

VARIANTES GENÉTICAS COMO FATORES DE RISCO PARA A TROMBOSE VENOSA

ELIANE BANDINELLI

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Israel Roisenberg
Co-Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, fevereiro de 2000.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HEMOSTASIA	4
1.2. TROMBOSE	11
1.2.1. PROTEÍNA C.....	13
1.2.2. INIBIDOR DA PROTEÍNA C.....	17
1.2.3. TROMBOMODULINA	18
1.2.4. PROTEÍNA S	20
1.2.5. ANTITROMBINA III	22
1.2.6. INIBIDOR DA ROTA DO FATOR TISSULAR.....	24
1.2.7. PLASMINOGÊNIO	26
1.2.8. ATIVADOR TISSULAR DO PLASMINOGÊNIO.....	29
1.2.9. INIBIDOR-1 DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO.....	30
1.2.10. O COMPLEXO FATOR VIII/FATOR VON WILLEBRAND	33
1.2.11. FATOR V	35
1.2.12. FATOR II ou PROTROMBINA	40
1.2.13. FATOR VII.....	41
1.2.14. GLICOPROTEÍNA IIb\IIIa.....	45
1.2.15. HOMOCISTEINEMIA	46
2. OBJETIVOS.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. AMOSTRA.....	51
3.1.1. Grupo de Pacientes	51
3.1.2. Grupo Controle Caucasóide	52
3.1.3. Grupo Controle Negroíde	52
3.1.4. Grupo Controle de Ameríndios	52
3.2. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO	53
3.2.1. Obtenção do Plasma	53
3.2.2. Dosagem de Fator VIII.....	53
3.2.3. Dosagem de Fator von Willebrand.....	53
3.2.4. Dosagem das Proteínas C, S e ATIII.....	53
3.3. ESTUDOS DE DNA	54
3.3.1. Obtenção do DNA	54
3.3.2. Detecção dos Polimorfismos	54
a) Polimorfismos no gene do Fator VII (FVII)	55
b) Polimorfismo no gene do Inibidor-1 do Ativador do Plasminogênio (PAI-1).....	55
c) Polimorfismo no gene do Ativador Tissular do Plasminogênio (t-PA)	56
d) Polimorfismo no gene da Glicoproteína IIb/IIIa.....	56
e) Polimorfismo no gene da protrombina (Fator II)	56
f) Polimorfismo no gene da enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)	57
g) Polimorfismos no gene do Fator V	57
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Distribuição dos pacientes segundo os fatores genéticos de risco e caracterização demográfica.	59
4.2. Sobre a influência do grupo sanguíneo ABO e dos níveis de FVIII e FvW na incidência de TVP.....	61

4.3. Sobre os polimorfismos no gene do fator V	64
4.3.1. Sobre o polimorfismo 1691G→A	64
4.3.1.1. Polimorfismo 1691G→A na população em geral	64
4.3.1.2. Polimorfismo 1691G→A em pacientes com trombose venosa.....	76
4.3.2. Sobre o polimorfismo 4070A→G	78
4.3.2.1. Polimorfismo 4070A→G na população em geral	78
4.3.2.2. Polimorfismo 4070A→G em pacientes com trombose venosa.....	79
4.4. Sobre o polimorfismo no gene da Protrombina.....	80
4.4.1. Polimorfismo 20210 G→A na população em geral	80
4.4.2. Polimorfismo 20210 G→A em pacientes com trombose venosa.....	85
4.5. Sobre os polimorfismos no gene do fator VII	86
4.5.1. Sobre o polimorfismo R353Q.....	86
4.5.1.1. Polimorfismo R353Q na população em geral.....	86
4.5.1.2. Polimorfismo R353Q em pacientes com trombose venosa	88
4.5.2. Sobre o polimorfismo -323P0/10.....	90
4.5.2.1. Polimorfismo -323P0/10 na população em geral.....	90
4.5.2.2. Polimorfismo -323P0/10 em pacientes com trombose venosa	93
4.6. Sobre o polimorfismo no gene da Glicoproteína IIb/IIIa	95
4.6.1. Polimorfismo PI ^{A1} /PI ^{A2} na população em geral	95
4.6.2. Polimorfismo PI ^{A1} /PI ^{A2} em pacientes com trombose venosa.....	96
4.7. Sobre o polimorfismo na enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase.....	98
4.7.1. Polimorfismo 677C→T na população em geral	98
4.7.2. Polimorfismo 677C→T em pacientes com trombose venosa.....	102
4.8. Sobre o polimorfismo no gene do Ativador Tissular do Plasminogênio.....	104
4.8.1. Polimorfismo de inserção/deleção na população em geral.....	104
4.8.2. Polimorfismo de inserção/deleção em pacientes com trombose venosa	105
4.9. Sobre o polimorfismo no gene do Inibidor-1 do Ativador do Plasminogênio	106
4.9.1. Polimorfismo 4G/5G na população em geral	106
4.9.2. Polimorfismo 4G/5G em pacientes com trombose venosa.....	108
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
6. RESUMO E CONCLUSÕES	113
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	116
8. BIBLIOGRAFIA	119

1. INTRODUÇÃO

1.1. HEMOSTASIA

A hemostasia, nos seres humanos, é mantida por uma série de mecanismos interrelacionados que envolvem componentes bioquímicos humorais e celulares. Os papéis específicos das células endoteliais, matrizes subendoteliais, plaquetas e das proteínas da coagulação e da fibrinólise têm sido incessantemente pesquisados e alguns já estão bem definidos.

As células participam em eventos chaves da coagulação sangüínea: iniciação, propagação do estímulo inicial e interação com fibrinogênio e fibrina para modificar a estrutura do coágulo. Essas interações celulares não somente fornecem um local para controlar a extensão na qual a coagulação é amplificada, mas também propiciam mecanismos para localizar a resposta hemostática. Todas as respostas requerem atividade celular. Além disso, a natureza adesiva das células ativadas contribui para a formação do tampão hemostático.

Controversamente, um sistema que coagula o sangue rapidamente, em resposta a um pequeno estímulo, é por si uma ameaça à vida, uma vez que um coágulo intravascular pode se deslocar e obstruir vias vitais da circulação. Entretanto, a demora na formação do coágulo ou ausência de sua formação pode levar um indivíduo a morte por hemorragia.

LAFFAN & TUDDENHAM (1997) salientam que a coagulação sangüínea é um sistema fisiológico que evoluiu atendendo a dois requisitos básicos e opostos:

- 1) É vital para os organismos superiores que o sangue flua livremente, dentro da rede vascular, alcançando todos os tecidos;
- 2) Em qualquer local de extravasamento de sangue, deve haver a formação de um tampão sólido que impedirá a perda de sangue para o exterior do vaso.

Assim, a hemostasia dos mamíferos preenche esses requisitos por meio de um complexo sistema interativo, que envolve diferentes mecanismos com vários sistemas de controle positivos e negativos. Falhas na hemostasia promovem perda de sangue ou contribuem para a etiologia da trombose.

O mecanismo da coagulação sangüínea é explicado pela Teoria Seqüencial, que está baseada nos trabalhos de DAVIE & RATNOFF (1964) e MacFARLANE (1964), na qual a formação de fibrina ocorre como resultado de uma cadeia de reações envolvendo serino-

proteases. Esta rede de fibrina permite a consolidação e a estabilidade do tampão hemostático. A cadeia de reações pode ser iniciada por dois mecanismos diferentes: o intrínseco, através da ativação do fator XII, e o extrínseco, através da ativação do fator VII. Atualmente é aceito que esses mecanismos não atuam de modo independente, mas que apresentam uma série de interações complementares. A figura 1 mostra um esquema simplificado dos processos envolvidos na geração da trombina, enzima responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina.

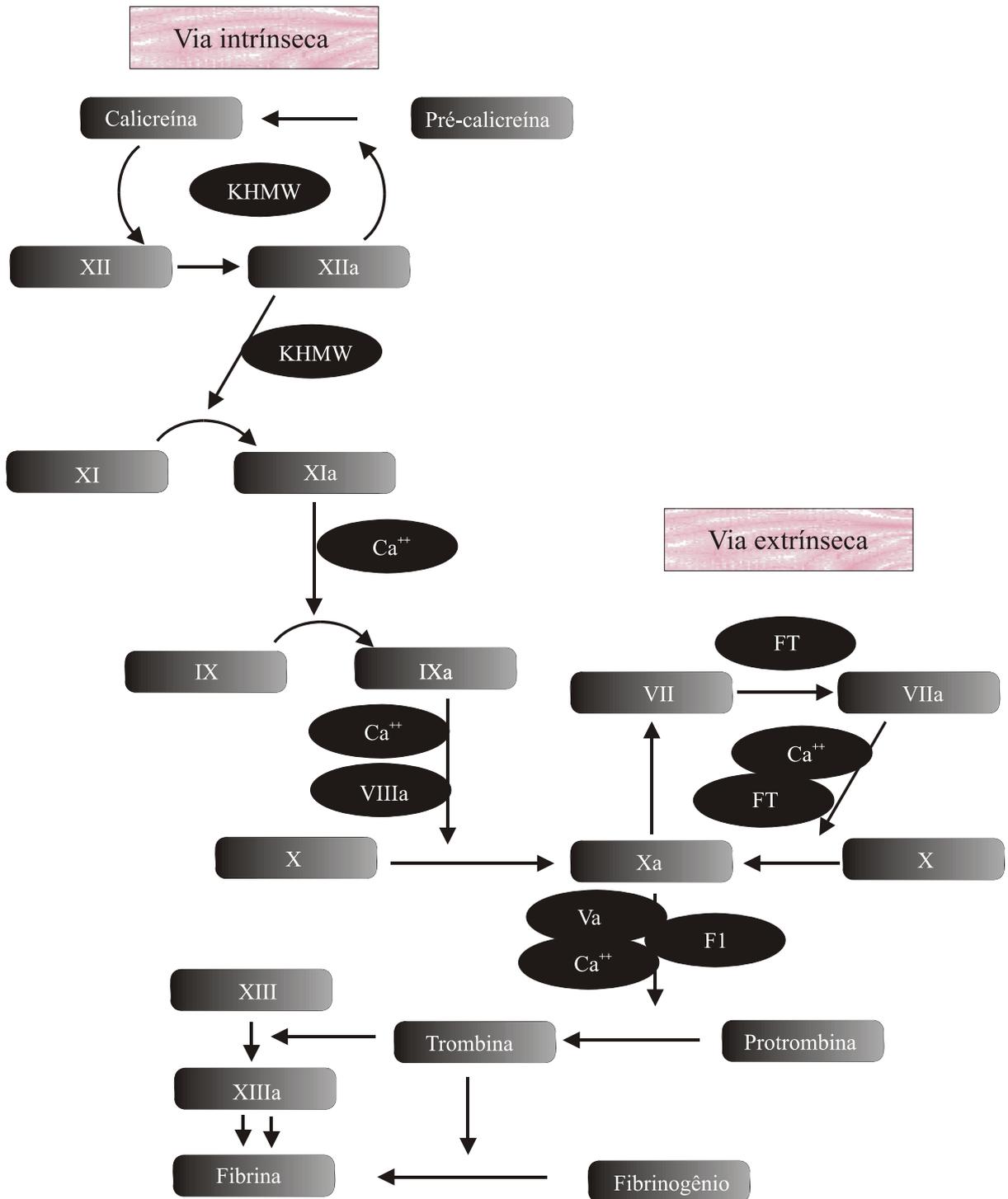


Figura 1: Cascata da coagulação e seus dois mecanismos de ativação. Baseado em TUDDENHAM & COOPER (1993). KHMW: Cinogênio de alto peso molecular; FT: fator tissular; Fl: fosfolípido.

Um dos aspectos mais importantes da hemostasia é o controle da formação e degradação da fibrina. A produção de fibrina é controlada pelos mecanismos anticoagulantes e a degradação, pelo mecanismo fibrinolítico.

a) Mecanismos Anticoagulantes

Os três principais mecanismos anticoagulantes que regulam a coagulação são:

- 1) Sistema da proteína C;
- 2) Antitrombina III;
- 3) Inibidor da rota do fator tissular.

Esses sistemas desempenham papéis distintos e aparentemente complementares no mecanismo anticoagulante, conforme mostra a Figura 2.

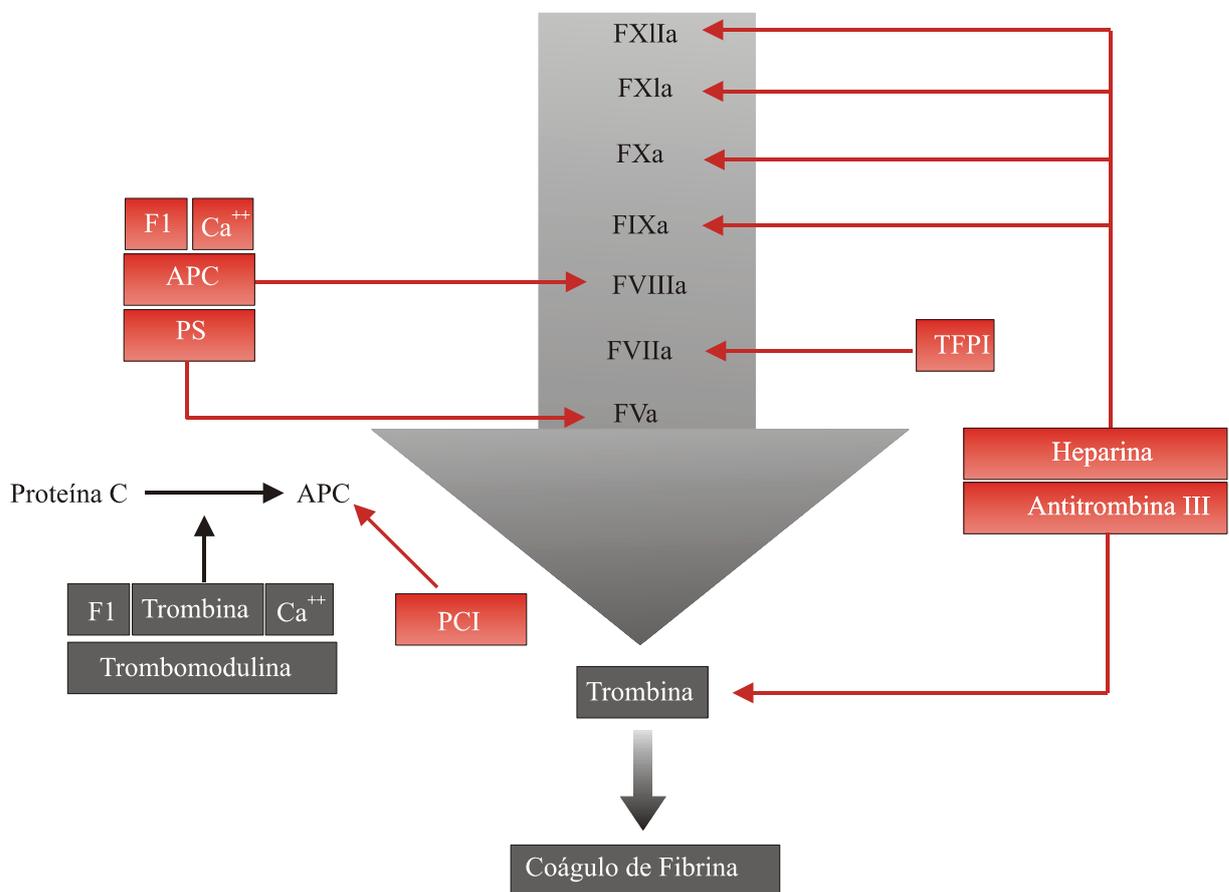


Figura 2: Atuação do mecanismo anticoagulante. — : inibição; — : ativação. F1: fosfolípido; APC: proteína C ativada; PCI: inibidor da proteína C; PS: proteína S; TFPI: inibidor da rota do fator tissular.

A seguir, será apresentada uma visão geral da atuação dos mecanismos inibidores da coagulação.

1) O sistema da proteína C é composto, principalmente pelas seguintes proteínas: proteína C, proteína S, trombomodulina e inibidor da proteína C.

De acordo com a revisão realizada por ESMON et al. (1999), a regulação da coagulação pelo sistema da proteína C pode ser resumida da seguinte maneira: a trombina formada no local da lesão vascular difunde-se e se liga de forma reversível e com alta afinidade a trombomodulina, que é uma proteína transmembrana. O complexo trombina/trombomodulina, na presença de íons cálcio, converte a proteína C em proteína C ativada (APC). A ativação da proteína C pelo complexo trombina/trombomodulina é acentuada pela ligação da proteína C ao receptor da proteína C da célula endotelial (EPCR).

A APC liga-se ao seu co-fator, a proteína S (PS). Na presença de íons cálcio e fosfolípidos, o complexo APC/PS cliva as formas ativas dos fatores V e VIII, tornando esses co-fatores da coagulação inativos. O fator V também atua como um co-fator para proteína C no processo de inativação do fator VIII.

O plasma contém um inibidor específico para a APC, o inibidor da proteína C, o qual atua formando um complexo 1:1 com a APC, inativando-a. Esse inibidor também é capaz de inibir o complexo trombina/trombomodulina.

2) A antitrombina III é um dos mais importantes inibidores fisiológicos da coagulação, é o principal inibidor da trombina e também inibe outras serino-proteases ativadas da cascata da coagulação, a saber, os fatores XIIa, XIa, Xa, IXa.

A atividade inibitória sobre a trombina é aumentada 2.000 vezes na presença de quantidades adequadas de heparina. Esse mucopolissacarídeo induz uma alteração alostérica na posição do resíduo Arg393, deixando essa região do inibidor prontamente disponível para interagir com a trombina (BAUER & ROSENBERG, 1991).

Conforme revisto em BLAJCHMAN (1994), quando uma serino-protease interage com a antitrombina III, as duas proteínas formam um complexo estequiométrico 1:1, que é rapidamente removido da circulação. A formação desse complexo envolve a clivagem do sítio reativo da antitrombina III (Arg393-Ser394) pelo sítio ativo da serino-protease. Após essa clivagem, ocorre a formação de uma ligação éster entre o sítio ativo da serino-protease e o resíduo Arg393 da antitrombina III.

3) O inibidor da rota do fator tissular (TFPI) inibe a via extrínseca da coagulação.

A via extrínseca da coagulação inicia quando o fator VII é ativado pelo fator Xa, na presença do fator tissular (FT), o qual é uma glicoproteína transmembrana. O complexo FVIIa/FT na presença de íons cálcio, ativa por proteólise os fatores IX e X, desencadeando as

outras etapas da cascata da coagulação. Após a ativação, o fator X ou o fator IX são liberados do sítio de ligação do fator tissular.

O inibidor da rota do fator tissular liga-se ao fator Xa, formando um complexo binário, esse complexo liga-se ao FVIIa/FT impedindo a ligação de fator X ou fator IX e, conseqüentemente, evitando a ativação desses fatores. Portanto esse inibidor atua de uma maneira dependente de FXa (BROZE et al., 1988).

b) Mecanismo Fibrinolítico

Como já referido, outro importante aspecto da hemostasia é a degradação da fibrina. O mecanismo fibrinolítico, ou fibrinólise, é responsável pela remoção da fibrina no momento em que a barreira hemostática não é mais necessária e também atua como um fator limitante à extensão do coágulo. Alterações no mecanismo fibrinolítico podem ocasionar hemorragias, como no caso do aumento de produção do ativador tissular do plasminogênio (HAMPTON et al., 1972) ou ser um fator de risco para ocorrência de trombose, como no caso da deficiência de plasminogênio (AOKI et al., 1978).

Na sua essência, o sistema fibrinolítico consiste de elementos que promovem ou inibem a conversão da pro-enzima plasminogênio em plasmina, uma serino-protease ativa. Assim, os principais componentes da fibrinólise são:

- plasminogênio;
- ativador tissular de plasminogênio;
- inibidor-1 do ativador de plasminogênio;
- ativador tipo uroquinase de plasminogênio;
- inibidor-2 do ativador de plasminogênio,
- α_2 -antiplasmina.

A plasmina é a principal enzima responsável pela degradação da fibrina. Além disso, a atividade proteolítica da plasmina é importante em processos fisiológicos que requerem a migração celular, tais como inflamação, metástase e angiogênese (JENKINS et al., 1997).

A regulação da fibrinólise ocorre em vários níveis, começando com a transcrição dos genes envolvidos, incluindo o plasminogênio, seus ativadores e inibidores e os inibidores dos seus ativadores, conforme esquematizado na Figura 3. Os sítios de síntese e secreção das proteínas da fibrinólise e as suas propriedades de ligação à superfície celular, à fibrina, à

fibronectina e entre elas mesmas, determinam a localização física da geração da plasmina e a extensão da ação contra seus substratos (fibrina e outras proteínas da matriz extracelular).

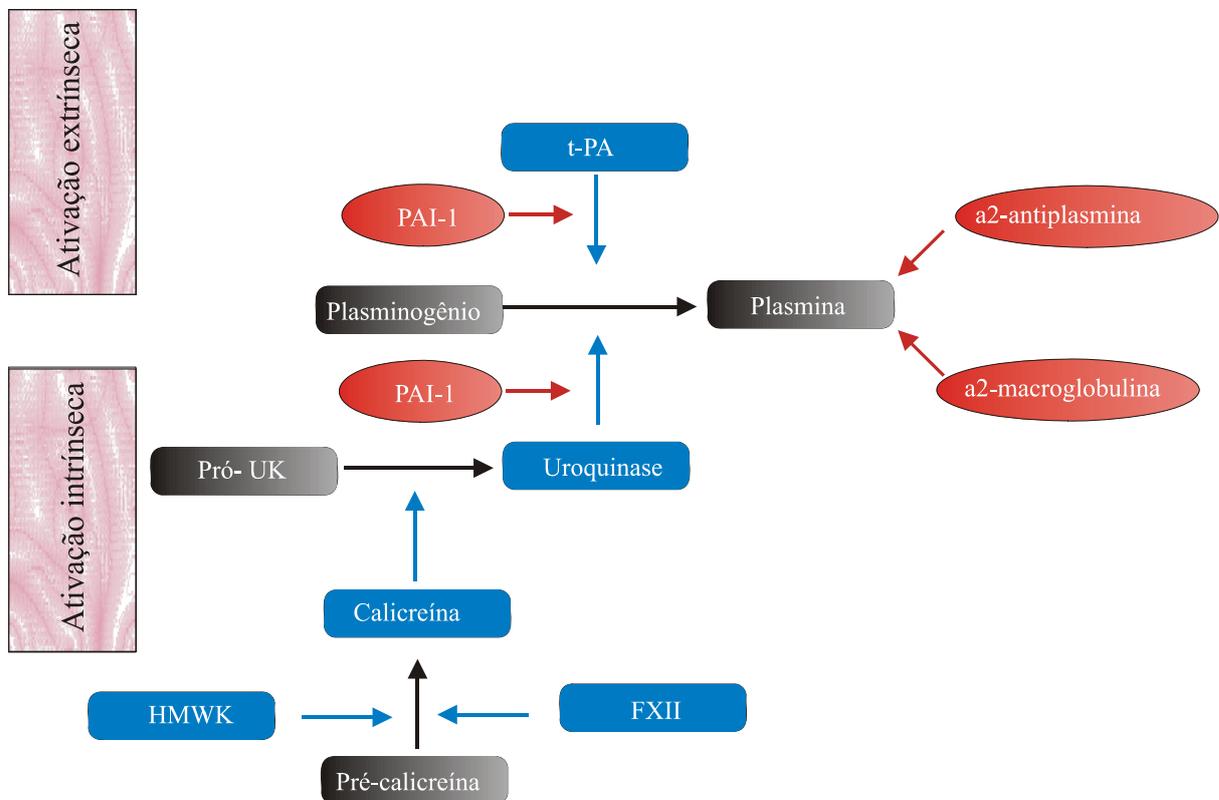


Figura 3: Regulação da ativação do plasminogênio à plasmina pelas vias intrínseca e extrínseca. — : inibição; — : ativação; UK: uroquinase; PAI-1: inibidor-1 do ativador do plasminogênio; t-PA: ativador tissular do plasminogênio, HMWK: cinogênio de alto peso molecular.

Estudos *in vivo* mostraram que a proteína C ativada acelera a fibrinólise (COMP & ESMON, 1981), embora o mecanismo não esteja completamente esclarecido. Estudos *in vitro*, realizados por SAKATA et al. (1988), mostram que a APC forma um complexo com o inibidor-1 do ativador do plasminogênio, neutralizando-o. Conseqüentemente, o ativador tipo tissular do plasminogênio fica livre para promover a fibrinólise, mas a forma latente do inibidor não é suscetível à APC, de modo que somente ocorre uma inativação parcial do inibidor. GRUBER et al. (1994) propõem que a APC pode aumentar a eficiência da fibrinólise *in vivo* através de vários mecanismos: alterando a estrutura da matriz interna do trombo; formando complexos com os inibidores da fibrinólise e inibindo a adição de fibrina ao trombo.

1.2. TROMBOSE

Trombose é o processo de coagulação do sangue circulante dentro do sistema cardiovascular de um animal vivo. Resulta da formação de uma massa sólida ou semi-sólida, formada a partir dos constituintes do sangue, denominada trombo. A fisiopatologia da trombose é conhecida desde a metade do século XIX, quando VIRCHOW propôs os três fatores envolvidos na formação do trombo, esses fatores são conhecidos como a Tríade de Virchow e incluem: 1) anormalidades na parede vascular; 2) estase sangüínea; 3) mudanças na composição do sangue.

Segundo a localização do trombo, existem dois tipos de trombose: a trombose arterial e a trombose venosa. Essas patologias são referidas como tendo etiologias diferentes, sendo que a associação com as alterações das proteínas dos mecanismos coagulante e anticoagulante ocorre, principalmente, nos casos de trombose venosa.

A trombose arterial resulta, geralmente, de um processo de alteração da parede dos vasos, por exemplo, aterosclerose. Normalmente, começa com a formação de um agregado de plaquetas e fibrina na superfície vascular. O mecanismo pelo qual o trombo se propaga a partir do sítio inicial permanece sem explicação e em muitas formas da trombose arterial a fisiopatologia é incerta.

Na trombose venosa, geralmente, a parede vascular não apresenta alteração histológica e fatores extrínsecos ao vaso parecem desempenhar o papel principal na fisiopatologia. O trombo venoso desenvolve-se sob condições de fluxo sangüíneo lento, sendo aumentado por um novo retardo e estagnação do fluxo.

A freqüência de trombose venosa é aproximadamente de 1/1.000 indivíduos, por ano, em países desenvolvidos (WHO, 1995).

A manifestação clínica mais freqüente é a trombose venosa profunda (TVP) das veias da perna, a qual pode levar a situações mórbidas como a síndrome pós-fleblítica e a insuficiência respiratória devido ao tromboembolismo pulmonar (TEP).

Quando não identificada e tratada corretamente, a TVP pode causar morte através da ocorrência de tromboembolismo pulmonar, o qual ocorre quando um trombo venoso se solta e migra através da circulação até o pulmão, formando um êmbolo que obstrui os vasos pulmonares. Conforme dados da revisão de HIRSH & HOAK (1996), cerca de 30% dos indivíduos com TVP desenvolvem tromboembolismo pulmonar e 10% destes indivíduos

morrem devido a estas complicações. Além disso, o TEP é a causa mais freqüente de morte pós-parto.

Os fatores de risco conhecidos para trombose envolvem a Tríade de Virchow e atualmente os mesmos podem ser classificados em adquiridos e genéticos (ROSENDAAL, 1999).

Os fatores adquiridos incluem imobilização, cirurgias, gravidez, puerpério, uso de anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal, anticorpos antifosfolipídeos, câncer e quimioterapia. Ainda que não existam evidências claras, também são considerados fatores de risco adquiridos, diabetes, fumo, obesidade, hiperlipidemia e aterosclerose (WHO, 1995).

Os fatores de risco genéticos incluem: a) alterações nos fatores de coagulação, por exemplo, o fator V Leiden, b) deficiências das proteínas inibidoras da coagulação, por exemplo, antitrombina III.

Entretanto, a dicotomia da classificação em fatores de risco adquiridos e genéticos é muito reducionista. Alguns fatores de risco são ao mesmo tempo genéticos e adquiridos. Por exemplo, níveis elevados de triglicérides aumentam o nível de plasmático do fator VII, entretanto esse aumento é maior nos indivíduos que apresentam um determinado genótipo para uma variante do fator VII, como será detalhado mais adiante.

Atualmente, a trombose venosa é considerada uma doença multifatorial, onde fatores de risco adquiridos e genéticos podem estar presentes simultaneamente em um mesmo indivíduo (ROSENDAAL, 1999). Entretanto, nem sempre é possível identificar as causas genéticas ou ambientais responsáveis pelo desencadeamento dessa patologia.

MILETICH et al. (1993) publicaram uma revisão sobre a predisposição hereditária à trombose, essa revisão foi baseada nas discussões dos participantes da Segunda Conferência Internacional de Pine Ridge sobre causas genéticas da trombose ocorrida em 1992. Nessa revisão, os autores sugeriram que a predisposição hereditária para trombose, geralmente, resulta da combinação de mutações em dois ou mais genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo da coagulação. Esses autores apresentaram uma lista de genes candidatos a mutações que poderiam predispor à trombose, conforme mostra a Tabela 1.1.

MILETICH et al. (1993) também sugeriram que estudos de associação entre trombose e os genes citados fossem realizados, com o objetivo de identificar quais os genes que contribuem para a ocorrência da trombose e como influenciam o seu desenvolvimento.

DAHLBÄCK et al. (1993) publicaram um trabalho no qual mostravam a existência de uma outra alteração que causava trombose, essa alteração, caracterizada por BERTINA et al.

(1994), era uma mutação no gene do fator V. Mais recentemente, POORT et al. (1996) identificaram uma mutação no gene da protrombina que também predispõe à trombose. Assim, essas duas situações, que serão detalhadas nos próximos tópicos, ilustram que os participantes Primeira Conferência Internacional Pine Ridge sobre Hemostasia e Trombose estavam no caminho certo ao elaborarem a lista de genes a serem investigados.

Tabela 1.1: Genes clonados da rota da coagulação que são candidatos a mutações que predispõem à trombose, segundo MILETICH et al. (1993).

Deficiência de Atividade	Aumento de Atividade
Antitrombina III	Fator Tissular
Proteína C	Fator VIII
Proteína S	Fibrinogênio
Fibrinogênio	Fator VII
Plasminogênio	Protrombina
Ativador Tipo Tissular do Plasminogênio	Inibidor-1 do Ativador do Plasminogênio
Fator XII	Fator von Willebrand
Trombomodulina	Lipoproteína (a)
Inibidor da Rota do Fator Tissular	Glicoproteína Rica em Histidinas
Co-fator II da Heparina	$\alpha 2$ -antiplasmina
$\alpha 2$ -glicoproteína	Inibidor da Proteína C
$\alpha 2$ -macroglobulina	Fator IX
$\alpha 2$ -antitripsina	Fator X
Pro-uroquinase	Fator V
Pré-caliceína	

Nos próximos tópicos dessa introdução alguns aspectos sobre a maioria dessas proteínas serão abordados. Alterações nessas proteínas são ou podem ser fatores de risco para a trombose venosa.

1.2.1. PROTEÍNA C

A proteína C é uma glicoproteína plasmática cuja síntese é dependente de vitamina K. Na sua forma ativada, inibe a atividade coagulante dos fatores Va e VIIIa e estimula a fibrinólise regulando a formação e a degradação de fibrina.

A proteína C é sintetizada no fígado como um zimogênio de cadeia única e sofre várias modificações pós-síntese (γ -carboxilação, β -hidroxilação e glicosilação). A forma nativa da proteína C circula predominantemente como um heterodímero, ligado por pontes dissulfeto,

composto por uma cadeia leve de massa molecular de 21.000 e por uma cadeia pesada de 41.000 (KISIEL, 1979).

A proteína C é convertida a sua forma ativa pela clivagem da ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos Arg169-Leu170. Essa clivagem é realizada pelo complexo trombina/trombomodulina. Sua ativação requer, também, a ligação de cálcio no sítio EGF (fator de crescimento epidérmico) da cadeia leve.

A ativação da proteína C pelo complexo trombina/trombomodulina é acentuada pela ligação da proteína C ao receptor da proteína C da célula endotelial (EPCR). O EPCR aumenta a afinidade do complexo trombina/trombomodulina pela proteína C. Nem todos os processos de ativação da proteína C envolvem o EPCR, uma vez que a quantidade desse receptor na micro-circulação é muito baixa (ESMON, 1999).

O gene que codifica a proteína C está localizado no cromossomo 2, região 2p13-p14 (PATRACCHINI et al., 1989). Esse gene possui uma extensão de 11 Kb, nove exons e foi isolado e caracterizado por dois grupos de pesquisadores, FOSTER et al. (1985) e PLUTZKI et al. (1986).

Na região 5', entre os nucleotídeos -34 e -26, existe uma região (AATATTT) semelhante ao "TATA box". Estudos de expressão em cultura de células, revelam a presença de mRNA de dois tamanhos diferentes, um com 1,65 Kb e outro com 1,85 Kb (BECKMANN et al., 1985), provavelmente devido a sítios de poliadenilação alternativos.

SPEK et al. (1994) descreveram três polimorfismos na região promotora do gene da proteína C. Foram identificadas as seguintes trocas de bases nas posições -1654C→T, -1641 A→G e -1476 A→T. Dos oito haplótipos possíveis, três (CGT, TAA e CAA) foram mais freqüentes, juntos eles corresponderam a 88% dos haplótipos observados.

Indivíduos homozigotos para o haplótipo CGT apresentam uma concentração de proteína C menor do que indivíduos homozigotos para o haplótipo TAA (SPEK et al., 1995). Ainda nesse estudo, os autores determinaram que indivíduos homozigotos para o haplótipo CGT tinham 50% a 100% maior chance de desenvolver trombose venosa do que indivíduos homozigotos para o haplótipo TAA.

O trabalho de SCOPES et al. (1995) mostrou que a eficiência na transcrição é dirigida pelos polimorfismos nas posições -1654 e -1641. Assim sendo, AIACH et al. (1999) verificaram a influência desses polimorfismos (-1654C→T, -1641A→G) sobre os níveis de proteína C e sobre a ocorrência de trombose venosa. Indivíduos homozigotos ou heterozigotos

para o haplótipo CG tinham menor concentração de proteína C do que os homozigotos TA e tinham um risco de 4% a 87% maior de desenvolver trombose.

O primeiro caso de deficiência hereditária de proteína C, apresentando trombose recorrente foi descrito por GRIFFIN et al. (1981). Desde então, muitos estudos confirmam a associação entre a deficiência de proteína C e a trombose venosa.

A deficiência de proteína C é classificada em dois tipos:

-Tipo I: ocorre uma redução ou ausência de proteína C. Existindo proporcionalidade entre a quantidade de antígeno presente e atividade funcional da proteína, devido a uma redução na síntese ou na estabilidade dessa proteína;

-Tipo II: ocorre a presença de uma molécula anormal com atividade bastante reduzida quando comparada com o nível de antígeno, provavelmente devido a uma síntese da quantidade normal de uma proteína alterada, que tem atividade específica reduzida.

A deficiência tipo I é mais freqüente, entretanto os sintomas clínicos dos dois tipos são semelhantes. A deficiência de proteína C é uma doença com padrão de herança autossômico dominante.

Na maioria dos casos descritos de homozigose para deficiência de proteína C, os sintomas aparecem logo após o nascimento e geralmente levam a morte neonatal (SELIGSOHN et al., 1984). Entretanto, existem casos em que os sintomas aparecem após os seis meses, ou ainda, na segunda década de vida, não chegando a ocasionar morte (TUDDENHAM et al., 1989).

A probabilidade de tromboembolismo em um paciente heterozigoto para deficiência de proteína C aumenta com a idade. BROEKMANS et al. (1983a), estudando 18 pacientes (três genealogias), relataram que 50% dos pacientes tiveram pelo menos um episódio antes dos 30 anos e 80% antes dos 40 anos. Entretanto, nenhum dos pacientes manifestou sintomas clínicos antes dos 15 anos.

Conforme TUDDENHAM & COOPER (1993), é muito difícil obter dados sobre a incidência/prevalência da deficiência de Proteína C, tanto em pacientes com trombose como na população em geral, devido a falhas nos estudos, tais como: descrição inadequada da população, documentação incompleta sobre a presença da trombose venosa ou erros nos testes laboratoriais.

GLADSON et al. (1988) relataram uma prevalência de 4% de heterozigotos para deficiência de proteína C tipo I, em um grupo de pacientes com trombose venosa com menos de 45 anos e uma prevalência de 12% em pacientes com tromboembolismo recorrente.

A partir dos dados de BROEKMANS et al. (1983b) e GLADSON et al. (1988) é possível estimar uma frequência de heterozigotos entre 1/16.000 e 1/36.000 na população em geral. Entretanto, como essas estimativas são derivadas de pacientes com trombose, elas não medem a frequência em indivíduos assintomáticos que tem deficiência de proteína C.

MILETICH et al. (1987) estudaram 5.422 doadores de sangue saudáveis, dos quais 1/60 apresentaram níveis de proteína C nos limites inferiores da distribuição normal (55%-65%) e dez indivíduos apresentaram níveis entre 35% e 51%.

ALLAART et al. (1993) estudaram a influência da heterozigosidade e de outros prováveis fatores de risco na ocorrência de trombose, em indivíduos heterozigotos para a mutação e seus familiares normais. Os outros fatores de risco, considerados pelos autores, foram: o sexo, a gravidez, o uso de contraceptivo oral, o fumo, a obesidade, a imobilização, a presença de varizes ou de tumores malignos e a ocorrência de cirurgia ou trauma. Os autores encontraram uma diferença significativa entre os heterozigotos e seus familiares normais: até a idade de 45 anos, 50% dos heterozigotos e apenas 10% dos indivíduos normais tiveram episódios de trombose. Com relação aos fatores de risco estudados, esses parecem estar associados com o aumento de risco, mas individualmente não mostraram um efeito significativo na incidência dos episódios de trombose.

REITSMA et al. (1995) organizaram uma base de dados com as mutações que causam a deficiência de proteína C. Foram registradas as seguintes mutações: 4 mutações na região promotora; 2 mutações na região 5' não traduzida; 18 mutações nos sítios de "splicing"; 5 deleções "in-frame"; 10 deleções "frameshift"; 2 inserções "in-frame"; 6 inserções "frameshift"; 34 mutações "nonsense"; 243 mutações "missense" e 9 mutações silenciosas. Dessas 334 mutações descritas, 160 foram eventos únicos. As únicas mutações que também causam deficiência do tipo II são as mutações "missense", as demais causam deficiência do tipo I.

IDO et al. (1993) relataram um caso de dupla heterozigosidade para deficiência de proteína C em um recém-nascido com púrpura fulminante. Uma das mutações identificada foi uma deleção (tipo "frameshift") do nucleotídeo 10758 (exon 9) resultando na alteração de todos os aminoácidos da região carboxi-terminal da proteína. A outra alteração caracterizada foi uma mutação de ponto do tipo "missense" no nucleotídeo 2977 (exon 3), resultando na substituição de uma lisina por um ácido glutâmico.

1.2.2. INIBIDOR DA PROTEÍNA C

O inibidor da proteína C foi descrito, pela primeira vez, por MARLAR & GRIFFIN (1980) e foi purificado por SUZUKI et al. (1983a).

O inibidor da proteína C é uma glicoproteína de cadeia única, pertencente à família das serpinas (inibidores de serino-proteases) e com massa molecular de 57.000. A proteína madura é composta por 387 aminoácidos, sendo sintetizada no fígado e secretada para o sangue (SUZUKI et al., 1987a).

Esse inibidor desempenha um papel importante na regulação da hemostasia como um dos principais inibidores da proteína C ativada, embora α 1-antitripsina e α 1-macroglobulina possam inibir a APC. O inibidor da proteína C também inibe o ativador tipo uroquinase de plasminogênio, o ativador tissular do plasminogênio, a trombina, o fator XIa, o fator Xa e a calicreína (ESPAÑA et al., 1989).

O gene que o codifica foi localizado no cromossomo 14 por MEIJERS & CHUNG (1991). Utilizando eletroforese de campo pulsado, BILLINGSLEY et al. (1993) mapearam esse gene na região 14q32.1 próximo a três genes que codificam outras proteínas pertencentes à superfamília das serpinas. O gene do inibidor da proteína C foi clonado e caracterizado por MEIJERS & CHUNG (1991), possui uma extensão de 11 Kb sendo composto por 5 exons que codificam um mRNA de 2,1 Kb. Os autores analisaram aproximadamente 800 pb da região 5' e não encontraram nenhuma sequência indicativa de "TATA box" ou "CCAAT box". Entretanto, prováveis sítios de ligação aos fatores de transcrição Sp1 e Ap2 foram identificados nas regiões -253 e -87, respectivamente. Em genes de eucariotos esses sítios de ligação são motivos de regulação alternativos para o "TATA box".

MARLAR & GRIFFIN (1980) postularam que a deficiência desse inibidor seria responsável pelos casos de deficiência combinada de fator V/fator VIII em 6 pacientes estudados. No entanto, estudos posteriores (CANFIELD & KISIEL, 1982; SUZUKI et al., 1983b; GARDINIER & GRIFFIN, 1984) mostraram que pacientes com deficiência combinada de fator V/fator VIII tinham níveis normais do inibidor. Os dados encontrados por MARLAR & GRIFFIN (1980) foram originados de um problema técnico, o congelamento e descongelamento do plasma diminuem a atividade do inibidor da proteína C. Recentemente, NICHOLS et al. (1998) identificaram que a deficiência combinada de fator V/fator VIII é causada por mutações no gene que codifica uma proteína transmembrana do retículo de Golgi, denominada ERGIC -35.

