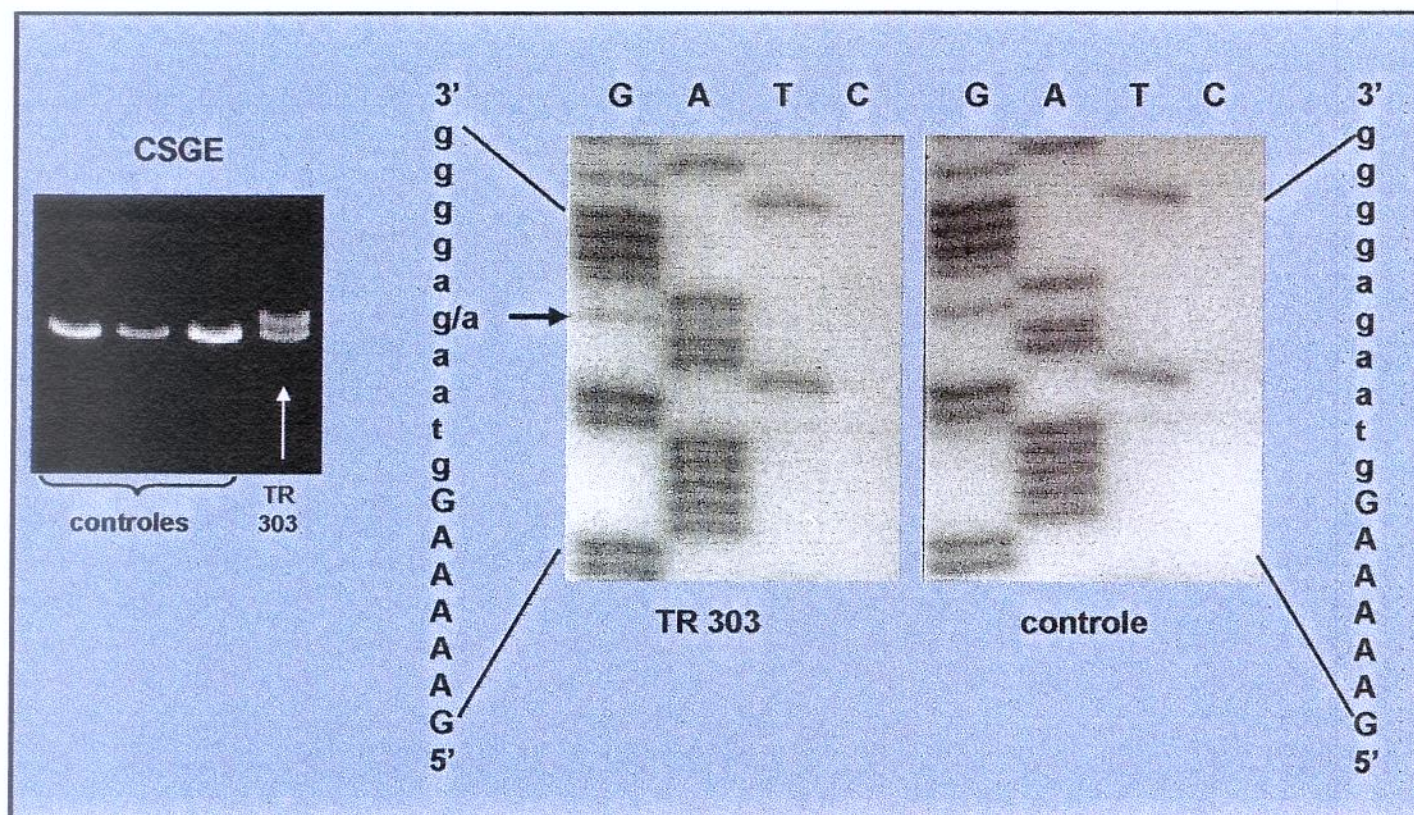


Figura 10: Análise de CSGE do exon 1 e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado pela PCR

À esquerda, gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 1 do gene da AT, corado com brometo de etídio. O fragmento de DNA do paciente TR 303, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 1 do gene da AT do paciente TR 303, que revelou uma transição G→A na posição +5 do intron 1.

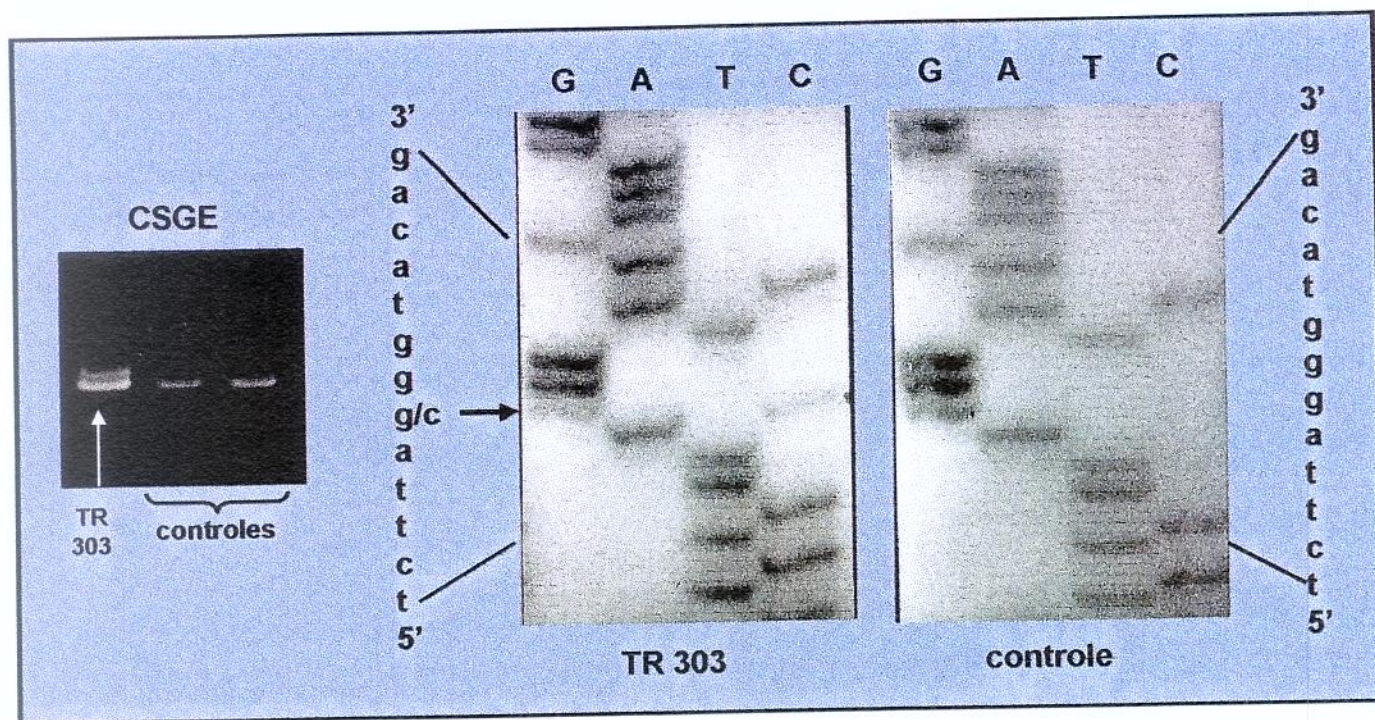


Figura 11: Análise de CSGE do exon 5 e identificação do polimorfismo 9893 por seqüenciamento direto do DNA amplificado pela PCR