CARROL et al. (1997) encontraram um nível mais elevado desse inibidor em indivíduos sobreviventes de infarto do miocárdio. Os autores sugerem que esse aumento seja um fator de risco para eventos coronários agudos, uma vez que esse inibidor interfere tanto no sistema de anticoagulação como no sistema fibrinolítico.

Não foram encontrados na literatura outros trabalhos de associação entre alterações no inibidor da Proteína C e trombose.

1.2.3. TROMBOMODULINA

A trombomodulina é uma glicoproteína transmembrana, localizada na superfície das células endoteliais, que se liga à trombina com alta afinidade. Devido a essa ligação, a trombomodulina não atua somente como um inibidor das atividades procoagulantes da trombina, tais como, formação de fibrina, ativação do fator V, fator VIII e plaquetas, mas também acelera em até 1.000 vezes a capacidade da trombina ativar a proteína C. Portanto, a trombomodulina desempenha um importante papel na manutenção das propriedades anticoagulantes da superfície da célula endotelial (NAGASHIMA et al., 1993).

A expressão de trombomodulina é um dos vários sistemas ativos pelo qual o endotélio vascular controla o mecanismo hemostático.

A seqüência de aminoácidos da trombomodulina humana foi deduzida de clones de cDNA. Esses clones foram isolados de bancos construídos a partir de mRNA extraído de células endoteliais e pulmonares (WEN et al., 1987). Essa proteína possui 575 aminoácidos, sendo que os primeiros 18 compõem o peptídeo sinal. Após sua tradução, a trombomodulina sofre algumas modificações: glicosilação, β -hidroxilação e fosforilação (SUZUKI et al., 1987b).

A trombomodulina consiste de 5 domínios estruturais: um domínio amino-terminal com 223 resíduos de aminoácidos; um domínio de 236 resíduos com 6 repetições de regiões semelhantes a EGF; um domínio rico em serinas e treoninas com 34 resíduos; um domínio transmembrana com 28 resíduos e uma cauda citoplasmática composta por 38 resíduos (ESMON et al., 1988). Estudos de TSIANG et al. (1992) mostraram que os domínios EGF 4, 5 e 6 e o domínio rico em serinas e treoninas são necessários para sua atividade de co-fator na ativação da APC.

Estudos de imunohistoquímica mostraram que a maioria da trombomodulina está localizada nos microvasos, os quais respondem por 99% da superfície endotelial em contato com o sangue. Cada célula endotelial contém aproximadamente 50.000 a 100.000 moléculas de trombomodulina. O soro contém 20 ng/ml de uma forma solúvel dessa proteína, provavelmente originada por clivagem da sua forma tissular (MARUYAMA et al., 1985).

O gene que codifica a trombomodulina foi localizado no cromossomo 20, na região 20p12-cen, através de estudos de hibridização *in situ* (ESPINOSA et al., 1989). Esse gene possui aproximadamente 3,66 Kb, não possui íntrons, e codifica um mRNA de 1,725 Kb. Existe ainda uma região 3' não codificadora com 1,779 kb. Na região 5' não codificadora (com aproximadamente 163 pb) existem seqüências "TATA box" e "CCAAT box", além disso 4 "GC box" (possível sítio de ligação do fator de transcrição Sp1).

van der VELDEN et al. (1991) relatam a presença de um polimorfismo de seqüência (GCC/GTC), o qual resulta na substituição de aminoácidos (alanina/treonina) no resíduo 455 do sexto domínio EGF. Esses autores não encontraram associação deste polimorfismo com trombose venosa.

IRELAND et al. (1997) relatam a ausência de associação desse polimorfismo com infarto do miocárdio. Entretanto, a associação entre esse polimorfismo com infarto do miocárdio foi encontrada no trabalho desenvolvido por NORLUND et al. (1997).

ÖHLIN & MARLAR (1995) descreveram a primeira mutação no gene da trombomodulina em pacientes com trombose venosa. Nesse trabalho foram investigados 28 pacientes com história familiar e pessoal de trombose venosa que tinham resultados laboratoriais normais para proteína C, proteína S e antitrombina III e que não apresentavam fator V Leiden. Somente um paciente apresentou alteração no gene da trombomodulina, uma mutação no nucleotídeo 1456G→T.

FAIONI et al. (1997) também investigaram essa mutação (1456G→T) em 100 pacientes italianos com trombose venosa, porém nenhum paciente apresentou essa mutação.

IRELAND et al. (1997) estudaram 104 pacientes com infarto do miocárdio e identificaram 5 pacientes com mutações no gene da trombomodulina, sendo que 3 dessas mutações eram diferentes.

Recentemente, FLEM et al. (1999) investigaram a região promotora do gene da trombomodulina em 205 pacientes com trombose venosa e identificaram uma única mutação, a qual estava presente em dois pacientes.

Esses dados indicam que alterações no gene da trombomodulina podem ser fatores de risco para a ocorrência de trombose venosa ou arterial, embora sejam menos frequentes que outras alterações, como a deficiência de proteína C, por exemplo.

1.2.4. PROTEÍNA S

A proteína S é uma proteína plasmática dependente de vitamina K, com massa molecular de 70.000 (DiSCIPIO & DAVIE, 1979). No plasma, a proteína S circula sob duas formas diferentes: na forma livre e formando um complexo com a proteína de ligação C4b do sistema do complemento. Em torno de 60% da quantidade total da proteína S está ligada a C4b, entretanto somente a forma livre é capaz de atuar como co-fator para a proteína C, exercendo assim sua atividade de inibidor fisiológico da coagulação (DAHLBÄCK, 1984).

A proteína S é sintetizada nos hepatócitos (FAIR & MARLAR, 1986), células endoteliais (FAIR et al., 1986) e megacariócitos (SCHWARTZ et al., 1989) como uma proteína de cadeia única com 676 resíduos de aminoácidos, dos quais 41 pertencem ao peptídeo líder. A proteína S sofre várias modificações pós-tradução (γ -carboxilação, glicosilação e β -hidroxilação). A seqüência de aminoácidos, deduzida a partir do cDNA, indica que a proteína madura é composta pelos seguintes domínios funcionais: um domínio ácido-carboxiglutâmico (Gla); um domínio sensível a trombina; 4 domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e 7 domínios semelhantes ao da globulina que se liga ao hormônio sexual (LUNDWALL et al., 1986).

O gene que codifica a proteína S ($PS\alpha$) está localizado no cromossomo 3, 3p11.1-3p11.2 (WATKINS et al., 1988). Existe ainda um pseudogene, denominado $PS\beta$, localizado no cromossomo 3, a menos de 4cM de $PS\alpha$ (PLOOS van AMSTEL et al., 1987). Ambos os genes possuem similaridade de 97% na seqüência de nucleotídeos.

SCHMIDEL et al. (1990) isolaram e caracterizaram o gene $PS\alpha$. Esse gene possui uma extensão de 80 Kb e 15 exons, que codificam um mRNA de 3,5 Kb. Não foi encontrada nenhuma região "TATA box", entretanto existem vários segmentos GC 30 a 80 nucleotídeos acima do sítio de iniciação da transcrição. Esses segmentos são semelhantes ao sítio de ligação do fator de transcrição Sp1.

DIEPSTRATEN et al. (1991) identificaram um polimorfismo neutro, na extremidade 3' do exon 15, nucleotídeo 2148A→G, no códon que codifica para a prolina 626. A frequência encontrada em 28 indivíduos caucásios foi 0,48 para G e 0,52 para o alelo A.

MUSTAFA et al. (1996) identificaram um polimorfismo na região 3' não traduzida do gene da Proteína S devido a uma transversão C→A no nucleotídeo 2698.

Recentemente, LEROY-MATHERON et al. (1999) estudaram os polimorfismos 2148A→G e 2698C→A em indivíduos normais e encontraram associação desses polimorfismos com o nível de proteína S. Embora o mecanismo pelo qual esses polimorfismos regulam a síntese da proteína S não tenha sido elucidado, os autores sugerem que o polimorfismo 2148A→G possa criar um sítio de "splicing" alternativo, o que resultaria em um mRNA truncado. Os autores não descartaram a hipótese desses polimorfismos estarem em ligação com uma outra mutação que alteraria os níveis da proteína S.

A deficiência de proteína S associada com tromboembolismo recorrente foi descrita pela primeira vez no início da década de oitenta por dois grupos independentes, SCHWARTZ et al. (1984) e COMP et al. (1984). Desde então, muitos outros casos têm sido relatados.

A deficiência de proteína S pode ser classificada em três subtipos, conforme salienta SIMMONDS et al. (1997): deficiência do tipo I, redução da atividade e redução dos níveis, tanto de proteína S total, como livre (deficiência quantitativa); deficiência do tipo II, redução da atividade, mas com níveis normais de proteína S total e livre (deficiência qualitativa) e tipo III, nível normal de proteína S total e redução tanto do nível de proteína S livre, como da atividade.

A maioria dos pacientes deficientes é heterozigoto para a deficiência de proteína S e as principais manifestações clínicas são, tromboflebite superficial, trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar (BROEKMANS et al., 1985; ENGESSER et al., 1987a). A média de idade do primeiro episódio trombótico está entre 24 anos (BRIËT et al., 1988) e 28 anos (ENGESSER et al., 1987a).

MAHASANDANA et al. (1990) descrevem um caso de homozigose para a deficiência de proteína S, em uma criança de 2 anos que apresentava púrpura fulminante desde o nascimento. Os pais da criança tinham 27 anos, apresentavam resultados laboratoriais de heterozigotos e eram assintomáticos.

BRIËT et al. (1988) encontraram uma frequência de 4% de heterozigotos para deficiência de proteína S em um estudo com 257 pacientes com tromboembolismo recorrente,

enquanto que GLADSON et al. (1988) encontraram 5% de heterozigotos em um grupo de 141 pacientes.

Conforme a base de dados Human Molecular Gene Database™ (COOPER et al., 1998), até o presente, existem descritas 107 mutações que causam deficiência de proteína S. Dessas 107 mutações, 71 são substituições "missense" ou "nonsense", 13 alteram os sítios de "splicing", 14 são pequenas deleções, 6 são pequenas inserções, 2 são grandes deleções e 1 inversão.

1.2.5. ANTITROMBINA III

A antitrombina III é uma glicoproteína de cadeia única com massa molecular de 58.000, faz parte da família das Serpinas, apresentando 30% de homologia com outras proteínas dessa superfamília.

A antitrombina III é sintetizada no fígado (FAIR & BAHNAK, 1984) e células endoteliais (CHAN & CHAN, 1981). A proteína madura é composta por 432 resíduos de aminoácidos e sua estrutura terciária é mantida por 3 pontes dissulfetos (PETERSEN et al., 1979). Possui dois sítios funcionais: um sítio de ligação à trombina, Arg393-Ser394, (BJORK et al., 1982) e um sítio de ligação à heparina, que envolve os resíduos Pro41-Arg47-Trp49, entre outros (BERESFORD & OWEN, 1990).

Como já referido, antitrombina III é um dos mais importantes inibidores fisiológicos da coagulação, inibe várias serino-proteases ativadas da cascata da coagulação, incluindo os fatores XIIa, XIa, Xa, IXa e a trombina.

O nível normal de antitrombina III circulante é de aproximadamente 200mg/l e a meia-vida dessa glicoproteína é de 3 dias (COLLÉN et al., 1977). Nos estudos clínicos, o nível geralmente é expresso como uma porcentagem do nível encontrado em um conjunto de plasmas normais. Os níveis normais variam entre 70% e 130%.

PROCHOWNIK et al. (1985) clonaram e caracterizaram o gene que codifica a antitrombina III. Esse gene possui uma extensão de 14 Kb e 7 exons que codificam um mRNA de 1,5 Kb. OLDS et al. (1993) identificaram a presença de elementos de repetição da família Alu nos íntrons 1, 2, 3B, 4 e 5, todos, exceto um elemento, estão orientados na direção reversa. O papel desses elementos Alu é desconhecido, mas sua alta frequência no gene da antitrombina III é um fator de risco para ocorrência de deleções (LANE et al., 1993).

O gene da antitrombina III está localizado no cromossomo 1, na região 1q23-1q25, conforme mostraram os estudos de ligação de WINTER et al. (1982) e os estudos de hibridização *in situ* realizados por BOCK et al. (1985).

A importância da manutenção de níveis suficientes de antitrombina III na circulação é evidenciada pelo fato de que, heterozigotos para uma alteração no gene da antitrombina III geralmente apresentam níveis de, aproximadamente, 65% e mesmo assim sofrem de tromboembolismo recorrente.

EGEBERG (1965) relatou o primeiro caso de deficiência hereditária de antitrombina III em uma família norueguesa, que apresentava trombose venosa recorrente e níveis de antitrombina III de 50% do normal.

A deficiência de antitrombina III é, classicamente, dividida em dois tipos: no tipo I, tanto a atividade antigênica como funcional estão diminuídas; no tipo II, somente a atividade funcional está diminuída. HIRSH et al. (1989) propõem uma classificação em 3 tipos, baseando-se nos níveis de antígeno, de atividade da antitrombina III e da ligação à heparina. No tipo I, todos os níveis estão reduzidos; no tipo II, o nível de antígeno está normal e as atividades da antitrombina III e de ligação à heparina reduzidos; tipo III, níveis de antígeno e de atividade normais, entretanto a ligação à heparina está reduzida.

A deficiência exibe um padrão de herança autossômico dominante, sendo que a maioria dos afetados apresenta nível de antitrombina III de 40% a 70%. O risco de trombose aumenta com idade, HIRSH et al. (1989) calculam que o risco de um indivíduo heterozigoto ter trombose até os 10 anos é 5%, entretanto até os 30 anos o risco aumenta para 65%. THALER & LECHNER (1981) relatam que 85% dos indivíduos com deficiência de antitrombina III com mais de 50 anos já tiveram, pelo menos, um episódio de trombose. DEMERS et al. (1992) observam que a prevalência de trombose em indivíduos com deficiência de antitrombina III é de 51% e que na maioria dos casos um outro fator de predisposição estava presente.

A frequência da deficiência de antitrombina III tipo I, na população em geral, é de 1/5000 (ABILDGAARD, 1981). TAIT et al. (1994a) também encontraram uma frequência semelhante para a deficiência tipo I, entretanto para a deficiência tipo II (esses autores utilizaram a divisão clássica) a frequência encontrada foi 1,45/1000. Os autores sugerem que as variantes do tipo II com alteração na ligação à heparina, conferem um baixo risco de trombose aos indivíduos heterozigotos.

Em pacientes com trombose, a frequência da deficiência de antitrombina III é de 4,5% (HIRSH et al., 1989).

Baseando-se na classificação citada acima, HIRSH et al. (1989) revisaram casos de deficiência de antitrombina III obtendo os seguintes resultados: dos 260 indivíduos com deficiência tipo I, 52% tiveram trombose; dos 105 indivíduos com tipo II, 54% tiveram trombose; dos 51 indivíduos homocigotos para a deficiência tipo III, somente 0,58% tiveram trombose. Portanto, a expressão clínica dos tipos I e II é diferente da expressão da deficiência tipo III. Casos de homocigotos para a deficiência tipo I nunca foram descritos, portanto é presumível que esta situação seja incompatível com a vida (TUDDENHAM & COOPER, 1993).

Um estudo realizado por FINAZZI & BARBUI (1994) mostra que pacientes com deficiência de antitrombina III têm uma maior incidência de trombose do que aqueles com deficiência de proteína C ou proteína S. Os autores sugerem que a deficiência hereditária da antitrombina III constitui um fator de risco para trombose maior do que as deficiências hereditárias de proteína C e proteína S.

Conforme informações obtidas na base de dados "Imperial College Human Antithrombin III Site" (<http://www.med.ic.ac.uk/dd/ddhc>) até o momento foram registradas 256 mutações que causam a deficiência de antitrombina III. Dessas 256 mutações descritas, 127 são diferentes: 60 mutações "missense"; 8 mutações "nonsense"; 7 deleções "in frame"; 21 deleções "frameshift"; 12 inserções "frameshift"; 7 mutações em sítios de "splicing"; 7 deleções parciais do gene; 5 deleções totais do gene.

1.2.6. INIBIDOR DA ROTA DO FATOR TISSULAR

Conforme revisão de TUDDENHAM & COOPER (1993), desde a década de quarenta existem evidências que a rota iniciada pelo fator tissular era inibida por um fator plasmático ou sérico. Entretanto, somente na década de oitenta esse inibidor foi caracterizado e alguns aspectos de seu mecanismo de ação foram elucidados. Como já mencionado, esse inibidor impede a ativação do fator X e do fator IX.

O inibidor da rota do fator tissular (TFPI) é um inibidor tipo Kunitz, foi purificado de linhagens de células de hepatoma e possui massa molecular de 38.000 (BROZE & MILETICH, 1987). No plasma, ocorre sob duas formas principais, uma com massa molecular de 40.000 e a outra com 46.000 (NOVOTNY et al., 1989). As formas de massa moleculares

de 46.000 ou maiores ocorrem devido à associação com lipoproteínas. A diferença de tamanho entre as formas plasmáticas e a encontrada em células de hepatoma, pode ser devido à ausência de glicosilação e associação com lipoproteínas no hepatócito.

O inibidor da via do fator tissular foi sintetizado, *in vitro*, em células de hepatoma (WARN-CRANMER et al., 1989), células endoteliais e por outras linhagens celulares (RANA et al., 1988). Entretanto, as células endoteliais são a principal fonte desse inibidor no plasma (BAJAJ et al., 1987).

A seqüência completa de aminoácidos foi estabelecida de clones de cDNA de um banco de expressão por WUN (1988). Esse inibidor apresenta uma seqüência líder hidrofóbica de 24 ou 28 resíduos de aminoácidos, seguida de 276 resíduos da proteína madura. Possui 3 domínios funcionais que são do tipo Kunitz: o domínio K1 se liga ao fator Xa (GIRARD et al., 1989); o K2 ao complexo FT/FVIIa e o K3 está envolvido na formação de pontes dissulfeto com lipoproteínas (BROZE et al., 1990). Após sua tradução, essa proteína é glicosilada e fosforilada.

O gene do inibidor da via do fator tissular foi caracterizado por van der LOGTH et al. (1991a) e GIRARD et al. (1991). Esse gene possui uma extensão de aproximadamente 70 Kb sendo composto por 9 exons. A estrutura do gene é similar àqueles de outros inibidores tipo Kunitz, inclusive α_1 -antitripsina e precursor amilóide. Não existem "TATA box", nem "GC box" na região promotora, entretanto prováveis sítios de ligação aos fatores de transcrição NF1 e AP2 foram identificados.

Estudos realizados utilizando "Northern blot" revelam a presença de dois tamanhos de mRNA, um de 1,4 Kb e outro de 4,4 Kb, ambos os tamanhos foram encontrados em diferentes linhagens celulares: células de fígado Chang, células de hepatoma HepG2 e SK (WUN et al., 1988); plaquetas (NOVOTNY et al., 1988); megacariócitos e células endoteliais de cordão umbilical (BAJAJ et al., 1990). Esses dois tipos de mRNA podem ter sido originados por processamento alternativo do transcrito, uma vez que ambos são idênticos na região de sobreposição.

Dados experimentais sugerem que o TFPI desempenha um importante papel como um anticoagulante natural. Em modelos experimentais, a imunoabsorção do TFPI induz à coagulação intravascular disseminada e a infusão de TFPI recombinante protege contra a trombose (BAJAJ & BAJAJ, 1997).

MOATTI et al. (1999) identificaram 3 polimorfismos no gene do TFPI, -33C→T, 384T→C e 874G→A. Os dois primeiros polimorfismos não acarretam troca de aminoácidos e

o último implica na substituição de uma valina por uma metionina na posição 264 (V264M). Os autores não encontraram associação entre esse polimorfismo e doença coronariana aguda, embora os indivíduos heterozigotos tivessem o nível de TFPI plasmático reduzido, em comparação com os indivíduos homozigotos para o aminoácido valina.

Posteriormente, esse mesmo grupo de pesquisadores investigou a associação do polimorfismo V264M com trombose venosa, em um grupo de 198 pacientes e não encontraram associação (ARNAULD et al., 1999).

KLEESIEK et al. (1999) investigaram a ocorrência de mutações no gene do TFPI em 342 pacientes com trombose venosa e encontraram uma mutação no exon 7 (536C→T), essa mutação acarreta a troca do aminoácido prolina por uma leucina na posição 151 da proteína (P151L). Quatro pacientes eram heterozigotos para essa mutação e nenhum apresentou outro fator de risco genético para trombose (deficiências de proteína C, proteína S ou ATIII, fator V Leiden ou mutação 20210G→A no gene da protrombina). A prevalência de heterozigotos em doadores de sangue foi 0,002. A análise estatística mostrou um risco significativo para trombose nos indivíduos heterozigotos (OR = 9,3; IC 95% = 1,8-48,6; P <0,01).

1.2.7. PLASMINOGÊNIO

O plasminogênio é o zimogênio plasmático precursor da plasmina, uma serino-protease que atua na degradação proteolítica da fibrina (fibrinólise).

O plasminogênio foi a primeira proteína da fibrinólise a ser purificada e ter sua seqüência primária determinada através dos trabalhos de vários grupos de pesquisa, entre eles, WIMAN & COLLÉN (1977).

A proteína madura é um monômero composto por 791 aminoácidos com massa molecular de 92.000, sendo sintetizada no fígado. Os resíduos 1-76 constituem o peptídeo de pré-ativação; os resíduos 77-560 constituem a região A, que contém 5 estruturas tipo "kringle"; os resíduos 561-790 compõem a região B, que contém o sítio ativo da plasmina.

A plasmina é formada a partir do plasminogênio através de dois mecanismos principais: um dos mecanismos é dependente do ativador tissular do plasminogênio, também chamado de via extrínseca de ativação do plasminogênio; o outro mecanismo envolve os fatores de contato da coagulação (fator XII, cininogênio de alto peso molecular e calicreína) e uroquinase, também chamado de via intrínseca de ativação do plasminogênio.

A plasmina é uma serino-protease composta por duas cadeias ligadas por pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas. A plasmina degrada várias proteínas e substratos peptídicos, principalmente fibrina. A sua especificidade por fibrina *in vivo* é determinada pelo fato da plasmina se ligar à fibrina e de seu ativador primário, o ativador tissular de plasminogênio, ser específico para a fibrina. A plasmina livre é rapidamente neutralizada por inibidores, tais como a α_2 -antiplasmina e α_2 -macroglobulina.

O gene do plasminogênio foi localizado no cromossomo 6 através de estudos de hibridização com células somáticas por MURRAY et al. (1987). Utilizando hibridização *in situ*, FRANK et al. (1989) o mapearam na região 6q26-q27.

O isolamento e caracterização do gene do plasminogênio foram realizados por MALINOWSKI et al. (1984), MALGARETTI et al. (1990) e PETERSEN et al. (1990). Esse gene possui 52,5 Kb e é composto por 19 exons, que codificam um mRNA de 2,7 Kb.

Conforme revisto em TUDDENHAM & COOPER (1993), as deficiências de plasminogênio descritas pertencem a duas categorias: hipoplasminogenemias, devido à redução na quantidade de plasminogênio, também chamada de deficiência tipo I e displasminogenemias, devido a uma quantidade normal de plasminogênio qualitativamente anormal, também chamada de tipo II.

Até 1993, existiam 10 casos descritos na literatura de indivíduos com deficiência tipo I e trombose. Na maioria dos casos um possível desencadeante (ocorrência de lesão vascular, cirurgia ou uso de anticoncepcional oral) estava presente. Os níveis de atividade foram consistentes com heterozigidade para o defeito, entretanto não foi observada a ocorrência de trombose nos outros familiares, mesmo quando comprovada a heterozigidade para a deficiência, através dos níveis reduzidos de plasminogênio (TUDDENHAM & COOPER, 1993).

Com relação à deficiência de plasminogênio tipo II, existiam 11 casos descritos na literatura até 1993. Os probandos tiveram episódios de trombose e na maioria dos casos os demais familiares eram assintomáticos, mesmo aqueles com níveis marcadamente reduzidos (TUDDENHAM & COOPER, 1993).

GLADSON et al. (1988) encontraram uma prevalência de 2% a 3% da deficiência de plasminogênio nos casos de trombose em pacientes jovens.

TAIT et al. (1994) estudaram 9.611 doadores de sangue e 0,5% apresentaram deficiência de plasminogênio. Esses autores concluíram que a deficiência de plasminogênio

não é, por si mesma, um fator de risco significativo para a trombose, uma vez que a frequência da deficiência de plasminogênio em grupos com trombose é de 1%.

Por outro lado, SARTORI et al. (1994) estudaram 21 indivíduos (pertencentes a 5 famílias) e encontraram que 33,3% dos indivíduos com deficiência de plasminogênio tiveram trombose, enquanto que somente 3,7% de seus familiares, com níveis normais de plasminogênio, apresentaram essa patologia. Esses autores concluíram que a deficiência de plasminogênio é um fator de risco para trombose.

Segundo BIASIUTTI et al. (1998) o fato da deficiência de plasminogênio ser ou não um fator de risco para trombose é uma questão aberta. Esses autores estudaram a prevalência da deficiência de plasminogênio em um grupo de 1.192 pacientes com trombose. A frequência dessa deficiência foi 1,9% entre os probandos com trombose venosa, e de 1,4% entre aqueles com trombose arterial. Entre os probandos com deficiência de plasminogênio, 35% apresentaram outro fator de risco para trombose (fator V Leiden, deficiência de ATIII ou deficiência de PS), enquanto que outros 17% apresentaram fator de risco circunstancial (hipertensão arterial, doença de Beçet, hipercolesterolemia).

Estudando os familiares dos probandos com deficiência de plasminogênio, BIASIUTTI et al. (1998) relatam que a frequência de trombose, nos indivíduos com deficiência de plasminogênio, foi semelhante à frequência nos indivíduos que tinham níveis normais de plasminogênio. Assim, esses autores concluem que a deficiência de plasminogênio não é um fator de risco importante para a trombose.

A deficiência de plasminogênio também leva à formação de depósito de fibrina extravascular, causando a conjuntivite lígnea. Essa patologia é causada pela deposição de fibrina na córnea devido à ausência de plasmina, podendo ocorrer depósito de fibrina em outras mucosas, como, faringe, boca, traquéia e brônquios, o que propicia infecções (Base de dados OMIN™, Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

Conforme a base de dados Human Molecular Gene Database™ (COOPER et al., 1998) até o presente, foram descritas 12 mutações que causam deficiência de plasminogênio. Dessas 12 mutações, 9 são mutações de ponto "missense", 1 mutação de ponto "nonsense" e 2 pequenas deleções.

1.2.8. ATIVADOR TISSULAR DO PLASMINOGÊNIO

O ativador tissular do plasminogênio (tPA) é uma serino-protease com massa molecular de 70.000. Essa proteína é sintetizada nas células endoteliais como uma glicoproteína de cadeia única com 530 resíduos de aminoácidos, sendo que os 35 primeiros constituem uma seqüência pré-pró-líder.

Com base na similaridade de seqüência com outras proteínas, o ativador tipo tissular do plasminogênio possui os seguintes domínios estruturais: um domínio em forma de "dedo", um domínio tipo EGF, dois domínios tipo "kringle" e um domínio catalítico (PENNICA et al., 1983).

Quando essa proteína é adsorvida por uma superfície com fibrina ocorre a clivagem proteolítica do resíduo Arg275, transformando o tPA em sua forma ativa com cadeia dupla (PENNICA et al., 1983).

Como referido anteriormente, o t-PA atua na ativação do plasminogênio, sendo o principal ativador endógeno do sistema fibrinolítico.

BENHAM et al. (1984) localizaram o gene do tPA no cromossomo 8 e YANG-FENG et al. (1986) o mapearam na região 8p12-11.12 por hibridização *in situ*.

Embora vários grupos tenham isolado seqüências parciais do gene do tPA, a seqüência completa foi obtida por DEGEN et al. (1986). Esse gene possui aproximadamente 40 Kb e 14 exons que codificam um mRNA de 2,65 Kb.

O gene do ativador tipo tissular do plasminogênio é composto por 22% de seqüências repetidas. Foram encontrados 28 diferentes elementos de repetição tipo Alu nos íntrons e na região 5' flanqueadora. Também foi encontrado um elemento tipo LINE, na região 1,8 Kb-1,5 Kb acima do sítio de iniciação da transcrição.

DEGEN et al. (1986) descreveram um polimorfismo no íntron 8 do gene do tPA causado pela inserção de uma seqüência Alu. Esse e outros polimorfismos causados pela inserção de seqüências Alu no genoma têm sido usados como marcadores genéticos em estudos sobre a origem e evolução humana (TISHKOFF et al. 1996).

Para verificar se esse polimorfismo afeta a síntese do t-PA, van den EIJENDEN-SCHRAUWEN et al. (1997) estudaram células endoteliais de cordão umbilical em cultura. Os resultados obtidos indicaram que esse polimorfismo não afeta a síntese basal do t-PA.

van der BOM et al. (1997) investigaram a associação desse polimorfismo com infarto do miocárdio em 121 pacientes de ambos os sexos. Nesse trabalho os autores encontraram

associação desse polimorfismo com o infarto do miocárdio. A homozigose para o alelo D (ausência da inserção) estava associada com o aumento do risco para o infarto do miocárdio (OR= 2,24; 95% IC = 1,11-5,4). Entretanto, os níveis de t-PA não estavam associados com esse polimorfismo.

Por outro lado, RIDKER et al. (1997a) não encontraram associação desse polimorfismo com infarto do miocárdio, num estudo envolvendo 369 homens que tiveram essa patologia. A ausência de associação também foi encontrada no trabalho realizado STEEDS et al. (1998) com 529 pacientes, de ambos os sexos, com infarto do miocárdio.

1.2.9. INIBIDOR-1 DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO

O inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) é uma glicoproteína da superfamília das Serpinas, possui massa molecular de 52.000 e foi purificado por van MOURIK et al. (1984).

Conforme revisto em SPRENGS & KLUFT (1987), esse inibidor é sintetizado nas células endoteliais e em outras linhagens celulares em cultura. Devido ao processamento diferencial da extremidade N-terminal, a proteína madura possui 379 ou 381 resíduos de aminoácidos, sendo que as duas formas estão presentes em quantidades equimolares. Semelhante a outras serpinas, esse inibidor atua formando um complexo com a serino-protease alvo, que pode ser o ativador tissular do plasminogênio ou a uroquinase de cadeia dupla (forma ativa do ativador tipo uroquinase do plasminogênio).

A concentração plasmática do PAI-1 é um determinante crítico da quantidade de ativador disponível para a ativação do plasminogênio e, conseqüentemente, para a fibrinólise. A deficiência do PAI-1 está relacionada com graves hemorragias (FAY et al., 1992). Por outro lado, um nível muito elevado de PAI-1 pode inibir a fibrinólise, podendo ser um fator de predisposição à trombose.

O gene do PAI-1 foi mapeado por hibridização *in situ* no cromossomo 7, região 7q21.3-q22, por KLINGER et al. (1987). O gene foi caracterizado por FOLLO & GINSBURG (1989), e possui, aproximadamente, 12 Kb e 9 exons.

A síntese de PAI-1 é regulada por vários fatores tais como, interleucina-1, TNF α , TNF β , endotoxina e insulina. Em estudos de expressão com células em cultura, altos níveis de

glicose, triglicerídeos e insulina atuam em sinergia no aumento do nível de PAI-1 (revisto em SOBEL, 1999).

Alguns estudos mostraram que níveis elevados desse inibidor são um fator de risco para o infarto do miocárdio (HAMSTEN et al., 1985; HAMSTEN, 1987; SCARABIN et al., 1998), doença aterosclerótica coronariana (ECAT, 1993) ou trombose venosa (NILSSON et al., 1985; JUHAN-VAGUE et al., 1987). Entretanto, em outros trabalhos não foi encontrada associação entre níveis elevados de PAI-1 e infarto do miocárdio (JUNHAN-VAGUE et al., 1996), doença isquêmica do coração (LOWE et al., 1998) ou trombose venosa (ENGESSER et al., 1989).

DOGGEN et al. (1999) salientam que a existência de uma associação entre os níveis de PAI-1 e trombose, não permite a conclusão de causa-e-efeito, devido aos seguintes fatores: a) a presença de aterosclerose aumenta o nível de PAI-1, fazendo com que o mesmo seja um marcador de aterosclerose e não um fator de risco para a trombose; b) o infarto do miocárdio é acompanhado por lesão tissular, a qual pode estimular a produção de PAI-1; c) os fatores de risco para infarto, tais como obesidade e diabetes, estão relacionados com o nível de PAI-1.

DAWSON et al. (1993) identificaram um polimorfismo, na região promotora do gene do PAI-1, causado pela inserção/deleção de uma base guanina em uma seqüência de quatro guaninas (alelos 4G e 5G). As frequências alélicas obtidas em uma amostra de 95 suecos foram, 0,47 para o alelo 4G e 0,53 para o alelo 5G. Os dados obtidos por esses autores indicam que esse polimorfismo não afeta a expressão basal, embora altere a resposta do gene à interleucina-1, a qual é um reativo de fase aguda.

Entretanto, o trabalho de ERIKSSON et al. (1995) mostrou que o polimorfismo 4G/5G altera a transcrição basal do PAI-1, pois indivíduos homozigotos para o alelo 4G apresentaram, em média, níveis mais elevados de PAI-1 do que os homozigotos 5G, os heterozigotos apresentaram níveis intermediários.

BURZOTTA et al. (1998) estudaram a influência desse polimorfismo e de fatores ambientais nos níveis de PAI-1. Os resultados obtidos mostraram que esse polimorfismo influencia a relação entre os níveis de PAI-1 e alguns fatores ambientais. Em indivíduos normolipêmicos, uma correlação positiva entre os níveis de colesterol e de PAI-1 foi obtida nos homozigotos 5G5G, mas não nos homozigotos 4G4G. Entretanto, essas diferenças não ocorreram nos estudos com indivíduos dislipidêmicos. Por outro lado, a correlação entre os níveis de triglicerídeos e os de PAI-1 somente foi encontrada nos homozigotos 4G4G, no

grupo de indivíduos com dislipidemia. No grupo de normolipêmicos, o genótipo para o polimorfismo não alterou o coeficiente de correlação.

ERIKSSON et al. (1995) estudaram a distribuição desse polimorfismo em 94 homens com infarto do miocárdio e encontraram associação entre esse polimorfismo e essa patologia. A frequência do alelo 4G foi maior nos pacientes do que no grupo controle (OR = 2,15; IC 95% = 1,17-3,96).

MANSFIELD et al. (1995) estudaram a associação desse polimorfismo com doença arterial coronariana em pacientes com diabetes não-insulino-dependente. O genótipo 4G4G foi mais freqüente no grupo de 38 pacientes que desenvolveram doença arterial coronariana, do que no grupo de 122 controles. Esses autores sugerem que a homozigose para o alelo 4G é um fator de risco para a doença arterial coronariana.

GARDERMANN et al. (1999) relatam associação desse polimorfismo com doença arterial coronariana, num estudo envolvendo 2.565 indivíduos submetidos à angiografia. O genótipo 4G4G foi mais freqüente no grupo de pacientes com doença arterial coronariana (n = 1.971) do que no grupo sem essa doença (n = 594). Entretanto, os autores não encontraram associação desse polimorfismo com a presença de infarto do miocárdio.

DOGGEN et al. (1999) estudaram 331 homens com infarto do miocárdio e não encontraram associação desse polimorfismo com essa doença, nem desse polimorfismo com os níveis de PAI-1.

IACOVIELLO et al. (1998) realizaram uma meta-análise sobre esse polimorfismo e concluíram que os resultados obtidos corroboram com a hipótese de que o alelo 4G confere um aumento no risco de infarto do miocárdio (OR = 1,23; IC 95% = 1,04-1,45).

GRUBIC et al. (1996) estudaram os níveis de PAI-1 e a distribuição dos genótipos desse polimorfismo em 83 pacientes, de ambos os sexos, com trombose venosa e em 50 indivíduos controles. As frequências genotípicas obtidas não foram diferentes nos dois grupos. Os resultados mostraram a associação do polimorfismo com os níveis de PAI-1, os indivíduos homozigotos para o alelo 4G apresentaram níveis mais altos desse inibidor. Os níveis de PAI-1 nos dois grupos estudados foram similares.

Em uma ampliação do estudo realizado por GRUBIC et al. (1996), STEGNAR et al. (1998) estudaram 150 pacientes com trombose venosa, de ambos os sexos, e 145 indivíduos controles. Também, nesse trabalho, os pesquisadores não encontraram associação desse polimorfismo com essa patologia. A associação entre o polimorfismo com os níveis de PAI-1 foi significativa somente no grupo de pacientes, e a correlação entre os níveis de PAI-1 e os

níveis de triglicerídeos foi, significativamente, maior nos pacientes com genótipo 4G4G do que nos homozigotos 5G5G. Os autores concluíram que esse polimorfismo não é, por si mesmo, um fator de risco para trombose venosa.

Por outro lado, no estudo realizado por SARTORI et al. (1998), a frequência de homozigotos para o alelo 5G foi significativamente reduzida no grupo de pacientes com trombose venosa. Nesse trabalho, os autores mostraram que havia uma diminuição da atividade fibrinolítica, devido ao excesso de PAI-1, nos indivíduos que apresentavam o alelo 4G.

1.2.10. O COMPLEXO FATOR VIII/FATOR VON WILLEBRAND

O fator VIII (FVIII) é uma glicoproteína plasmática que atua na via intrínseca do mecanismo de coagulação, acelerando a ativação do fator X, através da formação de um complexo com íons cálcio, fosfolípidos e fator IX ativado (BLOOM, 1981).

A hemofilia A, grave doença genética hemorrágica, é causada por níveis reduzidos de FVIII. O padrão de herança da hemofilia A é recessivo ligado ao sexo, e frequência varia entre 1: 5.000 à 1:10.000 homens.

O gene que codifica o FVIII está localizado no cromossomo X, na região Xq28, possui uma extensão de 186 Kb, sendo composto por 26 exons que codificam um mRNA de 9 Kb, aproximadamente (WHITE & SHOEMAKER, 1989).

No plasma, o fator VIII circula formando um complexo não covalente com o fator von Willebrand (FvW).

O FvW é uma glicoproteína formada por múltiplos unidos por pontes dissulfídicas e desempenha dois importantes papéis na hemostasia: a) atua na adesão e agregação plaquetária; b) estabiliza e protege o FVIII da degradação proteolítica.

A doença de von Willebrand (dvW) é causada por alterações qualitativas (dvW tipo 1 e dvW tipo 3) ou quantitativas (dvW tipo 2) no FvW. Essa doença hemorrágica apresenta padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta e expressividade variada (dvW tipo 1 e dvW tipo 2) ou autossômico recessivo (dvW tipo III). A frequência dessa patologia, se todos os graus de gravidade forem incluídos, é de 1:100, entretanto a frequência das formas clinicamente relevantes é de 1,25/10.000 (TUDENHAM & COOPER, 1993).

Devido ao efeito protetor do FvW sobre o FVIII, indivíduos com doença de von Willebrand, geralmente, apresentam níveis diminuídos de FVIII.

O gene que codifica o FvW está localizado no cromossomo 12, na região 12p12-pter. Esse gene possui cerca de 178 Kb, contém 52 exons que codificam um mRNA de 9 Kb (RUGGERI, 1999).

O sistema sangüíneo ABO influencia os níveis do complexo FVIII/FvW. Indivíduos do grupo sangüíneo O apresentam, em média, níveis mais baixos de FVIII e FvW do que indivíduos dos outros grupos (PRESTON & BARR, 1964; FISCHER, 1995).

Há mais de 30 anos, a associação entre trombose com o sistema ABO é conhecida. Os trabalhos de ALLAN & DAWSON, (1968) e de JICK et al. (1969) mostram que existe um aumento na freqüência de indivíduos do grupo não-O em pacientes com trombose.

JICK et al. (1969) sugeriram que o fato de indivíduos não-O serem mais propensos à trombose poderia estar relacionado aos resultados obtidos por PRESTON & BARR (1964), os quais mostravam que indivíduos não-O apresentavam níveis mais elevados de fator VIII.

KOSTER et al. (1995) estudaram a importância do FVIII, FvW e dos grupos sangüíneos do sistema ABO no desenvolvimento da trombose venosa. Através da análise univariada, os resultados obtidos mostraram que essas três variáveis estavam relacionadas com trombose venosa: o risco de trombose aumentava conforme o aumento dos níveis do FVIII e do FvW, sendo esse efeito maior em indivíduos de grupo sangüíneo não-O. Entretanto, na análise multivariada, somente o FVIII permaneceu como um fator de risco.

KRAAIJENHAGEN et al. (2000) estudaram 60 pacientes com tromboembolismo venoso e os resultados obtidos mostraram que níveis elevados de fator VIII estavam associados com essa patologia.

KAMPHUISEN et al. (1999) ressaltam que, como o FVIII é medido em indivíduos após o evento de trombose, o aumento desse fator observado nos pacientes pode não ser a causa da trombose, mas uma resposta fisiológica ao processo inflamatório. Assim, esses pesquisadores corrigiram os níveis de FVIII conforme os níveis de Proteína C Reativa (um marcador de inflamação) e os resultados obtidos indicaram que os níveis elevados de FVIII em pacientes com trombose não são uma consequência do processo inflamatório.

KAWASAKI et al. (1999), em estudos com modelos animais, mostraram que níveis elevados de FVIII contribuem para o desenvolvimento de trombose.

O'DONNELL et al. (2000) mostraram que os níveis elevados de fator VIII em pacientes com trombose venosa são persistentes e independentes da fase aguda, sendo um fator de risco para trombose.

1.2.11. FATOR V

O fator V é uma glicoproteína de cadeia simples com massa molecular de 300.000. Os principais sítios de síntese do fator V são o fígado e os megacariócitos. A maior parte do fator V está no plasma e cerca de 25% está estocado nos grânulos- α das plaquetas.

Durante o processo de coagulação o fator V é convertido à sua forma ativa, FVa, através de proteólise pela trombina. O FVa é composto por uma cadeia leve e uma cadeia pesada que, na presença de íons cálcio, são associadas de forma não-covalente.

O FVa atua como co-fator para o fator Xa. Juntos o FXa e o FVa, na presença de fosfolípidos e íons cálcio, ativam a protrombina em trombina.

A deficiência de fator V causa graves hemorragias, essa doença genética também é denominada parahemofilia, sendo o padrão de herança autossômico recessivo (FISCHER et al., 1984).

O fator V também participa do processo de inibição da coagulação. Na presença de proteína S, o fator V acentua a inibição do fator VIIIa pela proteína C ativa (SHEN & DAHLBÄCK, 1994).

O gene do fator V está localizado no cromossomo 1, na região 1q21-25 (WANG et al., 1988) e foi caracterizado por CRIPE et al. (1992). Esse gene possui cerca de 80 Kb e 25 exons.

O FVa é inativado pela proteína C ativa (APC) na presença do co-fator proteína S, fosfolípidos e íons cálcio. A inativação do FVa pela APC requer 3 clivagens na cadeia pesada nas seguintes posições Arg506, Arg306 e Arg679 (KALAFATIS et al., 1994).

Baseados na hipótese de que uma baixa resposta à ação anticoagulante da APC poderia ser um fator de predisposição à trombose venosa, DAHLBÄCK et al. (1993) desenvolveram uma série de novos testes de coagulação, os quais avaliavam a resposta anticoagulante do plasma à APC.

Estudando uma família com história hereditária de trombose venosa, DAHLBÄCK et al., (1993) encontraram 14 pessoas que tinham uma resposta anticoagulante muito baixa quando era adicionada APC aos seus plasmas, os autores denominaram esse defeito

bioquímico como resistência à APC e sugeriram que esse defeito fosse hereditário. Nessa família, 5 das 14 pessoas com resistência à APC tiveram episódios de trombose. Entretanto, esses pesquisadores não identificaram qual a causa da resistência à APC, apenas sugeriram que seria devido à deficiência de um co-fator necessário para a atividade da APC.

Após esse trabalho, alguns grupos começaram a investigar a frequência da resistência à APC em indivíduos com trombose e em indivíduos normais. GRIFFIN et al. (1993) e SVENSSON & DAHLBÄCK (1994) encontraram que, aproximadamente 50% indivíduos com trombose apresentavam resistência à APC.

KOSTER et al. (1993) encontraram que a resistência à APC estava presente em 21% dos pacientes com trombose e em 5% em indivíduos normais. Através de estudos familiares, esses autores concluíram que a resistência à APC apresentava um padrão de herança autossômico dominante.

Na tentativa de provar a existência desse co-fator, cuja deficiência causaria resistência à APC, DALBÄCK & HILDERBRAND (1994) tentaram purificar esse co-fator do plasma. Após vários experimentos, esses pesquisadores chegaram a conclusão de que esse co-fator seria o próprio fator V. Os autores propuseram que o fator V, além de sua atividade coagulante, teria uma função anticoagulante e que mutações no gene do fator V poderiam causar resistência à APC, não alterando a função coagulante do mesmo.

Logo em seguida, BERTINA et al. (1994) identificaram no gene do fator V a mutação que causava a resistência à APC. Nesse trabalho, 80% dos indivíduos com resistência à APC apresentavam essa mutação. A mutação ocorre no exon 10, nucleotídeo 1691 G→A e resulta na substituição da arginina 506 por uma glutamina. O fator V que apresenta a glutamina na posição 506 é denominado de Fator V Leiden ou fator V R506Q.

Essa substituição de aminoácidos ocorre no sítio de clivagem do fator Va pela APC, como mencionado acima, essa clivagem é necessária para a inativação completa do fator Va. Portanto, essa mutação explicava a resistência à APC nesses indivíduos. Posteriormente, VARADI et al. (1999) demonstraram que essa substituição de aminoácidos também elimina a atividade do fator V como co-fator da APC, no processo de inativação do fator VIIIa.

BERTINA et al. (1994) estimaram que a frequência desse alelo mutante seria de 2% na população holandesa.

Embora exista uma grande variação na frequência do fator V Leiden nas diferentes populações caucasóides, como será visto mais adiante, todos os trabalhos confirmam que o mesmo é um importante fator de risco para trombose. Como exemplo, citaremos alguns dados

mostrando a frequência de heterozigotos, respectivamente, na população em geral e nos pacientes com trombose venosa: a) na França, as frequências foram 3,5% e 14,5% (LEROYER et al., 1997); b) nos Estados Unidos, 6% e 12% (RIDKER et al., 1995); c) na Austrália, 4% e 26,5% (MA et al., 1995); d) na Suécia, 11% e 25% (SVENSSON et al., 1997).

ZÖLLER et al. (1994) investigaram 308 indivíduos pertencentes a 47 famílias com trombose venosa e fator V Leiden, dos indivíduos que apresentaram trombose venosa 146 indivíduos não apresentavam o fator V Leiden (normais), 146 eram heterozigotos e 18 eram homozigotos para o fator V Leiden. Até os 33 anos, 8% dos indivíduos normais, 20% dos heterozigotos e 40% dos homozigotos para o fator V Leiden apresentaram episódios de trombose. Sendo que a idade média da ocorrência de trombose foi 36 anos (amplitude 16 – 71) tanto nos heterozigotos como nos normais e 25 anos (amplitude 10 – 40) nos homozigotos para o fator V Leiden (ZÖLLER et al. 1994).

EMMERICH et al. (1997) estudaram 36 homozigotos para o fator V Leiden, 31 pacientes tiveram trombose, sendo que a idade média da ocorrência de trombose foi 38 ± 16 anos. Dos pacientes que tiveram trombose, 29 tiveram um fator de risco circunstancial na época da trombose. Esses autores referem que a homozigose para o fator V Leiden leva a complicações trombóticas menos severas do que a homozigose para as deficiências de proteína C ou proteína S.

A resistência à APC não é determinada somente pela presença do fator V Leiden, pois no estudo realizado por BERTINA et al. (1994), 20% dos casos que apresentaram resistência à APC nos testes de coagulação não apresentaram o fator V Leiden. A origem da resistência à APC sem a presença do fator V Leiden ainda não está bem estabelecida, sendo provável que seja uma mistura de causas genéticas e adquiridas (ROSENDALL, 1999).

Em uma revisão sobre o assunto, BERTINA (1999) refere que gravidez, uso de anticoncepcional oral, lupus anticoagulante e níveis elevados de fator VIII podem causar o fenótipo de resistência à APC. Entretanto, a base molecular desses tipos de resistência à APC não é conhecida ainda.

A resistência à APC também pode ser causada por anticorpos contra a proteína C. ZIVELIN et al. (1999) relataram o caso de uma paciente com trombose venosa e arterial e que apresentava resistência à APC devido à produção de um anticorpo contra a APC.

A hipótese de que mutações nos sítios de inativação do fator VIIIa pela APC poderiam causar resistência à APC levou ROELSE et al. (1996) e BOKAREWA et al. (1997) a

investigarem o gene do fator VIII em indivíduos com resistência à APC e que não apresentavam o fator V Leiden. Entretanto, esses pesquisadores não encontraram nenhuma mutação no gene do fator VIII, que pudesse ocasionar a resistência à APC.

Porém, outras alterações no gene do fator V que causam o fenótipo de resistência a APC foram identificadas, a saber, o fator V Arg306Thr e o fator V His1299Arg.

O fator V Arg306Thr, também denominado fator V Cambridge, é causado por uma mutação no nucleotídeo 1091 (exon 7), a qual resulta na substituição de uma arginina por uma treonina no resíduo 306 do fator V (WILLIAMSON et al., 1998). Essa mutação foi identificada em uma paciente com trombose venosa e que apresentava resistência à APC. Entretanto, nesse mesmo trabalho foram investigados 585 pacientes com trombose venosa e 226 doadores de sangue, mas nenhum destes apresentou esta mutação.

A presença do fator V Arg306Thr também foi investigada por FRANCO et al. (1998), esses pesquisadores estudaram 104 pacientes com trombose venosa e 208 indivíduos controles. Apenas um indivíduo controle apresentou essa alteração, assim baseados nos dados obtidos, esses autores sugeriram que o fator V Arg306Thr não seria um fator de risco para a trombose venosa.

O fator V His1299Arg é causado por uma mutação de ponto no nucleotídeo 4070 A→G, no exon 13, a qual resulta na troca de aminoácido histidina por uma arginina na posição 1299 (LUNGHI et al., 1996). Nesse trabalho foi demonstrado que o alelo R2 (1299Arg) estava associado com níveis mais baixos de fator V, indicando a influência genética na variação nos níveis do fator V.

Posteriormente, esse mesmo grupo de pesquisadores verificou que o alelo R2 causava resistência à APC (BERNARDI et al., 1997). Nesse mesmo trabalho, a frequência dessa mutação foi investigada em 100 pacientes com trombose venosa e em um grupo controle composto por 98 indivíduos. A frequência de heterozigotos obtida no grupo de pacientes (11%) foi similar à frequência encontrada no grupo controle (9%). Portanto, esses autores sugeriram que esse polimorfismo, quando em heterozigose, não seria um fator de risco para trombose.

Por outro lado, os resultados obtidos por ALHENC-GELAS et al. (1999) mostraram associação entre esse polimorfismo e trombose venosa. Neste trabalho, foram estudados 205 pacientes com trombose venosa e 394 indivíduos controles. As frequências de heterozigotos e homozigotos (R2R2) obtidas foram, respectivamente 18% e 0,5%, no grupo de pacientes e 11% e 0,2% no grupo controle. O alelo R2 foi mais frequente no grupo de pacientes com

trombose venosa do que no grupo controle (OR = 1,8; IC 95% = 1,1-2,8). Mesmo após a exclusão de pacientes com outras alterações genéticas que predisõem à trombose, o alelo R2 continuou sendo um fator de risco para trombose (OR = 2,0; IC 95% = 1,2-3,5). Sugerindo, assim, que o fator V His1299Arg é um fator de risco para trombose venosa.

Dada a importância do fator V Leiden como fator de risco para a trombose, vários trabalhos têm sido publicados com relação à distribuição desse polimorfismo em diferentes populações e algumas inferências evolutivas têm sido levantadas, assim alguns desses trabalhos serão referidos nos próximos parágrafos.

O trabalho de REES et al. (1995) mostrou que existem diferenças nas frequências do fator V Leiden entre as diversas populações analisadas, nesse trabalho foram estudados 1.690 indivíduos pertencentes a 24 populações. Agrupando as populações por continentes, as frequências alélicas obtidas para o fator V Leiden foram, 4,4% na Europa (618 indivíduos estudados), 0,6% na Ásia Menor (180 indivíduos estudados). Entretanto, esse alelo não foi encontrado na África (incluindo o Oriente Médio, 306 indivíduos estudados), Australásia (168 indivíduos estudados), Ásia (272 indivíduos estudados) e América (146 indivíduos incluindo jamaicanos, índios peruanos, e índios das ilhas Vancouver).

No mesmo trabalho, as frequências alélicas obtidas nos vários países da Europa foram diferentes, 0% na Itália (49 indivíduos estudados), 2,0% na Alemanha (49 indivíduos da Bavária), 2,6% na Groenlândia (96 indivíduos), 4,4% na Inglaterra (237 indivíduos) e 7% na Grécia (187 cipriotas).

Considerando a frequência elevada no fator V Leiden na Europa e a sua raridade em outras populações, REES et al. (1995) salientaram que a mutação que originou esse polimorfismo ocorreu recentemente na população fundadora da Europa e se dispersou por migração. Esses autores também salientaram que a alta frequência de um alelo com um fenótipo, aparentemente, deletério tanto em homozigose como em heterozigose, poderia apresentar vantagem seletiva para os heterozigotos. Assim, esses pesquisadores sugeriram que a heterozigose poderia ter sido vantajosa pela redução do sangramento após um trauma, especialmente na época em que o ser humano era caçador, e pela diminuição da perda de sangue na menstruação e parto, protegendo contra a perda de ferro.

REES et al. (1995) também sugeriram que a trombose pudesse ser menos grave no passado, uma vez que outros fatores de risco tais como, cirurgias, terapia hormonal, imobilidade e idade avançada, eram raros.

Outro fator que evidencia uma única origem do fator V Leiden é a segregação do mesmo com um único haplótipo, como mostram os trabalhos realizados por COX et al. (1996), ZIVELIN et al. (1997), ZÖLLER et al. (1997) e REES et al. (1998).

Os resultados obtidos por COX et al. (1997), no estudo de 46 heterozigotos e 6 homozigotos para o fator V Leiden, mostraram que o alelo 1691A segregava sempre com um mesmo haplótipo para o exon 13 do gene do fator V, indicando uma única origem para o fator V Leiden. Dados similares foram encontrados por ZIVELIN et al. (1997), ZÖLLER et al. (1997) e REES et al. (1998).

Analisando os resultados obtidos pelo estudo de haplótipos, ZIVELIN et al. (1997) sugerem que a mutação que deu origem ao fator V Leiden surgiu em um único ancestral caucasóide entre 21.000 a 34.000 anos atrás. E, considerando sua elevada frequência em caucasóides, esses autores também sugeriram que este seja um polimorfismo que confere vantagem ao heterozigoto, do mesmo modo como o sugerido por REES et al. (1995).

1.2.12. FATOR II ou PROTROMBINA

A protrombina ou fator II é o zimogênio da serino-protease trombina, a qual é uma das enzimas chaves no processo de hemostasia e trombose. A trombina apresenta atividade pró-coagulante, anticoagulante e antifibrinolítica.

A trombina atua no final da cascata de coagulação, convertendo o fibrinogênio em fibrina e participa da retroalimentação positiva desse processo, ativando os fatores V e VIII. Também, é responsável pela ativação do fator XIII (fator que confere estabilidade ao coágulo). Assim, dessas diferentes maneiras a trombina exerce a atividade pró-coagulante.

A trombina, juntamente com a trombomodulina, ativa a proteína C, a qual inibe os fatores V e VIII da cascata da coagulação, desse modo a trombina desempenha seu papel anticoagulante.

No processo de fibrinólise, a trombina pode afetar a capacidade fibrinolítica pela modulação da produção do ativador tissular do plasminogênio e do inibidor-1 do ativador do plasminogênio.

A trombina também tem ação sobre as células: é o ativador mais potente de plaquetas, estimula as células endoteliais a expressarem P-selectina (molécula de adesão leucocitária), fator von Willebrand, fatores de crescimento e citocinas (COUGHLIN, 1998).

O gene que codifica a protrombina está localizado cromossomo 11, na região 11p11-q12. Apresenta tamanho de 21 Kb, sendo composto por 14 exons que codificam mRNA de 2,1 Kb (TUDDENHANM & COOPER, 1993).

POORT et al. (1996) investigaram o gene da protrombina como candidato a alterações que possam predispor à trombose. Esse grupo de pesquisadores analisou o gene da protrombina em 28 pacientes selecionados, com trombose venosa idiopática. A única alteração encontrada foi um polimorfismo na região 5' não traduzida, causado por uma mutação G→A no nucleotídeo 20210. Nesse grupo de pacientes, selecionados quanto à ausência de outro fator de risco e presença de história familiar de trombose, a frequência do alelo 20210A foi 18%. Quando todos os pacientes com trombose venosa foram testados, a frequência do alelo A foi 3,2%. A frequência do alelo 20210A na população em geral foi 1,15%. Assim, POORT et al. (1996) estabeleceram que esse polimorfismo é um fator de risco para trombose (OR = 2,8; 95% IC = 1,4-15,8).

Nesse mesmo trabalho, POORT et al. (1996) demonstraram que o alelo 20210A estava relacionado com o aumento dos níveis de protrombina. Embora, não tenham elucidado o mecanismo pelo qual esse polimorfismo influencia o nível de protrombina, os autores sugerem que ele possa aumentar a estabilidade do mRNA ou estar em desequilíbrio de ligação com outra mutação ainda não detectada.

Desde a caracterização desse polimorfismo, muitos grupos de pesquisa têm determinado a frequência dessa mutação em pacientes com trombose venosa. Os resultados obtidos, mesmo em diferentes países, confirmam que a presença do alelo 20210A é um fator de risco para essa doença. Para exemplificar podemos citar alguns desses estudos, SOUTO et al. (1998) na Espanha, LEROYER (1998) na França; HILLARP et al. (1997) na Suécia; FERRARESI et al. (1997) na Itália; KAPUR et al. (1997) nos Estados Unidos; CUMMING et al. (1997) na Inglaterra e ARRUDA et al. (1997) no Brasil.

1.2.13. FATOR VII

O fator VII é uma glicoproteína plasmática que participa da via extrínseca da coagulação, sendo sintetizado no fígado e secretado como uma proteína de cadeia simples.

Na presença do fator tissular, o fator VII inativo é convertido a sua forma ativa, de cadeia dupla, por clivagem proteolítica. O fator VII é ativado pelo fator Xa, e outras proteases, como fator XIIa, fator IXa, trombina e pelo próprio fator VIIa.

O fator VIIa juntamente com o fator tissular e na presença de íons cálcio e fosfolipídeos ativa os fatores IX e X.

Os níveis plasmáticos de fator VII são influenciados tanto por fatores genéticos como ambientais. Os níveis de triglicerídeos são os principais determinantes ambientais do nível do fator VII. Idade, índice de massa corporal, uso de contraceptivos orais e menopausa também influenciam o nível do fator VII (BALLEISEN et al., 1985a e BALLEISEN et al., 1985b).

O gene que codifica o fator VII está localizado no cromossomo 13, na região 13q34 (GILGENKRANTZ et al., 1986). Esse gene é composto por 12,8 Kb organizadas em 9 exons, que codificam um mRNA de 1,4 Kb (O'HARA et al., 1987).

Vários estudos têm evidenciado associações entre polimorfismos de DNA no gene do fator VII com níveis plasmáticos dessa proteína. Entre os polimorfismos já descritos para esse gene, os polimorfismos R353Q e -323P0/10 têm sido os mais estudados.

O polimorfismo R353Q é causado pela substituição de uma guanina por uma adenina no códon para o aminoácido 353, essa mutação leva a troca do aminoácido arginina (alelo R) por uma glutamina (alelo Q) na proteína (GREEN et al., 1991).

O polimorfismo -323P0/10 é causado pela inserção/deleção de 10pb no nucleotídeo -323 na região promotora do gene (MARCHETTI et al., 1993). O alelo P10 apresenta o fragmento de 10 pb, no alelo P0 esse fragmento está ausente.

Esses dois polimorfismos apresentam associação alélica, sendo que os alelos Q e P10 segregam juntos (HUMPHRIES et al., 1996).

GREEN et al. (1991) relatam a associação entre o polimorfismo R353Q e os níveis plasmáticos de fator VII. Os indivíduos heterozigotos apresentaram níveis de fator VIIc 22% mais baixos do que a média da população. Esse polimorfismo foi responsável por 20% da variância no nível de fator VII e o colesterol por 3,5%. Os autores sugeriram que a presença do alelo Q pudesse conferir proteção contra trombose e infarto do miocárdio, uma vez que o mesmo estava associado com níveis mais baixos de fator VII.

Alguns estudos relatam a existência de interação genótipo-ambiente influenciando os níveis de fator VII, a associação entre o aumento de triglicerídeos e o aumento de fator VII dependeria do genótipo para o fator VII. LANE et al., (1992) relatam que a correlação entre os níveis de fator VII e os níveis de triglicerídeos foi positiva nos indivíduos homozigotos para o alelo R, entretanto essa correlação foi inexistente nos heterozigotos e nos homozigotos para o alelo Q. Esses dados foram confirmados pelos trabalhos de HUMPHRIES et al. (1994),

SILVEIRA et al. (1994), KARIO et al. (1995), HUMPHRIES et al. (1996) e BENTZEN et al. (1996).

Entretanto, HEYWOOD et al. (1996a) e MEILAHN et al. (1995) não encontram interação entre os genótipos desse polimorfismo e triglicerídeos.

Visando entender o mecanismo pelo qual o polimorfismo R353Q altera os níveis de fator VII, HUNAULT et al. (1997) realizaram experimentos de transfecção transiente utilizando a linhagem celular COS-1. O meio de cultura das células transfectadas com o plasmídeo contendo o cDNA correspondente ao alelo Q apresentou, significativamente, níveis mais baixos de fator VII do que o meio de cultura das células que continham o alelo R. Entretanto, a quantidade de fator VII presente no lisado celular não foi, estatisticamente, diferente nos dois tipos de células. Portanto, os autores sugerem que esse polimorfismo interfere no processo de secreção do fator VII pelas células hepáticas e não no processo de expressão do gene.

Com relação ao polimorfismo -323P0/10, vários trabalhos relatam a associação entre os níveis de fator VII e esse polimorfismo. O alelo para inserção, P10, está associado com níveis mais baixos de fator VII, conforme mostram os dados obtidos por BENTZEN et al. (1996), HUMPHRIES et al. (1996) e BERNARDI et al. (1997).

Em estudos de transfecção, POLLAK et al. (1996) mostraram que a seqüência que continha a inserção de 10pb diminuía a atividade do promotor em 33% quando comparada com a seqüência que continha a deleção. Entretanto, os estudos usando "eletromobility shift assay" realizados por van't HOOFT et al. (1999) mostram que esse polimorfismo não afeta a interação da região promotora com as proteínas nucleares hepáticas.

HUMPHRIES et al. (1996) salienta que, como existe associação alélica entre os polimorfismos R353Q e -323P0/10, um dos polimorfismos pode ser apenas um marcador genético para o outro, o qual realmente afetaria a expressão do gene. Conforme os dados obtidos nesse trabalho, os autores sugerem que parte do efeito do polimorfismo R353Q sobre os níveis de fator VII possa ser devido ao polimorfismo -323P0/10.

Di CASTELNUOVO et al. (1998) ressaltam que ambos polimorfismos podem ser funcionalmente relevantes, mas que o efeito no fenótipo seja regulado por diferentes mecanismos. Esses pesquisadores, mostraram que o impacto desses polimorfismos sobre o nível fator VII era diferente entre os sexos. Nos homens, 29% da variância nos níveis de fator VII era explicado pelo polimorfismo R353Q e 22% pelo polimorfismo -323P0/10. Nas

mulheres, os resultados obtidos foram, 17% para o polimorfismo R353Q e 9% para o polimorfismo -323P0/10.

Recentemente, van't HOOFT et al. (1999) descreveram dois novos polimorfismos na região promotora do fator VII, -401G/T e -402G/A. Esses polimorfismos estão associados com o nível desse fator, os dois juntos explicam 18% da variação no nível de fator VII. Os experimentos de "eletromobility shift assay", usando extrato de proteínas nucleares de células hepáticas, mostraram que os dois polimorfismos influenciam na ligação das proteínas nucleares no DNA, o mecanismo pelo qual isso acontece não foi determinado.

Estudos clínicos têm mostrado associação entre níveis elevados de fator VII e aumento de risco para doenças cardiovasculares, entre esses estudos pode-se ressaltar os realizados por MEADE et al. (1986), MEADE et al. (1993), HEINRICH et al. (1994).

Entretanto, outros estudos não têm encontrado essa associação. A análise univariada realizada por CORTELLARO et al. (1992) mostrou que níveis aumentados de fator VII estavam associados com infarto do miocárdio. Porém, quando a análise multivariada foi realizada, a associação não foi encontrada.

Os resultados obtidos por JUNKER et al. (1997) mostram que indivíduos com doença arterial coronariana têm níveis mais altos de fator VII, entretanto quando a regressão logística foi realizada, o fator VII não mostrou ser um fator de risco independente para a doença. O estudo realizado por TRACY et al. (1999), também mostrou que o fator VII não estava associado com doença cardiovascular.

Alguns estudos têm investigado a associação dos polimorfismos de DNA e o risco de doença cardiovascular. HEYWOOD et al. (1996a), LANE et al. (1996), WANG et al. (1997), DOGGEN et al. (1998) e LEE et al. (1999) não encontraram associação entre o polimorfismo R353Q e doença arterial coronariana.

CORRAL et al. (1998) estudaram os polimorfismos R353Q e -323P0/10, e também não encontraram desses polimorfismos com doença arterial coronariana.

Entretanto, IACOVELLO et al. (1998) encontram associação entre o polimorfismo R353Q e infarto do miocárdio. A frequência do alelo Q estava diminuída no grupo de pacientes com relação ao controle, sugerindo que esse alelo teria um efeito protetor contra o infarto do miocárdio.

KOSTER et al. (1994) não encontraram associação dos níveis de fator VII nem do polimorfismo R353Q com trombose venosa, embora o alelo Q estivesse associado com níveis mais baixos de fator VII.

1.2.14. GLICOPROTEÍNA I**IIb/IIIa**

As plaquetas são essenciais na manutenção da hemostasia, atuando na formação do tampão hemostático, através da adesão e agregação das plaquetas ao subendotélio lesado, e participando no processo de coagulação sanguínea, através do fornecimento de fosfolípidos e receptores, através da liberação substâncias pró-coagulantes e pela interação estrutural com o coágulo de fibrina.

O processo de formação do tampão hemostático é mediado por receptores presentes na superfície plaquetária, os quais são glicoproteínas. A adesão e agregação plaquetárias dependem da interação desses receptores com as proteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, colágeno e fator von Willebrand).

A glicoproteína plaquetária I**IIb/IIIa** (GPIIb/IIIa) é um complexo composto por duas subunidades ($\alpha_{IIb} \beta_3$) e atua como receptor primário para as moléculas adesivas. A GPIIb/IIIa é o receptor plaquetário mais abundante, cada plaqueta apresenta aproximadamente 50.000 cópias (LEFKOVITS et al., 1995)

A ligação do fibrinogênio a GPIIb/IIIa é o principal mecanismo de agregação plaquetária, embora outras proteínas adesivas como fibronectina, FvW e vitronectina também possam se ligar a esse receptor. A ausência ou diminuição da atividade funcional da GPIIb/IIIa causa Trombastenia de Glanzmann, uma doença hemorrágica rara, com padrão de herança autossômico recessivo (BENNETT, 1990).

O gene que codifica a subunidade I**IIb** localiza-se no cromossomo 17, na região 17q21-q22, possui tamanho de 17,2 Kb e 30 exons. O gene que codifica a subunidade I**IIIa** também se localiza no cromossomo 17, na região 17q21-q23, possui tamanho de 46 Kb e 14 exons (BENNETT, 1990).

As glicoproteínas I**IIb** e I**IIIa**, assim com outras proteínas plaquetárias, são polimórficas, essas variantes podem levar a incompatibilidade materno-fetal, ocasionando a trombocitopenia neonatal aloimune. Um dos antígenos relacionados a essas patologias é o PI^A , o qual está presente na GPIIIa.

NEWMAN et al. (1989) identificaram a base molecular do antígeno PI^A , esse polimorfismo ocorre devido a uma substituição de uma citosina por uma timina no

nucleotídeo 1565 do gene da glicoproteína IIIa. Essa transição de bases acarreta troca do aminoácido na posição 33, uma leucina (alelo PI^{A1}) é substituída por uma prolina (alelo PI^{A2}).

Até o trabalho de WEISS et al. (1996), esse polimorfismo era estudado com relação ao seu papel nas doenças imunes que causam a destruição de plaquetas, como por exemplo trombocitopenia neonatal aloimune e púrpura pós-transfusão, após esse trabalho o PI^A passou a ser investigado como um fator de risco para trombose.

Baseando-se no fato de o infarto do miocárdio resulta da formação de um agregado de plaquetas no local de ruptura da placa aterosclerótica e que a formação deste agregado requer a ligação do fibrinogênio a GPIIb/IIIa, WEISS et al. (1996) realizaram um estudo para investigar a relação entre esse polimorfismo e a síndrome coronariana aguda. Nesse estudo, os autores encontraram que o alelo PI^{A2} era, significativamente, mais freqüente nos pacientes com trombose coronariana aguda do que nos controles.

Os resultados obtidos por WALTER et al. (1997) indicam que pacientes com o alelo PI^{A2} têm risco aumentado de ter trombose coronariana após a colocação do "stent". KASTRATI et al. (1999), também encontraram associação do alelo PI^{A2} com re-estenose coronariana após a colocação do "stent". O risco foi maior em pacientes homocigotos para o alelo PI^{A2} e em mulheres.

Entretanto, os resultados do trabalho de RIDKER et al. (1997) mostram que não existe associação desse polimorfismo com infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, nem com trombose venosa.

A influência desse polimorfismo na atividade desse receptor ainda é desconhecida (BRAY, 1999). Usando epinefrina como agonista, FENG et al. (1999) encontraram que a presença do alelo PI^{A2} está associada com aumento na agregação plaquetária.

1.2.15. HOMOCISTEINEMIA

A homocisteína é um aminoácido produzido, como um produto intermediário, durante o metabolismo da metionina. A homocisteína é metabolizada por duas rotas diferentes, remetilação para metionina e transsulfuração para cisteína. A enzima Metileno Tetraidrofolato Redutase (MTHFR) atua na rota de remetilação e a enzima Cistationa β -sintetase (CBS) atua na rota de transsulfuração. A concentração média normal de homocisteína no sangue é de 10 $\mu\text{mol/L}$ (SELHUB & D'ANGELO, 1997).

A homocistinúria, doença com padrão de herança autossômico recessivo, é caracterizada pela concentração elevada de homocisteína e metionina no sangue e na urina. Em indivíduos com homocistinúria, a concentração plasmática de homocisteína pode variar de 200 a 400 $\mu\text{mol/L}$ (SELHUB & D'ANGELO, 1997).

Os níveis plasmáticos de homocisteína são modulados por uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais. As vitaminas B₆, B₁₂ e o ácido fólico são co-enzimas essenciais no metabolismo da homocisteína. Assim, deficiências dessas co-enzimas, tanto por fatores genéticos como por carência nutricional, levam ao aumento da homocisteína (D'ANGELO & SELHUB, 1997).

Alterações que reduzem a função da CBS ou da MTHFR têm potencial para aumentar o nível plasmático de homocisteína. Várias mutações já foram identificadas nos genes que codificam a MTHFR e a CBS, todas essas mutações, em homozigose, causam grave homocistinúria (MINER et al., 1997).

Indivíduos com homocistinúria apresentam grande incidência de doenças cardiovasculares e podem ter morte prematura devido à trombose arterial ou venosa (HARPEL, 1997).

Vários estudos clínicos têm sugerido que níveis moderadamente aumentados de homocisteína no sangue (homocisteinemia), em média 30% acima do normal, também estão associados com doença vascular e trombose (HARPEL, 1997).

den HEIJER et al. (1996) encontraram que níveis elevados de homocisteína são um fator de risco para trombose venosa na população em geral, os mesmos resultados também foram encontrados por CATTANEO et al. (1996).

O trabalho realizado por RIDKER et al. (1997c) confirma esses dados e acrescenta que o risco de trombose é maior nos indivíduos que apresentam, concomitantemente, fator V Leiden e homocisteinemia do que naqueles que apresentam, somente, fator V Leiden ou homocisteinemia.

Conforme a revisão realizada por HARPEL (1997), a homocisteinemia leva à aterosclerose e trombose porque interfere tanto no mecanismo de proliferação das células endoteliais, como no mecanismo anticoagulante. A homocisteína interage com as células musculares lisas estimulando a proliferação celular e a síntese de colágeno, levando à aterosclerose. Estudos *in vitro* mostram que a homocisteína inibe a atividade da trombomodulina, ativa o fator V, diminui a atividade fibrinolítica associada ao endotélio e aumenta a produção do fator tissular, levando à trombose.

KANG et al. (1988) identificaram uma variante termolábil da enzima MTHFR, a qual estava relacionada com homocistinemia moderada, que podia ser corrigida com suplementação de ácido fólico. Em estudos subsequentes, KANG et al. (1991) mostrou que a termolabilidade da MTHFR era uma característica recessiva e que estava presente em 5% da população em geral e em 17% dos pacientes com doença arterial coronariana.

Posteriormente, FROSST et al. (1995) caracterizaram a mutação que causa a variante termolábil: uma mutação no nucleotídeo 677, substituição de uma citosina por uma timina (C→T), a qual resulta na troca do aminoácido alanina por uma valina. Esses pesquisadores determinaram as frequências alélicas numa população de canadenses franceses, alelo C = 0,62 e alelo T = 0,38.

Indivíduos homozigotos para o alelo T têm a atividade específica da enzima reduzida de 40 a 50% (ROZEN, 1997). Sendo que os níveis médios de homocisteína, em jejum, variam conforme o genótipo para a MTHFR, indivíduos homozigotos CC apresentam nível médio de homocisteína de 12,3 $\mu\text{mol/L}$, os heterozigotos, 13,4 $\mu\text{mol/L}$ e os homozigotos TT, 16,3 $\mu\text{mol/L}$ (KLUIJTMANS et al., 1996).

Entretanto, a correlação entre esse polimorfismo e o nível plasmático de homocisteína depende de outras variáveis, como por exemplo, o nível de ácido fólico. O genótipo homozigoto para a mutação (TT) parece não predispor a homocistinemia quando o nível de folato é adequado (ROZEN, 1997).

Vários trabalhos têm investigado a associação entre esse polimorfismo e trombose venosa ou doença arterial coronariana, entretanto os resultados obtidos são controversos.

KLUIJTMANS et al. (1998) estudaram 471 pacientes com trombose venosa profunda e 474 controles, e não encontraram associação deste polimorfismo com a trombose venosa. A ausência de associação também é relatada em outros trabalhos (TOSETTO et al., 1997; CATTANEO et al., 1997; SALDEN et al., 1997; ORDÓÑES et al., 1999).

Por outro lado, alguns trabalhos relatam que a homozigose para o alelo T está associada com o aumento do risco de trombose venosa. MARGAGLIONE et al. (1998) estudaram 227 pacientes com trombose venosa e 431 controles, os resultados mostraram que o genótipo TT era mais frequente nos pacientes (0,26) do que nos controles (0,18), OR = 1,6; IC 95% 1,1-2,3. A associação entre a homozigose para o alelo T e o aumento do risco para trombose venosa também foi encontrada nos trabalhos de ARRUDA et al. (1997) e GEMMATTI et al. (1999).

2. OBJETIVOS

Interações entre diferentes genes e entre genes e ambiente podem ser fatores de risco para a trombose venosa, a qual é uma doença multifatorial.

O processo de compreensão do desenvolvimento da trombose começou com Virchow em meados do século 19, o qual propôs que mudanças na parede do vaso, no fluxo sanguíneo e na composição do sangue estavam envolvidos na fisiopatologia dessa doença.

No final da década de 60, a associação entre o sistema sanguíneo ABO e trombose venosa é descrita (JICK et al., 1969).

Em 1965, cem anos após Virchow, foi identificado o primeiro fator de risco hereditário para a trombose venosa, a deficiência de antitrombina III.

E, somente, no início da década de 80 outros fatores de risco hereditários foram identificados, as deficiências de proteína C e de proteína S.

Mesmo assim, a compreensão do mecanismo que levava ao desenvolvimento da trombose venosa continuava a ser desafiadora, as deficiências destas proteínas explicavam apenas cerca de 10% dos casos de trombose familiar, em uma mesma família havia indivíduos que apresentavam a deficiência mas não manifestavam a trombose, enquanto outros, que não apresentavam a deficiência, tinham trombose.

Em 1993, foi demonstrado, através da identificação do fator V Leiden, que não somente as alterações nos inibidores fisiológicos da coagulação eram fatores de risco para trombose, mas também alterações em seus substratos, os fatores de coagulação.

Em 1995, foi demonstrado que níveis elevados de fator VIII estão associados com a trombose venosa. Entretanto, a base genética do aumento do nível do fator VIII ainda não é conhecida.

Com o progresso da biologia molecular e tendo a disponibilidade de genes clonados, vários genes candidatos a mutações que possam predispor à trombose têm sido estudados. O gene da protrombina foi investigado e em 1996 foi descrito um polimorfismo, 20210G→A, o qual mostrou ser um fator de risco inequívoco para a trombose venosa, embora o seu papel funcional não tenha sido elucidado.

Outros polimorfismos têm sido identificados e, também são candidatos a fatores de risco para trombose venosa, entretanto os seus papéis no desenvolvimento dessa patologia não

estão bem estabelecidos, como por exemplo: polimorfismos nos genes dos fatores de coagulação VII (R353Q, -32P0/P10), V (4070A→G), XIII (Val34Leu), nos genes da proteína C (-1654C/T e -1641A/G), do PAI-1 (4G/5G), da Glicoproteína IIb/IIIa (PL^{A1}) ou da enzima MTHFR (677C→T).

Assim, o presente trabalho tem objetivo geral de contribuir para a melhor compreensão sobre os fatores genéticos de risco que estão associados à ocorrência de trombose venosa. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1) Caracterizar uma amostra de pacientes caucasóides com trombose venosa profunda quanto à proporção sexual, idade de manifestação do primeiro episódio de trombose e história familiar;

2) Verificar as possíveis relações entre sistema sanguíneo ABO, níveis de fator VIII e de fator von Willebrand e trombose venosa;

3) Determinar as frequências do fator V Leiden, do polimorfismo 20210G→A no gene da protrombina, das deficiências de proteína C, proteína S e antitrombina III nos pacientes com trombose venosa;

4) Investigar a existência de associação entre os polimorfismos de DNA e a trombose venosa, estudando os seguintes genes: fator V, fator VII, glicoproteína IIb/IIIa, Metilenotetrahidrofolato Redutase, ativador tissular do plasminogênio e inibidor-1 do ativador do plasminogênio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRA

3.1.1. Grupo de Pacientes

Durante o desenvolvimento desse projeto foram investigados 195 indivíduos com trombose. Destes, somente 121 foram incluídos no presente trabalho.

Foram critérios de inclusão no presente trabalho:

- 1) Ocorrência de, pelo menos, um único evento de TVP confirmado por flebografia ou eco-doppler ou,
- 2) Ocorrência de trombose de repetição ou TVP seguida de embolia pulmonar, mesmo sem a confirmação por flebografia ou eco-doppler.

Foram excluídos os indivíduos com trombose arterial ou trombose secundária devido a outras patologias tais como: diabetes, câncer, hepatopatia, β -Talassemia. Também foram excluídos indivíduos que não apresentaram trombose em membros inferiores, mas somente trombose em outros sítios, tais como: trombose de retina, trombose renal, trombose em membros superiores, trombose de veia porta e trombose mesentérica. Indivíduos que apresentaram somente embolia pulmonar sem evidência de TVP não foram incluídos no presente trabalho.

Quanto à procedência, as amostras incluídas no presente trabalho tiveram três diferentes origens:

- 1) Treze pacientes já haviam sido investigados pelo nosso grupo no trabalho de ZIMMER (1993) e já tinham resultados para Proteína C, Proteína S e ATIII. Entretanto, todos os polimorfismos de DNA foram investigados no presente trabalho;
- 2) Cinquenta e oito pacientes foram encaminhados pelos médicos diretamente ao nosso laboratório;
- 3) As amostras de cinquenta pacientes foram enviadas pelo Laboratório de Hematologia do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para a investigação dos polimorfismos de DNA.

3.1.2. Grupo Controle Caucasóide

Para os estudos de polimorfismos de DNA, o grupo controle foi pareado por sexo e idade (variação de ± 3 anos) com o grupo de pacientes com TVP, sendo constituído por indivíduos sem história pessoal de TVP.

Na análise dos níveis de fator VIII e de fator von Willebrand, o grupo controle constituiu-se de 70 indivíduos sem história hemorrágica, previamente testados por nosso grupo no trabalho de FISCHER (1995).

Na análise da frequência dos grupos sanguíneos do sistema ABO foi utilizado como grupo controle os indivíduos estudados por DORNELLES (1998).

3.1.3. Grupo Controle Negróide

Esse grupo controle foi utilizado nos estudos de polimorfismos de DNA, sendo constituído das seguintes amostras:

- 1) Setenta e um indivíduos eram habitantes do Rio de Janeiro, amostras gentilmente enviadas pelo Dr. Marcos Palatinik, do Hospital Universitário da UFRJ;
- 2) Vinte indivíduos do Rio Grande do Sul, amostras coletadas pelo nosso grupo;
- 3) Sessenta e cinco indivíduos de Porto Alegre, amostras gentilmente cedidas pelas Dras. Mara H. Hutz e Maria Cátira Bortolini do Departamento de Genética da UFRGS;
- 4) Dezesesseis indivíduos de Salvador (Bahia), amostras gentilmente cedidas pelas Dra. Maria Cátira Bortolini do Departamento de Genética da UFRGS.