À esquerda, gel de CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 5 do gene da AT, corado com brometo de etídio. O fragmento de DNA do paciente TR 303, apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 5 do gene da AT do paciente TR 303. O seqüenciamento revelou a transversão G→C na posição 9893, já descrita no database de 1997 (LANE *et al.*, 1997) como um polimorfismo .

Tabela 7: Avaliação de AT e de outros fatores relacionados à trombofilia hereditária no paciente e seus familiares.

Análise Laboratorial				
	Paciente	Pai	Mãe	Irmã
AT (imunoelektroforese)	78% (VN - 70% a 120%)	86%	93%	100%
(substrato cromogênico)	59% (VN - 105%)	101%	113%	108%
Proteína C	Normal	Normal	Normal	Normal
Proteína S	Normal	Normal	Normal	Normal
Fator V Leiden	Positivo (het.)	Positivo	Negativo	Positivo
MTHFR	Positivo (homo)	Positivo (het)	Positivo (het)	Negativo
Protrombina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Análise Molecular

O paciente TR 491 apresentou uma mutação (Figura 13) e um polimorfismo (Figura 11). A primeira é caracterizada por uma transição G→A na posição 13328 no exon 6, na primeira base do codon, correspondente ao aminoácido 404, levando à substituição da alanina (GCC) por treonina (ACC), caracterizando uma mutação "missense".

Alguns familiares do paciente TR 491 foram estudados e as dosagens laboratoriais, as técnicas de rastreamento de mutações e o seqüenciamento revelaram que o paciente é o único a possuir a alteração e a deficiência de AT. Diante disto, foi realizado o estudo de paternidade pelo Departamento de Medicina Legal da FCM/UNICAMP, utilizando as técnicas de Biologia Molecular, onde foi confirmado com 99,99938% que o probando é um filho legítimo, sugerindo que esta mutação é uma mutação "de novo".

O paciente também apresentou o mesmo polimorfismo G→C no exon 5, na posição 9893 (LANE *et al.*, 1997), em heterozigose, verificado no TR303.

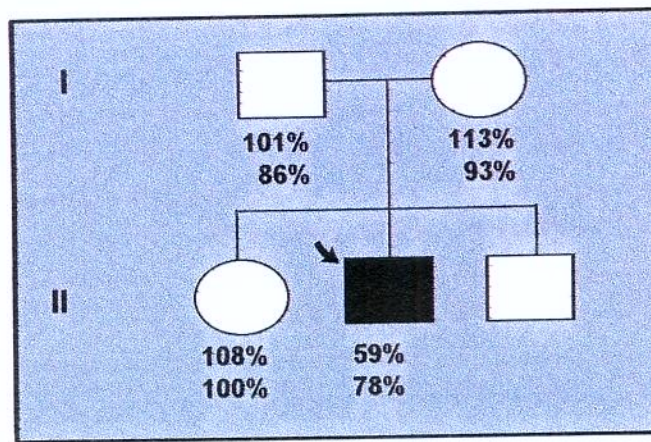


Figura 12: Heredograma da família do paciente TR 491. (■) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↘) Propósito (...%) Dosagem de AT.