3.1.4. Grupo Controle de Ameríndios

Esse grupo foi utilizado no estudo da frequência do fator V Leiden, sendo constituído por amostras de 153 indígenas brasileiros pertencentes as seguintes tribos: Zoró (n = 25), Gavião (n = 27), Xavante (n = 29), Wai-Wai (n = 26), Suruí (n = 21). Essas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Mara H. Hutz e Dr. Francisco M. Salzano do Departamento de Genética da UFRGS

As tribos Zoró e Xavante localizam-se no estado do Mato Grosso, a tribo Gavião no estado de Rondônia, a tribo Wai-Wai no estado do Pará e a tribo Suruí está localizada parte no estado de Rondônia e parte no estado do Mato Grosso.

3.2. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO

3.2.1. Obtenção do Plasma

Para a realização dos testes laboratoriais foi utilizado sangue coletado por punção venosa, sendo utilizado como anticoagulante citrato de sódio 3,8%, na proporção de 1/10. O plasma foi obtido por centrifugação, 5.000 g durante 15 minutos. Quando não testado imediatamente após coleta, o plasma foi armazenado à -70°C.

3.2.2. Dosagem de Fator VIII

O fator VIII somente foi dosado naqueles indivíduos coletados em nosso laboratório, e que não estavam em terapia anticoagulante. Foi utilizado o método de dosagem por um estágio baseado na metodologia descrita por AUSTEN & RHYMES (1975).

3.2.3. Dosagem de Fator von Willebrand

O nível plasmático de Fator von Willebrand foi determinado naqueles indivíduos coletados em nosso laboratório, pelo método de imunoeletroforese quantitativa com anti-soro heterólogo, baseado na técnica descrita por LAURELL (1966). O anti-soro policlonal utilizado foi desenvolvido em nosso laboratório por FISCHER et al. (1996).

3.2.4. Dosagem das Proteínas C, S e ATIII

Esses testes foram realizados pela equipe do banco de sangue do HCPA. Foram testados somente os pacientes coletados no HCPA.

A atividade funcional da proteína C, antitrombina III foi determinada através da proteólise de substratos cromogênicos sintéticos, conforme os "kits" utilizados (Diagnostica Stago[®] e Dade[®]).

A quantidade proteína S total foi determinada por imunoeletroforese, conforme instruções nos "kits" utilizados (Diagnostica Stago[®]).

3.3. ESTUDOS DE DNA

3.3.1. Obtenção do DNA

Para a realização dos estudos moleculares o DNA genômico foi obtido a partir de sangue periférico citratado conforme técnica descrita por LAHIRI & NURBERGER (1991).

Essa técnica pode ser resumida nos seguintes procedimentos: a) lise dos leucócitos com solução hipotônica e detergente não iônico; b) desproteinização do núcleo com detergente iônico e incubação a 56°C; c) separação das proteínas do DNA por precipitação diferencial com cloreto de sódio e d) precipitação do DNA com etanol.

3.3.2. Detecção dos Polimorfismos

De modo geral, a metodologia para a detecção dos polimorfismos pode ser resumida nas seguintes etapas:

- 1) Amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A reação continha:
 - a) 0,4 µM de cada "primer" (concentração final);
 - b) 200 µM de cada dNTP (concentração final);
 - c) Tampão (na concentração final de: 10 mM Tris, pH 8,3; 50 mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂);
 - d) Uma unidade da enzima Taq DNA Polimerase (CENBIOT/RS[®]) por reação;
 - e) 100 a 500 ng de DNA genômico por reação;
 - f) Água q.s.p. 25 µl.
- 1) Verificação da eficiência da amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta;
- 2) Incubação do DNA amplificado com a endonuclease de restrição apropriada nas condições recomendadas pelos fabricantes;
- 3) Análise dos polimorfismos por eletroforese em gel de agarose 1% ou em gel de poliacrilamida (nas concentrações de 5% ou 6%), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

a) Polimorfismos no gene do Fator VII (FVII)

Foram estudados 2 polimorfismos no gene fator VII:

1) Polimorfismo R353Q localiza-se no exon 8 do gene do FVII, sendo detectado pela clivagem do DNA com a endonuclease de restrição **MspI**. Para o estudo desse polimorfismo foram utilizadas as condições descritas por HEYWOOD et al. (1996). O fragmento de DNA amplificado apresenta 272pb, na presença do sítio de restrição para **MspI** (alelo R), esse fragmento é clivado em dois fragmentos menores de 205pb e 67pb. Na ausência do sítio de restrição para **MspI** (alelo Q), o fragmento de 272pb permanece inalterado. Após a clivagem com a enzima de restrição, os fragmentos de DNA foram separados e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo.

2) Polimorfismo -323 P0/P10: esse polimorfismo localiza-se na região promotora do FVII, sendo causado pela inserção ou deleção de um fragmento de 10pb na posição -323. Para a realização do PCR foram utilizados os "primers" e as condições descritas por HUMPRIES et al. (1996). Na presença da inserção, o fragmento amplificado apresenta 224pb e na ausência da inserção 214pb. Os fragmentos amplificados foram separados e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo.

b) Polimorfismo no gene do Inibidor-1 do Ativador do Plasminogênio (PAI-1)

Foi estudado o polimorfismo 4G/5G localizado na região promotora do gene do PAI-1, esse polimorfismo é caracterizado pela presença de 4 (alelo 4G) ou de 5 (alelo 5G) bases guanina. Para identificação desse polimorfismo foram utilizadas as condições descritas por MANSFIELD et al. (1995), sendo que os "primers" utilizados eram específicos para a identificação da seqüência de 4G ou 5G.

c) Polimorfismo no gene do Ativador Tissular do Plasminogênio (t-PA)

Esse polimorfismo localiza-se no intron 8 do gene do t-PA, sendo causado pela inserção ou deleção de uma seqüência Alu de 312 pb. O polimorfismo foi detectado diretamente após o PCR, por eletroforese em gel de agarose 1%, uma vez que os fragmentos amplificados possuem um tamanho de 967 pb (devido à inserção da seqüência Alu, alelo I) ou de 655 pb (devido à deleção da seqüência Alu, alelo D), utilizando-se as condições descritas por LUDWIG et al. (1992).

d) Polimorfismo no gene da Glicoproteína IIb/IIIa

Esse polimorfismo está localizado no exon 2 do gene da subunidade IIIa da GPIIb/IIIa, sendo detectado pela endonuclease de restrição **MspI** conforme técnica descrita por WEISS et al. (1996). O fragmento de DNA amplificado apresenta 266pb e um sítio constante para **MspI**, o qual leva a subdivisão do fragmento de 266pb em 221pb e 45pb. Na ausência do polimorfismo (alelo PI^{A1} , o qual codifica para o aminoácido leucina), o fragmento de DNA de 221pb permanece inalterado. Na presença do polimorfismo (alelo PI^{A2} , o qual codifica para o aminoácido prolina), o fragmento de DNA de 221pb é clivado, resultando em fragmentos de 177pb e 44pb. Após, a clivagem com a enzima de restrição, os fragmentos de DNA foram separados e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo.

e) Polimorfismo no gene da Protrombina (Fator II)

Esse polimorfismo localiza-se no nucleotídeo 20210 na região 3' não traduzida do gene da protrombina, devido a uma mutação G→A. Foi identificado pela utilização da endonuclease de restrição **HindIII**, como descrito por POORT et al. (1996). O fragmento de DNA amplificado apresenta 345pb, na presença do alelo A este fragmento é clivado pela enzima **HindIII**, resultando em fragmentos de 322pb e 23pb. Na presença do alelo G, o fragmento de 345 permanece inalterado. Após a clivagem com a enzima de restrição, os

fragmentos de DNA foram separados e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídeo.

f) Polimorfismo no gene da enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)

Esse polimorfismo ocorre no nucleotídeo 677 do gene da MTHFR, devido a uma mutação C→T. Foi detectado pela endonuclease de restrição **HinfI** nas condições técnicas estabelecidas por Frosst et al. (1995). O fragmento de DNA amplificado por PCR apresenta 198pb. Na presença do alelo T, este fragmento é clivado pela enzima **HinfI**, resultando em fragmentos de 175pb e 23pb. Na presença do alelo C, o fragmento de DNA de 198pb permanece inalterado. Após a clivagem com a enzima de restrição, os fragmentos de DNA foram separados e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo.

g) Polimorfismos no gene do Fator V

Foram estudados 2 polimorfismos no gene do fator V:

1) Fator V Leiden: esse polimorfismo ocorre no exon 10 devido a uma mutação G→A no nucleotídeo 1691 e foi identificado pela incubação do DNA amplificado com a endonuclease de restrição **MnlI**, utilizando a metodologia descrita por BERTINA et al. (1994). O fragmento de DNA amplificado possui 267pb e um sítio de clivagem constante para a enzima de restrição **MnlI**, o qual leva a subdivisão deste fragmento em fragmentos de 200pb e 67 pb após a clivagem com esta enzima. Na presença do alelo G, o fragmento de 200pb é clivado pela enzima, resultando em fragmentos de 163pb e 37pb. Na presença do alelo A, o fragmento não é clivado pela enzima **MnlI**, permanecendo com o tamanho inalterado. Após a clivagem com a enzima de restrição, os fragmentos de DNA foram separados e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo.

2) Polimorfismo 4070 A→G: esse polimorfismo localiza-se no exon 13 e foi identificado pela enzima de restrição **RsaI**, conforme descrito por LUNGHI et al. (1996). O fragmento de DNA amplificado apresenta 703pb e na presença do alelo G (ou alelo R2) esse fragmento é clivado pela enzima **RsaI**, resultando em fragmentos de 492pb e 211pb. Na

presença do alelo A (ou alelo R1), o fragmento de 703pb não é clivado pela enzima **RsaI**. Após a clivagem com a enzima de restrição, os fragmentos de DNA foram separados e identificados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

3. 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos em cada grupo estudado, e as diferenças encontradas foram comparadas através do teste de qui-quadrado (χ^2). Nas tabelas 2x2, a correção de Yates foi utilizada sempre que o valor do χ^2 era significativo, conforme recomendado por BEIGUELMAN (1988).

Para realizar a comparação das médias dos fatores VIII, von Willebrand e de idade foi utilizado o teste de Student (teste t). Os dados para os fatores VIII e von Willebrand foram normalizados pela transformação em logaritmo natural.

O programa estatístico utilizado nestas análises foi BioEstat (AYRES et al. 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Distribuição dos pacientes segundo os fatores genéticos de risco e caracterização demográfica.

Foram estudados 121 pacientes com trombose venosa profunda (TVP). Todos os pacientes foram investigados para a presença do polimorfismo 1691G→A fator V (fator V Leiden) e para o polimorfismo 20210G→A no gene da protrombina. Além disso, 85 destes pacientes também foram avaliados quanto aos níveis dos seguintes inibidores fisiológicos da coagulação: ATIII, proteína C e proteína S.

Considerando todos os pacientes, 25 pacientes (21%) apresentaram o fator V Leiden e 11 pacientes (9%) o alelo 20210A no gene da protrombina.

Entre os 85 pacientes que foram investigados quanto aos níveis de ATIII, proteína C e proteína S, 4 pacientes (4,7%) apresentavam deficiência de ATIII, 5 pacientes (5,8%) deficiência de PC e 5 pacientes (5,8%) deficiência para proteína S (um dos quais apresentava o fator V Leiden). Assim, dos 85 pacientes estudados quanto aos inibidores fisiológicos da coagulação referidos, em 72 (84,7%) não foram encontradas deficiências, porém, entre estes últimos, 21 pacientes (24,7%) apresentaram o fator V Leiden ou alelo 20210A no gene da protrombina.

Portanto, considerando somente os fatores genéticos de risco clássicos, ou seja, fator V Leiden, polimorfismo 20210G→A no gene da protrombina, deficiência de ATIII, proteína C ou S, o fator genético de risco para trombose venosa, não foi identificado em 51 pacientes (60%).

Dados sobre a história familiar foram obtidos de 84 pacientes, 33% apresentavam história familiar de trombose. Quando os pacientes foram diferenciados por apresentarem ou não fator de risco genético para trombose venosa, os resultados obtidos mostraram que: 40% dos pacientes com fator de risco genético identificado apresentaram história familiar positiva, assim como 25% dos pacientes sem fator genético de risco identificado. Entretanto, essas diferenças não foram significativas ($\chi^2 = 2,38$; GL = 1; P = 0,122). Esse resultado está na direção esperada, pois presume-se que no grupo de pacientes sem fator de risco genético, os

fatores ambientais seriam o principal fator de risco para a trombose e portanto, esperar-se-ia uma menor frequência de história familiar de trombose neste grupo de pacientes, do que no grupo com fator de risco genético identificado. Talvez as diferenças não tenham alcançado o nível de significância pelo limitado tamanho da amostra.

Considerando todos os pacientes, a idade média do 1º episódio de trombose venosa foi $33,6 \pm 12,1$ anos (amplitude 13 a 69 anos).

No grupo de pacientes sem fator genético de risco identificado, a idade média foi $32,9 \pm 11,4$ anos (amplitude 13 a 58 anos) e no grupo de pacientes com fator genético de risco a idade média foi $34,3 \pm 12,7$ anos (amplitude 16 a 69 anos). As diferenças entre as idades médias de ocorrência do primeiro episódio de trombose nos dois grupos de pacientes, diferenciados segundo a identificação do fator genético de risco, não foram significativas ($t = 0,56$; $P = 0,576$). Aparentemente, este resultado não está de acordo com o esperado, pois, presume-se indivíduos que apresentam fatores genéticos de risco manifestem a trombose em idade mais jovem.

Entretanto, resultados similares têm sido referidos em outros trabalhos. No trabalho realizado por MARGAGLIONE et al. (1998) a idade média de manifestação foi 38,5 anos nos pacientes que apresentavam fator de risco genético e 37 anos nos outros pacientes, essa diferença não foi significativa. No trabalho de MARTINELLI et al. (1998) idade média nos pacientes com fator genético de risco não foi significativamente diferente da idade média dos pacientes que não apresentavam fator de risco genético.

A idade média do 1º episódio de trombose venosa foi, significativamente, menor nas mulheres do que nos homens, $32,1 \pm 11,35$ anos para o sexo feminino e $36,9 \pm 12,6$ anos para o sexo masculino ($t = 2,11$; $P = 0,036$), considerando todos os pacientes. Como já mencionado, a gestação, o período puerperal e o uso de anticoncepcional oral (ACO) são fatores de risco para trombose venosa. Como as mulheres que estão expostas a esses fatores estão em idade reprodutiva, é esperado que a trombose se manifeste mais frequentemente em mulheres jovens. Em nossos dados, esses fatores estavam presentes em 76% das pacientes com trombose.

Além disso, considerando as situações hormonais acima referidas, seria esperado um número maior de mulheres afetadas do que homens. Em nossos dados, a frequência de mulheres foi 62% e de homens 38%, estes valores são significativamente diferentes da proporção sexual esperada de 1:1 ($\chi^2 = 6,479$; $GL = 1$; $P = 0,0109$).

Esses nossos resultados são corroborados pelos obtidos por SILVERSTEIN et al. (1998) em um estudo retrospectivo, o qual abrangeu um período de 25 anos, sobre a incidência de trombose venosa e embolia pulmonar. Em pacientes com menos de 55 anos a incidência de tromboembolismo é maior nas mulheres e após essa idade a incidência é maior nos homens. Os autores relacionam esses dados com a exposição a fatores de risco restrito às mulheres jovens, tais como, uso de ACO e gestação, puerpério.

4.2. Sobre a influência do grupo sanguíneo ABO e dos níveis de FVIII e FvW na incidência de TVP

Como pode ser observado na Tabela 4.2.1, a frequência de indivíduos do grupo sanguíneo não-O foi mais elevada nos pacientes com TVP do que na população caucasóide do Rio Grande do Sul ($\chi^2 = 13,47$; GL = 1; P << 0,001).

Tabela 4.2.1. Distribuição dos grupos sanguíneos do sistema ABO na população caucasóide do Rio Grande de Sul e em pacientes com trombose venosa.

	N	grupo sanguíneo O frequência	grupo sanguíneo não-O frequência
Controles*	2708	0,450	0,550
Pacientes	80	0,240	0,760

*: dados obtidos no trabalho de DORNELLES (1998).

Assim em nossos dados, foi encontrada associação entre sistema sanguíneo ABO e a ocorrência de trombose venosa, havendo um aumento na frequência de indivíduos de grupo sanguíneo não-O nos pacientes. Esses dados corroboram os encontrados em outros trabalhos tais como, JICK et al. (1969), ROBINSON & ROISENBERG (1980), LOURENÇO et al. (1996) e WAUTRECHT et al. (1998).

A relação entre grupos sanguíneos do sistema ABO e trombose venosa é conhecida desde a década de sessenta, quando JICK et al. (1969) relataram que havia um aumento de indivíduos de grupo não-O em pacientes com trombose venosa e relacionaram os seus dados com os obtidos por PRESTON & BARR (1964), os quais mostraram que indivíduos de grupo sanguíneo não-O apresentam níveis mais elevados do fator VIII.

KOSTER et al. (1995) investigaram a influência do sistema sangüíneo ABO e dos níveis dos fatores VIII e von Willebrand no desenvolvimento da trombose venosa. Os resultados obtidos mostraram que no grupo de pacientes havia um aumento na frequência do grupo sangüíneo não-O e de indivíduos com níveis elevados dos fatores VIII e von Willebrand. Os indivíduos de grupo sangüíneo não-O apresentaram risco 2 vezes maior de trombose do que os indivíduos de grupo sangüíneo O.

Em nossos resultados também foi verificado que os pacientes com trombose venosa apresentam, níveis médios de fator VIII e de fator von Willebrand mais elevados do que os indivíduos controles, como mostram os dados da Tabela 4.2.2, corroborando com os resultados obtidos por KOSTER et al. (1995).

Tabela 4.2.2. Níveis de fator VIII e fator von Willebrand em indivíduos normais e em pacientes com trombose venosa.

		controles	pacientes	t	P
		N = 70	N = 33		
fator VIII	média ± dp	105 ± 36	149 ± 64	4,99	<<0,001
	amplitude	41 - 290	82 - 370		
fator vW	média ± dp	105 ± 30	155 ± 54	6,54	<<0,001
	amplitude	50 - 195	80 - 307		

Quando os pacientes foram separados de acordo com o grupo sangüíneo e comparados com os seus respectivos controles, os resultados continuaram mostrando que os pacientes com trombose venosa apresentavam níveis, significativamente, mais elevados do que os controles, como mostram os dados da Tabela 4.2.3 para o fator VIII e da Tabela 4.2.4 para o fator von Willebrand.

Tabela 4.2.3. Níveis de fator VIII em indivíduos normais e em pacientes com trombose venosa, distribuídos conforme o grupo sanguíneo ABO.

grupo sanguíneo	amostra	N	nível de fator VIII (%)		t	P
			média ± dp	amplitude		
O	controles	27	87 ± 25	41 - 163	3,62	<< 0,001
	pacientes	11	124 ± 46	85 - 248		
não-O	controles	43	115 ± 38	69 - 290	3,23	<< 0,001
	pacientes	22	157 ± 69	82 - 370		

Tabela 4.2.4. Níveis de fator von Willebrand em indivíduos normais e em pacientes com trombose venosa, distribuídos conforme o grupo sanguíneo ABO.

grupo sanguíneo	amostra	N	nível de fator von Willebrand (%)		t	P
			média ± dp	amplitude		
O	controles	27	88 ± 22	50 - 167	5,10	<< 0,001
	pacientes	11	133 ± 50	80 - 230		
não-O	controles	43	115 ± 30	65 - 195	4,05	<< 0,001
	pacientes	22	163 ± 54	90 - 307		

Portanto, os nossos dados indicaram que, independentemente do grupo sanguíneo, níveis elevados de fator VIII e de fator von Willebrand estão associados com a ocorrência de trombose venosa.

No grupo de pacientes, os indivíduos de grupo sanguíneo não-O apresentaram níveis médios de fator VIII e von Willebrand mais elevados do que os indivíduos de grupo sanguíneo O, entretanto essas diferenças não foram significativas ($t = 1,6$; $P = 0,117$ para o fator VIII e $t = 1,92$; $P = 0,060$ para o fator von Willebrand).

Assim, em nossos dados verificou-se que tanto o sistema sanguíneo ABO, como os fatores VIII e von Willebrand estão associados com a ocorrência de trombose venosa profunda. Os pacientes com trombose venosa apresentaram níveis elevados dos fatores VIII e von Willebrand, bem como maior frequência do grupo sanguíneo não-O.

4.3. Sobre os polimorfismos no gene do fator V

4.3.1. Sobre o polimorfismo 1691G→A

4.3.1.1. Polimorfismo 1691G→A na população em geral

Esse polimorfismo ocorre devido a uma mutação G→A no nucleotídeo 1691, no exon 10 do gene do fator V. Cabe salientar que a presença do nucleotídeo A na posição 1691 leva a síntese do fator V Leiden, o qual apresenta uma glutamina em vez de uma arginina na posição 506. As frequências alélicas e genotípicas obtidas no presente trabalho, nos diferentes grupos estudados, são mostradas na Tabela 4.3.1.

Tabela 4.3.1. Frequência do polimorfismo 1691G→A no gene do fator V nos grupos estudados.

grupo	N*	frequências genotípicas			frequências alélicas	
		1691GG	1691GA	1691AA	1691G	1691A
Ameríndios	128	1,0	0	0	1,0	0
Negróides	163	1,0	0	0	1,0	0
Caucasóides	172	0,953	0,047	0	0,977	0,023
Pacientes	121	0,793	0,207	0	0,897	0,103

*: número de indivíduos estudados

No grupo caucasóide, a distribuição genotípica está de acordo com a prevista pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Dois outros trabalhos investigaram a frequência desse polimorfismo na população caucasóide brasileira, ambos foram realizados em São Paulo (Campinas e Ribeirão Preto). No trabalho de ARRUDA et al. (1995) a frequência do alelo 1691A em 100 indivíduos estudados foi 0,010 e no trabalho de FRANCO et al. (1999) foi 0,013 em 152 indivíduos. A frequência obtida no presente trabalho (0,023) não foi significativamente diferente das obtidas nestes trabalhos, ainda que seja o dobro da obtida no trabalho de ARRUDA et al. (1995).

Existe uma grande heterogeneidade na frequência do fator V Leiden nas diversas populações européias estudadas ($\chi^2 = 83,26$; GL = 21; $P \ll 0,001$), como pode ser observado nos dados mostrados na Tabela 4.3.2.

REES et al. (1995) sugeriram que o fator V Leiden seria mais freqüente no norte da Europa do que no sul. Entretanto, ainda que esse gradiente seja observado de uma forma geral, existem evidentes exceções a serem destacadas, por exemplo, a Finlândia (norte da Europa) apresenta a segunda menor frequência do alelo 1691A, sendo menor do que a obtida em Nápoles (sul da Europa).

Tabela 4.3.2. Frequências alélicas do polimorfismo 1691 G→A no gene do fator V em caucasóides de diferentes países da Europa.

local	N*	frequências alélicas		referência
		1691G	1691A	
Islândia	159	0,969	0,031	ÓLAFSON et al., 1998
Finlândia	142	0,990	0,010	LINNA et al., 1997
Suécia	101	0,945	0,055	HOLM et al., 1996
Dinamarca	4188	0,966	0,034	LARSEN et al., 1998
Alemanha (norte)	159	0,940	0,060	ASCHKA et al., 1996
Alemanha (sul)	180	0,961	0,039	BRAUN et al., 1996
Escócia	224	0,989	0,011	McCOLL et al., 1999
Inglaterra (leste, Cambridge)	508	0,985	0,015	BROWN et al., 1997
Inglaterra (sul, Cardiff)	310	0,961	0,039	BOWEN et al., 1998
Holanda	169	0,982	0,018	VANDENBROUKE et al., 1994
Polônia	200	0,950	0,050	HERRMANN et al., 1997
Bélgica	91	0,984	0,016	HAINAULT et al., 1997
França (Brest)	400	0,975	0,025	LEROYER et al., 1997
Áustria (Viena)	96	0,974	0,026	LALOUSCHECK et al., 1998
Hungria	407	0,951	0,049	BALOGH et al., 1999
Suíça	89	0,966	0,034	REDONDO et al., 1999
Itália (norte, Milão)	468	0,985	0,015	MANNUCCI et al., 1996
Itália (sul, Nápoles)	1036	0,979	0,021	MAGAGLIONE et al., 1999
Espanha (Oviedo)	200	0,983	0,017	VARGAS et al., 1999
Espanha (Pamplona)	304	0,997	0,003	ZABALEGUI et al., 1998
Grécia	160	0,975	0,025	ANTONIADI et al., 1999
Grécia (Chipre)	187	0,930	0,070	REES et al., 1995

*: número de indivíduos analisados

Também existem diferenças marcantes dentro de um mesmo país. Na Inglaterra, a frequência do fator V Leiden foi maior no sul (0,039) do que no leste do país (0,015), $\chi^2 = 9,39$; GL = 1; P = 0,002. REES et al. (1995) relataram uma frequência de 0,022 para esse alelo na Inglaterra, entretanto os autores não mencionaram em que região do país a amostra foi coletada.

Essas variações regionais também podem ser observadas, na França, Alemanha, Itália e Grécia, ainda que as diferenças internas não tenham sido significativas. Por exemplo, na França, BATHELIER et al. (1998) referem que a frequência do fator V Leiden foi 0,026 na região de Paris e de 0,017 no sul do país.

Na Espanha as diferenças foram significativas, a frequência foi maior em Oviedo (0,017) do que em Pamplona (0,003), $\chi^2 = 4,05$; GL = 1; P = 0,044. Em Pamplona a população é, predominantemente, de origem Basca, sendo a frequência encontrada por ZABALEGUI et al. (1998) similar à descrita por LUCOTTE & MERCIER (1997) para Bascos da França (alelo 1691A = 0,005).

Nos Estados Unidos, a frequência do fator V Leiden, em caucasóides, também apresenta variações nos diferentes estados. Em Connecticut a frequência do alelo 1691A foi 0,008 (n = 126) no estudo realizado por POTTINGER et al. (1996). No estado de Wisconsin, HESSNER et al. (1999) estudaram 192 caucasóides e encontram uma frequência de 0,018. Nos estados de Oregon e Pensilvânia as frequências foram, respectivamente, 0,038 (n = 197; LIU et al., 1995) e 0,041 (n = 429, BURICK et al., 1997). Uma possível explicação para essa heterogeneidade seria as diferentes composições dos fluxos migratórios da Europa para os Estados Unidos.

Na América do Sul, além do Brasil existem relatos na literatura da frequência do fator V Leiden no Chile, Argentina, Venezuela e Colômbia. No Chile, 159 indivíduos foram estudados por PEREIRA et al. (1996) e a frequência do alelo 1691A foi 0,019. Na Argentina, foram estudados 498 indivíduos provenientes de diferentes partes do país, sendo a frequência alelo 1691A = 0,008 (HEPNER et al., 1999). Na Venezuela, HERRMANN et al. (1997) estudaram 126 indivíduos e a frequência do alelo 1691A foi 0,008. Na Colômbia foram estudados 150 indivíduos e nenhum apresentou o alelo 1691A (VANEGAS et al., 1998). Embora, esses países, incluindo o Brasil, apresentem composições étnicas distintas, a frequência do fator V Leiden é homogênea entre os mesmos ($\chi^2 = 8,59$; GL = 4; P = 0,072).

Com relação aos ameríndios, no presente trabalho, o alelo 1691A não foi encontrado no estudo de 128 indígenas brasileiros (tribos: Zoró, Gavião, Xavante, Wai-Wai, Suruí). A ausência do fator V Leiden também foi observada no estudo de 83 indígenas da região amazônica (tribo Parakanã) realizado por ARRUDA et al. (1996). Entretanto, FRANCO et al. (1999) encontraram um heterozigoto entre os 151 indígenas da região amazônica estudados (tribos: Arara, Kayapo, Wayampi, Wayana-Apalai, Yanomami, Awa-Guaja, Portujara) e

sugerem que a presença do fator V Leiden nestes ameríndios possa ser resultante de miscigenação com caucasóides.

Outros estudos também relatam a ausência do fator V Leiden em indígenas do continente americano, entretanto o número de indivíduos estudados nestes trabalhos é pequeno. GREGG et al. (1991) estudaram 54 nativos dos Estados Unidos e REES et al. (1995) analisaram 36 indígenas das ilhas Vancouver e 19 indígenas peruanos.

Com relação aos negróides, no presente trabalho, o alelo 1691A não foi encontrado no estudo de 163 negróides brasileiros, esse resultado está de acordo com o esperado considerando os dados da literatura, os quais relatam que o alelo 1691A é raro em populações não-caucasóides.

A ausência do fator V Leiden tem sido relatada nos estudos realizados com populações negras de países da África tais como, Quênia, Senegal e Zâmbia (REES et al., 1995), Benin (PEPE et al., 1997), Zaire e Camarões (FRANCO et al., 1999).

Entretanto, conforme mostram os dados apresentados na Tabela 4.3.3, a presença desse polimorfismo tem sido descrita em negróides de países não africanos, tais como Estados Unidos, Inglaterra, Jamaica e Brasil.

Tabela 4.3.3. Frequências alélicas do polimorfismo 1691 G→A no gene do fator V em negróides de diferentes países.

local	N*	frequências alélicas		referência
		1691GG	1691GA	
Quênia	60	1,0	0	REES et al., 1995
Senegal	96	1,0	0	REES et al., 1995
Zâmbia	95	1,0	0	REES et al., 1995
Zaire e Camarões	97	1,0	0	FRANCO et al., 1999
E.U.A	650	0,993	0,007	RIDKER et al., 1997d
Londres/Afro-caribenhos	105	0,995	0,005	JEFFERY et al., 1996
Jamaica	165	0,994	0,006	WRIGHT et al., 1997
Antilhas	61	0,975	0,025	HELLEY et al., 1997
Brasil	137	0,996	0,004	ARRUDA et al., 1996
Brasil	163	1,0	0	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

Cabe salientar que os trabalhos WRIGHT et al. (1997) e HELLEY et al. (1997) foram realizados com indivíduos que apresentavam anemia falciforme ou traço falcêmico.

Nos Estados Unidos, vários trabalhos relatam a frequência do alelo 1691A em afro-americanos de diferentes estados: Connecticut, 0,007 (POTTINGER et al., 1996); Geórgia, 0,008 (DILLEY et al., 1998); Califórnia, 0,009 (GREGG et al., 1997); Pensilvânia, 0,002 (ROSE et al., 1998); Wisconsin, 0,008 (HESSNER et al., 1999).

Considerando-se a ausência desse polimorfismo nas populações negras africanas (região sub-Saara), pode-se supor que a presença do mesmo em negróides de outros países seja devido à miscigenação com caucasóides. Entretanto, cabe salientar que, quando consideramos cada país individualmente, o número de indivíduos africanos estudados é reduzido. Os países africanos são compostos por diferentes etnias, as quais foram originadas de diferentes tribos e que muitas vezes não se miscigenam entre si. Portanto, seria interessante estudar um número maior de indivíduos das principais etnias, para termos mais evidências da ausência desse polimorfismo em negros africanos.

No estudo realizado por REES et al. (1995) não foi detectada a presença do fator V Leiden no Oriente Médio, tendo sido estudados 45 indivíduos da Arábia Saudita. Posteriormente, DZIMIRI & MEYER (1996) estudaram 200 indivíduos sauditas, tendo encontrado que a frequência do alelo 1691A era de 0,0125.

AWIDI et al. (1999) estudaram 400 árabes jordanianos e a frequência do alelo 1691A foi 0,07. Em um estudo envolvendo 70 árabes de Israel, a frequência encontrada para o alelo 1691A foi 0,136, enquanto que nos judeus Ashkenazim (n = 139) foi 0,022 (ROSEN et al., 1999). Árabes de Israel já haviam sido estudados por SELIGSOHN & ZIVELIN (1997) e a frequência obtida para o alelo 1691A foi 0,07 (n = 411). Assim, a elevada frequência desse alelo em árabes observada no trabalho de ROSEN et al. (1999) pode ser devido ao número de indivíduos estudados.

Na Turquia, ÖZBEK & TANGÜN (1996) estudaram 120 indivíduos e encontraram uma frequência de 0,046 para o alelo 1691A.

HELLEY et al. (1997) detectaram um heterozigoto para o fator V Leiden entre os 44 indivíduos estudados de Maghreb (região da África que engloba Argélia, Mauritânia, Tunísia, Marrocos e Líbia), a frequência do alelo 1691A foi 0,011. CHAFA et al. (1997) identificaram um homozigoto para o fator V Leiden em um estudo envolvendo 75 argelianos (alelo 1691A = 0,013). Cabe salientar que as populações destes países africanos são compostas, principalmente, por árabes e berberes e não por negros.

No continente asiático, conforme a revisão de REES (1996), a ausência do fator V Leiden tem sido descrita no Japão, Coréia, Mongólia, Indonésia e China. Por outro lado, ARNUTTI et al. (1998) detectaram 2 heterozigotos para o fator V Leiden entre 14 indígenas tailandeses com trombose venosa, embora nenhum dos 114 indivíduos controles tenha apresentado esse polimorfismo.

Na região norte da Índia, a frequência encontrada foi 0,021 em um estudo com 70 indivíduos realizado por GOU et al. (1996) e de 0,019 no trabalho realizado por GAREWAL et al. (1997), estudando 130 indivíduos.

O fator V Leiden também foi encontrado no estudo de 156 indivíduos da Daguestão, sendo que a frequência do alelo 1691A foi 0,045 (REES, 1996). No Azerbaijão, a frequência do alelo 1691A foi 0,07, em um estudo envolvendo 43 indivíduos (GURGEY et al., 1998).

Do ponto de vista genético e evolutivo, uma das questões mais interessantes é sobre a origem do fator V Leiden.

Baseando-se na elevada frequência do fator V Leiden na Europa e na sua raridade em outras populações, REES et al. (1995) sugeriram que a mutação que ocasiona o fator V Leiden surgiu recentemente na Europa e se dispersou por migração para outros continentes. ZIVELIN et al. (1997) sugeriram que o fator V Leiden surgiu uma única vez há 21000-34000 anos.

A hipótese de uma única origem tem sido corroborada pelos estudos com haplótipos, os quais mostraram que o fator V Leiden segrega preferencialmente com um mesmo haplótipo (COX et al., 1996; ZIVELIN et al., 1997; ZÖLLER et al., 1997 e REES et al., 1998).

No trabalho de COX et al. (1996), foram estudados 12 homozigotos para o fator V Leiden e todos apresentaram o mesmo haplótipo, entretanto esse haplótipo era o mais frequente (69,5%) na população. O mesmo acontece no trabalho de ZÖLLER et al. (1997), os alelos que segregam com o fator V Leiden, nos 95 homozigotos estudados, eram os mais frequentes na população.

No trabalho de ZIVELIN et al. (1997), 88% dos cromossomos com o fator V Leiden segregavam com um mesmo haplótipo, os restantes segregavam com 4 outros haplótipos. Porém, esses autores sugerem que a segregação do fator V Leiden com outros haplótipos ocorre devido à recombinação.

No trabalho de REES et al. (1999) foram analisados dois homozigotos, procedentes do Dagestão e do Paquistão. Esses indivíduos apresentaram o mesmo haplótipo que os indivíduos estudados por COX et al. (1996), sendo que esse haplótipo apresenta uma

frequência de 64% na Ásia menor. REES et al. (1999) salienta que é improvável que existam múltiplas origens genéticas para o fator V Leiden na Europa e oeste da Ásia, mas a possibilidade de uma origem independente não pode ser excluída enquanto o mesmo for encontrado em indivíduos de outros grupos raciais.

Para explicar a presença dessa mutação em negros ou indianos, alguns autores consideram que houve mistura racial com colonizadores europeus, entretanto na população da Tailândia essa hipótese é descartada por ARNUTTI et al. (1998), pois esse país nunca foi colonizado por europeus.

Considerando que a mutação que causa o fator V Leiden (1691 G→A) ocorre em um dinucleotídeo CpG, um reconhecido "hot spot" de mutação em mamíferos, é difícil imaginar que a mesma tenha surgido uma única vez durante o processo evolutivo. Porém, se admitimos que houve vários eventos de mutação, como explicar a sua ausência em asiáticos da região leste e em negros africanos? Parece pouco provável que nestas populações a chance de mutação seja menor do que nos europeus e árabes.

Desde a sua descoberta, várias questões sobre valor adaptativo do fator V Leiden têm sido levantadas. Partindo do princípio de que fator V Leiden é fator de risco para trombose e que a mesma é deletéria, vários trabalhos consideram que o fator V Leiden conferiu alguma vantagem seletiva aos heterozigotos e que por isso a sua frequência é tão elevada (MAJERUS, 1994; REES et al., 1995; ZÖLLER et al., 1996; ZIVELIN et al., 1997). A hipótese da vantagem seletiva é reforçada pelo fato de que os dados da literatura referem que essa mutação teve uma única origem. Como já mencionado na Introdução desse trabalho, de modo geral, os autores sugerem que o fator V Leiden reduziria a perda de sangue, protegendo contra a hemorragia e, conseqüentemente, evitando a perda de ferro.

Assim, alguns pesquisadores investigaram a relação entre a presença do fator V Leiden e a diminuição de sangramento:

a) NICHOLS et al. (1996) sugeriram um efeito protetor do fator V Leiden em pacientes com hemofilia A. A presença do fator V Leiden foi investigada em 6 pacientes com hemofilia A. Dois pacientes apresentavam a mutação R1689C no gene do fator VIII, um deles apresentava nível de fator VIII menor do que 1% e não apresentava o fator V Leiden e o outro, cujo nível de fator VIII era 2%, apresentava simultaneamente o fator V Leiden. Os outros quatro pacientes apresentavam a mutação R2209Q no gene do fator VIII, um deles apresentava nível de fator VIII menor do que 1% e não apresentava o fator V Leiden. Os outros três apresentavam nível de fator VIII de 2%, e um deles apresentava o fator V Leiden.

Os autores sugeriram que a presença do fator V Leiden pode ser um determinante importante do fenótipo clínico em hemofílicos A.

Evidentemente, mesmo que acatemos os resultados obtidos por NICHOLS et al. (1996), estes não são por si só uma evidência de vantagem seletiva para portadores do fator V Leiden, pois apenas caracterizam uma melhor condição de sobrevivência para uma patologia rara como a hemofilia A, não podendo ser generalizada para os demais indivíduos da população que apresentam o fator V Leiden.

b) Os estudos *in vitro* realizados por van't VEER et al. (1997) mostraram que o fator V Leiden pode aumentar a formação de trombina em hemofílicos A severos.

c) LINDQVIST et al. (1998) investigaram 587 gestantes e mostraram que mulheres que apresentavam o fator V Leiden perdiam, em média, menor volume de sangue durante o parto e apresentavam menor frequência de anemia pós-parto. Estes autores sugeriram que o fator V Leiden confere vantagem seletiva aos seus portadores pela redução da perda de sangue no parto e, conseqüentemente, da perda de hemoglobina, ainda que o mesmo esteja associado com o aumento no risco de tromboembolismo pulmonar.

Em outro trabalho realizado por LINDQVIST et al. (1999), com um número elevado de gestantes ($n = 2470$), foram obtidos os seguintes resultados: 3,7% das mulheres com fator V Leiden perderam mais de 600 ml de sangue durante o parto, enquanto que no grupo sem o fator V Leiden a frequência de mulheres que perderam esse volume de sangue foi 7,9% ($P = 0,02$). Entretanto, a frequência de anemia pós-parto foi similar nos dois grupos, 6% nas mulheres com fator Leiden e 6,8% nas outras ($P = 0,6$). Esses autores salientam que em tempos primitivos a hemorragia durante o parto era geralmente letal e a redução da sua frequência em mulheres com o fator V Leiden deve ter conferido uma vantagem de sobrevivência, contribuindo, assim, para aumentar a frequência do fator V Leiden.

Quando os autores sugerem que o fator V Leiden confere vantagem seletiva pela diminuição de sangramento, a redução da anemia sempre é ressaltada como um fator extremamente importante (REES et al., 1995; LINDQVIST et al., 1998). Entretanto, no trabalho de LINDQVIST et al. (1999) não há redução da frequência de anemia nas mulheres que apresentavam o fator V Leiden. Assim, considerando a situação de gravidez, a hipótese restante para explicar a vantagem seletiva do fator V Leiden seria a redução da mortalidade materna por hemorragia.

Porém, as principais causas de morte materna por hemorragia envolvem outras situações patológicas, tais como: placenta abrupta, placenta prévia, atonia uterina e retenção

de placenta. Assim, deve-se investigar se nestas situações patológicas a presença do fator V Leiden é capaz de diminuir o sangramento, evitando a morte materna. Por outro lado, a presença do fator Leiden está associada com o aumento do risco de placenta abrupta, pré-eclampsia e retardo de crescimento fetal (KUPFERMINC et al., 1999).

Além disso, se a presença do fator V Leiden está associado com a redução da mortalidade materna por hemorragia, seria esperado que, de modo geral, nos países onde a frequência do mesmo é elevada houvesse uma redução da mortalidade materna por hemorragia. Na Suécia, onde a frequência do fator V Leiden é 5%, 19% das mortes maternas foram por hemorragia no período de 1980 a 1988 (HÖGEBERG et al., 1994). Enquanto que nos Estados Unidos (Utah), a frequência de morte materna por hemorragia foi 13% no período de 1983 a 1993 (JACOB et al., 1998), sendo que a frequência do fator V Leiden neste estado é 2,1% (DIZON-TOWSON et al., 1997). Obviamente, esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois não há dados, nos trabalhos citados, sobre a incidência das patologias acima mencionadas e que ocasionam hemorragias. Também devemos considerar que as condições de atendimento médico às gestantes podem ser diferentes nos dois países.

O ideal seria realizar um estudo controlado para verificar a existência de diferença na frequência de mortalidade materna por hemorragia entre as mulheres com e sem fator V Leiden.

Com relação à presença do fator V Leiden e gestação, não podemos deixar de mencionar que a presença do mesmo é um fator de risco para trombose venosa e embolia pulmonar durante a gravidez. A frequência de trombose venosa associada à gestação varia de 1/500 à 1/2500 gestações e a taxa de mortalidade materna por tromboembolismo pulmonar é 1/100.000, nos Estados Unidos (ROUSE et al., 1997).

A frequência de mortalidade materna por embolia parece seguir o padrão esperado, ou seja, maior frequência nos países onde o fator V Leiden é mais frequente. Na Suécia, 31% das mortes maternas foram por embolia (HÖGEBERG et al., 1994), enquanto que em Utah (EUA) a frequência foi 16% (JACOB et al., 1998).

Por outro lado, além de aumentar o risco de trombose durante a gestação, o fator V Leiden está associado com abortos de repetição. O trabalho realizado por BRENNER et al. (1999) mostrou que 32% das mulheres com perda fetal recorrente apresentavam o fator V Leiden, enquanto que no grupo controle a frequência foi 10%. Entretanto, não existem dados na literatura que indiquem especificamente o quanto a presença do fator V Leiden interfere na fertilidade feminina.

Os dados mencionados acima parecem ser contraditórios, por um lado é levantada a hipótese de que o fator V Leiden protegeria as mulheres de morte por hemorragia no parto, por outro lado, o fator V Leiden aumenta o risco de morte por embolia pulmonar e está associado com abortos de repetição, o que poderia causar a diminuição do valor adaptativo das mulheres. Embora alguns autores utilizem os termos vantagem e desvantagem seletiva, nenhum trabalho calcula o valor adaptativo do Fator V Leiden.

Ao revisar os trabalhos da literatura, alguns dados, mencionados abaixo, levam a questionar sobre a necessidade de justificar a frequência do fator V Leiden pela vantagem seletiva, e nos levam a cogitar a hipótese de um polimorfismo neutro:

a) A principal doença associada a esse polimorfismo é a trombose venosa, a qual é uma doença multifatorial. Assim, nem todos os indivíduos que apresentam o fator V Leiden, mesmo em homozigose, desenvolvem trombose. EMMERICH et al. (1997) estudaram 36 homozigotos para o fator V Leiden, a maioria destes indivíduos eram familiares de probandos previamente identificados. Destes, 31 (86%) tiveram episódios de TVP, sendo que a idade média foi 38 ± 16 anos. Exceto 2 pacientes, os demais apresentaram outro fator de risco circunstancial (cirurgias, imobilização, contraceptivos orais, gravidez) para TVP. Entre os 36 homozigotos, 16 pacientes vivenciaram mais de uma situação de risco (cirurgias, imobilização, contraceptivos orais) sem terem apresentado trombose, mesmo sem profilaxia. Oito das 16 mulheres homozigotas deram a luz sem complicações entre as idades de 19 e 37 anos.

Os fatores circunstanciais de risco, como anticoncepcional oral, cirurgias e imobilização não faziam parte da vida do homem primitivo, portanto não atuavam concomitantemente com o fator V Leiden no desenvolvimento da trombose.

b) Outro ponto importante é a idade de manifestação da trombose. No estudo realizado por EHRENFORTH et al. (1999), envolvendo 38 homozigotos e 195 heterozigotos para o fator V Leiden, a idade média de manifestação nos heterozigotos foi 32 anos (amplitude 18-45) e dos homozigotos foi 28 anos (amplitude 18-41).

Se no homem primitivo a idade de manifestação da trombose fosse a mesma do homem atual, muitos poucos indivíduos seriam afetados por essa patologia, visto que a expectativa de vida era 30 anos. Estudos demográficos das populações de caçadores-coletores contemporâneas, tais como !Kung e Aché mostram que no passado a expectativa de vida ao nascimento era de 30 anos (LEE, 1997). Atualmente, nos Estados Unidos, a expectativa de vida é 79 anos (LEE, 1997).

Nos índios Xavantes (população de caçadores-coletores) a idade reprodutiva média para as mulheres foi 22,4 anos \pm 6,9 anos (amplitude 11-38) e nos homens foi 32,4 anos \pm 9,2 anos (amplitude 17-62). Nas mulheres, a taxa de fertilidade é maior dos 15 aos 19 anos e nos homens dos 25 aos 45 anos (SALZANO, F.M., comunicação pessoal). Nas tribos Aché e !Kung a idade materna no primeiro filho é 17 e 19 anos respectivamente (HILL & HURTADO, 1996).

Estendendo esses dados para as populações humanas primitivas e considerando que a idade de manifestação da trombose fosse a mesma do homem atual, pode-se supor que a trombose afetaria os seres humanos, principalmente, no período pós-reprodutivo.

d) A longevidade parece ser independente da presença do fator V Leiden. BLADBJERG et al. (1999) investigaram a presença do fator V Leiden em 187 centenários dinamarqueses, sendo que as freqüências genotípicas no grupo de centenários foram similares as do grupo controle (doadores de sangue), tendo sido detectado dois homozigotos em ambos os grupos. Resultados similares foram obtidos por MARI et al. (1996) num estudo com 124 centenários italianos e por HEIJMANS et al. (1998) num estudo com 660 idosos holandeses com idade igual ou superior a 85 anos.

Os resultados por HEIJMANS et al. (1998) indicam que o fator V Leiden não aumenta a taxa de mortalidade da população. Resultados similares também foram obtidos por HILLE et al. (1997), os quais investigaram a taxa de mortalidade e as causas de morte nos pais (86 mães e 85 pais) de indivíduos que apresentavam o fator V Leiden. A idade média da morte foi 70 anos (amplitude 33 a 96 anos), sendo que taxa de mortalidade foi similar a da população holandesa.

Portanto, analisando em conjunto todos os dados mencionados acima e enquanto o valor adaptativo para o fator V Leiden não for calculado, parece prematuro tentar justificar a elevada freqüência do fator V Leiden através da hipótese de vantagem seletiva, sendo também prematuro afirmar que o mesmo seja um polimorfismo neutro. Ambas as hipóteses devem ser analisadas e questionadas.

4.3.1.2. Polimorfismo 1691G→A em pacientes com trombose venosa

Em nosso estudo, 25 dos 121 pacientes com TVP eram heterozigotos para esse polimorfismo, não tendo sido encontrado nenhum homozigoto 1691AA. Assim, a frequência de heterozigotos 1691GA no grupo de pacientes foi 0,207, enquanto que na amostra controle foi 0,047 ($\chi^2_c = 16,65$; GL = 1; $P \ll 0,001$). Portanto, como já era esperado devido aos relatos da literatura, esse polimorfismo é um importante fator de risco genético para a ocorrência de TVP (OR = 5,33; IC 95% = 2,3-12,3; $P \ll 0,001$).

Entre os 25 pacientes que apresentaram o fator V Leiden, 4 apresentaram outro fator genético de risco para trombose, 3 eram heterozigotos para o polimorfismo no gene da protrombina (20210GA) e um apresentou deficiência de proteína S. Excluindo esses 4 pacientes da análise, a "Odds Ratio" obtida continuou sendo significativa (OR = 4,48; IC 95% = 1,91-10,5; $P \ll 0,001$).

Entre os 21 pacientes heterozigotos 1691GA, informações sobre fatores de risco adquiridos (cirurgias, imobilização, uso de anticoncepcional oral, gestação, puerpério) foram obtidas de 18 pacientes, sendo que 12 (67%) apresentaram um fator de risco adquirido na época da TVP. Esse nosso resultado está de acordo com o descrito na literatura, pois no trabalho de ZÖLLER et al. (1994), 58% dos 43 heterozigotos 1691GA e no trabalho de LEROYER et al. (1997) 71% dos 24 heterozigotos 1691GA também apresentaram fator de risco adquirido.

A idade média da ocorrência de trombose nos pacientes heterozigotos 1691GA foi $37,5 \pm 14,5$ anos (amplitude 22-67 anos). Esse dado está de acordo com o encontrado em outros trabalhos, 36 anos (amplitude 18-71 anos) no trabalho de ZÖLLER et al. (1994), 37 ± 24 anos no estudo realizado por LEROYER et al. (1997) e 37 ± 15 anos (amplitude 15-80 anos) no trabalho de MARTINELLI et al. (1998).

Embora, a idade média da ocorrência de trombose no grupo de mulheres heterozigotas 1691GA ($35,07 \pm 13,2$ anos) tenha sido inferior a idade média dos homens heterozigotos 1691GA ($41,37 \pm 16,36$ anos), essa diferença não foi significativa. No trabalho realizado por ZÖLLER et al. (1994) essa tendência foi observada, mas o resultado também não foi significativo. Entretanto, no trabalho de TOSETTO et al. (1998) a idade média das mulheres (31,8 anos) foi, significativamente, menor do que a dos homens (39,6 anos). No estudo de EMMERICH et al. (1997), realizado com indivíduos homozigotos para o fator V Leiden, a

idade média de trombose nas mulheres (33 ± 14 anos) também foi, significativamente, menor do que a dos homens (43 ± 16 anos).

Como mencionado anteriormente, uma possível explicação para a diferença na idade média de ocorrência de trombose entre os sexos é a presença de alterações hormonais nas mulheres, essa mesma hipótese também foi levantada por EMMERICH et al. (1997). De fato, o uso de ACO e a gestação são fatores de risco independentes para a trombose e a sua associação com fatores genéticos tende a desencadear essa doença mais precocemente.

No presente trabalho, 67% das mulheres heterozigotas 1691GA e 74% das mulheres sem fator de risco genético, tiveram trombose associada à gestação ou ao uso de ACO, porém essa diferença não foi significativa. Entretanto, no trabalho realizado por STEFANO et al. (1999), essa diferença foi significativa e no sentido contrário aos nossos dados: 78% das heterozigotas 1691GA e 50% das mulheres sem fator de risco genético ($\chi^2 = 12,9$; GL = 1; $P \ll 0,001$). Uma possível explicação para essa discrepância entre os resultados é o menor número de mulheres em nossa amostra, 13 mulheres heterozigotas 1691GA e 31 no grupo sem fator de risco genético, enquanto que no referido trabalho foram estudadas, respectivamente, 61 e 163 mulheres.

Sobre o risco de trombose em mulheres que apresentam fator V Leiden e usam ACO, é interessante mencionar o trabalho de SCHAMBECK et al. (1997), neste trabalho foram estudados dois grupos de mulheres que usam ACO, as que apresentaram trombose venosa ($n = 101$) e as que não tiveram trombose venosa (grupo controle, $n = 101$). A frequência do fator V Leiden foi 35% no grupo com trombose e 8% no grupo controle (OR = 4,9; IC95% = 2,0-11,7; $P \ll 0,001$). No trabalho de MARTINELLI et al. (1999), foi relatado que o risco de trombose aumenta 4 vezes nas mulheres que usam ACO e apresentam o fator V Leiden (OR = 20; IC95% = 4,2-894,3), enquanto que nas mulheres que usam ACO e não apresentam o fator V Leiden a "odds ratio" é 4,6 (IC 95% = 2,6-8,0). Assim, esses dados evidenciam, a interação entre fatores de risco genéticos e ambientais no desenvolvimento da trombose.

MARTINELLI et al. (1998) investigaram a ocorrência de trombose em 200 indivíduos com fator V Leiden, 10% dos homens e 23% das mulheres com fator V Leiden tiveram trombose, essa diferença foi tangencial à significância ($\chi^2 = 3,67$; GL = 1; $P = 0,055$). Entretanto, esse resultado é sugestivo de que as mulheres heterozigotas para o fator V Leiden são mais suscetíveis à trombose, e conforme os dados acima citados, as alterações hormonais podem ser responsáveis por esse aumento de suscetibilidade.

4.3.2. Sobre o polimorfismo 4070A→G

4.3.2.1. Polimorfismo 4070A→G na população em geral

Esse polimorfismo ocorre devido a uma mutação A→G no nucleotídeo 4070 (exon 13) do gene do fator V e ocasiona a troca do aminoácido histidina por uma arginina na posição 1299 do fator V. O alelo R2 (nucleotídeo guanina, aminoácido arginina) está associado com níveis mais baixos de fator V (LUNGHI et al., 1996) e com trombose venosa, pois também causa resistência à proteína C ativa (BERNARDI et al., 1997; ALHENC-GELAS et al., 1999a).

A Tabela 4.3.4 mostra as freqüências genotípicas e alélicas, obtidas no presente trabalho, para o polimorfismo 4070 A→G, nos grupos de indivíduos normais, segundo o grupo étnico, e de pacientes com TVP.

Nos grupos de indivíduos normais, caucasóides e negróides, as freqüências genotípicas estão distribuídas de acordo com o esperado para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas freqüências alélicas entre os grupos negróides e caucasóides não foram significativas ($\chi^2 = 0,336$; GL = 1; P = 0,562). A ausência de diferenças entre estes grupos étnicos também foi relatada no trabalho de BERNARDI et al. (1997), os quais estudaram 40 somalis e a freqüência de indivíduos que apresentavam o alelo R2 (0,08) foi a mesma da observada nos italianos.

Tabela 4.3.4. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo 4070 A→G no gene do fator V nos grupos estudados.

grupo	N*	freqüências genotípicas			freqüências alélicas	
		R1R1	R1R2	R2R2	R1	R2
Negróides	70	0,871	0,129	0	0,936	0,064
Caucasóides	118	0,839	0,161	0	0,920	0,080
Pacientes	120	0,825	0,158	0,017	0,904	0,096

*: número de indivíduos estudados

Com relação aos caucasóides, a frequência do alelo R2 (0,08) no presente trabalho a mesma encontrada por BERNARDI et al. (1997) em italianos.

4.3.2.2. Polimorfismo 4070A→G em pacientes com trombose venosa

No grupo de pacientes com trombose venosa profunda, as frequências genótípicas, para esse polimorfismo, distribuem-se de acordo com o previsto para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas frequências dos genótipos entre o grupo controle e o grupo de pacientes com TVP não foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 1,98$; GL = 2; P = 0,371). Assim como não foram estatisticamente significativas as diferenças nas frequências alélicas ($\chi^2 = 0,34$; GL = 1; P = 0,556). Portanto, esses resultados indicam que esse polimorfismo não está associado com TVP.

Também não encontramos associação, quando a comparação foi realizada entre os subgrupos de pacientes e seus respectivos controles. No subgrupo FGRI (pacientes com fator genético de risco identificado) os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 1,98$; GL = 2; P = 0,159 para as frequências genótípicas e $\chi^2 = 1,81$; GL = 1; P = 0,178 para as frequências alélicas. No subgrupo FGRNI (pacientes que não tiveram o fator genético de risco identificado), os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 3,27$; GL = 2; P = 0,195 para as frequências genótípicas e $\chi^2 = 3,041$; GL = 1; P = 0,081 para as frequências alélicas.

Assim, em nossos dados não foi encontrada associação entre esse polimorfismo e trombose venosa e, também, a presença desse polimorfismo não aumentou o risco de trombose nos indivíduos que já apresentavam um fator de risco genético para TVP.

Os nossos resultados corroboram os obtidos por BERNARDI et al. (1997) e CAM-DUCHEZ et al. (1999) os quais relataram que o alelo R2 não era fator de risco para trombose venosa. Entretanto, são contraditórios aos obtidos por ALHENC-GELAS et al. (1999a), os quais indicam que a presença do alelo R2 é um fator de risco para trombose venosa.

ALHENC-GELAS et al. (1999a) realizaram um estudo envolvendo 205 pacientes com TVP e 394 controles. O alelo R2 foi mais frequente no grupo de pacientes (0,095) do que no grupo controle (0,058), OR = 1,8 (IC 95% = 1,1-2,8; P = 0,02). Após a exclusão dos pacientes com outras alterações genéticas que predisõem à trombose (fator V Leiden, mutação 20210

G→A no gene da protrombina, deficiência de proteína C ou S), a presença do alelo R2 mostrou ser um fator de risco independente para TVP (OR = 2,0; IC 95% = 1,2-3,5; P = 0,01).

Por outro lado, os resultados obtidos por FAIONI et al. (1999) sugerem que a presença do alelo R2 não é um fator de risco independente para trombose, porém a presença do mesmo aumenta em 3 vezes o risco de trombose nos indivíduos que apresentam o fator V Leiden. Estes autores estudaram 839 familiares de indivíduos com trombose venosa e que apresentavam pelo menos uma alteração genética que predispõe a trombose. Nenhum dos 42 indivíduos que apresentavam somente o alelo R2 teve trombose. Porém, 18% dos 22 indivíduos que apresentavam concomitantemente o alelo R2 e o fator V Leiden tiveram trombose. O risco relativo de trombose para a presença somente do fator V Leiden foi 4,2 (IC 95% = 1,5-11,3), enquanto que para a presença do fator V Leiden juntamente com a do alelo R2 foi 10,9 (IC 95% = 2,9-40,6).

Os resultados obtidos por CAM-DUCHEZ et al. (1999) mostraram que a presença do alelo R2 não aumenta o risco de trombose em pacientes com fator V Leiden. Neste trabalho foram estudados 370 indivíduos pertencentes a 43 famílias, sendo que 209 indivíduos apresentavam o fator V Leiden. Entre os indivíduos que apresentavam fator V Leiden, 80 tiveram episódios de trombose e a frequência do alelo R2 nesse subgrupo foi 0,04, tendo sido obtida a mesma frequência do alelo R2 no subgrupo de indivíduos que apresentavam o fator V Leiden e que não tiveram trombose (n = 129). Para explicar a falta de associação, estes autores sugerem que o número de indivíduos que apresentaram os dois genótipos (fator V Leiden e alelo R2) foi muito pequeno, e propõem que outros trabalhos sejam realizados com um número maior de indivíduos.

4.4. Sobre o polimorfismo no gene da Protrombina

4.4.1. Polimorfismo 20210 G→A na população em geral

Esse polimorfismo ocorre devido a uma mutação no nucleotídeo 20210 G→A, na região 3' não-traduzida do gene da protrombina, estando relacionado com o aumento plasmático desta proteína, os indivíduos que apresentam o alelo 20210A têm nível mais elevado de protrombina (POORT et al., 1996).

A Tabela 4.4.1 mostra as freqüências genotípicas e alélicas, obtidas no presente trabalho, para o polimorfismo 20210 G→A, nos grupos de indivíduos normais, segundo o grupo étnico, e de pacientes com TVP.

Tabela 4.4.1. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo 20210 G→A no gene da protrombina nos grupos estudados.

grupo	N*	freqüências genotípicas			freqüências alélicas	
		20210 GG	20210 GA	20210 AA	20210 G	20210 A
Negróides	146	0,986	0,014	0	0,993	0,007
Caucasóides	278	0,989	0,011	0	0,995	0,005
Paciente	121	0,909	0,091	0	0,955	0,045

*: número de indivíduos estudados

Nos grupos de indivíduos normais, caucasóides e negróides, as freqüências genotípicas estão distribuídas de acordo com o esperado para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para tornar mais compreensível algumas análises realizadas e que serão abordadas mais adiante, as diferentes populações européias estudadas foram separadas de acordo com a localização do país de origem, norte ou sul, em relação ao paralelo 50°N. A Tabela 4.4.2 mostra as freqüências alélicas obtidas nos países do sul da Europa e a Tabela 4.4.3 as dos países do norte.

As freqüências alélicas obtidas nas diferentes populações caucasóides estudadas não são homogêneas ($\chi^2 = 45,83$; GL = 17; P << 0,001), como pode ser observado nas Tabelas 4.4.2 e 4.4.3, existem diferenças significativas nas freqüências alélicas obtidas nos diversos países e também, dentro de um mesmo país, como no caso da Espanha.

As freqüências alélicas obtidas nos 4 estudos realizados na Espanha não foram homogêneas ($\chi^2 = 8,89$; GL = 3; P = 0,03), sendo que as freqüências extremas para o alelo 20210A foram encontradas em Múrcia (0,007) e em Barcelona (0,032).

SOUTO et al. (1998) salientaram que a região de Barcelona recebeu muitos imigrantes de outros locais da Espanha entre 1950 e 1975 e que, devido a essa heterogeneidade genética, os resultados obtidos podem ser extrapolados para a população espanhola em geral.

Tabela 4.4.2. Frequência alélica do polimorfismo 20210 G→A no gene da protrombina em caucasóides de diferentes países da região sul da Europa.

local	N*	frequências alélicas		referência
		20210 G	20210 A	
França (Paris e Ruen)	400	0,986	0,014	ALHENC-GELAS et al., 1999
França (Brest)	400	0,995	0,005	LEROYER et al., 1998
Áustria (Viena)	102	0,990	0,010	WATZKE et al., 1997
Áustria (Viena)	96	0,974	0,026	LALOUSHEK et al., 1998
Hungria	407	0,987	0,013	BALOGH et al., 1999
Itália (Milão)	416	0,989	0,011	CATTANEO et al. 1997
Itália (Nápoles)	850	0,977	0,023	MARGAGLIONI et al., 1998
Espanha (Oviedo)	200	0,983	0,017	VARGAS et al., 1999
Espanha (Pamplona)	304	0,979	0,021	ZABALEGUI et al., 1998
Espanha (Barcelona)	201	0,968	0,032	SOUTO et al., 1998
Espanha (Múrcia)	291	0,993	0,007	CORRAL et al., 1997

*: número de indivíduos analisados

A distribuição das frequências alélicas foi mais homogênea nos países da região norte da Europa ($\chi^2 = 5,62$; GL = 6; P = 0,467), do que nos países da região sul ($\chi^2 = 25,62$; GL = 10; P = 0,004). Mesmo assim, chama a atenção os resultados obtidos nos dois estudos realizados na Inglaterra, onde o alelo 20210A apresentou uma grande variação.

Tabela 4.3.7. Freqüências alélicas do polimorfismo 20210 G→A no gene da protrombina em caucasóides de diferentes países do norte da Europa.

local	N*	freqüências alélicas		referência
		20210 G	20210 A	
Islândia	108	0,995	0,005	ÓLAFSSON et al., 1998
Dinamarca	608	0,995	0,005	de MAAT et al., 1997
Suecia	282	0,991	0,009	HILLARP et al., 1997
Escócia	224	0,989	0,011	McCOLL et al., 1999
Inglaterra	508	0,987	0,013	BROWN et al., 1997
Inglaterra	164	0,994	0,006	CUMMING et al., 1997
Holanda	474	0,988	0,012	POORT et al., 1996

*: número de indivíduos analisados

ROSENDAAL et al. (1998) relatam a existência de um gradiente norte-sul, na Europa (incluindo judeus de Israel), com relação à distribuição do alelo 20210A. Nas cidades ao norte da latitude de 50°N (considerando os dados obtidos em Malmö, Manchester, Sheffield, Amsterdam e Leiden) a prevalência total de heterozigotos foi 1,7% e nas cidades localizados ao Sul de 50°N (considerando os dados obtidos em Paris, Viena, Ferrara e Tel Aviv) a prevalência foi 3%, essa diferença foi significativa ($\chi^2 = 9,05$; GL = 1; P = 0,003). Esse gradiente é inverso ao proposto para o fator V Leiden, uma vez que a freqüência do fator V Leiden é maior nas populações do norte da Europa.

Seguindo a metodologia de ROSENDAAL et al. (1998), analisamos os dados citados nas Tabelas 4.4.2 e 4.4.3, para tanto, agrupamos as populações de acordo com a localização, norte ou sul, considerando a latitude de 50°N como limite. Assim, nessa análise foram incluídos 2.364 indivíduos pertencentes à região norte da Europa e 3.657 indivíduos pertencentes à região sul. O alelo 20210A foi, significativamente, mais freqüente na região sul (A = 0,016) do que na região norte (A = 0,010) da Europa, ($\chi^2 = 6,96$; GL = 1; P = 0,008).

Com relação à existência do gradiente norte-sul, alguns outros aspectos devem ser mencionados: a) o número total de indivíduos estudados é menor no norte da Europa; b) o número de trabalhos que estudaram populações caucasóides do norte da Europa é menor do que os que estudaram populações do sul.

Com relação aos negróides, além do presente trabalho, dois outros estudos investigaram a presença desse polimorfismo nesse grupo étnico no Brasil. No trabalho de ANDRADE et al.

(1998) foram estudados 137 indivíduos negróides, e a frequência do alelo 20210A obtida foi 0,001, enquanto que no trabalho de FRANCO et al. (1998) a presença do alelo A não foi detectada num grupo de 52 indivíduos negróides.

Nos Estados Unidos, HOWARD et al. (1998) estudaram 52 afro-americanos e relatam a ausência do alelo 20210A nesse grupo étnico. Da mesma forma, os trabalhos de FRANCO et al. (1998) e REES et al., estudando, respectivamente, 60 e 389 africanos, relatam a ausência do alelo 20210A nesta etnia.

Considerando os dados citados acima, pode-se inferir que a presença de heterozigotos 20210GA obtida na nossa amostra negróide (0,014) seja devido à miscigenação com caucasóides. De fato, conforme BORTOLINI (1999), as populações afro-brasileiras apresentam 27% a 59% de genes não-africanos (europeus e/ou ameríndios).

Ainda sobre esse polimorfismo em diferentes grupos étnicos, REES et al. (1999) salientaram que a presença do alelo 20210A é rara em populações não-europeias, pois dentre os 158 indianos estudados, foi encontrado somente um heterozigoto e nenhum heterozigoto foi detectado entre 365 indivíduos da Australásia e 604 indivíduos do sudeste e centro asiáticos. Estes pesquisadores também não detectaram o alelo 20210A em 122 índios brasileiros, nem entre 78 nativos da América (Nuu-Chah-Nulth e Huicholes mexicanos). A ausência desse alelo em indígenas brasileiros também foi relatada por FRANCO et al. (1998) em um estudo envolvendo 148 indivíduos pertencentes a 5 tribos amazônicas.

Considerando todos esses dados, é lógico supor que esse polimorfismo é restrito ao grupo caucasóide. Entretanto, cabe salientar que o número de indivíduos não-caucasóides estudados, considerando os trabalhos de FRANCO et al. (1998), HOWARD et al. (1998), RAHIMY et al. (1998) e REES et al. (1999), foi 2.188, enquanto que em relação aos caucasóides, somente no trabalho de ROSENDAAL et al. (1998) foram estudados 4.624 indivíduos.

Estudando judeus de diferentes grupos étnicos, ZIVELIN et al. (1998) relataram a ausência do alelo 20210A nos 177 judeus da Etiópia estudados e as seguintes frequências para esse alelo nos outros grupos, 0,033 nos Ashkenazim ($n = 464$), 0,028 nos Sepharadim do norte da África ($n = 273$), 0,020 nos judeus do Iraque ($n = 247$), 0,010 nos judeus do Irã ($n = 199$), 0,005 nos judeus do Iêmen ($n = 310$).

Nesse mesmo trabalho, ZIVELIN et al. (1998) caracterizaram o haplótipo com o qual segrega o alelo 20210A e sugerem que esse polimorfismo tenha se originado de uma única

mutação que ocorreu após a divergência dos caucasóides a partir das subpopulações mongolóides.

REES et al. (1999) sugeriram que essa mutação ocorreu uma única vez, relativamente cedo na colonização moderna da Europa, e foi dispersa pela migração associada com a agricultura a cerca de 10.000 anos atrás.

4.4.2. Polimorfismo 20210 G→A em pacientes com trombose venosa

Em nosso estudo, 12 dos 121 pacientes com TVP eram heterozigotos para esse polimorfismo, não tendo sido encontrado nenhum homozigoto 20210AA Assim, a frequência de heterozigotos no grupo de pacientes foi 0,091, enquanto que na amostra controle foi 0,011 ($\chi^2 = 13,70$; GL = 1; $P \ll 0,001$). Portanto, como já era esperado devido aos relatos da literatura, esse polimorfismo é um importante fator de risco genético para a ocorrência de TVP (OR = 9,1; IC 95% = 2,5-33,49; $P \ll 0,001$).

Entre os 12 pacientes heterozigotos 20210GA, 3 apresentaram outro fator genético de risco para trombose, a saber, o fator V Leiden. Entretanto, mesmo quando esses três pacientes são excluídos da comparação, a "Odds Ratio" obtida permaneceu significativa (OR = 6,67; IC 95% = 1,7-33,25; $P = 0,005$).

Considerando os indivíduos heterozigotos 20210GA, a idade média de ocorrência da trombose foi 32,7 anos \pm 12,7 anos (amplitude 17 a 52 anos). Esse nosso dado é similar às idades médias obtidas em outros trabalhos, 38 anos (MARGAGLIONE et al., 1998), 30 anos (MARTINELLI et al., 1999), 30,5 anos (FERRARESI et al., 1997). Esses dados são contrastantes aos obtidos no trabalho realizado por HILLARP et al. (1997), no qual todos os heterozigotos 20210GA tiveram trombose após os 60 anos, porém a média de idade dos pacientes nesse trabalho foi 64 anos (amplitude 21-89).

No presente trabalho, cinco pacientes eram do sexo feminino e destas, 4 (80%) tiveram trombose associada a alterações hormonais, 3 por uso de anticoncepcional oral e 1 no período pós-parto. Esse dado foi similar aos obtidos por SALOMON et al. (1999), entre as 21 mulheres heterozigotas 20210GA, 86% tiveram trombose associada a alterações hormonais, por SOUTO et al. (1998), 6 das 10 pacientes heterozigotas 20210GA estavam fazendo uso de

anticoncepcional oral quando tiveram a trombose e por MARTINELLI et al. (1999), 75% das 14 pacientes heterozigotas usavam anticoncepcional oral.

A idade média de ocorrência da trombose foi $44 \pm 9,3$ anos (amplitude 31 a 52 anos) nos homens heterozigotos 20210GA, enquanto que nas mulheres heterozigotas 20210GA, a idade média foi $22,3 \pm 5$ anos (amplitude 17 a 30 anos). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($t = -3,84$; $P = 0,018$). Essa mesma tendência foi observada nos pacientes heterozigotos para o fator V Leiden, e como já mencionado, pode estar relacionado com os fatores hormonais.

No trabalho realizado por MARTINELLI et al. (1999), o risco de trombose em mulheres que usam ACO e que são heterozigotas 20210GA foi 16,3 (IC 95% = 3,4-79,1), enquanto que nas mulheres que não apresentam o alelo 20210A e usam ACO o risco foi 4,6 (IC 95% = 2,6-8,0).

4.5. Sobre os polimorfismos no gene do fator VII

4.5.1. Sobre o polimorfismo R353Q

4.5.1.1. Polimorfismo R353Q na população em geral

A Tabela 4.5.1 mostra as frequências genótípicas e alélicas obtidas para o polimorfismo R353Q nos grupos de indivíduos normais, segundo o grupo étnico, e em pacientes com TVP. Como já mencionado, esse polimorfismo é causado pela troca de uma arginina (alelo R) por uma glutamina (alelo Q) no aminoácido 353 do fator VII.

Nos grupos de indivíduos normais, em ambas as etnias, a distribuição dos genótipos para o polimorfismo R353Q está de acordo com a prevista para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4.5.1. Frequência do polimorfismo R353Q no gene do fator VII nos grupos estudados.

grupo	N*	frequências genótípicas			frequências alélicas	
		R/R	R/Q	Q/Q	R	Q
Negróides	84	0,680	0,320	0	0,840	0,160
Caucasóides	120	0,675	0,290	0,035	0,821	0,179
Pacientes	119	0,798	0,194	0,008	0,895	0,105

*: número de indivíduos estudados

As diferenças nas frequências genótípicas e alélicas entre os grupos caucasóides e negróides não foram estatisticamente significativas, respectivamente, $\chi^2 = 2,90$; GL = 2; P = 0,229 e $\chi^2 = 0,42$; GL = 1; P = 0,627. A ausência de diferença entre caucasóides e negróides também foi observada por de MAAT et al. (1997) em um estudo envolvendo europeus (dinamarqueses e holandeses) e afro-caribenhos. Entretanto, as frequências alélicas obtidas no grupo negróide do presente trabalho foram diferentes quando comparadas com as obtidas no grupo de afro-caribenhos, alelo R = 0,914 e alelo Q = 0,086 ($\chi^2_c = 4,12$; GL = 1; P = 0,042).

O trabalho realizado por de MAAT et al. (1997) envolveu outras populações, além de europeus e afro-caribenhos, também foram estudados indianos e Inuits (nativos da Groenlândia). As frequências obtidas para o alelo R foram, 0,901 nos europeus, 0,914 nos afro-caribenhos, 0,742 nos indianos e 0,710 nos Inuits. As frequências obtidas nos europeus e afro-caribenhos foram, significativamente, diferentes das obtidas nos Inuits e indianos.

As frequências alélicas obtidas nos caucasóides do presente trabalho e as obtidas em outras populações não estão distribuídas de forma homogênea ($\chi^2 = 15,75$; GL = 8; P = 0,046), conforme mostram os dados da Tabela 4.5.2. As frequências alélicas da nossa população foram diferentes das obtidas nas populações de noruegueses ($\chi^2 = 11,11$; GL = 1; P << 0,001) e de irlandeses ($\chi^2 = 6,66$; GL = 1; P = 0,01) e semelhantes às obtidas nas demais populações.

Tabela 4.5.2. Frequência alélica do polimorfismo R353Q no gene do fator VII em diferentes populações caucasóides.

amostra	N*	frequências alélicas		referência
		R	Q	
noruegueses	136	0,915	0,085	BERNARDI et al., 1997
poloneses	99	0,869	0,131	HANAULT et al., 1997
irlandeses	142	0,894	0,106	LANE et al., 1996
franceses	90	0,875	0,125	BERNARDI et al., 1997
ingleses	175	0,871	0,129	HEYWOOD et al., 1997
holandeses	94	0,883	0,117	BERNARDI et al., 1997
italianos	99	0,849	0,151	BERNARDI et al., 1997
espanhóis	318	0,855	0,145	BERNARDI et al., 1997
brasileiros	120	0,821	0,179	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

Portanto, os dados obtidos no nosso trabalho e os da literatura indicam diferenças nas frequências desse polimorfismo não só entre os grupos étnicos, mas também entre os caucasóides de diferentes países.

BERNARDI et al. (1997) sugeriram a existência de um gradiente norte-sul na distribuição do alelo Q na Europa. Como pode ser observado na Tabela 4.5.2, a frequência do alelo Q aumentou de 0,085 no norte da Europa (Oslo, Noruega) até valores de 0,145 (Múrcia, Espanha) e de 0,151 (Roma, Itália) no sul da Europa, passando por valores intermediários na Holanda e na França. Considerando que, o alelo Q está relacionado com níveis mais baixos de fator VII e a incidência de infarto agudo do miocárdio é maior nos países do norte da Europa, a inferência decorrente é uma possível associação desse polimorfismo com essa patologia.

4.5.1.2. Polimorfismo R353Q em pacientes com trombose venosa

A Tabela 4.5.1 mostra a distribuição deste polimorfismo nos pacientes com TVP do presente estudo. As frequências genótípicas distribuíram-se de acordo com o esperado para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças entre as frequências genótípicas obtidas no grupo controle e as do grupo de pacientes com TVP foram tangenciais a significância ($\chi^2 = 5,39$; GL = 2; P = 0,067). Porém, em relação às frequências alélicas, a frequência do alelo R foi significativamente maior no grupo de pacientes ($\chi^2 = 4,79$; GL = 1; P = 0,029).

Quando os indivíduos analisados foram diferenciados, conforme o genótipo, em dois grupos (RR e QQ+RQ), as diferenças nas frequências entre o grupo controle e o de pacientes também foram significativas, $\chi^2 = 4,70$; GL = 1; P = 0,029 e OR = 1,90; IC 95% = 1,06-3,43; P = 0,044, o grupo de pacientes apresentou um aumento na frequência de homozigotos RR em relação ao grupo controle.

Assim, os nossos dados indicam que a presença do genótipo RR é um possível fator de risco para TVP. Discordando do trabalho de KOSTER et al. (1994) o qual relata ausência de associação entre esse polimorfismo e a ocorrência de TVP.

Em nossos dados, quando os pacientes foram diferenciados segundo a existência ou não de um fator de risco genético identificado (respectivamente, FGRI e FGRNI), a presença dessa associação ficou mais evidente. As frequências genótípicas e alélicas obtidas podem ser observadas na Tabela 4.5.3.

Tabela 4.5.3. Frequência do polimorfismo R353Q do gene do fator VII em pacientes com TVP, subdivididos em relação à identificação do fator genético de risco e nos respectivos grupos controles.

subgrupo	N*	frequências genótípicas			frequências alélicas	
		R/R	R/Q	Q/Q	R	Q
pacientes FGRI	47	0,872	0,128	0	0,936	0,064
controles	47	0,660	0,298	0,042	0,809	0,191
pacientes FGRNI	74	0,730	0,257	0,013	0,858	0,142
controles	72	0,765	0,206	0,029	0,841	0,159

*: número de indivíduos estudados

No subgrupo de pacientes FGRNI, as frequências genótípicas e alélicas não foram diferentes das frequências obtidas no respectivo subgrupo controle, $\chi^2 = 0,39$; GL = 2; P = 0,822, para as frequências genótípicas e $\chi^2 = 0,07$; GL = 1; P = 0,793, para as frequências alélicas.

Entretanto, as frequências genótípicas e alélicas do subgrupo de pacientes FGRI foram diferentes das frequências do subgrupo controle, respectivamente, $\chi^2 = 6,59$; GL = 2;

$P = 0,037$ e $\chi^2 = 5,78$; $GL = 1$; $P = 0,016$. O genótipo RR foi mais freqüente nesse subgrupo de pacientes do que no subgrupo controle, $\chi^2 = 4,81$; $GL = 1$; $P = 0,028$ e $OR = 3,53$; $IC\ 95\% = 1,24-10,05$; $P = 0,028$.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que nos indivíduos que apresentam um fator genético de risco para trombose, a homozigose para o alelo R aumenta 3,5 vezes a chance de trombose.

Como já mencionado, este resultado é contraditório ao obtido por KOSTER et al. (1994), esses pesquisadores estudaram a relação entre aos níveis de fator VII e o polimorfismo R353Q em 199 pacientes, de ambos os sexos, com trombose venosa. Os autores concluíram que nem o nível de fator VII, nem a presença do genótipo RR eram fatores de risco para trombose venosa, embora o genótipo RR estivesse associado com um nível mais elevado de fator VII. Entretanto, o trabalho não informa se os pacientes apresentavam alguma das alterações genéticas que causam trombose, tais como, deficiência de proteína C, proteína S, ATIII ou presença de fator V Leiden.

4.5.2. Sobre o polimorfismo -323P0/10

4.5.2.1. Polimorfismo -323P0/10 na população em geral

A Tabela 4.5.4 mostra a freqüência alélica e a distribuição dos genótipos para o polimorfismo de inserção/deleção na região promotora do gene do fator VII, nos grupos estudados no presente trabalho. O alelo P0 corresponde à ausência do fragmento de inserção de 10 pb, e o alelo P10 corresponde à presença desse fragmento inserido na região -323 do gene do fator VII.

Tabela 4.5.4. Frequência do polimorfismo –323 P0/P10 no gene do fator VII nos grupos estudados.

grupo	N*	frequências genotípicas			frequências alélicas	
		P0/P0	P0/P10	P10/P10	P0	P10
Negróides	86	0,558	0,337	0,105	0,730	0,270
Caucasóides	119	0,647	0,319	0,034	0,810	0,190
Pacientes	120	0,735	0,250	0,015	0,860	0,140

*: número de indivíduos estudados

Nos grupos de indivíduos normais, independente do grupo étnico, a distribuição dos genótipos para esse polimorfismo está de acordo com a prevista para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas frequências dos genótipos entre os grupos caucasóides e negróides não foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 4,70$; GL = 2; P = 0,097), assim como não foram estatisticamente significativas as diferenças nas frequências alélicas ($\chi^2 = 3,20$; GL = 1; P = 0,074).

de MAAT et al. (1997) estudaram esse polimorfismo em diferentes populações, caucasóides europeus, afro-caribenhos, indianos e inuits, as frequências do alelo P0 foram, respectivamente, 0,861, 0,671, 0,756 e 0,680. Neste trabalho, as diferenças entre caucasóides e afro-caribenhos foram significativas. Entretanto, as frequências alélicas obtidas no grupo negróide do presente trabalho foram similares às obtidas no grupo de afro-caribenhos ($\chi^2 = 1,36$; GL = 1; P = 0,244).

As frequências alélicas obtidas na amostra de caucasóides do presente trabalho e as de outras populações não estão distribuídas homogeneamente ($\chi^2 = 21,60$; GL = 7; P = 0,003), conforme mostram os dados da Tabela 4.5.5. As frequências alélicas da nossa população foram diferentes das obtidas nas populações de poloneses ($\chi^2_c = 8,89$; GL = 1; P = 0,003), de noruegueses ($\chi^2 = 9,2$; GL = 1; P = 0,002) e semelhantes às obtidas nas demais populações.