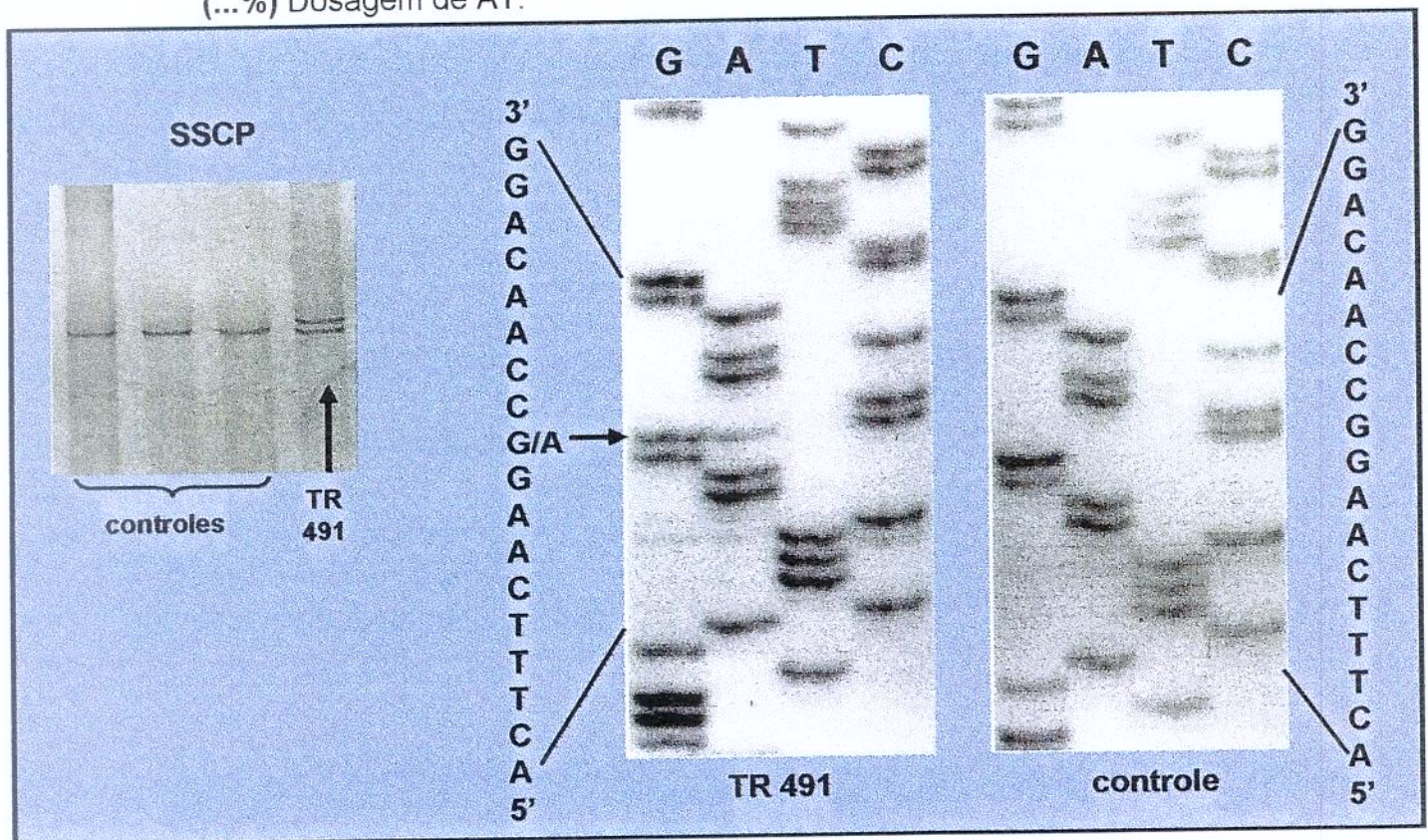


Figura 13: Análise de SSCP do exon 6 e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR

À esquerda, gel de SSCP dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 6 do gene da AT, corado com nitrato de prata. O fragmento de DNA do paciente TR 491 apresentou um padrão de migração eletroforética diferente dos demais (indicado com a seta). À direita, uma parte da auto-radiografia da seqüência nucleotídica do exon 6 do gene da AT do paciente TR 491, revelando a transição G→A na posição 13328.

Quadro 1: Alinhamento de aminoácidos da AT de diferentes espécies.

	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AT humana (aa 399-408)	R	V	T	F	K	A	N	R	P	F
AT bovina (aa 399-408)	R	V	T	F	K	A	N	R	P	F
AT de camundongo (aa 399-408)	R	V	T	F	K	A	N	R	P	F
AT de porco (aa 399-408)	R	V	T	F	K	A	N	R	P	F

Ala 404 Thr

(*) Aminoácidos conservados entre as quatro espécies de mamíferos alinhadas

Tabela 8: Análise laboratorial da paciente TR 702

Análise Laboratorial	
AT (substrato cromogênico)	51% (VN – 105% ± 20)
Proteína C	Normal
Proteína S	Normal
Fator V Leiden	Negativo
MTHFR	Negativo
Protrombina	Negativo

Análise Molecular

A paciente TR 702 apresentou um padrão eletroforético anormal no SSCP e CSGE, quando comparado com os controles (Figura 15). Foi realizado o rastreamento com as mesmas técnicas para alguns de seus familiares, apresentando também a mesma alteração. Foi então realizado o seqüenciamento onde não se encontrou alteração nenhuma na região seqüenciada.

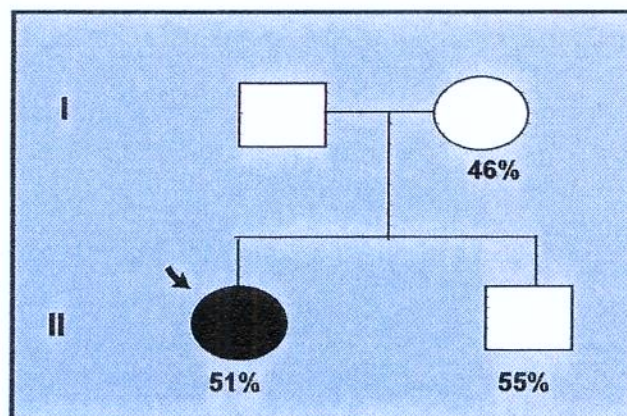


Figura 14: Heredograma da família da paciente TR 702. (●) Indivíduos que apresentaram trombose. (○ □) Indivíduos sem quadro de trombose. (↘) Propósito (...%) Dosagem de AT.