Tabela 4.5.5. Frequência alélica do polimorfismo -323P0/10 em diferentes populações caucasóides.

amostra	N*	frequências alélicas		referência
		P0	P10	
noruegueses	136	0,905	0,095	BERNARDI et al., 1997
poloneses	99	0,904	0,096	HUNAUULT et al., 1997
franceses	90	0,856	0,144	BERNARDI et al., 1997
ingleses	175	0,886	0,114	HEYWOOD et al., 1997
holandeses	94	0,878	0,122	BERNARDI et al., 1997
italianos	99	0,838	0,162	BERNARDI et al., 1997
espanhóis	318	0,833	0,167	BERNARDI et al., 1997
brasileiros	119	0,810	0,190	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

BERNARDI et al. (1997) sugeriram a existência de um gradiente norte-sul na distribuição do alelo P10 na Europa, do mesmo modo do que o sugerido para o alelo Q do polimorfismo R353Q, mencionado anteriormente.

Em nossos dados, os polimorfismos R353Q e de inserção/deleção apresentaram desequilíbrio de ligação no grupo caucasóide ($\chi^2 = 10,7$; GL = 1; $0,001 < P < 0,01$). Considerando somente os cromossomos inequívocos, o haplótipo RP0 ocorreu em 87% dos 180 cromossomos analisados, os haplótipos RP10, QP0 e QP10 apresentaram, respectivamente, frequências de 5%, 3,5% e 4,5%.

Por outro lado, no grupo negróide, os dois polimorfismos se encontram em equilíbrio de ligação ($\chi^2 = 1,23$; GL = 1; $0,20 < P < 0,30$). O haplótipo RP0 aparece em 75% dos 124 cromossomos analisados, os haplótipos RP10, QP0 e QP10 apresentaram, respectivamente, frequências de 18%, 4% e 3%. Esses polimorfismos também apresentaram equilíbrio de ligação na população de afro-caribenhos estudada por de MAAT et al. (1997).

As populações de indianos e inuits estudadas por de MAAT et al. (1997) apresentaram desequilíbrio de ligação para esses polimorfismos.

O desequilíbrio de ligação entre esses dois polimorfismos em caucasóides também foi relatado nos trabalhos realizados em outras populações (HUMPHRIES et al., 1996; HEYWOOD et al., 1997; de MAAT et al., 1997). Entretanto, HUNAUULT et al. (1997) relatam que na população polonesa esses polimorfismos estão em equilíbrio de ligação.

HUMPHRIES et al. (1996) verificaram a inexistência do alelo P10 em 12 indivíduos pertencentes a 3 espécies de primatas e sugeriram que, o gene do fator VII ancestral não tinha a seqüência de 10pb, assim o alelo P10 teria surgido durante o processo evolutivo por um evento de inserção. Considerando que a mutação que origina o polimorfismo R353Q ocorre em uma seqüência CpG ("hot spot" de mutação), estes pesquisadores sugeriram que o alelo 353Q tenha surgido duas vezes independentemente, uma vez no cromossomo que apresentava a ausência da inserção (alelo P0) e outra em um cromossomo que apresentava a inserção (alelo P10).

4.5.2.2. Polimorfismo -323P0/10 em pacientes com trombose venosa

A distribuição dos genótipos para o polimorfismo -323P0/P10, no grupo de pacientes com TVP, está de acordo com a prevista para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas freqüências dos genótipos entre o grupo controle e o grupo de pacientes com TVP não foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 2,44$; GL = 2; P = 0,31). Também, não foram estatisticamente significativas as diferenças nas freqüências alélicas ($\chi^2 = 2,30$; GL = 1; P = 0,131). Assim, esses resultados indicaram que esse polimorfismo não estava associado com TVP.

Entretanto, os nossos dados revelaram associação quando as comparações foram realizadas entre os subgrupos de pacientes com TVP (os que tinham fator genético de risco identificado "FGRI" e os que não tiveram o fator genético de risco identificado "FGRNI") e seus respectivos subgrupos controles. As freqüências genotípicas e alélicas obtidas podem ser observadas na Tabela 4.5.6.

Tabela 4.5.6. Frequência do polimorfismo -323P0/P10 do gene do fator VII em pacientes com TVP, subdivididos em relação à identificação do fator genético de risco e nos respectivos grupos controles.

subgrupo	N*	frequências genóticas			frequências alélicas	
		P0/P0	P0/P10	P10/P10	P0	P10
pacientes FGRI	47	0,851	0,149	0	0,925	0,075
controles	47	0,638	0,340	0,022	0,809	0,191
pacientes FGRNI	74	0,730	0,257	0,013	0,858	0,142
controles	72	0,680	0,278	0,042	0,819	0,181

*: número de indivíduos estudados

No subgrupo de pacientes FGRNI, as frequências genóticas e alélicas não foram diferentes das frequências obtidas no respectivo subgrupo controle, respectivamente, $\chi^2 = 1,24$; GL = 2; P = 0,537 e $\chi^2 = 0,81$; GL = 1; P = 0,368.

As diferenças entre as frequências genóticas obtidas no subgrupo de pacientes FGRI e no subgrupo controle foram tangenciais à significância ($\chi^2 = 5,95$; GL = 2; P = 0,051). Porém, as diferenças nas frequências alélicas foram significativas ($\chi^2 = 4,61$; GL = 1; P = 0,032), o alelo P0 foi mais freqüente no subgrupo de pacientes FGRI do que no subgrupo grupo controle.

Quando os indivíduos estudados foram diferenciados em dois grupos (P0P0 e P10P10+P0P10), observou-se um aumento significativo na frequência de homozigotos P0P0 no grupo de pacientes FGRI, $\chi^2 = 4,53$; GL = 1; P = 0,033 e OR = 3,2; IC 95% = 1,19-8,79; P = 0,033.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, a homozigose para o alelo P0 aumenta 3,2 vezes a chance de trombose naqueles indivíduos que apresentam um fator genético de risco para trombose.

Como os polimorfismos -323P0/P10 e R353Q estão em desequilíbrio de ligação, não podemos excluir a possibilidade de que apenas um deles seja realmente fator de risco para trombose venosa, entretanto os dados obtidos por Di CASTELNUOVO et al. (1998) indicaram que ambos os polimorfismos influenciam os níveis de fator VII.

4.6. Sobre o polimorfismo no gene da Glicoproteína IIb/IIIa

4.6.1. Polimorfismo PI^{A1}/PI^{A2} na população em geral

A Tabela 4.6.1 mostra a distribuição dos genótipos e as frequências alélicas para o polimorfismo PI^{A1}/PI^{A2} no gene da subunidade IIIa da GPIIb/IIIa. O alelo PI^{A1} codifica o aminoácido leucina e o PI^{A2} uma prolina.

Tabela 4.6.1. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo PI^{A1}/PI^{A2} no gene da subunidade IIIa da GPIIb/IIIa.

grupo	N*	frequência genotípica			frequência alélica	
		PI ^{A1} /PI ^{A1}	PI ^{A1} /PI ^{A2}	PI ^{A2} /PI ^{A2}	PI ^{A1}	PI ^{A2}
Negróides	71	0,845	0,125	0,030	0,910	0,090
Caucasóides	120	0,770	0,210	0,020	0,875	0,125
Pacientes	120	0,767	0,208	0,025	0,871	0,129

*: número de indivíduos estudados

Nos indivíduos normais, de ambos os grupos étnicos, a distribuição dos genótipos para esse polimorfismo está de acordo com a prevista para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças encontradas nas frequências alélicas entre os grupos de caucasóides e negróides não foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 0,10$; GL = 1; P = 0,317).

No grupo negróide, as frequências encontradas no presente trabalho são similares às encontradas no trabalho de KIM et al. (1995) em indivíduos afro-americanos ($\chi^2 = 0,143$; GL = 1; P = 0,706). Nesse trabalho as diferenças nas frequências alélicas entre afro-americanos e caucasóides também não foram significativas.

Nos caucasóides, esse polimorfismo se distribui de forma homogênea entre as diferentes populações estudadas ($\chi^2 = 2,31$; GL = 5; P = 0,805), como pode ser observado na Tabela 4.6.2.

Tabela 4.6.2. Frequências alélicas do polimorfismo PI^{A1}/PI^{A2} no gene da subunidade IIIa da GPIIb/IIIa em diferentes populações caucasóides.

amostra	N*	frequências alélicas		referência
		PI^{A1}	PI^{A2}	
alemães	972	0,849	0,151	LAULE et al., 1999
irlandeses	176	0,855	0,145	HERRMANN et al., 1997
franceses	523	0,844	0,156	HERRMANN et al., 1997
norte-americanos	188	0,872	0,128	ANDERSON et al., 1999
ingleses	216	0,854	0,146	CARTER et al., 1997
brasileiros	120	0,875	0,125	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

KIM et al. (1995) estudaram 100 sul-coreanos e encontram uma frequência de 0,005 para o alelo PI^{A2} . Em japoneses, as frequências encontradas foram 0,004 (ODAWARA et al., 1996) e 0,002 (TANAKA et al. 1996), nesses trabalhos foram estudados, respectivamente, 370 e 331 indivíduos.

Utilizando testes imunológicos, LIN et al. (1993) estudaram a presença do antígeno PI^{A2} em 100 indivíduos chineses e INOSTROZA et al. (1988) em 112 indivíduos da tribo Mapuche, o antígeno PI^{A2} não foi encontrado em nenhuma destas populações.

de MAAT et al. (1997) relatam que a frequência do alelo PI^{A2} foi 0,037 na população de nativos da Groenlândia (inuits), tendo sido estudados 415 indivíduos.

Considerando os dados referidos acima, não existe heterogeneidade na distribuição desse polimorfismo entre negroídes e caucasóides. Entretanto, o alelo PI^{A2} é raro em orientais e indígenas.

4.6.2. Polimorfismo PI^{A1}/PI^{A2} em pacientes com trombose venosa

No grupo de pacientes com trombose venosa profunda, as frequências genotípicas obtidas estão de acordo com as esperadas, conforme o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas frequências genótípicas e alélicas entre pacientes e controles não foram significativas, respectivamente, $\chi^2 = 0,22$; GL = 2; P = 0,896 e $\chi^2 = 0,02$; GL = 1; P = 0,891, indicando a ausência de associação entre esse polimorfismo e a ocorrência de TVP.

Também não encontramos associação, quando a comparação foi realizada entre os subgrupos de pacientes, diferenciados segundo a presença de fatores genéticos de risco, e seus respectivos controles. No subgrupo FGRI (pacientes com fator genético de risco identificado) os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 2,09$; GL = 2; P = 0,366 para as frequências genótípicas e $\chi^2 = 0,22$; GL = 1; P = 0,636 para as frequências alélicas. No subgrupo FGRNI (pacientes que não tiveram o fator genético de risco identificado), os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 1,96$; GL = 2; P = 0,375 para as frequências genótípicas e $\chi^2 = 0,069$; GL = 1; P = 0,792 para as frequências alélicas.

Assim, a presença desse polimorfismo não é um fator de risco independente, ou mesmo combinado com outros fatores genéticos de risco, para TVP.

Os nossos dados corroboram os encontrados por RIVERA et al. (1996) e por RIDKER et al. (1997b), os quais também não encontram associação desse polimorfismo com TVP. O trabalho de RIVERA et al. (1996) foi realizado na Espanha e foram estudados 86 pacientes com doença cerebrovascular isquêmica, 48 pacientes com trombose venosa, e 84 indivíduos controles. Os resultados obtidos mostraram que o alelo PI^{A2} não é um fator de risco para essas patologias.

O trabalho de RIDKER et al. (1997b) foi realizado com os participantes de um amplo estudo prospectivo, *US Physicians' Health Study*, sendo composto exclusivamente por homens, que tiveram trombose venosa (n = 121), infarto do miocárdio (n = 374) ou acidente vascular cerebral (n = 209) durante o período de seguimento do projeto. As frequências alélicas obtidas nos grupos de pacientes foram similares à do grupo controle.

Entretanto, o trabalho de WEISS et al. (1996) mostrou resultados diferentes. Estes autores realizaram um estudo caso-controle de 68 pacientes com infarto do miocárdio ou angina instável e relatam existência de associação desse polimorfismo com trombose coronariana. Os resultados obtidos mostraram que indivíduos heterozigotos ou homozigotos para o alelo PI^{A2} tinham maior chance (OR = 2,8; IC 95% = 1,2-6,4; P = 0,01) de ter trombose coronariana do que indivíduos homozigotos para o PI^{A1}. Esse risco foi mais acentuado quando somente foram considerados os indivíduos que tiveram infarto do miocárdio antes dos 60 anos de idade (OR = 6,2; IC 95% = 1,8-22,4; P = 0,002).

Em uma revisão sobre o assunto, BRAY (1999) salienta que dos 18 trabalhos publicados até 1998, 8 relataram associação entre o alelo PI^{A2} e a mesma manifestação da doença arterial coronariana. Para esse autor, uma das causas dessas discrepâncias entre os estudos podem ser as diferentes manifestações clínicas dessa doença, alguns trabalhos incluem pacientes que apresentam obstrução coronariana, mas que não desenvolveram infarto do miocárdio.

ZOTZ et al. (1998) investigaram a presença desse polimorfismo em 194 pacientes com infarto do miocárdio, 131 pacientes com doença arterial coronariana sem infarto e em 157 controles. Os resultados mostraram que o alelo PI^{A2} é um fator de risco para o infarto do miocárdio em pacientes com doença arterial coronariana pré-existente, sendo considerado um fator trombogênico. Entretanto, não é um fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana.

4.7. Sobre o polimorfismo na enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase

4.7.1. Polimorfismo 677C→T na população em geral

A Tabela 4.7.1 mostra as freqüências genotípicas e gênicas para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR nos grupos de indivíduos normais, segundo o grupo étnico e em pacientes com TVP. O alelo C codifica o aminoácido alanina e o alelo T, o aminoácido valina, o qual torna esta enzima termolábil.

Tabela 4.7.1. Freqüência do polimorfismo C677T no gene da MTHFR nos grupos estudados.

grupo	N*	freqüências genotípicas			freqüências alélicas	
		CC	CT	TT	C	T
Negróides	96	0,677	0,271	0,052	0,812	0,188
Caucasóides	118	0,460	0,400	0,140	0,657	0,343
Pacientes	120	0,370	0,500	0,130	0,617	0,383

*: número de indivíduos estudados

Nos grupos de indivíduos normais, dos dois grupos étnicos, as frequências genotípicas obtidas estão de acordo com as esperadas, indicando que as duas populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas frequências alélicas entre os grupos negróides e caucasóides foram significativas ($\chi^2 = 12,94$; GL = 1; $P \ll 0,001$). Diferenças significativas, entre esses dois grupos étnicos, também foram encontradas em trabalhos realizados nos Estados Unidos (McANDREW, 1996; STEVENSON et al., 1997; HESSNER et al., 1999), na África do Sul (LOKTINOV et al, 1999) e no Brasil (ARRUDA et al., 1998; FRANCO et al., 1998).

Como pode ser observado na Tabela 4.7.2, existe heterogeneidade nas frequências alélicas entre populações negróides de diferentes países ($\chi^2 = 33,59$; GL = 8; $P \ll 0,001$). Entretanto, não houve diferenças significativas entre as populações de um mesmo país, como no caso do Estados Unidos ($\chi^2 = 1,48$; GL = 3; $P = 0,686$) e do Brasil ($\chi^2 = 3,27$; GL = 3; $P = 0,195$). Também não foram significativas as diferenças nas duas populações africanas estudadas ($\chi^2 = 2,46$; GL = 1; $P = 0,116$). Logo, para a realização das próximas comparações, os dados das populações de um mesmo país foram agrupados, assim como foram agrupados os dados para as populações africanas.

Portanto, a frequência do alelo T foi 0,180 nos negróides brasileiros, 0,108 nos afro-americanos e 0,080 nos africanos.

Tabela 4.7.2. Frequências alélicas do polimorfismo C607T no gene da MTHFR em negróides nos diferentes trabalhos realizados.

amostra	N*	frequências alélicas		referência
		C	T	
afro-americanos	102	0,902	0,098	McANDREW et al. (1996)
afro-americanos	146	0,894	0,106	STEVENSON et al. (1997)
afro-americanos	185	0,900	0,100	DILLEY et al. (1998)
afro-americanos	185	0,876	0,124	HESSNER et al. (1999)
negros africanos	67	0,948	0,052	FRANCO et al. (1998)
negros africanos	100	0,900	0,100	LOKTINOV et al. (1999)
negros brasileiros	50	0,880	0,120	FRANCO et al., 1998
negros brasileiros	137	0,800	0,200	ARRUDA et al. (1998)
negróides brasileiros	96	0,812	0,188	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

As frequências alélicas obtidas na população negróide brasileira foram significativamente diferentes dos obtidos na população afro-americana ($\chi^2 = 17,75$; GL = 1; $P \ll 0,001$) e na africana ($\chi^2 = 16,58$; GL = 1; $P \ll 0,001$).

Por outro lado, as frequências alélicas nas populações americana e africana foram similares ($\chi^2 = 1,88$; GL = 1; $P = 0,170$).

Como já referido anteriormente, em revisão sobre a origem das populações Neo-americanas, BORTOLINI (1999) salienta que a presença de genes não-africanos (europeus e/ou ameríndios) em populações afro-brasileiras urbanas varia de 27% a 59%, enquanto que, na América do Norte varia de 3,7% a 25%.

Assim, a frequência mais elevada do alelo T na população negróide brasileira em relação a afro-americana pode ser explicada por diferentes taxas de miscigenação nesses dois países.

Como pode ser observado na Tabela 4.7.3, não existe heterogeneidade nas frequências alélicas encontradas nas populações caucasóides de diversos países ($\chi^2 = 5,33$; GL = 6; $P = 0,50$).

Tabela 4.7.3 Freqüências alélicas do polimorfismo C677T no gene da MTHFR em diferentes populações caucasóides.

amostra	N*	freqüências alélicas		referência
		C	T	
holandeses	100	0,690	0,310	VERHOEF et al., 1997
ingleses	164	0,662	0,338	SALDEN et al., 1997
espanhóis	200	0,680	0,320	ORDÓÑEZ et al., 1999
italianos	198	0,576	0,424	STEFANO et al., 1998
australianos	225	0,642	0,368	CHRISTENSEN et al., 1997
americanos	155	0,687	0,313	BRUGADA & MARIAN, 1997
brasileiros	240	0,617	0,383	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

Com relação à população caucasóide brasileira, dois outros trabalhos investigaram a presença deste polimorfismo em nossa população. ARRUDA et al. (1998) estudaram 107 caucasóides de Campinas (São Paulo) e encontraram as seguintes freqüências alélicas: C = 0,627 e T = 0,373. FRANCO et al. (1998) estudaram 51 caucasóides de Ribeirão Preto (São Paulo), sendo que a freqüência dos alelos C e T foram, respectivamente, 0,638 e 0,362.

As freqüências obtidas nas três populações caucasóides brasileiras (Rio Grande do Sul, Campinas e Ribeirão Preto) foram homogêneas ($\chi^2 = 0,136$ GL = 2; P = 0,934).

Com relação a outros grupos étnicos, a presença desse polimorfismo foi descrita em japoneses, Inuits canadenses e ameríndios. MORITA et al. (1997) estudaram 778 japoneses e as freqüências alélicas encontradas (C = 0,666 e T = 0,334) foram similares às descritas para caucasóides. Nos Inuits canadenses, as freqüências alélicas foram, C = 0,939 e T = 0,061 (HEGELE et al., 1997).

HESSNER et al. (1999) estudaram 87 índios da tribo Navajo e encontraram as seguintes freqüências, alelo C = 0,713 e alelo T = 0,287. Na tribo Parakanã (região amazônica) foram estudados 83 indivíduos e determinadas as seguintes freqüências: alelo C = 0,886 e alelo T = 0,114 (ARRUDA et al., 1998).

Portanto, os dados obtidos no presente trabalho e os descritos na literatura indicam que as freqüências alélicas desse polimorfismo variam entre as diferentes populações e grupos étnicos.

4.7.2. Polimorfismo 677C→T em pacientes com trombose venosa

Com relação aos pacientes com TVP, a distribuição dos genótipos obtida, para esse polimorfismo, indica que essa população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Como pode ser observado na Tabela 4.7.1, as diferenças nas frequências genotípicas entre o grupo controle e o grupo de pacientes com TVP não foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 2,61$; GL = 2; P = 0,271). Também não foram estatisticamente significativas as diferenças nas frequências alélicas ($\chi^2 = 0,66$; GL = 1; P = 0,415). Assim, os nossos resultados indicam ausência de associação entre esse polimorfismo e TVP.

Também não encontramos associação, quando a comparação foi realizada entre os subgrupos de pacientes e seus respectivos controles. No subgrupo FGRI (pacientes com fator genético de risco identificado) os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 2,55$; GL = 2; P = 0,279 para as frequências genotípicas e $\chi^2 = 0,10$; GL = 1; P = 0,756 para as frequências alélicas. No subgrupo FGRNI (pacientes que não tiveram o fator genético de risco identificado), os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 1,96$; GL = 2; P = 0,375 para as frequências genotípicas e $\chi^2 = 1,34$; GL = 1; P = 0,246 para as frequências alélicas.

Portanto, em nossos dados não foi encontrada associação entre esse polimorfismo e trombose venosa e, também, a presença desse polimorfismo não aumentou o risco de trombose nos indivíduos que já apresentavam um fator de risco genético para TVP.

Como veremos a seguir, estudos de associação desse polimorfismo com trombose venosa ou com doença coronariana têm apresentado resultados controversos.

Entre 1997 e 1999, foram realizados 6 diferentes estudos de associação entre esse polimorfismo e trombose venosa na Itália (TOSETTO et al., 1997; CATTANEO et al., 1999; LEGNANI, et al., 1997; MARGAGLIONI et al., 1998; STEFANO et al., 1998; GEMMATI et al., 1999). Entre os pacientes com trombose venosa, a frequência do alelo T variou entre 0,400 e 0,525. A associação entre a homozigose para o alelo T e a trombose venosa foi encontrada somente em dois trabalhos (MARGAGLIONI et al. 1998; GEMMATI et al. 1999). Quando testada a homogeneidade das frequências alélicas entre os trabalhos, os controles mostraram-se homogêneos ($\chi^2 = 2,848$; GL = 5; P = 0,723), entretanto, entre os pacientes as frequências mostraram-se heterogêneas ($\chi^2 = 11,964$; GL = 5; P = 0,035). Porém, quando os dois estudos que mostraram associação entre o alelo T e a trombose são retirados da análise, as frequências alélicas entre os pacientes passam a ser homogêneas ($\chi^2 = 1,037$; GL = 3; P = 0,792).

Ainda na Europa, foram realizados 4 outros estudos de associação entre a homozigose para o alelo T e a trombose venosa, na França (ALHENC-GELAS et al., 1999), Espanha (ORDÓÑES et al., 1999), Inglaterra (SALDEN et al., 1997.) e Holanda (KLUIJTMANS et al., 1998). As freqüências do alelo T foram homogêneas tanto entre os controles ($\chi^2 = 5,769$; GL = 3; P = 0,123), como entre os pacientes ($\chi^2 = 1,304$; GL = 3; P = 0,728), variando entre 0,313 e 0,366 e em nenhum trabalho a associação entre homozigose para o alelo T e a trombose venosa foi encontrada.

Uma possível explicação da associação do alelo T com trombose venosa nos dois trabalhos da Itália, seria a da heterogeneidade dos critérios utilizados na seleção dos pacientes, envolvendo variáveis como sexo, idade, quadro clínico. Entretanto essas variáveis não parecem ser diferentes entre os diferentes trabalhos.

No Brasil, além do presente trabalho, três outras publicações referem-se à distribuição do polimorfismo C677T da MTHFR na população em geral e em pacientes com trombose venosa.

FRANCO et al. (1998) não encontraram associação entre esse polimorfismo e a trombose venosa. Entretanto, os dados de ARRUDA et al. (1997) mostraram um significativo aumento de homozigotos TT em pacientes com trombose venosa ($\chi^2 = 7,48$; GL = 1; P = 0,006), usando como controle as freqüências obtidas em recém-nascidos.

Os nossos dados não mostram associação entre homozigose para o alelo T e a ocorrência de TVP ($\chi^2 = 0,003$; GL = 1; P = 0,958). Entretanto, é importante ressaltar que os dados dos controles de ARRUDA et al. (1997) diferem significativamente ($\chi^2 = 15,070$; GL = 1; P < 0,001) de outros dados de controles caucasóides publicados por estes autores (ARRUDA et al., 1998). No trabalho que mostrou associação entre o polimorfismo da MTHFR e trombose venosa não há informações sobre a composição étnica do grupo controle nem do grupo de pacientes, o que dificulta uma possível explicação para a heterogeneidade encontrada entre os controles nos dois trabalhos.

4.8. Sobre o polimorfismo no gene do Ativador Tissular do Plasminogênio

4.8.1. Polimorfismo de inserção/deleção na população em geral

Esse polimorfismo ocorre devido à presença (alelo I) ou ausência (alelo D) de uma seqüência Alu no gene do ativador do plasminogênio. As freqüências genotípicas e alélicas obtidas no presente trabalho podem ser observadas na Tabela 4.8.1.

Tabela 4.8.1. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Alu no gene do ativador tissular do plasminogênio.

grupo	N*	freqüências genotípicas			freqüências alélicas	
		DD	DI	II	D	I
Negróides	104	0,375	0,404	0,221	0,577	0,423
Caucasóides	119	0,134	0,479	0,387	0,370	0,630
Pacientes	120	0,200	0,475	0,325	0,440	0,560

*: número de indivíduos estudados

Com relação às amostras controles, os dois grupos estudados, negróides e caucasóides, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As diferenças nas freqüências alélicas entre caucasóides e negróides foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 14,25$; GL = 1; P << 0,001).

Como pode ser observado na Tabela 4.8.2, as freqüências alélicas, obtidas no presente trabalho e as de outras populações caucasóides, são homogêneas ($\chi^2 = 3,721$; GL = 3; P = 0,293).

Tabela 4.8.2. Frequências alélicas do polimorfismo Alu do gene do t-PA em diferentes populações caucasóides.

amostra	N*	frequências alélicas		referência
		D	I	
ingleses	525	0,418	0,582	STEEDS et al., 1998
holandeses	250	0,446	0,554	van der BOM et al., 1997
alemães	80	0,400	0,600	LUDWIG et al., 1992
brasileiros	119	0,370	0,630	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

Comparando os dados obtidos para a nossa população negróide com os descritos, por BATZER et al. (1991), para populações de negros americanos e africanos, verificou-se que as frequências alélicas são homogêneas nessas três amostras ($\chi^2 = 0,308$, GL = 2; P = 0,857).

4.8.2. Polimorfismo de inserção/deleção em pacientes com trombose venosa

Com relação aos pacientes com TVP, a distribuição dos genótipos obtida, para esse polimorfismo, indica que a nossa população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genotípicas e alélicas foram similares entre pacientes e controle, respectivamente, $\chi^2 = 2,17$; GL = 2; P = 0,338 e $\chi^2 = 2,10$; GL = 1; P = 0,160, demonstrando a ausência de associação entre esse polimorfismo e a ocorrência de TVP.

Também não encontramos associação, quando a comparação foi realizada entre os subgrupos de pacientes e seus respectivos controles. No subgrupo FGRI (pacientes com fator genético de risco identificado) os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 3,34$; GL = 2; P = 0,188, para as frequências genotípicas e $\chi^2 = 2,54$; GL = 1; P = 0,1070, para as frequências alélicas. No subgrupo FGRNI (pacientes que não tiveram o fator genético de risco identificado), os resultados dos testes estatísticos foram, $\chi^2 = 0,137$; GL = 2; P = 0,933, para as frequências genotípicas e $\chi^2 = 0,11$; GL = 1; P = 0,739, para as frequências alélicas.

Os trabalhos encontrados na revisão da literatura investigam sobre a influência desse polimorfismo com o infarto do miocárdio, não tendo sido encontrado nenhum trabalho que investigue a associação do mesmo com trombose venosa. O trabalho realizado por van der BOM et al. (1997) relata que indivíduos homocigotos para o alelo D apresentavam um risco 2

vezes maior de desenvolver infarto do miocárdio. Entretanto, em outros dois trabalhos (RIDKER et al., 1997a; STEEDS et al., 1998) essa associação não foi encontrada.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que esse polimorfismo não está associado com trombose venosa.

4.9. Sobre o polimorfismo no gene do Inibidor-1 do Ativador do Plasminogênio

4.9.1. Polimorfismo 4G/5G na população em geral

A Tabela 4.9.1 mostra as freqüências genótípicas e alélicas para o polimorfismo 4G/5G, localizado na região promotora do gene PAI-1, nos grupos de indivíduos normais, segundo o grupo étnico, e em pacientes com TVP.

Tabela 4.9.1. Freqüência do polimorfismo 4G/5G no gene do inibidor-1 do ativador do plasminogênio nos grupos estudados.

grupo	N*	freqüências genótípicas			freqüências alélicas	
		4G4G	4G5G	5G5G	4G	5G
Negróides	90	0,044	0,333	0,623	0,211	0,789
Caucasóides	118	0,237	0,543	0,220	0,508	0,492
Pacientes	121	0,317	0,400	0,283	0,517	0,483

*: número de indivíduos estudados

Os indivíduos normais, independentes do grupo étnico, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, as diferenças nas freqüências genótípicas e alélicas entre os grupos caucasóides e negróides foram significativas, respectivamente, $\chi^2 = 31,55$; GL = 2; $P << 0,001$ e $\chi^2 = 38,08$; GL = 1; $P << 0,001$.

A Tabela 4.9.2 mostra que as freqüências alélicas, obtidas no presente trabalho e as de outras populações caucasóides, se distribuem de forma homogênea ($\chi^2 = 2,66$; GL = 4; $P = 0,616$).

Tabela 4.9.2. Frequências alélicas do polimorfismo 4G5G no gene do PAI-1 em diferentes populações caucasóides.

amostra	N*	frequências alélicas		referência
		4G	5G	
ingleses	172	0,560	0,440	CATTO et al., 1997
italianos	218	0,560	0,440	BURZOTTA et al., 1998
suecos	100	0,530	0,470	ERIKSSON et al., 1995
holandeses	302	0,530	0,470	DOGGEN et al., 1999
brasileiros	118	0,508	0,492	presente trabalho

*: número de indivíduos estudados

As frequências alélicas obtidas no grupo negróide, no nosso estudo, foram similares às encontradas por PANAHLÓO et al. (1995) em um estudo envolvendo afro-caribenhos ($\chi^2 = 1,80$; GL = 1; P = 0,177).

Existem poucos estudos sobre esse polimorfismo em outros grupos étnicos, IWAI et al. (1998) estudaram esse polimorfismo em japoneses, encontrando as seguintes frequências alélicas: 4G = 0,61 e 5G = 0,39. Essas frequências diferiram das obtidas no grupo caucasóide no presente trabalho ($\chi^2 = 6,06$; GL = 1; P = 0,014) e também foram diferentes das frequências obtidas para os holandeses ($\chi^2 = 6,28$; GL = 1; P = 0,012). Entretanto, não foram diferentes quando comparadas com as outras populações caucasóides, ingleses ($\chi^2 = 2,11$; GL = 1; P = 0,149), italianos ($\chi^2 = 2,59$; GL = 1; P = 0,108) e suecos ($\chi^2 = 3,53$; GL = 1; P = 0,060).

Evidentemente, considerando os resultados acima mencionados, as frequências alélicas na população japonesa são diferentes das frequências obtidas na população negróide estudada no presente trabalho ($\chi^2 = 73,40$; GL = 1; P << 0,001).

McCORMACK et al. (1996) estudaram esse polimorfismo nos índios Pima (Arizona, USA) e as frequências alélicas obtidas, 4G = 0,51 e 5G = 0,49, não foram significativamente diferentes das obtidas nas populações caucasóides mostradas na Tabela 4.9.2. Entretanto, como já era previsto baseando-se nas análises já realizadas, essas frequências foram diferentes das obtidas na população negróide estudada no presente trabalho ($\chi^2 = 39,63$; GL = 1; P << 0,001) e também das frequências descritas por IWAI et al. (1998) para a população japonesa ($\chi^2 = 6,53$; GL = 1; P = 0,011).

Portanto, os dados obtidos no presente trabalho e os descritos na literatura indicam que as frequências alélicas desse polimorfismo são influenciadas pelo grupo étnico.

4.9.2. Polimorfismo 4G/5G em pacientes com trombose venosa

Entre os pacientes do presente estudo, as frequências não se distribuem segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 4,87$; GL = 1; $0,02 < P < 0,05$), ocorrendo uma deficiência de indivíduos heterozigotos, compensada por aumentos nas frequências de homozigotos. Não encontramos explicação para estes resultados.

As frequências genóticas obtidas nos pacientes com TVP não foram, significativamente, diferentes daquelas encontradas no grupo controle ($\chi^2 = 4,85$; GL = 2; P = 0,088). Assim, em nossos dados, não encontramos associação entre esse polimorfismo e trombose venosa, corroborando com dados obtidos por RIDKER et al. (1997e) e STEGNAR et al. (1998).

Entretanto, os resultados obtidos por SARTORI et al. (1998) mostram uma distribuição genótica no grupo de pacientes com TVP, significativamente, diferente daquela observada no grupo controle ($\chi^2 = 6,75$; GL = 2; P = 0,034), ocorrendo uma diminuição na frequência de homozigotos 5G5G nos pacientes. Porém, as diferenças nas frequências alélicas foram tangenciais à significância ($\chi^2 = 3,58$; GL = 1; P = 0,059), mostrando um excesso na frequência do alelo 4G no grupo de pacientes. Esses autores citaram os trabalhos RIDKER et al (1997e) e STEGNAR et al. (1998), mas não justificaram as possíveis causas da divergência de resultados.

É importante salientar que os estudos citados apresentaram características epidemiológicas diferentes. Por exemplo, trabalho de RIDKER et al. (1997e) foi realizado com os participantes de um amplo estudo prospectivo, *US Physicians' Health Study*, sendo composto por exclusivamente por homens, que desenvolveram trombose durante o período de seguimento do projeto. A idade média do evento de trombose nestes pacientes foi $62,3 \pm 9$ anos. O trabalho não informa se os pacientes tinham alguma das alterações genéticas que predis põem à trombose, tais como, deficiências de proteína C, proteína S, ATIII, ou presença de fator V Leiden.

No trabalho de STEGNAR et al. (1997) foram estudados 158 pacientes com idade média de 40 anos, todos nascidos na Europa Central, sendo 60% do sexo masculino. Esse trabalho também não informa se os pacientes apresentavam alguma alteração genética que predis põe à trombose.

Por outro lado, no estudo realizado por SARTORI et al. (1998), somente foram incluídos os pacientes que não apresentavam as alterações genéticas que são fatores de risco

para a trombose, já referidas acima. Nesse trabalho foram estudados 70 pacientes com idade média de $53,4 \pm 17$ anos, sendo 53% do sexo masculino. Esse trabalho foi realizado por pesquisadores italianos e suecos, entretanto não há referência sobre a origem dos pacientes.

Seguindo o procedimento adotado por SARTORI et al. (1998), resolvemos verificar a frequência desse polimorfismo nos dois subgrupos de pacientes do presente trabalho, os que tiveram o fator genético de risco para trombose identificado (FGRI) e os que não tiveram o fator genético de risco identificado (FGRNI). As frequências genotípicas e alélicas obtidas podem ser observadas na Tabela 4.9.3.

Tabela 4.9.3. Frequência do polimorfismo 4G5G no gene do PAI-1 em pacientes com TVP, subdivididos em relação à identificação do fator genético de risco e nos respectivos grupos controles.

subgrupo	N*	frequências genotípicas			frequências alélicas	
		4G4G	4G5G	5G5G	4G	5G
pacientes FGRI	47	0,405	0,340	0,255	0,575	0,425
controle	46	0,130	0,566	0,304	0,413	0,597
pacientes FGRNI	74	0,270	0,433	0,297	0,486	0,514
controle	71	0,296	0,521	0,183	0,560	0,440

*: número de indivíduos estudados

As frequências genotípicas e alélicas do subgrupo de pacientes FGRI foram diferentes das frequências do subgrupo controle, respectivamente, $\chi^2 = 9,29$; GL = 2; P = 0,009 e $\chi^2 = 4,22$; GL = 1; P = 0,040. O genótipo 4G4G foi mais frequente nesse subgrupo de pacientes do que no subgrupo controle ($\chi^2 = 7,53$; GL = 1; P = 0,006), enquanto que as frequências dos genótipos 4G5G e 5G5G no subgrupo controle e no subgrupo de pacientes FGRI foram similares.

Os nossos resultados indicam que, os indivíduos que apresentam um fator genético de risco para trombose e que são homozigotos 4G4G apresentam uma chance 4,5 vezes maior de desenvolver trombose (OR = 4,50; IC 95% = 1,60-12,76; P = 0,006) do que aqueles que não apresentam esse genótipo.

Esses nossos resultados são divergentes dos obtidos por RIDKER et al. (1997e) e STEGNAR et al. (1997), pois esses pesquisadores não encontraram a associação desse polimorfismo com TVP. Como já mencionado, os aspectos epidemiológicos dos trabalhos são

bastante diferentes, não havendo referência sobre a inclusão ou não de pacientes com fatores genéticos de risco. Portanto, uma possível causa dessa divergência, seja a possibilidade de indivíduos que não apresentam fatores genéticos de risco para TVP estarem incluídos nos trabalhos citados. Cabe salientar, que as frequências genótípicas nos grupos controles dos três trabalhos são similares ($\chi^2 = 0,297$; GL = 2; P = 0,680), assim a divergência dos resultados devem ser causadas pelas diferenças nas amostras de pacientes.

Os nossos resultados são divergentes dos obtidos por SARTORI et al. (1998) em dois aspectos:

1) No trabalho de SARTORI et al. (1998), como mencionado anteriormente, as frequências genótípicas foram diferentes entre pacientes e controles ($\chi^2 = 6,75$; GL = 2; P = 0,034), havendo uma redução na frequência de homozigotos 5G5G compensada por um aumento nas frequências de homozigotos 4G4G e de heterozigotos 4G5G, enquanto que as diferenças nas frequências alélicas foram tangenciais à significância. A partir destes resultados é possível inferir que, neste trabalho, o alelo 4G mostrou ser um fator de risco para TVP, tanto em homozigose com em heterozigose, enquanto que nos nossos dados somente a homozigose para o alelo 4G é um fator de risco.

2) Como o estudo de SARTORI et al. (1998) foi realizado somente em pacientes que não apresentavam fatores genéticos de risco para trombose, pode-se deduzir que a presença do alelo 4G seja um fator de risco independente. Entretanto, em nosso trabalho, observamos que o alelo 4G foi um fator de risco para TVP somente em homozigose e combinado com outros fatores de risco.

Por outro lado, os nossos resultados estão na mesma direção dos encontrados na metanálise sobre esse polimorfismo e infarto do miocárdio, realizada por IACOVELLO et al. (1998). Os resultados obtidos nesse trabalho indicaram diferenças no efeito do genótipo 4G4G em populações de baixo e alto risco de infarto do miocárdio. Esses autores sugeriram que a existência de ateroma e/ou disfunção metabólica sejam necessárias para que o efeito do genótipo 4G4G seja desencadeado.

Os nossos resultados também estão na mesma direção dos obtidos por ZÖLLER et al. (1998), os quais encontraram que indivíduos que apresentam deficiência de proteína S e são homozigotos 4G4G apresentam risco 4,5 vezes maior de desenvolver tromboembolismo pulmonar do que os indivíduos que apresentam esta deficiência e possuem os genótipos 4G5G ou 5G5G.

Como já mencionado, o PAI-1 atua no processo fibrinolítico inibindo o ativador tissular do plasminogênio, assim níveis elevados de PAI-1 diminuem a eficiência desse processo. O alelo 4G está relacionado com o aumento no nível desse inibidor, tanto em indivíduos sadios (ERIKSSON et al., 1995) como em pacientes com TVP (SARTORI et al., 1998). Estes últimos autores também demonstraram que os diferentes genótipos para PAI-1 apresentavam, concomitantemente, diferentes efeitos sobre a redução da atividade fibrinolítica e que este efeito foi significativamente menor nos homozigotos 5G5G do que os efeitos observados tanto para os heterozigotos 4G5G, como para os homozigotos 4G4G.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde a proposta de Virchow sobre a fisiopatologia da trombose, muitos progressos foram feitos e atualmente, consegue-se identificar um fator de risco genético em cerca de 50% dos pacientes com essa patologia.

Entretanto, a pergunta continua, o que está alterado nos outros 50% ?

Duas respostas são possíveis: a) nestes pacientes o fator de risco foi ambiental; b) existe uma alteração genética que ainda não foi descoberta.

Ambas respostas estão corretas, os fatores de risco ambientais estão bem estabelecidos e podem existir alterações genéticas desconhecidas, há 10 anos atrás o fator genético de risco mais freqüente, o fator V Leiden, ainda não havia sido identificado.

Porém, estas respostas nos levam a outras perguntas: a) por que nem todos os indivíduos que se expõem aos fatores de risco ambientais desenvolvem trombose venosa? b) se existe um componente genético, por que indivíduos consangüíneos do probando, com o mesmo fator de risco genético, não são afetados?