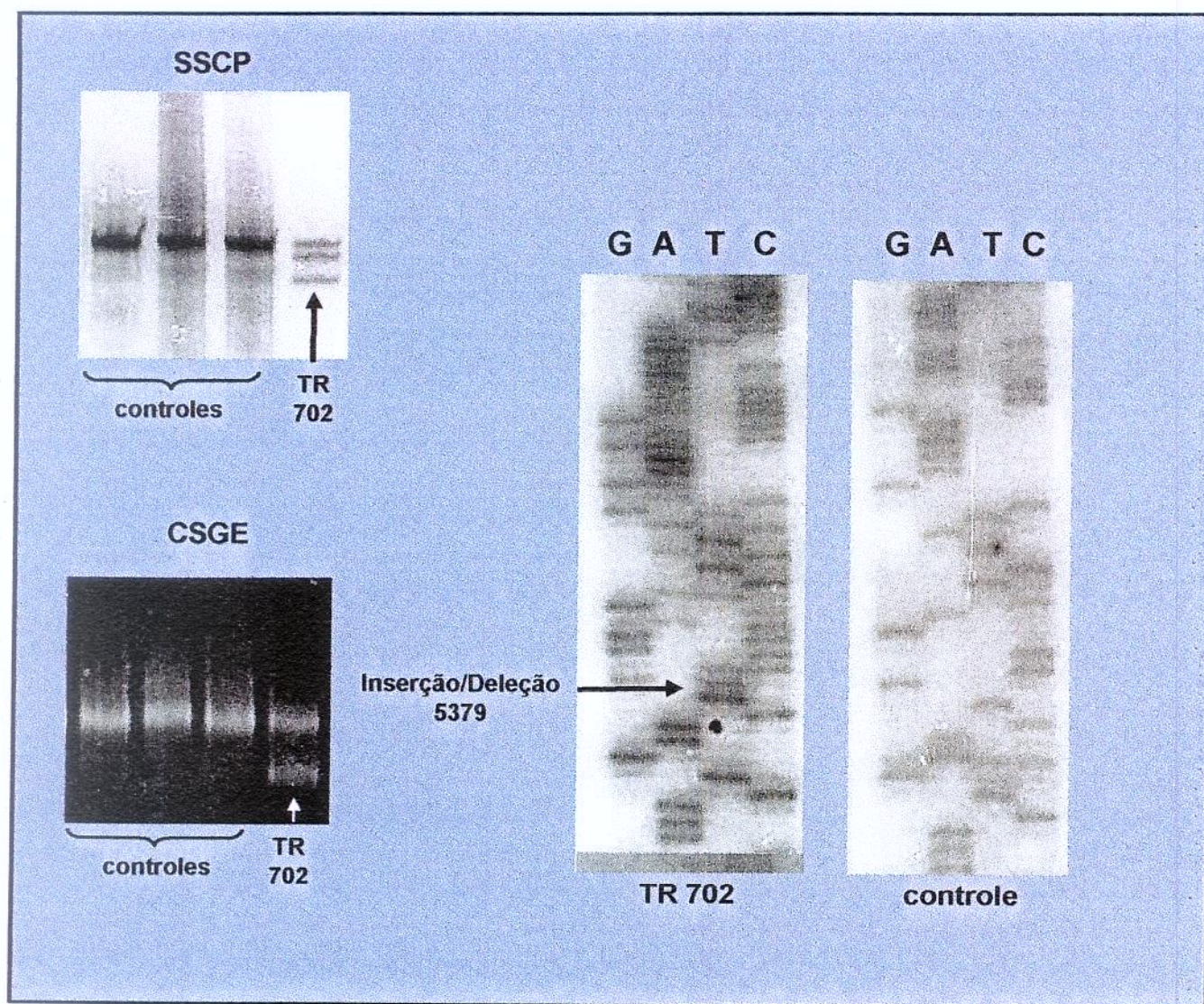


Figura 15: Análise de SSCP e CSGE do exon 3A e identificação da alteração molecular por seqüenciamento direto do DNA amplificado por PCR.

À esquerda, gel de SSCP e CSGE dos fragmentos de PCR correspondentes ao exon 3A do gene da AT, corados com nitrato de prata e brometo de etídio, respectivamente. O sequenciamento revelou, tanto na paciente como nos 2 familiares, um “borramento” a partir do nucleotídeo 5379 levando a uma provável inserção ou deleção. Para a confirmação deste achado, será realizado clonagem desse exon.

Discussão

Neste trabalho foram estudados cinco pacientes com deficiência de AT que apresentaram trombose espontânea (3 pacientes) ou associada ao uso de anticoncepcional oral (2 pacientes). Outras deficiências ou alterações que predispoem a trombose também foram avaliadas, como deficiência de proteína C, proteína S, a mutação 20210G→A no gene da protrombina, a Arg506Gln no gene do fator V, a Ala677Val no gene da metilenotetrahidrofolatoredutase foram avaliadas. O estudo familiar também foi realizado, contribuindo para uma melhor identificação da deficiência hereditária de AT.

Apesar de inicialmente, a deficiência de AT ter sido considerada uma doença mais grave que a deficiência de proteína C e proteína S, os estudos posteriores têm demonstrado que o risco de trombose não é tão elevado. O estudo de famílias numerosas com deficiência permitem uma análise desse dado, além de sugerir que a trombofilia é uma doença multigênica. Apesar das famílias avaliadas neste estudo constituírem-se principalmente de pais e filhos dos probandos, fica evidente que há portadores assintomáticos, favorecendo a hipótese de que há outros fatores interagindo para o aparecimento da trombose.

A análise pelos métodos de SSCP e CSGE possibilitou o rastreamento rápido de mutações. As mutações foram identificadas por seqüenciamento direto do DNA, permitindo a determinação precisa da alteração molecular responsável pela doença em 4 pacientes.

Com o uso do método de SSCP foi possível detectar quatro padrões anormais diferentes entre os cinco pacientes estudados. Para ter maior segurança na detecção de mutações foi empregada mais uma técnica de triagem, o CSGE, que identificou quatro padrões anormais diferentes de eletroforese entre os cinco pacientes estudados.

A alteração do padrão eletroforético do SSCP é muito sensível a pequenas variações de temperatura. O método é bastante simples, mas a sensibilidade pode variar de 85 a 95%, dependendo do tamanho do fragmento de DNA, sendo maior para fragmentos menores que 400 pb. Como utilizamos sempre as mesmas condições de temperatura, talvez isto explique o fato deste método não ter rastreado todas as alterações em nossos pacientes com deficiência de AT. Pode ser que se tivéssemos feito corridas eletroforéticas com outras

temperaturas encontrássemos outros padrões anormais. Por outro lado, o CSGE, que é um método tecnicamente mais difícil que o SSCP, detectou alterações não encontradas no SSCP, constituindo-se em mais um método de rastreamento. Portanto os resultados obtidos por esses 2 métodos de rastreamento foram complementares tanto para a detecção de mutações como para a identificação de polimorfismos.

O método de SSCP detectou 4 padrões anormais: um padrão anormal referente a dois polimorfismos no exon 4 (7596G→A e 7626G→A) em 2 pacientes; outro padrão referente à mutação +1 IVS5 G→A em 1 paciente; outro referente à mutação 13328 G→A no exon 6, com a troca do aminoácido alanina por treonina na posição 404, em um paciente, e outro no exon 3A, provavelmente decorrente da inserção ou deleção na posição 5379.

O CSGE revelou 4 padrões anormais: um padrão referente a um polimorfismo no IVS5 - 9893 G→C , em 2 pacientes; outro padrão correspondente à mesma mutação também determinada pelo SSCP, +1 IVS5 G→A em 1 paciente; outro padrão referente à mutação +5 IVS1 G→A em 1 paciente, e outro padrão anormal, também rastreado pelo SSCP, localizado no exon 3A, provavelmente decorrente da inserção ou deleção na posição 5379.

Por seqüenciamento, as únicas alterações encontradas no gene da paciente TR 216 foram dois polimorfismos, em heterozigose, já descritos anteriormente. Um polimorfismo encontra-se na posição 7596 (G→A) que corresponde ao codon 295 no exon 4, que não altera a valina normalmente encontrada (OLDS *et al.*, 1992). O outro polimorfismo resulta de uma substituição silenciosa da adenina para uma guanina na posição 7626, que codifica o aminoácido de codon 305 da AT (PROCHOWNIK *et al.*, 1983). Esta variação na seqüência cria um sítio de clivagem para a enzima *Pst* I. Os alelos que contêm este sítio de restrição *Pst* I são referidos como alelos positivos, e aqueles sem este, como alelos negativos. Com o mapeamento gênico, esta seqüência polimórfica pode ser detectada em amostras de DNA digeridas com *Pst* I. Este polimorfismo é considerado freqüente, e pode servir como um marcador útil da estrutura gênica da AT em famílias deficientes. Pela análise de amostras de DNA de vários membros da família, pode-se distinguir os alelos de AT materno e paterno e esclarecer a base molecular da deficiência.

A utilização destes polimorfismos para análise de segregação da deficiência de antitrombina não pode ser realizada nesta família, porque não tínhamos amostras de DNA dos filhos da paciente.

Uma das dificuldades encontradas no diagnóstico de deficiência hereditária de AT nesta paciente foi a falta de amostras de familiares, uma vez que os únicos participantes foram seus 2 filhos, que apresentavam dosagem normal de AT, e não havia história familiar para trombose. Por outro lado, há uma forte evidência de que se trata de deficiência hereditária de AT, pois a paciente não apresenta nenhuma outra doença de base, descartando deficiência adquirida de AT, e a repetição da dosagem por 3 vezes confirmou atividade diminuída de AT. Além disso, apresentou 2 episódios de trombose venosa na terceira década de vida, o primeiro associado ao uso de anticoncepcional oral e o segundo espontaneamente, ao interromper precocemente a anticoagulação oral. Na investigação laboratorial de trombofilia hereditária, a única alteração foi a diminuição de AT.

As hipóteses para não termos encontrado nenhuma alteração molecular no gene desta paciente são: a mutação estar localizada em uma região que não foi seqüenciada, isto é, as regiões intrônicas; ter ocorrido uma grande deleção que levou a resultados falso negativos tanto nos métodos de triagem como no seqüenciamento; a alteração molecular envolver um outro gene responsável pela regulação da produção de AT.

A paciente TR 253 apresenta deficiência de AT tipo I, apresentando uma diminuição tanto da atividade como do antígeno da AT. O gene desta paciente mostrou uma alteração ainda não descrita, na posição +1 (5'→3') do intron 5, causada por uma transição G→A. Esta alteração deve ser a mutação responsável pela deficiência de AT, uma vez que este nucleotídeo faz parte das seqüências altamente conservadas do gene, conhecidas como seqüências consenso. As mutações que envolvem essa região podem levar a produção de mRNA aberrantes e produção de proteínas truncadas, tanto pela inclusão da região intrônica pela criação de novos sítios crípticos, como pela exclusão do exon (exon "skipping"). Oitenta e um por cento das mutações em sítios de clivagem envolvem a substituição de uma guanina, e 61% dessas trocas são por uma adenina. Dez por cento das mutações na deficiência de AT tipo I ocorrem em sítios de clivagem (COOPER & KRAWCZAK, 1993). Além disso houve segregação da mutação com a deficiência, pois a mesma foi encontrada nos 22 membros portadores de deficiência de AT, dos 34 familiares estudados. Esta paciente também mostrou os mesmos polimorfismos localizados no exon 4, descritos no TR216, mas em homozigose.

Esta família está bem caracterizada quanto a deficiência hereditária de AT, pois além de um quadro grave de trombose, apresenta uma história familiar caracterizada por trombose

em 7 irmãos e 3 sobrinhos. A pesquisa de outras causas de trombofilia primária revelou que a única alteração é a deficiência de AT.

O paciente TR 303 é portador de deficiência de AT tipo I, caracterizada por episódios tromboembólicos recorrentes. O caráter hereditário é favorecido pela história familiar de pai e tia paterna com quadro clínico de trombose, responsável pelo óbito de ambos. A única alteração detectada no estudo laboratorial para trombofilia primária foi a deficiência de AT. O estudo molecular revelou a presença de duas alterações. A primeira é uma mutação, ainda não descrita, localizada na posição +5 (5'→3') do intron 1, caracterizada por uma transição G→A (ARNALDI *et al.*, 1999). Esta região é altamente conservada, e portanto considerada uma região consenso. Assim, os mecanismos moleculares que resultarão na deficiência de AT deste paciente podem ser semelhantes aos da mutação na posição +1 descrita no paciente TR 253. A guanina na posição +5 da região de clivagem é altamente conservada em genes vertebrados. A substituição do nucleotídeo G na posição +5 pode reduzir significativamente a estabilidade do pareamento das bases dessa região com a região complementar U1 do RNA nuclear. A transição G→A nesta posição também foi descrita em outros genes, sendo responsável por hemofilia A, hemofilia B, β -talassemia, osteogênese imperfeita, deficiência de proteína C e proteína S (COOPER & KRAWCZAK, 1993).

Outro achado que favorece a hipótese de que esta mutação é a responsável pela deficiência de AT, é que a mesma está presente somente no irmão e no sobrinho do paciente, que são os únicos familiares que também apresentam a deficiência de AT, dentre 14 membros estudados.

A outra alteração encontrada neste paciente foi um polimorfismo já descrito, localizado no intron 5 do gene da AT, caracterizado pela presença de uma guanina ou citosina na posição 9893. Este polimorfismo pode ser detectado com a enzima de restrição *Dde I*. (DALY & PERRY, 1990).

No paciente TR 491 foi encontrado uma mutação, responsável pela deficiência tipo II subtipo PE, e um polimorfismo. A mutação caracteriza-se por uma transição G→A na posição 13328, em heterozigose, no exon 6, correspondendo à substituição do aminoácido alanina para treonina, no codon 404. Esta alteração, anteriormente descrita na literatura, foi encontrada em outras três famílias, de acordo com o "database" de 1997 (LANE *et al.*, 1997). O estudo molecular de pacientes com o tipo II PE mostrou mutações de ponto que sempre

envolviam a troca de um aminoácido na região 402-407 da proteína variante (LANE *et al.*, 1992).

A interação defeituosa destas AT mutantes com a trombina resulta da proximidade da região 402-407 ao sítio reativo, e os níveis antigênicos diminuídos podem ser explicados pela localização próxima a uma região interna conservada, que contém elementos que influenciam o “turnover” e degradação intracelular das serpinas. Por outro lado, apesar de espacialmente distante da superfície carregada positivamente da AT, que forma o sítio de ligação com a heparina, as mutações que envolvem a região 402-407 demonstram que há uma ligação entre este sítio e o sítio reativo. As mutações dessa região podem causar alterações estruturais, afetando o centro da molécula, podendo inclusive influenciar a desnaturação proteica.

O estudo familiar revelou que nenhum outro membro apresentava história de TVP ou níveis reduzidos de AT. O paciente apresentava um quadro altamente sugestivo de deficiência hereditária, uma vez que teve trombose espontânea em membro inferior aos 15 anos de idade, que evoluiu com embolia pulmonar, além de outros episódios trombóticos em membros inferiores e trombose mesentérica. O teste de paternidade confirmou que o probando é filho legítimo do casal, sugerindo tratar-se de uma mutação ‘*de novo*’. É importante ressaltar que esse quadro grave de trombose pode ser explicado pela concomitância de outros fatores de risco para trombofilia, pois a investigação revelou que o paciente também é portador da mutação G1619A no gene do fator V (fator V Leiden) em heterozigose, e da variante C677T no gene da MTHFR em homozigose.