A resposta de que a trombose venosa é uma doença multifatorial não satisfaz a necessidade de compreensão do mecanismo. Essa resposta estimula a continuar a investigação sobre os fatores genéticos de risco, os seus efeitos e como interagem entre si e com os fatores ambientais para desencadear a doença.

No presente trabalho foi evidenciado que três polimorfismos de DNA (FVIII R353Q e -323P0/P10; PAI-1 4G5G) atuam de forma sinérgica a outros fatores genéticos de risco, ainda que, de forma isolada não sejam fatores de risco.

Temos interesse de verificar qual o efeito, no risco de trombose venosa, da interação destes polimorfismos com as outras variáveis estudadas neste trabalho (sistema sangüíneo ABO, fator VIII e fator von Willebrand) e com outros polimorfismos (nos genes do fibrinogênio, proteína C e fator XIII) que estão sendo estudados em nosso grupo, contribuindo assim, para uma melhor compreensão sobre o mecanismo dessa patologia.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram investigados, principalmente, polimorfismos de DNA dos genes envolvidos na síntese de proteínas relacionadas à hemostasia, como fatores de risco para a trombose venosa.

Neste estudo caso-controle foram incluídos 121 pacientes caucasóides com trombose venosa profunda e 121 controles. Também foram estudados 172 indivíduos negroídes da população em geral de diversos estados brasileiros.

Os pacientes foram encaminhados por profissionais da área de saúde e tiveram trombose venosa profunda nos membros inferiores, confirmada por flebografia ou ecodoppler ou que, mesmo sem esta confirmação diagnóstica, apresentavam trombose venosa de repetição ou trombose venosa profunda seguida de embolia pulmonar.

Foram excluídos pacientes nos quais a trombose venosa estivesse associada a patologias tais como diabetes, câncer e anticorpos anti-fosfolipídeos.

Foram investigados o fator V Leiden, o polimorfismo 20210G→A no gene da Protrombina, as deficiências de proteína C, proteína S e antitrombina III, os quais são fatores genéticos de risco bem-estabelecidos para trombose venosa. Também foram investigados os níveis dos fatores VIII e von Willebrand.

Além disso, foram realizados estudos de polimorfismos de DNA dos genes do Fator VII, do Inibidor do Ativador do Plasminogênio (Pai-1), do Ativador Tissular do Plasminogênio (t-PA), da Glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), do Fator II, do Fator V e da Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR).

Os critérios para a seleção dos polimorfismos a serem estudados foram: evidências de alteração na síntese das respectivas proteínas e/ou relatos de associação com doenças cardiovasculares.

Os principais resultados e conclusões alcançados podem ser sumariados como segue:

1) Reduções patológicas nos níveis dos principais inibidores fisiológicos de coagulação, proteína C, proteína S e ATIII, ocorreram de forma isolada (com uma exceção) em 16,3% dos pacientes.

2) A presença do Fator V Leiden ou do polimorfismo 20210G→A no gene da protrombina foi detectada em 28% dos pacientes.

Conclusão: apesar dos critérios de seleção dos pacientes favorecerem a identificação de fatores de risco hereditários, em uma frequência elevada dos pacientes (60%) não foram encontradas alterações genéticas.

3) De uma maneira geral, somente em 33% dos pacientes foi encontrada uma história familiar positiva. Quando os pacientes foram selecionados entre aqueles com os riscos genéticos identificados acima referidos, a frequência de ocorrência familiar desta patologia elevou-se para 40% dos pacientes. A idade média da primeira manifestação de trombose venosa foi 33 anos e os valores encontrados não foram diferentes entre os pacientes com fator risco genético identificado e naqueles sem fator de risco genético.

Conclusão: Considerando as variáveis genéticas estudadas, a elevada ausência de história familiar e a ausência de diferença na idade média de manifestação do primeiro sintoma entre pacientes com e sem fator de risco genéticos, a conclusão anterior de que existe um componente não genético importante no desenvolvimento da trombose venosa é reforçada

4) Foi encontrada uma frequência significativamente maior de mulheres (62%) do que de homens (38%) entre os afetados. Além disso, a idade média de manifestação do primeiro episódio de trombose venosa foi significativamente mais precoce entre as mulheres (32 anos) do que nos homens (37 anos).

Conclusão: As diferenças encontradas entre os sexos, tanto quanto à ocorrência, como em relação à idade de manifestação, provavelmente, são devidas aos fatores circunstanciais de risco tais como gestação, puerpério ou contraceptivo oral, os quais predis põem à trombose venosa.

5) Os grupos sanguíneos do sistema ABO não se distribuíram homogeneamente entre afetados e controles. Quando os indivíduos foram diferenciados em grupo O e grupo não-O, verifica-se uma concentração significativa do grupo não-O entre os afetados. Por outro lado, já foi descrito que os níveis de Fator VIII e de Fator von Willebrand também estão associados ao sistema sanguíneo ABO, pois os indivíduos do grupo não-O apresentam níveis mais elevados destes fatores. No presente estudo o complexo Fator VIII/Fator von Willebrand encontrava-se significativamente mais elevado nos pacientes do que nos controles. Entretanto,

estes aumentos dos níveis de Fator VIII e de Fator von Willebrand em pacientes mostraram-se independentes do efeito do sistema sanguíneo ABO.

Conclusão: Ainda que não tenha sido estabelecida uma relação de causa e efeito, há evidências de que o sistema sanguíneo ABO e os níveis dos Fatores VIII e von Willebrand estão associados com a Trombose Venosa Profunda e parecem atuar de forma independente.

6) A frequência de indivíduos com fator V Leiden nos pacientes com trombose venosa foi 21% e no grupo controle caucasóide foi 4,7%. Não tendo sido detectado nos grupos de negróides e ameríndios.

7) A frequência de indivíduos que apresentaram o alelo 20210A no gene da protrombina foi 9% no grupo de pacientes e 1% no grupo controle caucasóide; no grupo negróide a frequência foi 1,4%.

Conclusão: O fator V Leiden e o alelo 20210A do gene da protrombina são os fatores genéticos de risco para trombose venosa mais frequentes na população do Rio Grande do Sul.

8) As frequências alélicas dos polimorfismos de DNA dos genes da GPIIb/IIIa (PI^{A1}/PI^{A2}), MTHFR (677C →T), t-PA (I/D) e fator V (4070A→G) foram similares em pacientes e controles.

9) As frequências alélicas dos polimorfismos de DNA do fator VII foram diferentes entre controles e pacientes que apresentavam fatores genéticos de risco para a TVP. No grupo de pacientes que não apresentavam fator genético de risco identificado para TVP as frequências foram similares. A frequência de homozigotos para os alelos 353R e -323 P0 do gene do fator VIII, os quais estão relacionados com o aumento do nível desse fator de coagulação, foi maior no grupo de pacientes com fator de risco genético do que no grupo controle.

10) As frequências alélicas dos polimorfismos de DNA do PAI-1 foram diferentes entre controles e pacientes que apresentavam fatores genéticos de risco para a TVP. No grupo de pacientes que não apresentavam fator genético de risco para TVP as frequências foram similares. A frequência de homozigotos para o alelo 4G do PAI-1, o qual está relacionado com o aumento do nível desse inibidor da fibrinólise, foi maior no grupo de pacientes com fator de risco genético do que no grupo controle.

Conclusão: A homozigose para os alelos 353R e –323 do gene do fator VII ou 4G do gene do PAI-1 são fatores de risco adicionais em indivíduos que já apresentam um fator de risco genético para trombose.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The work presented in this thesis investigated DNA polymorphism of genes involved in the synthesis of proteins related to haemostasis as risk factors in deep venous thrombosis (DVT) patients in the Southern Brazilian state of Rio Grande do Sul (RS).

In this case-controlled study the subjects were 121 Caucasian patients with DVT from RGS and 121 controls (also from RS, but with no history of DTV) along with 172 Negroid individuals (no history of DVT) from diverse Brazilian states.

The patients were referred by health-care professionals and had a history of DVT in their lower limbs, confirmed either by flebography or Doppler-ecography. Some patients did not have their diagnosis confirmed but presented repeat venous thrombosis or DVT followed by pulmonary embolism. Patients whose venous thrombosis was associated with other pathologies, such as diabetes, cancer, or anti-phospholipid antibodies were excluded.

The well-established genetic risk-factors for venous thrombosis are factor V Leiden, polymorphism 20210G→A of the prothrombin gene, deficiencies of proteins C and S and antithrombin III (ATIII), all of which were investigated in the present study, along with the levels of factor VIII and von Willebrand factor.

DNA polymorphism was also studied in genes relating to factors II, V and VII, plasminogen-activator inhibitor (PAI-I), tissue-plasminogen activator (t-PA), glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) and methylenetetrahydrofolate-reductase (MTHFR).

The criteria for selection of polymorphisms were: evidence of altered protein synthesis and/or reports of polymorphism-associated cardiovascular disease.

The principal results and conclusions can be summarized as follows:

1. Pathological reductions in the levels of the principal physiological coagulation-inhibitors (protein C, protein S and ATIII) occurred in just over 16% of subjects.
2. The presence of factor V Leiden or polymorphism 20210G→A of the prothrombin gene was detected in 28% of subjects.

Conclusion 1: There were no genetic alterations in about 60% of the patients, in spite of the fact that the method of subject selection favored the inclusion of patients with hereditary risk-factors.

3. In general, only 33% of subjects had a positive family-history of DVT. When the subjects were selected from those with the above mentioned genetic risk-factors, 40% showed a positive family-history of DVT. The mean age of patients when DVT first occurred was 33 years, with no difference between subjects with and without identifiable risk-factors.

Conclusion 2: Considering the genetic variables studied in relation to both the low incidence of previous family history and the fact that there was no difference in age between subjects with and without risk-factors we may conclude that there is a substantial non-genetic component in DVT.

4. A significantly higher frequency of women (62%) than men (38%) were affected by DVT, and in women the mean age when the first DVT episode occurred (32 years) was significantly earlier than men (37 years).

Conclusion 3: The sex-related differences in relation to DVT frequency and age at first episode are probably due to associated risk-factors, such as previous pregnancies, puerperium and oral-contraceptives, all of which predispose to DVT.

5. The groups of the ABO blood system were heterogeneously distributed between DVT-positive patients and DVT-negative controls, with significantly more DVT-positive patients belonging to non-O blood groups. Factor VIII and von Willebrand factor are both blood-group associated, and non-O subjects exhibited significantly elevated levels of these factors. The data showed that the level of the factor VIII/von Willebrand Factor complex was significantly higher in DVT patients than in controls, although this was independent of blood-group.

Conclusion 4: Although no cause and effect relationship was established, the data indicates that the ABO blood-group system and the levels of the factor VIII/von Willebrand factor complex are associated with DVT, and that they seem to act independently.

6. The frequency of factor V Leiden in DVT patients was 21%, while it was 4.7% in Caucasian controls and undetected in Negroids and in Amerindians.

7. The frequency of heterozygous for the 20210A allele of the prothrombin gene was 9% in patients and about 1% in the Caucasian control and Negroid groups.

Conclusion 5: Factor V and the 20210A allele of the prothrombin gene are the most frequent genetic risk-factors predisposing to DVT in the Rio Grande do Sul population.

8. The allele frequencies of the polymorphisms of the genes for GPIIIb/IIIa (PI^{A1}/PI^{A2}), MTHFR (677C→T), t-PA (I/D) and factor V (4070A→G) were similar in patients and controls.

9. The allele frequencies of the polymorphisms of the genes for factor VII were different between controls and patients presenting identifiable genetic risk-factors for DVT, but there was no difference between the controls and patients not presenting genetic risk factors. The homozygous frequency for alleles 353R and -323PO of the genes for factor VIII (these alleles are implicated in the increase of factor VIII) were higher in patients with genetic risk-factors than in the control groups.

10. The allele frequencies of the polymorphisms of the genes for PAI-I were different between controls and patients presenting identifiable genetic risk-factors for DVT, but there was no difference between the controls and patients not presenting genetic risk factors. The homozygous frequency for allele 4G of PAI-I (this allele is implicated in increased fibrinolysis inhibitor) were higher in patients with genetic risk-factors than in the control groups.

Conclusion 6: Homozygosity for alleles 353R and -323PO of the gene for factor III or 4G of the PAI-I gene are additional risk factors in individuals who already present genetic risk factors for deep venous thrombosis.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABILDGAARD, D. (1981). Antithrombin and Related Inhibitors of Coagulation. In: **Recent Advances in Blood Coagulation. Vol 3**, pp.151-173. Pollar, L. (ed). Churchill Livingstone, Edinburgh.
- AIACH, M., NICAUD, V., ALHENC-GELAS, M., GANDRILLE, S., ARNAULD, E., ARNAULD, E., AMIRAL, J., GUIZE, L., FIESSINGER, J-N., EMMERICH, J. (1999). Complex Association of Protein C Gene Promoter Polymorphism with Circulating Protein C Levels and Thrombotic Risk. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1573-1576.
- ALHENC-GELAS, M., ARNAULD, E., NICAUD, V., AUBRY, M-L., FIESSINGER, J-N., AIACH, M., EMMERICH, J. (1999). Venous Thromboembolic Disease and Prothrombin, Methylenetetrahydrofolate Reductase and Factor V Genes. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 506-510.
- ALHENC-GELAS, M., NICAUD, V., GANDRILLE S., van DREDEN, P., AMIRAL, J., AUBRY, M-L., FIESSINGER, J-N., EMMERICH, J., AIACH, M. (1999a). The Factor V Gene A4070G Mutation and the Risk of venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 193-197.
- ALLAART, C.F., POORT, S.R., ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M., BRIËT, E. (1993). Increased Risk of Venous Thrombosis in Carriers of Hereditary Protein C Deficiency Defect. **Lancet**, **341**: 134-138.
- ALLAN, T.M. & DAWSON, A.A. (1968). ABO Blood Groups and Ischaemic Heart Disease in Men. **British Heart Journal**, **30**: 377-382.
- ANDRADE, F.L., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., SAAD, S.T.O., COSTA, F.F. , ARRUDA, V.R. (1998). Prothrombin Mutant, Factor V Leiden, and Thermolabile Variant of Methylenetetrahydrofolate Reductase Among Patients with Sickle Cell Disease in Brazil. **American Journal of Hematology**, **59**: 46-50.
- ANTONIADI, T., HATZIS, T., KROUPIS, C., ECONOMOU-PETERSEN, E., PETERSEN, M.B. (1999). Prevalence of Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations in a Greek Population of Blood Donors. **American Journal of Haematology**, **61**: 265-267.
- AOKI, N., MOROI, M., SAKATA, Y., YOSHIDA, N., MATSUDA, M. (1978). Abnormal Plasminogen. A Hereditary Molecular Abnormality Found in a Patient with Recurrent Thrombosis. **Journal of Clinical Investigation**, **61**: 1186-1195.
- ARNAULD, E., MOATTI, D., EMMERICH, J., AIACH, M., PROST, D. (1999). No Link between the TFPI V264M Mutation and Venous Thromboembolic Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 159-160.

- ARNUTTI, O., HIYOSHI, M., PRAYOONWIWAT, W., NATHALANG, O., SUWANASOPHON, C., KOKASEAM, R., TATSUMI, N. (1998). Coagulation Factor V Leiden Mutation was Detected in the Patients with Activated Protein C resistance in Thailand. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 344-345.
- ARRUDA, V.R., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., COSTA, F.F., REITSMA, P.H. (1995). Factor V Leiden (FVQ 506) is Common in a Brazilian Population. **American Journal of Haematology**, **49**: 242-243.
- ARRUDA, V.R., von ZUBEN, P.M., SOARES, M.C.P., MENEZES, R., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., COSTA, F.F. (1996). Very Low Incidence of Arg506→Gln Mutation in the Factor V Gene among the Amazonian Indians and the Brazilian Black Population. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 860-861.
- ARRUDA, V.R., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., GONÇALVES, M.S., COSTA, F.F. (1997). Prevalence of the Prothrombin Variant (nt 20210A) in Venous Thrombosis and Arterial Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 1430-1433.
- ARRUDA, V.R., von ZUBEN, P.M., CHIAPARINI, L.C., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., COSTA, F.F. (1997). The Mutation C677→T in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene: A Risk Factor for Arterial Disease and Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 818-821.
- ARRUDA, V.R., SIQUEIRA, L.H., GONÇALVES, M.S., von ZUBEN, P.M., SOARES, M.C.P., MENEZES, R., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., COSTA, F.F. (1998). Prevalence of the Mutation C677→T in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene among Distinct Ethnic Groups in Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, **78**: 332-335.
- ASCHKA, I., AUMANN, V., BUDDE, U., EBERL, W., ECKHOF-DONOVAN, S., KREY, S., NOWAK-GÖTTL, U., SCHOBESS, R., WENDISH, J., SCHNEPPENHEIM, R. (1996). Prevalence of Factor V Leiden in Children with Thrombo-embolism. **European Journal of Pediatrics**, **155**: 1009-1014.
- AUSTEN, D.E.G. & RHYMES, I.L. (1975). **A Laboratory Manual of Blood Coagulation**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 109pp.
- AYRES, M., AYRES Jr., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. (1998). **BioEstat**. Sociedade Civil Mamirauá, 193pp.
- AWIDI, A., SHANNAK, M., BSEISO, A., KAILANI, M.A.M., KAILANI, M.A., OMAR, N., ANSHASI, B., SAKARNEH, N. (1999). High Prevalence of Factor V Leiden in Healthy Jordanian Arabs. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 582-584.
- BAJAJ, M.S., RANA, S.V., WYSOMERSKI, K.B., BAJAJ, SP. (1987). Inhibitor of factor VIIa-tissue Factor Complex is Reduced in Patients with Disseminated Intravascular Coagulation but not in Patients with Severe Hepatocelular Disease. **Journal of Clinical Investigation**, **79**: 1874-1878.

- BAJAJ, M.S., KUPPUSWAMY, M.N., SAITO, H., SPITZER, S.G., BAJAJ, S.P. (1990). Cultured Normal Human Hepatocytes do not Synthesize Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor: Evidence that Endothelium is the Principal Site of the Synthesis. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **87**: 8869-8873.
- BAJAJ, M.S. & BAJAJ, SP. (1997). Tissue Factor Pathway Inhibitor: Potential Therapeutic Applications. **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 471-477.
- BALLEISEN, L., BAILEY, J., EPPING, P-H., SCHULTE, H., van de LOO, J. (1985a). Epidemiological Study on Factor VII, Factor VIII and Fibrinogen in an Industrial Population: I Baseline Data on the Relation to Age, Gender, Body weight, Smoking, Alcohol, Pill-using, and Menopause. **Thrombosis and Haemostasis**, **54**: 475-479.
- BALLEISEN, L., ASSMANN, G., BAILEY, J., EPPING, P-H., SCHULTE, H., van de LOO, J. (1985b). Epidemiological Study on Factor VII, Factor VIII and Fibrinogen in an Industrial Population- II Baseline Data on the Relation to Blood Pressure, Blood Glucose, Uric Acid, and Lipid Fractions. **Thrombosis and Haemostasis**, **54**: 721-723.
- BALOGH, I., PÓKA, R., PFLIEGLER, G., DÉKÁNY, M., BODA, Z., MUSZBEK, L. (1999). High Prevalence of Factor V Leiden Mutation and 20210A Prothrombin Variant in Hungary. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 660-661.
- BATHELEIR, C., CHAMPENOIS, T., LUCCOTTE, G. (1998). ARMS Test for Diagnosis of Factor V Leiden Mutation and Allele Frequencies in France. **Molecular and Cellular Probes**, **12**: 121-123.
- BATZER, M.A., GUDI, V.A., MENA, J.C., FOLTZ, D.W., HERRERA, R.J., DEININGER, P.L. (1991). Amplification Dynamics of Human-Specific (HS) Alu Family Members. **Nucleic Acids Research**, **19**: 3619-3623.
- BAUER, K.A. & ROSENBERG, R.D. (1991). Role of Antithrombin III as a Regulator of In Vivo Coagulation. **Seminars in Hematology**, **28**: 10-18.
- BECKMANN, R.J., SCHIMIDT, R.J., SANTERRE, R.F., PLUTZKI, J., CRABTREE, G.R., LONG, G.L. (1985). The Structure and Evolution of a 461 Amino Acid Human Protein C Precursor and its Messenger RNA, Based upon the DNA Sequence of Cloned Human Liver cDNAs. **Nucleic Acids Research**, **13**: 5233-5247.
- BEIGUELMAN, B. (1998). **Curso Prático de Bioestatística**. Sociedade Brasileira de Genética. São Paulo, Brasil. 231pp.
- BENHAM, F.J., SPURR, N., POVEY, S., BRINTON, B.T., GOODFELLOW, P.N., SOLOMON, E., HARRIS, T.J. (1984). Assignment of Tissue-type Plasminogen Activator to Chromosome 8 in Man and Identification of a Common Restriction Length Polymorphism within the Gene. **Molecular Biology and Medicine**, **2**: 251-259.
- BENNETT, J.S. (1990). The Molecular Biology of Platelet Membrane Proteins. **Seminars in Hematology**, **27**: 186-204.

- BENTZEN, J., BLADBJERG, E.M., de MAAT, M.P.M., MARCKMANN, P. (1996). Plasma Factor VII Levels are Determined by Polymorphisms in the Factor VII Gene. **Fibrinolysis**, **10**: 17-18.
- BERESFORD, C.H. & OWEN, M.C. (1990). Antithrombin III. **International Journal of Biochemistry**, **22**: 121-128.
- BERNARDI, F., ARCIERI, P., BERTINA, R.M., CHIAROTTI, F., CORRAL, J., PINOTTI, M., PRYDZ, H., SAMAMA, M., SANDSET, P.M., STROM, R., GARCIA, V., MARIANI, G. (1997). Contribution of Factor VII Genotype to Activated FVII Levels. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 2548-2553.
- BERNARDI, F., FAIONI, E.M., CASTOLDI, E., LUNGHI, B., CASTAMAN, G., SACCHI, E., MANNUCCI, P.M. (1997). A Factor V Genetic Component Differing from Factor V R506Q Contributes to the Activated Protein C Resistance Phenotype. **Blood**, **90**: 1552-1557.
- BERTINA, R.M., KOELEMAN, B.P.C., KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., DIRVEN, R.J., RONDE, H., van der VELDEN, P.A., REITSMA, P.H. (1994). Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C. **Nature**, **369**: 64-67.
- BERTINA, R. (1999). Molecular Risk Factors for Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 601-609.
- BIASIUTTI, F.D., SULZER, I., STUCKI, B., WUILLEMIN, W.A., FURLAN, M., LÄMMLE, B. (1998). Is Plasminogen Deficiency a Thrombotic Risk Factor?- A Study on 23 Thromboembolic Patients and Their Family Members. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 167-170.
- BILLINGSLEY, G.D., WALTER, M.A., HAMMOND, G.L., COX, D.W. (1993). Physical Mapping of Four Serpin Genes: α 1-antitrypsin, α 1-antichymotrypsin, Corticosteroid Binding Globulin, Protein C Inhibitor, within a 280 Kb Region on Chromosome 14q32.1. **American Journal of Human Genetics**, **52**: 343-353.
- BJORK, I., JACKSON, C.M., JORNVALL, H., LAVINE, K.L., NORDLING, K., SALSGIVER, W.J. (1982). The Active site of Antithrombin. **The Journal of Biological Chemistry**, **257**: 2406-2411.
- BLADBJERG, E.M., ANDERSEN-RANBERG, K., de MAAT, M., KRISTENSEN, S.R., JEUNE, B., GRAM, J., JESPERSEN, J. (1999). Longevity Is Independent of Common Variants in Genes Associated with Cardiovascular Risk. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 1000-1005.
- BLAJCHMAN, M.A. (1994). An Overview of the Mechanism of Action of Antithrombin and its Inherited Deficiency States. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, **5**: S5-11.
- BLOOM, A.L. (1981). Inherited Disorders of Blood Coagulation. In. BLOOM, A.L. & THOMAS; D.P. **Haemostasis and Thrombosis**. London, Churchill Livingstone. cap. 20, p. 321-370.

- BOCK, S.C., HARRIS, J.F., BALAZS, I., TRENT, J.M. (1985). Assignment of the Human Antithrombin III Structure Gene to Chromosome 1q23-1q25. **Cytogenetics and Cell Genetics**, **39**: 67-69.
- BORTOLINI, M.C. (1999). Breve Visão sobre a Gênese e Evolução das Populações Neoamericanas. **In**. FREITAS-SACCHET, A.M. **Genética Para Que Te Quero?** Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. cap. 7, pg. 57-62.
- BOWEN, D.J., BOWLEY, S., JOHN, M., COLLINS, P.W. (1998). Factor V Leiden (G1691A), the Prothrombin 3'-Untranslated Region Variant (G20210A) and Thermolabile MethylenetetraHydrofolate Reductase (C677T): A Single Genetic Test Genotypes all Three Loci-Determination of Frequencies in the S. Wales Population of the UK. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 949-954.
- BRAUN, A., MÜLLER, B., ROSCHE, A.A. (1996). Population Study of the G1691A Mutation (R506Q, FV Leiden) in the Humana Factor V Gene That Is Associated with Resistance to Activated Protein C. **Human Genetics**, **97**: 263-264.
- BRAY, P.F. (1999). Integrin Polymorphisms as Risk Factors for Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 337-344.
- BRENNER, B., SARIG, G., WINER, Z., YOUNIS, J., BLUMENFELD, Z., LANIR, N. (1999). Thrombophilic Polymorphisms are Common in Women with Fetal Loss without Apparent Cause. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 6-9.
- BRIËT, E., BROEKMANS, A.W., ENGESSER, L. (1988). Hereditary Protein S Deficiency. **In** BERTINA, R.M. (Ed.) **Protein C and Related Proteins: Biochemical and Clinical Aspects**. Churchill Livingstone, Edinburgh, p.203-212.
- BROEKMANS, A.W., VELTKAMP, J.J., BERTINA, R.M. (1983a). Congenital Protein C Deficiency and Venous Thromboembolism. **The New England Journal of Medicine**, **309**: 340-344.
- BROEKMANS, A.W., van der LINDEN, I.K., VELTKAMP, J.J., BERTINA, R.M. (1983b). Prevalence of Isolated Protein C Deficiency in Patients with Venous Thrombotic Disease and in the Population. **Thrombosis and Haemostasis**, **50**: 350.
- BROEKMANS, A.W., BERTINA, R.M., REINALDA-POOT, J., ENGESSER, L., MULLER, H.P., LEEUW, J.A., MICHIELS, J.J., BROMMER, E.J.P., BRIËT, E. (1985). Hereditary Protein S Deficiency and Venous Thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, **53**: 273-277.
- BROWN, K., LUDDINGTON, R., WILLIAMSON, D., BALER, P., BAGLIN, T. (1997). Risk of Venous Thromboembolism Associated with a G to A Transition at Position 20210 in the 3'- untranslated Region of the Prothrombin Gene. **British Journal of Haematology**, **98**: 907-909.
- BROZE, G.J., MILETICH, J.P. (1987). Isolation of the Tissue Factor Inhibitor Produced by HepG2 Hepatoma Cells. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **84**: 1886-1890.

- BROZE, G.J., WARREN, L.A., NOVOTNY, W.F., HIGUCHI, D.A., GIRARD, J.J., MILETICH, J.P. (1988). The Lipoprotein-Associated Coagulation Factor that Inhibits the Factor VII-Tissue Factor Complex also Inhibits Factor Xa: Insight into its Possible Mechanism of Action. **Blood**, **71**: 335-343.
- BROZE, G.J., NOVOTNY, W.F., GIRARD, J.J. (1990). Regulation of Coagulation by a Multivalent Kunitz-type Inhibitor. **Biochemistry**, **29**: 7339-7446.
- BRUGADA, R. & MARIAN, A.J. (1997). A Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene is Not a Major Risk of Coronary Artery Disease or Myocardial Infarction. **Atherosclerosis**, **128**: 107-112.
- BURICK, A., WISOTZKEY, J.D., NAJARIAN, M.P., MONK, J.S., RHOADS, J.E. (1997). The Role of Preoperative Factor V Leiden Screening in Different Geographic Populations. **American Surgeon**, **63**: 547-550.
- BURZOTTA, F., Di CASTELNUOVO, A., AMORE, C., D'ORAZIO, A., Di BITONDO, R., DONATI, M.B., IACOVELLO, L. (1998). 4G/5G Promoter PAI-1 Gene Polymorphism Is Associated with Plasmatic PAI-1 Activity in Italians: A Model of Gene-Environment Interaction. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 354-358.
- CAM-DUCHEZ, V., GANDRILLE S, TRÉGOUEËT, D., ALHENC-GELAS, M., EMMERICH, J., FIESSINGER, J-N., BORG, J-Y., AIACH, M. (1999). Influence of Three Potential Genetic Risk Factors for Thrombosis in 43 Families Carrying the Factor V Arg 506 Gln Mutation. **British Journal of Haematology**, **106**: 889-897.
- CANFIELD, W.M. & KISIEL, W. (1982). Evidence of Normal Functional Levels of Activated Protein C Inhibitor in Combined Factor V/Factor VIII Deficiency Disease. **Journal of Clinical Investigation**, **70**: 1260-1272.
- CARROL., V.A., GRIFFITHS, M.R., GEIGER, M., MERLO, C., FURLAN, M., LÄMMLER, B., BINDER, B.R. (1997). Plasma Protein C Inhibitor is Elevated in Survivors of Myocardial Infarction. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 114-118.
- CARTER, A.M., OSSEI-GERNING, N., GRANT, P.J. (1996). Platelet Glycoprotein IIIa P1A Polymorphism and Myocardial Infarction. **The New England Journal of Medicine**, **309**: 1072-1073.
- CATTANEO, M., TSAI, M.Y., BUCCIARELLI, P. TAIOLI, E., ZIGHETTI, M.L., BIGNELL, M., MANNUCCI, P.M. (1997). A Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene (C677T) Increases the Risk for Deep-Vein Thrombosis in Patients with Mutant Factor V (Factor V:Q⁵⁰⁶). **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1662-1666.
- CATTO, A.J., CARTER, A.M., STICKLAND, M., BAMFORD, J.M., DAVIES, J.A., GRANT, P.J. (1997). Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G Promoter Polymorphism and Levels in Subjects with Cerebrovascular Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 730-734.

- CHAFI, O., REGHIS, A., AUBERT, A., FISCHER, A-M. (1997). Prevalence of the FVQ 506 (Factor V Leiden) Mutation in the Normal and Thrombophilic Algerian Population. **British Journal of Haematology**, **97**: 685-692.
- CHAN, T.K. & CHAN, V. (1981). Antithrombin III, the Major Modulator of Intravascular Coagulation, is Synthesized by Human Endothelial Cells. **Thrombosis and Haemostasis**, **46**: 504-506.
- CHRISTENSEN, B., FROSST, P., LUSSIER-CACAN, S., SELHUB, J., GOYETTE, P., ROSENBLATT, D.S., GENEST, J., ROZEN, R. (1997). Correlation of a Common Mutation in the Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene with Plasma Homocysteine in Patients with Premature Coronary Artery Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 569-573.
- COLLÉN, D., SCHETZ, J., DeCOCK, F., HOLMER, E., VERSTRAETE, M. (1977). Metabolism of Antithrombin III (Heparin Cofactor) in Man: Effects of Venous Thrombosis and of Heparin Administration. **European Journal of Clinical Investigation**, **7**: 27-35.
- COMP, P.C. & ESMON, C.T. (1981). Generation of Fibrinolytic Activity by Infusion of Activated Protein C in Dogs. **Journal of Clinical Investigation**, **68**: 1221-1228.
- COMP, P.C., NIXON, R.R., COOPER, M.R., ESMON, C.T. (1984). Familial Protein S Deficiency is Associated with the Recurrent Thrombosis. **Journal of Clinical Investigation**, **74**: 2082-2088.
- COOPER, D.N., BALL, E.V., KRAWCZAK, M. (1998). The Human Gene Mutation Database. **Nucleic Acids Research**, **26**: 285-287.
- CORRAL, J., GONZALEZ-CONEJERO, R., LAZANO, M.L., RIVERA, J., VICENTE, V. (1997). The Venous Thrombosis Risk Factor 20210A Allele of the Prothrombin Gene Is Not a Major Risk Factor for Arterial Thrombotic Disease. **British Journal Haematology**, **99**: 304-307.
- CORRAL, J., GONZALEZ-CONEJERO, R., LAZANO, M.L., RIVERA, J., VICENTE, V. (1998). Genetic Polymorphisms of Factor VII are not Associated with Arterial Thrombosis. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, **9**: 267-272.
- CORTELLARO, M., BOSCHETTI, C., COFRANCESCO, E., ZANUSSI, C., CATALANO, M., de GAETANO, G., GABRIELLI, L., LOMBARDI, G., SPECCHIA, G., TAVAZZI, L., TREMOLI, E., della VOLPE, A., POLLI, E., and the PLAT STUDY GROUP. (1992). The PLAT Study: Hemostatic Function in Relation to Atherothrombotic Ischemic Events in Vascular Disease Patients. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, **12**: 1063-1070.
- COUGHLIN, S.R. (1998). How Thrombin "Talks" to Cell: Molecular Mechanisms and Roles In Vivo. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **18**: 514-518.
- COX, M.J., REES, D.C., MARTINSON, J.J., CLEGG, J.B. (1996). Evidence for a Single Origin of Factor V Leiden. **British Journal of Haematology**, **92**: 1022-1025.

- CRIFE, L.D., MOORE, K.D., KANE, W.H. (1992). Structure of the Gene for Human Coagulation Factor V. **Biochemistry**, **31**: 3777-3785.
- CUMMING, A.M., KEENEY, S., SALDEN, A., BHAVNANI, M., SHWE, K.H., HAY, C.R.M. (1997). The Prothrombin Gene G20210A Variant: Prevalence in a U.K. Anticoagulant Clinic Population. **British Journal of Haematology**, **98**: 353-355.
- DAHLBÄCK, B. (1984). Interaction between Vitamin K-dependent Protein S and the Complement Protein C4b-binding Protein. **Seminars in Thrombosis and Haemostasis**, **10**: 139-148.
- DAHLBÄCK, B., CARLSSON, M., SVENSSON, P.J. (1993). Familial Thrombophilia Due to a Previously Unrecognized Mechanism Characterized by Poor Anticoagulant Response to Activated Protein C: Prediction of a Cofactor to Activated Protein C. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **90**: 1004-1008.
- DAHLBÄCK, B. & HIDELBRAND, B. (1994). Inherited Resistance to Activated Protein C is Corrected by Anticoagulant Cofactor Activity Found to be a Property of Factor V. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **91**: 1396-1400.
- D'ANGELO, A. & SELHUB, J. (1997) Homocysteine and Thrombotic Disease. **Blood**, **90**: 1-11.
- DAVIE, E.W. & RATNOFF, O.D. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. **Science**, **145**: 1310-1312.
- DAWSON, S.J., WIMAN, B., HAMSTEN, A., GREEN, F., HUMPHRIES, S., HENNEY, A.M. (1993). The Two Allele Sequences of a Common Polymorphism of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene Respond Differently to Interleukin-1 in HepG2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, **268**: 10739-10745.
- DEGEN, S.J.F., RAJPUT, B., REICH, E. (1986). The Human Tissue Plasminogen Activator Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, **261**: 6972-6985.
- de MAAT, M.P.M., GREEN, F., KNIJFF, P., JESPERSEN, J., KLUFT, C. Factor VII Polymorphisms in Populations with Different Risks of Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 1918-1923.
- de MAAT, M.P.M., BLADBJERG, E.M., JOHANSEN, L.G., BENTZEN, J., JESPERSEN, J. (1997). PIA1/A2 Polymorphism of Platelet Glycoprotein IIIa and Risk of Cardiovascular Disease. **The Lancet**, **349**: 1099-1100.
- de MAAT, M.P.M., BLADBJERG, E.M., JOHANSEN, L.G., .GRAM, J., JESPERSEN, J. (1998). Absence of Prothrombin Mutation in Inuit (Greenland Eskimos). **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 882.
- DEMERS, C., GINSBERG, J.S., HIRSH, J., HENDENSON, P., BLAJMAN, M.A. (1992). Thrombosis and Antithrombin III-Deficient Persons. Report of a Large Kindred and Literature Review. **Annals of Internal Medicine**, **116**: 754-761.

- den HEIJER, M., KOSTER, T., BLOM, H.J., BOS, G.M.J., BRIËT, E., REITSMA, P.H., VANDENBROUCKE, J.P., ROSENDAAL, F.R. (1996). Hyperhomocysteinemia as Risk Factor for Deep-Vein Thrombosis. **New England Journal of Medicine**, **334**: 759-762.
- Di CASTELNUOVO, A., D'ORAZIO, A., AMORE, C., FALANGA, A., KLUFT, C., DONATI, M.B., IACOVELLO, L.(1998). Genetic Modulation of Coagulation Factor VII Plasma Levels: Contribution of Different Polymorphisms and Gender-related Effects. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 592-597.
- DIEPSTRATEN, C.M., PLOOS VAN AMSTEL, J.K., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M. (1991). A CCA/CCG Neutral dimorphism in the Codon for Pro 626 of the Human Protein S Gene PS α (PROS1). **Nucleic Acids Research**, **19**: 5091.
- DILLEY, A., AUSTIN, H., HOOPER, W.C., LALLY, C., RIBEIRO, M.J.A., WENGER, N.K., SILVA, V., RAWLINS, P., EVATT, B. (1998). Relation o Three Genetic Traits to Venous Thrombosis in an African-American Population. **American Journal of Epidemiology**, **147**: 30-35.
- DiSCIPIO, R.G. & DAVIE, E.W. (1979). Characterization of protein S, a Gamma-carboxyglutamic Acid Containing Protein from Bovine and Human plasma. **Biochemistry**, **18**: 899-904.
- DIZON-TOWNSON, D.S., MELINE, L., NELSON, L.M., VARNER, M., WARD, K. (1997). Fetal Carriers of the Factor V Leiden Mutation are Prone to Miscarriage and Placental Infarction. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, **177**: 402-405.
- DOGGEN, C.J.M., CATS, V.M., BERTINA, R.M., REITSMA, P.H., VANDENBROUKE, J.P., ROSENDAAL, F.R. (1998). A Genetic Propensity to High Factor VII is not Associated with the Risk of Myocardial Infarction in Men. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 281-285.
- DOGGEN, C.J.M., BERTINA, R.M., CATS, V.M., REITSMA, P.H., ROSENDAAL, F.R. (1999). The 4G/5G Polymorphism in the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene is not Associated with Myocardial Infarction. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 115-120.
- DORNELLES, C.L. (1998). Variabilidade Genética e Protéica em Populações Caucasóides do Sul do Brasil. Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DZIMIRI, N. & MEYER, B. (1996). World Distribution of Factor V Leiden. **The Lancet**, **347**: 481-482.
- ECAT ANGINA PECTORIS STUDY GROUP. (1993). ECAT Angina Pectoris Study: Baseline Associations of Haemostatic Factors with Extent of Coronary Artherosclerosis and Other Coronary Risk factors in 3000 Patients with Angina Pectoris Undergoing Coronary Angiography. **European Heart Journal**, **14**: 8-17.
- EGEBERG, O. (1965). Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. **Thrombosis and Diathesis Haemorrhagica**, **13**: 516-530.

- EHRENFORTH, S., von DEPKA PRONDSINSKI, M., AYGÖREN-PÜRSÜN, E., NOWAK-GÖTTL, U., SCHARRER, I., GANSER, A. (1999). Study of the Prothrombin Gene 20210 GA Variant in FV:Q⁵⁰⁶ Carriers in Relationship to the Presence or Absence of Juvenile Venous Thrombosis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 276-280.
- EMMERICH, J., ALHENC-GELAS, M., AILLAUD, M-F., JUHAN-VAGUE, I., JUDE, B., GARCIN, J-M., DREYFUS, M., MOERLOOSE, P., LE QUERREC, A., PRIOLLET, P., BERRUYER, M., VALLANTIN, X., WOLF, M., AIACH, M. FIESSINGER, J-N. (1997). Clinical Features in 36 Patients Homozygous for the Arg506→Gln Factor V Mutation. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 620-623.
- ENGESSER, L., BROEKMANS, A.W., BRIËT, E., BROMMER, E.J.P., BERTINA, R.M. (1987a). Hereditary Protein S Deficiency: Clinical Manifestations. **Annals of Internal Medicine**, **106**: 677-682.
- ENGESSER, L., BROMMER, E.J.P, KLUFT, C., BRIËT, E. (1989). Elevated Plasminogen Activator inhibitor (PAI), a cause of Thrombophilia? A Study in 203 Patients with Familial or Sporadic Venous Thrombophilia. **Thrombosis and Haemostasis**, **62**: 673-680.
- ERIKSSON, P., KALLIN, B., van't HOOFF, F.M., BAVENHOLM, P., HAMSTEN, A. (1995). Allelic-specific Increase in Basal transcription of the Plasminogen-Activator Inhibitor 1 gene is Associated with Myocardial Infarction. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, **92**: 1851-1855.
- ESMON, C.T. (1988). The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, **9**: 4743-4746.
- ESMON, C.T., XU, J., GU, J-M., QU, D., LASZLIK, Z., FERREL, G., STEARNS-KUROSAWA, D.J., KUROSAWA, S., TAYLOR Jr., F., ESMON, N.L. (1999). Endothelial Protein C Receptor. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 251-258.
- ESPAÑA, F., BERRETTINI, M., GRIFFIN, J.H. (1989). Purification and Characterization of Plasma Protein C Inhibitor. **Thrombosis Research**, **55**: 369-384.
- ESPINOSA, E., SADLER, J.E., LEBEAU, M.M. (1989). Regional Localization of the Human Thrombomodulin Gene to 20p12-cen. **Genomics**, **5**: 649-650.
- FAIONI, E.M., MERATI, G., PEYVANDI, F., BETTINI, P.M., MANNUCCI, P.M. (1997). The G¹⁴⁶⁵ to T Mutation in the Thrombomodulin Gene is not Frequent in Patients with Venous Thrombosis. **Blood**, **89**: 1467.
- FAIONI, E.M., FRANCHI, F., BUCCIARELLI, P., MARGAGLIONE, M., De STEFANO, V., CASTAMAN, G., FINAZZI, G., MANNUCCI, P.M. (1999). Cohinheritance of the HR2 Haplotype in the Factor V Gene Confers an Increased Risk of Venous Thromboembolism to Carriers of Factor V R506Q (Factor V Leiden). **Blood**, **94**: 3062-3066.
- FAIR, D.S. & BAHNAK, B.R. (1984). Human Hepatoma Cells Secrete Single Chain Factor X, Prothrombin and Antithrombin III. **Blood**, **64**: 194-204.