Outra alteração neste paciente é o polimorfismo na posição 9893 localizada no intron 5, já comentada anteriormente.

A paciente TR 702, é portadora de deficiência de AT, com quadro clínico caracterizado por TVP e embolia pulmonar, associado ao uso de anticoncepcional oral. O caráter hereditário é demonstrado tanto pela história familiar, como pelo achado de deficiência de AT assintomática em sua mãe e irmão. O sequenciamento revelou que o padrão eletroforético anormal do exon 3A, provavelmente corresponde a uma inserção ou deleção na posição 5379. Esta mutação pode causar alteração da estrutura de leitura de todas as trincas de pares de bases no gene, depois da alteração e inclusive gerar um codon prematuro de terminação. Este resultado somente será confirmado após a realização de clonagem desse

fragmento. Esta mutação não foi descrita anteriormente, mas provavelmente, pelo próprio mecanismo molecular, deve levar a uma deficiência tipo I. Recentemente uma mutação de ponto, com a troca de um G por um A, nesta mesma posição, que levou a troca de uma Cys por uma Tyr no aminoácido 128, foi descrita em um paciente com deficiência de AT tipo I.

De acordo com a mutação e o tipo de alteração molecular decorrente dela, as deficiências proteicas podem ser do tipo I ou II. Assim, em 2 dos nossos pacientes, com deficiência tipo I, detectou-se mutações em sítio de clivagem, o que provavelmente leva a formação de moléculas aberrantes, truncadas. No database todas as mutações que acometem o sítio de clivagem estão presentes somente na deficiência de AT do tipo I.

Um dos nossos pacientes, que não tinha a classificação do tipo de deficiência, apresenta uma mutação que provavelmente acarreta uma deficiência tipo I, pois de acordo com o database, todas as inserções e deleções levam a um codon prematuro de terminação e portanto a produção de uma proteína truncada.

As mutações que ocorrem na deficiência tipo II, estão representadas por mutações de ponto, do tipo "missense". Pelo próprio tipo de deficiência seria esperado que as mutações alterassem apenas a função da AT, comprometendo os sítios ativos da molécula.

Este é o primeiro trabalho em populações sul-americanas, onde se caracterizou molecularmente a deficiência de AT. Em 5 indivíduos não relacionados, observamos 3 mutações ainda não descritas na literatura.

Conclusões

O estudo de 5 famílias com deficiência de antitrombina possibilitou a detecção de 4 mutações responsáveis pela doença:

- duas mutações ainda não descritas, em sítios de clivagem: +1 IVS5 G→A em um paciente e +5 IVS1 G→A em um paciente;
- uma provável inserção ou deleção ainda não descrita, na posição 5379 no exon 3A, em um paciente;
- uma mutação de ponto *de novo*, do tipo missense, na posição 13328 G→A, no exon 6, em um paciente.

O rastreamento de alterações moleculares realizado pelo SSCP e CSGE mostrou que os 2 métodos foram complementares.

Todos os polimorfismos identificados já foram descritos anteriormente, e não parecem ter relação com a deficiência de antitrombina.

Apesar da deficiência de antitrombina em heterozigose apresentar um risco relativo de trombose de 5 vezes, este estudo mostrou que muitos familiares são portadores assintomáticos, o que favorece a hipótese de que outros fatores ainda não identificados devem contribuir para a clínica de trombose. Outros fatores de risco para trombofilia como deficiência de proteína C, proteína S, e mutações no gene da protrombina, não estavam presentes em nenhum dos pacientes. As mutações no gene do fator V (fator V Leiden) e da MTHFR estavam presentes apenas no paciente com a mutação *de novo*.

Referências Bibliográficas

- ABILDGAARD, U. – Highly purified antithrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc gel electrophoresis. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* **21**: 89-91, 1968.
- ARNALDI, L.A.T.; POLIMENO, N.C.; ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. – A Novel Splice Site Mutation in a Brazilian Patient with Hereditary Antithrombin Deficiency Type I. *Hum. Hered.* **49**: 119-120, 1999.
- BAYSTON, A. & LANE, D.A. – Antithrombin: Molecular Basis of Deficiency. *Thromb. Haemost.* **78**: 339-343, 1997.
- 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.
- BJORK, I.; DANIELSSON, A.; FENTON J.W.; JORNVALL, H. – The site in human antithrombin for functional proteolytic cleavage by human thrombin. *FEBS Lett.* **126**:257-260, 1981.
- BJORK, I.; JACKSON, C.M.; JORNVALL, H.; LAVINE, K.K.; NORDLING, K.; SALSGIVER, W.J. – The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically cleaved form of the inhibitor from complexes with factor Ixa, factor Xa and thrombin. *J. Biol. Chem.* **257**: 2406-2411, 1982.
- BLACBURN, M.N.; SIBLEY, C.C. – The heparin binding site of antithrombin III. Evidence for a critical tryptophan residue. *J. Biol. Chem.* **255**: 824-826, 1980.
- BLAJCHMAN, M.A.; AUSTIN, R.C.; FERNANDEZ-RACHUBINSKI, F.; SHEFFIELD, W.P. – Molecular Basis of Inherited Human Antithrombin Deficiency. *Blood* **80**: 2159-2171, 1992.
- BOCK, S.C. & PROCHOWNIK, E.V. – Molecular Genetic Survey of 16 Kindreds With Hereditary Antithrombin III Deficiency. – *Blood* **70**: 1273-1278, 1987.

- BOCK, S.C.; MARRINAN, J.A.; RADZIEJEWSKA, E. – Antithrombin III Utah: Proline-407 to Leucine Mutation in a Highly Conserved Region near the Inhibitor Reactive Site. *Biochemistry* **27**: 6171-6178, 1988.
- BOCK, S.C.; WION K.L.; VEহার, G.A.; LAWN, R.M. – Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III. *Nuc. Ac. Res.* **10**: 8113, 1982.
- BORG, J.Y.; BRENNAN, S.O.; CARRELL, R.W. – Antithrombin Rouen-IV 24 Arg→Cys. The amino-terminal contribution to heparin binding. *FEBS Lett.* **266**: 163-166, 1990.
- BORG, J.Y.; OWEN, M.C.; SORIA, C. – Proposed heparin binding site in antithrombin based on arginine 47. A new variant Rouen-II, 47 Arg to Ser. *J. Clin. Invest.* **81**: 1292-1296, 1988.
- BRENNAN, S.O.; BORG, J.Y.; GERGE, P.M. – New carbohydrate site in mutant antithrombin (7 Ile-Asn) with decreased heparin affinity. *FEBS Lett.* **237**: 118-122, 1988.
- 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**: 335-343, 1988.
- CHANDRA, T.; STACKHOUSE, R.; KIDD, V.J.; WOO, S.L.C. – Isolation and sequence characterization of a cDNA clone of human antithrombin III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 1845-1848, 1983.
- CHOWDURY, V.; MILLE, B.; OLDS, R.J. – Antithrombin Southport (99Leu to Val) and Vienna (118Gln to Pro): two novel antithrombin variants with abnormal heparin binding. *Br. J. Haematol.* **89**: 602-609, 1994.
- CHURCH, F.C.; MEADE, J.B.; TREANOR, R.E. – Antithrombin activity of. Fucoidan. The interaction of. Fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III and thrombin. *J. Biol. Chem.* **264**: 3618-3623, 1989.
- COMP, P.C.; ESMON, C.T. – Generation of fibrinolytic activity by infusion of protein C into dogs. *J. Clin. Invest.* **68**: 1221-1228, 1981.

- COOPER, D.N. & KRAWCZAK M. – Antithrombin III and antithrombin III deficiency. em **Venous Thrombosis from genes to clinical medicine**. BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp 37-59, 1997.
- COOPER, D.N. & KRAWCZAK M. – Single base-pair substitutions in human gene mRNA splice junctions and their phenotypic consequences em **Human Gene Mutation**, BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp 239-260, 1993.
- COSGRIFF, T.M.; BISHOP, D.T.; HERSHGOLD, E.J.; SKOLNICK, M.H.; MARTIN, B.A.; BATY, B.J.; CARLSON, K.S. – Familial Antithrombin III Deficiency: Its Natural History, Genetics, Diagnosis and Treatment. *Medicine* **62**: 209-220, 1983.
- DALY, M.E.; PERRY, D.J. – Dde I polymorphism in intron 5 of. The AT III gene. *Nuc. Ac. Res.* **18**: 5583, 1990.
- 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.
- EGEBERG, O. – Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **13**: 516-530, 1965.
- 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 DER HEUVEL, L.P.; ROZEN, R. – A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydro folate reductase. *Nature Gen.* **10**: 111-113, 1995.
- GANDRILLE, S.; AIACH, M.; LANE, D.A. – Important role of. Argine 129 in heparin-binding site of. Antithrombin III. *J. Biol. Chem.* **265**: 18997-19001, 1990.
- GANGULY, A.; ROCK, M.J.; PROCKOP, D.J. – Conformation-sensitive gel eletrophoresis for detection of. Single-base differences in double-strand PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 10325-10329, 1993.
- GETTINS, P.; CHOAY, J.; CREWS, B.C. – Role of tryptophan 49 in the heparin cofactor activity of human antithrombin III. *J. Biol. Chem.* **267**: 21946-21953, 1992.

- GRUNDY, C.B.; THOMAS, F.; MILLAR, D.S.; KRAWCZAK, M.; MELISSARI, E.; LINDO, V.; MOFFAT, E.; KAKKAR, V.V.; COOPER D.N. – Recurrent Deletion in the human Antithrombin III Gene. *Blood* **78**: 1027-1032, 1991.
- HATHAWAY, W.E. – Clinical Aspects of Antithrombin III Deficiency. *Sem. Hematol.* **28**: 19-23, 1991.
- HEIJBOER, H.; BRANDJES, D.P.; BULLER, H.R. – Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1512-1516, 1990.
- IOLASCON *et al.* – Rapid detection of Medium chain Acyl-Co A dehydrogenase gene mutations by non-radioactive, single strand conformation polymorphism minigels. *J. Med. Genet.* **31**: 551-554, 1994.
- JOCHMANS, K.; LISSENS, W.; SENECA, S.; CAPEL, P.; CHATELAIN, B.; MEEUS, P.; OSSELAER, J.C.; PEERLINCK, K.; SEGHERS, J.; SLACMEULDER, M.; STIBBE, J.; VAN DE LOO, J.; VERMYLEN, J.; LIEBAERS, I.; DE WAELE, M. – The Molecular Basis of Antithrombin Deficiency in Belgian and Dutch Families. *Thromb. Haemost.* **80**: 376-381, 1998.
- JOCHMANS, K.; LISSENS, W.; VERVOORT, R.; PEETERS, S.; WAELE, M.D.; LIEBAERS, I. – Antithrombin-Gly 424 Arg: A Novel point Mutation Responsible for Type I Antithrombin Deficiency and Neonatal Thrombosis. *Blood* **83**: 146-151, 1994.
- LANE, D.A. & BAYSTON, T.A. – Molecular Basis of Antithrombin Action and Deficiency. em **Medical Intelligence Unit. Molecular Mechanisms of Hypercoagulable States.** edited by SCHAFER, A.I. Landes Bioscience, pp 39-77, 1997.
- LANE, D.A.; BAYSTON, T.; OLDS, R.J.; FITCHES, A.C.; COOPER, D.N.; MILLAR, D.S.; JOCHMANS, K.; PERRY, D.J.; OKAJIMA, K.; THEIN, S.L.; EMMERICH, J. – Antithrombin Mutation Database: 2nd (1997) Update. *Thromb. Haemostasis* **77**: 197-211, 1997.

- LANE, D.A.; OLDS, R.J.; CONARD, J.; BOISCLAIR, M.; BOCK, S.C.; HULTIN, M.; ABILDGAARD, U.; IRELAND, H.; THOMPSON, E. SAS, G.; HORELLOU, M.H.; TAMPONI, G.; THEIN, S.L. – Pleiotropic Effects of. Antithrombin Strand 1C Substitution Mutations. *J. Clin. Invest* **90**: 2422-2433, 1992.
- LAURELL, C-B. – Quantitative estimation of. Proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* **15**: 45-52, 1966.
- MANN, K.G.; LORAND, L. – Introduction: Blood Coagulation. *Methods. Enzymol.* **222**: 1-10, 1993.
- MILETICH, J.P. – Thrombophilia as a multigenic Disorder. *Sem. Thromb. and Hemost.* **24**: 13-20, 1998.
- MILLE, B.; WATTON, J.; BARROWCLIFE, T.W. – Role of N and C terminal amino acids in antithrombin binding to pentasaccharide. *J. Biol. Chem.* **269**: 29435-29443, 1994.
- NAKAGAWA, M.; TANAKA, S.; TSUJI, H.; TAKADA, O.; UNO, M.; HASHIMOTO-GOTOH, T.; WAGATSUMA, M. – Congenital Antithrombin III Deficiency (AT-III Kyoto): Identification of a Point mutation altering Arginine-406 to Methionine behind the reactive site. *Thromb. Res.* **64**: 101-108, 1991.
- NAKAHARA, Y.; TSUJI, H.; NAKAGAWA, K.; MASUDA, H.; KITAMURA, H.; NISHIMURA, H.; KASAHARA, T.; SUGANO, T.; SAWADA, S.; NAKAGAWA, M. – Genetic Analysis in Japanese Kindreds of Congenital Type I Antithrombin Deficiency Causing Thrombosis. *Thromb. Haemost.* **77**: 616-619, 1997.
- OKAJIMA, K.; ABE, H.; MAEDA, S. – Antithrombin III Nagasaki (Ser116-Pro): a heterozygous variant with defective heparin binding associated with thrombosis. *Blood* **81**: 1300-1305, 1993.
- OLDS, R.J.; LANE, D.A.; BARBUI, T.; THEIN, S.L. A Frameshift Mutation Leading to Type I Antithrombin Deficiency and Thrombosis. *Blood* **76**: 2182-2186, 1990.
- OLDS, R.J.; LANE, D.A.; BOISCLAIR, M. – Antithrombin Budapest 3: an antithrombin variant with reduced heparin affinity resulting from the substitution L99F. *FEBS Lett* **300**: 241-246, 1992.

- OLDS, R.J.; LANE, D.A.; CASO, R.; PANICO, M.; MORRIS, H.R.; SAS, G.; DAWES, J.; THEIN, S.L. – Antithrombin III Budapest: A Single Amino Acid Substitution (429 Pro to Leu) in a Region Highly Conserved in the Serpin Family. *Blood* **79**: 1206-1212, 1992.
- OLDS, R.J.; LANE, D.A.; CHOWDHURY, V.; DE STEFANO, V.; LEONE, G.; THEIN, S.L. – Complete Nucleotide Sequence of the Antithrombin Gene: Evidence for Homologous Recombination Causing Thrombophilia. *Biochemistry* **32**: 4216-4224, 1993.
- OSLON, S.T.; SHORE, J.D. – Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Characterization of the protein fluorescence enhancement. *J. Biol. Chem.* **256**: 11065, 1981.
- PERRY, D.J.; DALY, M.E.; TAIT, R.C.; WALKER, I.D.; BROWN, K.; BEAUCHAMP, N.J.; PRESTON, F.E.; GYDE, H.; HARPER, P.L.; CARRELL, R.W. – Antithrombin Cambridge II (Ala384Ser): Clinical, Functional and Haplotype Analysis of 18 Families. *Thromb. Haemost.* **79**: 249-253, 1998.
- PICARD, V.; ERSDAL-BADJU, E.; BOCK, S.C. – Partial glycosylation of antithrombin III asparagine 135 is caused by the serine in the third position of its N-glycosylation consensus sequence and is responsible for production of the β -antithrombin III isoform with enhanced heparin affinity. *Biochemistry* **34**: 8433-8440, 1995.
- 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**: 3698-3703, 1996.
- PROCHOWNIK, E.V. – Molecular genetics of inherited antithrombin III deficiencies. *Am. J. Med.* **87**: 15S, 1989 (supl 3B).
- PROCHOWNIK, E.V.; ANTONARAKIS, S.; BAUER, K.A.; ROSENBERG, R.D.; FEARON, E.R.; ORKIN, S.H. – Molecular heterogeneity of. Inherited antithrombin III deficiency. *N. Eng. J. Med.* **308**: 1549-1552, 1983.
- PROCHOWNIK, E.V.; BOCK, S.C.; ORKIN, S.H. – Intron Structure of the Human Antithrombin III Gene Differs from That of Other Members of the serine Protease Inhibitor Superfamily. *J. Biol. Chem.* **260**: 9608-9612, 1985.

- PROCHOWNIK, E.V.; MARKHAM, A.F.; ORKIN, S.H. – Isolation of a cDNA Clone for Human Antithrombin III. *J. Biol. Chem.* **258**: 8389-8394, 1983.
- RAO, L.V.M. & RAPAPORT, S.I. – Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood* **69**: 645-651, 1987.
- RAO, L.V.M.; RAPAPORT, S.I.; HOANG, A.D. – Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor VIIa. *Blood* **81**: 2600-2607, 1993.
- ROSENBERG, R.D.; DAMUS, P.S. – The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* **248**: 6490-6505, 1973.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERTICH, H.A. – Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491, 1987.
- SALVESEN, G. & PIZZO, S.V. – Proteinase inhibitors: α -macroglobulins, serpins and kunitins. em **Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice**. 3^a 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. Acad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467, 1977.
- SAS, G.; BLASKO, G.; BANHEGYI, D.; JAKO, J.; PALOS, L.A. – Abnormal antithrombin III (antithrombin III "Budapest") as a cause of familial thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **32**: 105, 1974.
- SEEGARS, W.H.; JOHNSON, J.F.; FALL, C. – Na antithrombin reaction related to prothrombin activation. *Am. J. Physiol.* **126**: 97, 1954.
- STACKHOUSE, R.; CHANDRA, T.; ROBSON, K.J.H.; WOO, S.L.C. – Purification of Antithrombin III mRNA and Cloning of Its cDNA. *J. Biol. Chem.* **258**: 703-706, 1983.
- SUN, X-J.; CHANG, J-Y. – Heparin binding domain of human antithrombin III inferred from the sequential reduction of its three disulfide linkages. *J. Biol. Chem.* **264**: 11288, 1989.

- TABERNERO, M.D.; TOMAS, J.F.; ALBERCA, I. – Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am. J. Hematol.* **36**: 249-254, 1991.
- THALER, E.; LECHNER, K. – Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin. Haematol.* **10**: 369-390, 1981.
- TOMONARI, A.; IWAHANA, H.; YOSHIMOTO, K.; SHIGEKIYO, T.; SAITO, S. & ITAKURA, M. – Two New Nonsense Mutations in Type Ia Antithrombin III Deficiency at Leu 140 and Arg 197. *Thromb. Haemost.* **68**: 455-459, 1992.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Introduction. em **The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. 1ª ed. Oxford University Press Inc. – New York. pp 1-18, 1994.
- VIDAUD, D.; EMMERICH, J.; SIRIEIX, M.E.; SIÉ, P.; ALHENC-GELAS, M. & AIACH, M. – Molecular Basis for Antithrombin III Type I Deficiency; Three Novel Mutations Located in Exon IV. *Blood* **78**: 2305-2309, 1991.
- WILLIAMS, C.J.; ROCK, M.; CONSIDINE, E.; McCARRON, S.; GOW, P.; LADDA, R.; McLAIN, 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 Arg519→Cys base substitution using conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum. Mol. Gen.* 309-312, 1995.