- FAIR, D.S & MARLAR, R.A. (1986). Biosynthesis and Secretion of Factor VII, Protein C, Protein S and Protein C Inhibitor from a Human Hepatoma Cell Line. **Blood**, **67**: 64-70
- FAIR, D.S., MARLAR, R.A., LEVIN, E.G. (1986). Human Endothelial Cells Synthesize Protein S. **Blood**, **67**: 1168-1171.
- FAY, W.P., SHAPIRO, A.D., SHIH, J.L., SCHLEEF, R.R., GINSBURG, D. (1992). Complete Deficiency of a Plasminogen-activator Inhibitor due to a Frameshift Mutation. **The New England Journal of Medicine**, **317**: 1729-1733.
- FENG, D., LINDPAINTNER, K., LARSON, M.G., STERLAND, P.A., SILBERSHATZ, H., D'AGOSTINO, R.B., MULLER, J.E., MYERS, R.H., LEVY, D., TOFLER, G.H. (1999). Increased Platelet Aggregability Associated with Platelet GPIIb/IIIa PI^{A2} Polymorphism. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1142-1147.
- FERRARESI, P., MACHETTI, G., LEGNANI, C., CAVALLARI, E., CASTOLDI, E., MASCOLI, F., ARDISSIMO, D., PALARETI, G., BERNARDI, F. (1997). The Heterozygous 20210 G/A Prothrombin Genotype is Associated with Early Venous Thrombosis in Inherited Thrombophilia and is not Increased in Frequency in Artery Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 2418-2422.
- FINAZZI, G. & BARBUI, T. (1994). Different Incidence of Venous Thrombosis in Patients with Inherited Deficiencies of Antithrombin III, Protein C, Protein S. **Thrombosis and Haemostasis**, **71**: 15-18.
- FISCHER, R.R., PEREIRA, W.V., PEREIRA, D.V, ROISENBERG, I. (1984). Inherited Factor C Deficiency: Study of a Brazilian Family. **Human Heredity**, **34**: 226-230.
- FISCHER, R.R., LUCAS, E., PEREIRA, A.M.C.B., ROISENBERG, I. (1996). Preparation of a Heterologous Antiserum for the Determination of von Willebrand Factor in Human Plasma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **29**: 1641-1644.
- FISCHER, R.R. (1995). A Doença de von Willebrand no Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FLEM, L., PICARD, V., EMMERICH, J., GANDRILLE, S., FIESSINGER, J-N., AIACH, M., ALHENC-GELAS, M. (1999). Mutations in Promoter Region of Thrombomodulin and Venous Thromboembolic Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1098-1104.
- FOLLO, M. & GINSBURG, D. (1989). Structure and Expression of the Human Gene Encoding Plasminogen Activator Inhibitor, PAI-1. **Gene**, **84**: 447-453.
- FOSTER, D.C., YOSHITAKE, S., DAVIE, E.W. (1985). The Nucleotide Sequence of the Gene for Human Protein C. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **82**: 4673-4677.
- FRANCO, R.F., ARAÚJO, A.G., GUERREIRO, J.F., ELION, J., ZAGO, M.A. (1998). Analysis of the 677C→T Mutation of the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene in Different Ethnic Groups. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 119-121.

- FRANCO, R.F., ELION, J., SANTOS, S.E.B., ELLION, J., TAVELLA, M.H., ZAGO, M.A. (1998). Prevalence of the G20210A Polymorphism in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene in Different Human Populations. **Acta Haematologica**, **100**: 9-12.
- FRANCO, R.F., ELION, J., SANTOS, S.E.B., ARAÚJO, A.G., TAVELLA, M.H., ZAGO, M.A. (1999). Heterogeneous Ethnic Distribution of the Factor V Leiden Mutation. **Genetics and Molecular Biology**, **22**: 143-145.
- FROSST, P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., BOERS, G.J.H., den HEIJER, M., KLUIJTMANS, L.A.J., van den HEUVEL, ROZEN, R. (1995). A Candidate Genetic Risk Factor for Vascular Disease: A Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase. **Nature Genetics**, **10**: 111-113.
- GARDEMANN, A., LOHRE, J., KATZ, N., TILLMANN, H., HEHRLEIN, F.W., SCWARTZ, O., HABERBOSCH, W. (1999). The 4G/4G Genotype of the Plasminogen Activator Inhibitor 4G/5G Gene Polymorphism is Associated with Coronary Atherosclerosis in Patients at High Risk for this Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 1121-1126.
- GARDINIER, J.E. & GRIFFIN, J.H. (1984). Studies on human Protein C Inhibitor in Normal and Factor V/VIII Deficiency Plasmas. **Thrombosis Research**, **36**: 197-203.
- GAREWAL, G., DAS, R., TREHAN, U. (1997). Factor V Leiden: Prevalence in the Indigenous Population and Cases of Thrombosis in North India. **British Journal of Haematology**, **97**: 927-940.
- GEMMATI, D., PREVIATI, M., SERINO, M.L., MORATELLI, S., GUERRA, S., CAPITANI, S., FORINI, E., BALLERINI, G., SCAPOLI, G.L. (1999). Low Folate Levels and Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase as Primary Determinant of Mild Hyperhomocystinemia in Normal and Thromboembolic Subjects. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1761-1767.
- GILGENKRANTZ, S., BRIQUEL, M.E., ANDRÉ, E., ALEXANDRE, P., JALBERT, P., Le MAREC, E., POUZOL, P., POMMEREUIL, M. (1986) Structural Genes Coding for Coagulation Factors VII and X are Located on 13q34. **Annales de Génétique**, **29**: 32-35.
- GIRARDI, T.J., WARREN, L.A., NOVOTNY, W.F., LIKKERT, K.M., BROWN, S.G., MILETICH, J.P., BROZE, G.J. (1989). Functional Significance of the Kunitz-type Inhibitory Domains of Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor. **Nature**, **338**: 518-520.
- GIRARDI, T.J., EDDY, E., WESSELSCHIDT, R.L., MacPHAIL, L.A., LIKERT, K.M., BYERS, M.G., SHOWS, T.B., BROZE, G.J. (1991). Structure of the Human Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, **266**: 5036-5041.
- GLADSON, C., SCHARRER, I., HACH, V., BECK, K.H., GRIFFIN, J.H. (1988). The Frequency of Type I Heterozygous Protein S and Protein C Deficiency in 141 Unrelated Young Patients with Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **59**: 18-22.

- GOU, D., NAIPAL, A., REITSMA, P.H. (1996). World Distribution of Factor V Leiden. **The Lancet**, **347**: 59.
- GREEN, F., KELLEHER, C., WILKES, H., TEMPLE, A. MEADE, T., HUMPHRIES, S. A (1991) Common Genetic Polymorphism Associated with Lower Coagulation Factor VII Levels in Healthy Individuals. **Arteriosclerosis Thrombosis**, **11**: 540-546.
- GREGG, J.P., YAMANE, A.J., GRODY, W.W. (1997). Prevalence of the Factor V-Leiden Mutation in Four Distinct American Ethnic Populations. **American Journal of Medical Genetics**, **73**: 334-336.
- GRIFFIN, J.H., EVATT, B., ZIMMERMAN, T.S., KLEISS, A.J., WIDEMAN, C. (1981). Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. **Journal of Clinical Investigation**, **68**: 1370-1373.
- GRIFFIN, J.H., EVATT, B., WIDEMAN, C., FERNÁNDEZ, J.A. (1993). Anticoagulant Protein C Pathway Defective in Marjory of Thrombophilic Patients. **Blood**, **82**: 1989-1993.
- GRUBER, A., MORI, E., del ZOPPO, G.L., WAXMAN, L., GRIFFIN, J.H. (1994) Alteration of Fibrin Network by Activated Protein C. **Blood**, **83**: 2541-2538.
- GRUBIC, N., STEGNER, M., PETERNEL, P., KAINER, A., BINDER, B.R. (1996). A Novel G/A and the 4G/5G Polymorphism within the Promoter of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene in Patients with Deep Venous Thrombosis. **Thrombosis Research**, **84**: 431-443.
- GUERGEY, A., RUSTEMOV, R., PARLAK, H., BALTA, G. (1998). Prevalence of Factor V Leiden and Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutations in Azerbaijan. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 520-521.
- HAINAULT, P., AZERAD, M.A., LEHMANN, F., SCHLIT, A.F., ZECH, F., HEUSTERSPREUTE, M., PHILIPPE, M., COL, C., LAVENNE, E., MORIAU, M. (1997). Prevalence of Activated Protein C Resistance and Analysis of Clinical Profile in Thromboembolic Patients. A Belgian Prospective Study. **Journal of Internal Medicine**, **241**: 427-433.
- HAMPTON, J.W., OLDHAM, F.B., BANNERJEE, D., KALMAZ, E., DELANEY, R. (1972). Plasma Activator Plasminogen: Cause of a Familial Bleeding Diathesis. **Journal of Clinical Investigation**, **51**: 42A.
- HAMSTEN, A., WIMAN, B., De FAIRE, U., BLOMBÄCK, M. (1985). Increased Plasma Levels of a Rapid Inhibitor of Tissue Plasminogen Activator in Young Survivors of Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, **313**: 1157-1563.
- HAMSTEN, A., De FAIRE, U., WALLDIUS, G., DAHLÉN, G., SZAMOSI, A., LANDOU, C., BLOMBÄCK, M., WIMAN, B. (1987). Plasminogen Activator Inhibitor in Plasma: Risk Factor for Recurrent Myocardial Infarction. **The Lancet**, **II**: 3-9.
- HARPEL, P.C. (1997). Homocysteine, Atherogenesis and Thrombosis. **Fibrinolysis & Proteolysis**, **11**: 77-80.

- HEGELE, R.A., TULLY, C., YOUNG, T.K., CONNELLY, P.W. (1997). V677 Mutation of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Cardiovascular Disease in Canadian Inuit. **The Lancet**, **349**: 1221-122.
- HEIJMANS, B.T., WESTENDORP, R.G.J., KNOOK, D.L., KLUFT, C., SLAGBOOM, P.E. (1998). The Risk of Mortality and the Factor V Leiden Mutation in a Population-based Cohort. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 607-609.
- HEINRICH, J., BALLEISEN, L., SCHULTE, H., ASSMANN, G., van de LOO, J. (1994). Fibrinogen and Factor VII in the Prediction of Coronary Risk. Results from the PROCAM Study in Healthy Men. **Arteriosclerosis Thrombosis**, **14**: 54-59.
- HELLEY, D., BESMOND, C., DUCROCQ, R., SILVA, F., GUILLIN, M-C., BEZEAUD, A., ELION, J. (1997). Polymorphism in Exon 10 of the Human Coagulation Factor V Gene in a Population at Risk for Sickle Cell Disease. **Human Genetics**, **100**: 245-248.
- HEPNER, M., ROLDAN, A., PIERONI, G., FRONTHROTH, J.P., SERVIDIO, R.M., TORRES, A.F., SCIUCCATI, G., BONDUEL, M. (1999). Factor V Leiden Mutation in the Argentinian Population. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 989.
- HERRMANN, F.H., KOESLING, M., SCHRODER, W., ALTMAN, R., BONILLA, R.J., LOPACIUK, S., PEREZ, J.L., SINGH, J.R. (1997). Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Various Populations. **Genetic Epidemiology**, **14**: 403-411.
- HESSNER, M.J., LUHM, R.A., PEARSON, S.L., ENDEAN, D.J., FRIEDMAN, K.D., MONTGOMERY, R.R. (1999). Prevalence of Prothrombin G20210A, Factor V G1691A (Leiden), and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T in Seven Different Populations Determined by Multiplex Allele-specific PCR. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 733-738.
- HEYWOOD, D.M., MANSFIELD, M.W., GRANT, P.J. (1996). Factor VII Gene Polymorphisms, Factor VII:C Levels and Features of Insulin Resistance in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 401-406.
- HEYWOOD, D.M., OSSEI-GRNING, N., GRANT, P.J. (1996a). Association of Factor VII:C Levels with Environmental and Genetic Factors in Patients with Ischaemic Heart Disease and Coronary Atheroma Characterized by Angiography. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 161-165.
- HEYWOOD, D.M., CARTER, A.M., CATTO, A.J., BAMFORD, J.M., GRANT, P.J. (1997). Polymorphisms of the Factor VII Gene and Circulation FVII:C Levels in Relation to Acute Cerebrovascular Disease and Mortality. **Stroke**, **28**: 816-821.
- HILL, K. & HURTADO, A.M. (1996). **Ache Life History**. Walter de Gruyter Inc., Hawtorne, New York, 561pp.
- HILLARP, A., ZÖLLER, B., SVENSSON, P.J., DAHLBÄCK, B. (1997). The 20210 A Allele of the Prothrombin Gene is a Common Risk Factor among Swedish Outpatients with Verified Deep Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 990-992.

- HILLE, E.T.M., WESTENDORP, R.G.J., VANDENBROUCKE, J.P., ROSENDAAL, F.R. (1997). Mortality and Causes of Death in Families with the Factor V Leiden Mutation (Resistance of Activated Protein C). **Blood**, **89**: 1963-1967.
- HIRSH, J., PIOVELLA, F., PINI, M. (1989). Congenital Antithrombin III Deficiency. Incidence and Clinical Features. **The American Journal of Medicine**, **87**: 34S-38S.
- HIRSH, J. & HOAK, J. (1996). Management of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. **Circulation**, **93**: 2212-2245.
- HÖGBERG, U., INNALA, E., SANDSTRÖM, A. (1994). Maternal Mortality in Sweden, 1980-1988. **Obstetrics & Gynecology**, **84**: 240-244.
- HOLM, J., ZÖLLER, B., BERNTORP, E., ERHARDT, L., DAHLBÄCK, B. (1996). Prevalence of Factor V Gene Mutation amongst Myocardial Infarction Patients and Healthy Controls is Higher in Sweden than in Other Countries. **Journal of Internal Medicine**, **239**: 221-226.
- HOWARD, T.E., MARUSA, M., BOISZA, J., SEQUEIRA, J., CHANNELL, C., GUY, C., BENSON, E., BUNCAN, A. (1998). The Prothrombin gene 3'-Untranslated Region Mutation Is Frequently Associated with Factor V Leiden in Thrombophilic Patients and Shows Ethnic-Specific Variation in Allele Frequency. **Blood**, **91**: 1092.
- HUMPRIERS, S., LANE, A., GREEN, F., COOPER, J., MILLER, G.J. (1994). Factor VII Coagulant Activity and Antigen Levels in Healthy Men are Determined by Interaction Between Factor VII Genotype and Plasma Triglyceride Concentration. **Arteriosclerosis Thrombosis**, **14**: 193-198.
- HUMPRIERS, S., TEMPLE, A., LANE, A., GREEN, F., COOPER, J., MILLER, G. (1996). Low Plasma Levels of Factor VIIc and Antigen are More Strongly Associated with the 10 Base Pair Promoter (-323) Insertion than the Glutamine 353 Variant. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 567-572.
- HUNAULT, M., ARBINI, A.A., LOPACIUK, S., CAREW, J.A., BAUER, K.J. (1997). The Arg³⁵³Gln Polymorphism Reduces the Level of Coagulation Factor VII. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 2825-2829.
- IACOVELLO, L., Di CASTELNUOVO, A., KNIFF, P., D'ORAZIO, A., AMORE, C., ARBORETTI, R., KLUFT, C., DONATI, M.B. (1998). Polymorphisms in the Coagulation Factor VII Gene and the Risk of Myocardial Infarction. **The New England Journal of Medicine**, **338**: 79-85.
- IACOVELLO, L., BURZOTTA, F., Di CASTELNUOVO, A., ZITO, F., MARCHIOLI, R., DONATI, M.B. (1998). The 4G/5G Polymorphism of PAI-1 Gene and the Risk of Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 129-130
- IWAI, N., SHIMOIKE, H., NAKAMURA, Y., TAMAKI, S., KINOSHITA, M. (1998). The 4G/5G Polymorphism of the Plasminogen Activator Inhibitor Gene is Associated with the Time Course of Progression to Acute Coronary Syndromes. **Atherosclerosis**, **136**: 109-114.

- IDO, M., OHIWA, M., HAYASHI, T., NISHIOKA, J., HATADA, T., WATANABE, Y., WADA, H., SHIRAKAWA, S., SUZUKI, K., (1993). A Compound Heterozygous Protein C Deficiency with a Single Nucleotide G Deletion Encoding Gly-381 and an Amino Acid Substitution of Lys for Gla-26. **Thrombosis and Haemostasis**, **70**: 636-641.
- INOSTROZA, J., KIEFEL, V., MUELLER-ECKHARDT, C. (1988) Frequency of Platelet-Specific Antigens Pl^{A1}, Bak^a, Yuk^a, Yuk^b, and Br^a in South American (Mapuches) Indians. **Transfusion**, **28**: 586-587.
- IRELAND, H., KUNZ, G., KYRIAKOULIS, K., STUBBS, P.J., LANE, D.A. (1997). Thrombomodulin Gene Mutations Associated with Myocardial Infarction. **Circulation**, **96**: 15-18.
- JACOB, S., BLOEBAUM, L., SHAH, G., VARNER, M.W. (1998). Maternal Mortality in Utah. **Obstetrics and Gynecology**, **91**: 187-191.
- JEFFERY, S., LEATHAM, E., ZHANG, Y., CARTER, J., PRATEL, P., KASKI, J.C. (1996). Factor V Leiden Polymorphism (FV Q506) in Patients with Ischaemic Heart Disease, and in Different Populations Groups. **Journal of Human Hypertension**, **10**: 433-434.
- JENKINS, G.R., SEIFFERT, D., PARMER, R.J., MILES, L.A. (1997). Regulation of Plasminogen Gene Expression by Interleukin-6. **Blood**, **7**: 2394-2403.
- JICK, H., WESTERHOLM, B., VESSEY, M.P., LEWIS, G.P., SLONE, D., INMAN, W.H.W., SHAPIRO, S., WORCERSTER, J. (1969). Venous Thromboembolic Disease and ABO Blood Group. **The Lancet**, **I**: 539-542.
- JUHAN-VAGUE, I., VALADIER, J., ALESSI, M.C., ALLAUD, M.F., ANSALDI, J., PHILLIP-JOET, C., HALVOET, P., SERRADIMIGNI, A., COLLEN, D. (1987). Deficient t-PA Release and Elevated PA Inhibitor in Patients with Spontaneous or Recurrent Deep Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **57**: 67-72.
- JUHAN-VAGUE, I., PYKE, S.D.M., ALESSI, M.C., JESPERSEN, J., HAVERKATE, F., THOMPSON, S.G. (1996). Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. **Circulation**, **94**: 2057-2063.
- JUNKER, R., HEINRICH, J., SCHULTE, H., van de LOO, J., ASSMANN, G. (1997). Coagulation Factor VII in the Risk of Coronary Heart Disease in Healthy Men. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **7**: 1539-1544.
- KALAFATIS, M., RAND, M.D., MANN, K.G. (1994) Characterization of the Molecular Defect in Factor V^{R506Q}. **Journal of Biological Chemistry**, **270**: 4053-4056.
- KAMPHUISEN, P.W., EIKENBOOM, J.C.J., VOS, H.L., PABLO, R., STURK, A., BERTINA, R.M., ROSENDAAL, F.R. (1999). Increased Levels of Factor VIII and Fibrinogen in Patients with Venous Thrombosis are not Caused by Acute Phase Reactions. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 680-683.

- KANG, S-S., ZHOU, J., WONG, P.W.K., KOWALISYN, J., STROKOSCH, G. (1989). Intermediate Homocysteinemia: A Thermolabile Variant of Methylene tetrahydrofolate Reductase. **American Journal of Human Genetics**, **43**: 414-421.
- KANG, S-S., WONG, P.W.K., SUSMANO, A., SORA, J., NORUSIS, M., RUGGIE, N. (1991). Thermolabile Methylene tetrahydrofolate Reductase: An Inherited Risk Factor for Coronary Artery Disease. **American Journal of Human Genetics**, **48**: 536-545.
- KAPUR, R.K., MILLS, L.A., SPITZER, S.G., HULTIN, M.B. (1997). A Prothrombin Gene Mutation is Significantly Associated with Venous Thrombosis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 2875-2879.
- KARIO, K., NARITA, N., MATSUO, T., KAYABA, K., TSUSUMI, A., MATSUO, M., MIYATA, T., SHIMADA, K. (1995). Genetic Determinants of Plasma Factor VII Activity in the Japanese. **Thrombosis and Haemostasis**, **73**: 617-622.
- KASTRATI, A. SCHÖMIG, A., SEYFARTH, M., KOCH, W., ELEZI, S., BÖTTIGER, C., MEHILLI, J., SCHÖMIG, K., von BECKERATH, N. (1999). PL^A Polymorphism of Platelet Glycoprotein IIIa and Risk of Restenosis After Coronary Stent Placement. **Circulation**, **99**: 1005-1010.
- KAWASAKI, T., KAIDA, T., ARNOUT, j., VERMYLEN, J., HOYLAERTS, M.F. (1999). A New Animal Model of Thrombophilia Confirms that High Plasma Factor VIII Levels are Trombogenic. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 306-311.
- KIM, H.O., JIN, Y., KICKLER, T.S., BLAKEMORE, K., KWON, O.H., BRAY, P.F. (1995). Gene Frequencies of the Five Major Human platelet Antigens in African American, White, and Korean populations. **Transfusion**, **35**: 863-867.
- KISIEL, W. (1979). Human Plasma Protein C. Isolation, Characterization and Mechanism of Activation by α -antithrombin. **Journal of Clinical Investigation**, **64**: 761-769.
- KLEESIEK, K., SCHMIDT, M., GÖTTING, C., SCHWENZ, B., LANGE, S., MÜLLER-BERGHHAUS, G., BRINKMANN, T., PROHASKA, W. (1999). The 536C \rightarrow T Transition in the Human Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) Gene is Statistically Associated with a Higher Risk for Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 1-5.
- KLINGER, K.W., WINQVIST, R., RICCIO, A., ANDREASEN, P.A., SARTORIO, R., NIELSEN, L.S., STUART, N., STANISLOVITIS, P., WATIKINS, P., DOUGLAS, R., GRZESCHIK, K.H., ALITALO, K., BLASI, F., DANO, K. (1987). Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene is Located at Region q21.3-q22 of Chromosome 7 and Genetically Linked with Cystic Fibrosis. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **84**: 8548-8552.
- KLUIJTMANS, L.A.J., den HEIJER, M., REITSMA, P.H., HEIL, S.G., BLOM, H.J., ROSENDAAL, F.R. (1998). Thermolabile Methylene tetrahydrofolate Reductase and Factor V Leiden in the Risk of Deep-Vein Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 254-258.

- KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., RONDE, H., BRIËT, E., VANDENBROUCKE, J.P., BERTINA, R.M. (1993). Venous Thrombosis Due to Poor Activated Protein C: Leiden Thrombophilia Study. **The Lancet**, **342**: 1503-1506.
- KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H., van DER VELDEN, P.A., BRIËT, E., VANDENBROUCKE, J.P. (1994). Factor VII and Fibrinogen Levels as Risk Factors for Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **71**: 719-722.
- KOSTER, T., BLANN, A.D., BRIËT, E., VANDENBROUCKE, J.P., ROSENDAAL, F.R. (1995). Role of Clotting Factor VIII in Effect of von Willebrand on Occurrence of Deep-Vein Thrombosis. **The Lancet**, **345**: 152-155.
- KRAAIJENHAGEN, R.A., ANKER, P.S., KOOPMAN, M.M.W., REITSMA, P.H., PRINS, M.H., van den EIDE, A., BÜLLER, H.R. (2000). High Plasma Concentration of Factor VIIIc Is a Major Risk Factor for Venous Thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, **83**: 5-9.
- KUPFERMINC, M.J., ELDOR, A., STEINMAN, N., MANY, A., BAR-AM, A., JAFFA, A., FAIT, G., LESSING, J.B. (1999). Increased Frequency of Genetic Thrombophilia in Women with Complications of Pregnancy. **New England Journal of Medicine**, **340**: 9-13.
- LAFFAN, M. & TUDDENHAM, E. (1997). Thrombophilia: an Expanding Group of Genetic Defects that Predispose to Thrombosis. **Molecular Medicine Today**, **3**: 303-309.
- LAHIRI, D.K. & NURBERGER, J.I. (1991). A Rapid Non-enzymatic Method for the preparation of HMW DNA from Blood for RFLPs Studies. **Nucleic Acids Research**, **19**: 5444.
- LALOUSCHEK, W., AULL, S., SERIES, W., ZEILER, K. (1998). The Prothrombin G20210A Mutation and Factor V Leiden Mutation in Patients with Cerebrovascular Disease. **Blood**, **92**: 704-705.
- LANE, A., CRUICKSHANK, J.K., MITCHELL, J., HENDERSON, A., HUMPHRIES, S., GREEN, F. (1992). Genetic and Environmental Determinants of Factor VII Coagulant Activity in Ethnic Groups at Differing Risk of Coronary Heart Disease. **Atherosclerosis**, **94**: 43-50.
- LANE, D.A., OLDS, R.J., BOISCLAIR, M., CHOWDHURY, V., THEIN, S.L., COOPER, D.N., BLAJCHMAN, M., PERRY, D., EMMERICH, J., AIACH, M. (1993). Antithrombin III Mutation Database: First Update. **Thrombosis and Haemostasis**, **70**: 351-359.
- LANE, A., GREEN, F., SCARABIN, P.Y., NICAUD, V., BARA. L., HUMPHRIES, S., EVANS, A., LUC, G., CAMBOU, J.P., ARVELIER, D., CAMBIEN, F. (1996). Factor VII Arg/Gln₃₅₃ Polymorphism Determines Factor VII Coagulant Activity in Patients with Myocardial Infarction (MI) and Control in Belfast and in France but is not a Strong Indicator of MI Risk in the ECTIM Study. **Atherosclerosis**, **119**: 119-127.

- LARSEN, T.B., LASSEN, J.F., BRANDSLUND, I., BYRIEL, L., PETERSEN, G.B., NORGAARD-PEDERSEN, B. (1998). The Arg506Gln Mutation (FVLeiden) among a Cohort of 4188 Unselected Danish Newborns. **Thrombosis Research**, **89**: 211-215.
- LAURELL, C.B. (1966). Quantitative Estimation of Proteins by electroforesis in Agarose Gel Containing Antibodies. **Analytical Biochemistry**, **15**: 45-52.
- LEE, A.J., FOWKES, F.G.R., LOWE, G.D.O., CONNOR, J.M., RUMLEY, A. (1999). Fibrinogen, Factor VII and PAI-1 Genotypes and the Risk of Coronary and Peripheral Atherosclerosis: Edinburg Artery Study. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 553-560.
- LEE, R.D. (1997). Intergenerational Relations and the Elderly. In: **Between Zeus and the Salmon, The Biodemography of Longevity**. pp213-233. Watcher, K.W & Finch, C.E. (eds). National Academy Press, Washington, D.C.
- LEFKOVITS, J., PLOW, E.F., TOPOL, E.J. (1995). Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine. **The New England Journal of Medicine**, **332**: 1553-1559.
- LEGNANI, C., PALARETI, G., GRAUSO, F., SASSI, S., GROSSI, G., PIAZZI, S., BERNARDI, F., MARCHETTI, G., FERRARESI, P., COCCHERI, S. (1997). Hyperhomocyst(e)inemia and a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation (Ala223Val MTHFR) in Patients with Inherited Thrombophilic Coagulation Defects. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 2924-2929.
- LEROYER, C., MERCIER, B., ESCOFFRE, M., FÉREC, C., MOTTIER, D. (1997). Factor V Leiden Prevalence in Venous Thromboembolism Patients. **CHEST**, **111**: 1603-1606.
- LEROYER, C., MERCIER, B., OGER, E., CHENU, E., ABGRALL, J-F., FÉREC, C., MOTTIER, D. (1998). Prevalence of 20210 A Allele of the Prothrombin Gene in Venous Thromboembolism Patients. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 49-51.
- LEROY-MATERON, C., DUCHEMIN, J., LEVENT, M., GOUAULT-HEILMANN, M. (1999). Genetic Modulation of Plasma Protein S Levels by Two Frequent Dimorphisms in the PROS1 Gene. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 1088-1092.
- LIN, M., SHIEH, S.H., YANG, T.F. (1993). Frequency of Platelet-Specific Antigens among Chinese in Taiwan. **Transfusion**, **33**: 155-157.
- LINDQVIST, P.G., SVENSSON, P.J., DAHLBÄCK, B., MARSÁL, K. (1998). Factor V Q⁵⁰⁶ Mutation (Activated Protein C Resistance) Associated with Reduced Intrapartum Blood Loss-a Possible Evolutionary Selection Mechanism. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 69-73.
- LINDQVIST, P.G., SVENSSON, P.J., MARSÁL, K., GRENNER, L., LUTERKORT, M., DAHLBÄCK, B. (1999). Activated Protein C Resistance (FV:Q506) and Pregnancy. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 532-537.
- LINNA, T., YLIKORKALA, A., KONTULA, K., PUSKA, P., TERVO, T. (1997). Prevalence of Factor V Leiden in Young Adults with Retinal Vein Occlusion. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 214-215.

- LIU, X-Y., NELSON, D., GRANT, C., MOTHLAND, V., GOODNIGHT, S.H., PRESS, R.D. (1995). Molecular Detection of a Common Mutation in Coagulation Factor V Causing Thrombosis via Hereditary Resistance to Activated Protein C. **Diagnostic Molecular Pathology**, **4**: 191-197.
- LOKTINOV, A., VORSTER, H., O'NEILL, I.K., NELL, T., BINGHAM, S.A., RUNSWICK, S.A., CUMMINGS, J.H. (1999). Apolipoprotein E and Methylenetetrahydrofolate Reductase Genetic Polymorphisms in Relation to other risk Factors for Cardiovascular Disease in UK Caucasians and Black South Africans. **Atherosclerosis**, **145**: 125-135.
- LOURENÇO, D.M., MIRANDA, F., LOPES, L.H.C. (1996) ABO Blood Groups as Risk Factors for Thrombosis. **Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis**, **2**: 196-199.
- LOWE, G.D.O., YARNELL, J.W.G., SWEETNAM, P.M., RUMLEY, A., THOMAS, H.F., ELWOOD, P.C. (1998). Fibrin D-Dimer, Tissue Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor, and the Risk of Major Ischaemic Heart Disease in the Caerphilly Study. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 129-133.
- LUCOTTE, G. & MERCIER, G. (1997). Frequency of Factor V Leiden (Arg506Gln) in France. **British Journal of Haematology**, **99**: 241.
- LUDWIG, M., WOHN, K.D., SCHLEUNING, W.D., OLEK, K. (1992) Allelic Dimorphism in the Human Tissue Plasminogen Activator (TPA) Gene as a Result of an Alu Insertion/deletion Event. **Human Genetics**, **50**: 164-173.
- LUNDWALL, A., DACKOWISKI, W., COHEN, E., SAHFFER, M., MAHR, A., DAHLBÄCK, B., STENFLO, J., WYDRO, R. (1986). Isolation and Sequence of the cDNA for Human Protein S, a Regulator of Blood Coagulation. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **83**: 6716-6720.
- LUNGI, B., IACOVELLO, L., GEMMATI, D., DILASIO, M.G., CASTOLDI, E., PINOTTI, M., CATAMAN, G., REDAELLI, R., MARIANI, G., MARCHETTI, G., BERNARDI, F. (1996). Detection of New Polymorphic Markers in the Factor V Gene: Association with Factor V Levels in Plasma. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 45-48.
- MA, D.D.F., WILLIAMS, B.G., ABOUD, M.R., ISBISTER, J.P. (1995). Activated Protein C resistance (APC) and Inherited Factor V (FV) Missense Mutation in Patients with Venous and Arterial Thrombosis in Haematology Clinic. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, **25**: 151-154.
- Mac FARLANE, R.G. (1964). An Enzyme Cascata in the Blood Clotting Mechanism and its Function as Biochemical Amplifier. **Nature**, **202**: 498-499.
- McCOLL, M.D., CHALMERS, E.A., THOMAS, A., SPROUL, A., HEALEY, C., RAFFERTY, I., McWILLIAM, R., EUNSON, P. (1999). Factor V Leiden, Prothrombin 20210G→A and the MTHFR C677T Mutations in Childhood Stroke. **Thrombosis and Haemostasis**, **81**: 690-694.

- MAHASSANDANA, C., SUVATTE, V., CHUANSUMIT, A., MARLAR, R.A., MANCO-JOHNSON, M.J., JACOBSON, L.J., HATAWAY, W.E. (1990). Homozygous Protein S Deficiency in an Infant with Purpura Fulminans. **The Journal of Pediatrics**, **117**: 750-753.
- MAJERUS, P.W. (1994). Bad Blood Mutation. **Nature**, **369**: 14-15.
- MALGARETTI, U., BRUNO, L., PONTOGLIO, M., CANDIANI, G., MERONI, G., OTTOLENGHI, S., TARAMELLI, R. (1990). Definition of the Transcription Initiation Site of Human Plasminogen Gene in Liver and Non-hepatitis Cell Lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **173**: 1013-1018.
- MALINOWISKI, D.P., SADLER, J.E., DAVIE, E.W. (1984). Characterization of a Complementary Deoxyribonucleic Acid Coding for Human and Bovine Plasminogen. **Biochemistry**, **23**: 4243-4250.
- MANNUCCI, P.M., DUCA, F., PEYVANDI, F., TAGLIABUE, L., MERATI, G., MARTINELLI, I., CATTANEO, M. (1996). Frequency of Factor V Arg506 Gln in Italians. **Thrombosis and Haemostasis**, **75**: 693-699.
- MANSFIELD, M.W., STICKLAND, M.H., GRANT, P.J. (1995). Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Promoter Polymorphism and Coronary Artery Disease in Non-Insulin-Dependent Diabetes. **Thrombosis and Haemostasis**, **74**: 1032-1034.
- MARCHETTI, G., PATRACCHINI, M., FERRATI, M., BERNARDI, H. (1993). A Polymorphism in the 5' Region of Coagulation Factor VII (F7) Caused by an Inserted Decanucleotide. **Human Genetics**, **90**: 575-576.
- MARGAGLIONE, M., D'ANDREA, G., ADDEDDA, M., GIULIANI, N., CAPPUCCI, G., IANNACCONE, L., VECCHIONE, G., GRANDONE, E., BRANCACCIO, V., MINNO, G. (1998). The Methylenetetrahydrofolate Reductase TT677 Genotype is associated with Venous Thrombosis Independently of the Coexistence of the FV Leiden and the Prothrombin A²⁰²¹⁰ Mutation. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 907-911.
- MARGAGLIONE, M., D'ANDREA, G., GIULIANI, N., BRANCACCIO, V., LUCIA, D., GRANDONE, E., STEFANO, V., TONALI, P.A., MINNO, G. (1999). Inherited Prothrombotic Conditions and Premature Ischemic Stroke. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1751-1756.
- MARI, D., MANNUCCI, P.M., DUCA, F., BERTOLINI, S., FRANCESCHI, C. (1996). Mutant Factor V (Arg506Gln) in Healthy Centenarians. **The Lancet**, **347**: 1044.
- MARIAN, A.J., BRUGADA, R., KLEIMAN, N.S. (1996). Platelet Glycoprotein IIIa P1A Polymorphism and Myocardial Infarction. **The New England Journal of Medicine**, **309**: 1071-1072.
- MARLAR, R.A. & GRIFFIN, J.H. (1980). Deficiency of Protein C Inhibitor in Combined Factor V/VIII Deficiency Disease. **Journal of Clinical Investigation**, **66**: 1186-1189.

- MARTINELLI, I., MANNUCCI, P.M., STEFANO, V., TAIOLI, E., ROSSI, V., CROSTI, F., PACIARONI, K., LEONE, G., FAIONI, E.M. (1998). Different Risks of Thrombosis in Four Coagulation Defects Associated with Inherited Thrombophilia: A Study of 150 Families. **Blood**, **92**: 2353-2358.
- MARTINELLI, I., TAIOLI, E., BUCCIARELLI, P., AKHAVAN, S., MANNUCCI, P.M. (1999). Interaction between the G20210A Mutation of the Prothrombin Gene and Oral Contraceptive Use in Deep Vein Thrombosis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 700-703.
- MARUYAMA, I., BELL, CE., MAJERUS, P.W. (1985). Thrombomodulin Found on Endothelium of Arteries, Veins, Capillaries and Lymphatics and on Syncytiotrophoblast of Human Placenta. **Journal of Cellular Biology**, **101**: 363-366.
- McANDREW, P.E., BRANDT, J.T., PEARL, D.K., PRIOR, T.W. (1996). The Incidence of the Gene for Thermolabile Methylene Tetrahydrofolate Reductase in African Americans. **Thrombosis Research**, **83**: 195-198.
- McCORMACK, L.J., NAGI, D.K., STICKLAND, M.H., MANSFIELD, M.W., MOHAMED-ALI, V., YUDKIM, J.S., KNOWLER, W.C., GRANT, P.J. (1996). Promoter (4G/5G) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genotype in Pima Indians: Relationship to Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels and Features of the Insulin Resistance Syndrome. **Diabetologia**, **39**: 1512-1518.
- MEADE, T.W., MELLOWS, S., BROZOVIC, M., MILLER, G.J., THOMPSON, S.G. (1986). Haemostatic Function and Ischaemic Heart Disease: Principal Results of the Northwick Park Heart Study. **Lancet**, **II**: 533-537.
- MEADE, T.W., RUDDOCK, V., STIRLING, Y., CHAKRABARTI, R., MILLER, G.J., (1993). Fibrinolytic Activity, Clotting Factors, and Long Term Incidence of Ischaemic Heart Disease in the Northwick Park Heart Study. **Lancet**, **342**: 1076-1079.
- MEIJERS, J.C.M. & CHUNG, D.W. (1991). Organization of the Gene Coding for Human Protein C Inhibitor (Plasminogen Activator Inhibitor-3). **The Journal of Biological Chemistry**, **266**: 15028-15034.
- MEILAHN, E., FERREL, R., KISS, J., TEMPLE, A., GRENN, F., HUMPHRIES, S., KULLER, L. (1995). Genetic Determination Coagulation Factor VIIc Levels among Healthy Middle-aged Women. **Thrombosis and Haemostasis**, **73**: 623-622.
- MILETICH, J., SHERMAN, L., BROZE JR., G. (1987). Absence of Thrombosis in Subjects with Heterozygous Protein C Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, **317**: 991-996.
- MILETICH, J., PRESCOTT, S.M., WHITE, R., MAJERUS, P.W., BOVILL, E.G. (1993). Inherited Predisposition to Thrombosis. **Cell**, **72**: 477-480.
- MINER, S.E.S., EVROSKI, J., COLE, D.E.C. (1997). Clinical Chemistry and Molecular Biology of Homocysteine Metabolism: An Update. **Clinical Biochemistry**, **30**: 189-201.

- MOATTI, D. SEKNADJI, P., GALAND, C., POIRIER, O., FUMERON, F., DESPRESZ, S., GARBARZ, M., DHERMY, D., ARVELIER, D., EVANS, A., LUC, G., RUIDAVETS, J-B., OLLIVIER, V., HAKIN, J., AUMONT, M.C., POST, D. (1999). Polymorphisms of the Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) Gene in Patients with Acute Coronary Syndromes and in Healthy Subjects. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 862-869.
- MURRAY, J.C., BUTOW, K.H., DONOVAN, M., HORNUNG, S., MOTULSKY, A.G., DISTECHE, C., DYER, K., SWILSSHELM, K., ANDERSON, J., GIBLETT, E., SADLER, E., EDDY, R., SHOWS, T.B. (1987). Linkage Disequilibrium of Plasminogen Polymorphisms and Assignment of the Gene to Human Chromosome 6q16-6q27. **The American Journal of Human Genetics**, **40**: 338-350.
- MUSTAFA, S., PABINGER, I., MANHALTER, C. (1996). Two New Frequent Dimorphisms in the Protein S (PROS1) Gene. **Thrombosis and Haemostasis**, **76**: 393-396.
- NAGASHIMA, M., LUNDH, E., LEONARD, J.C., MORSER, J., PARKINSON, J.F. (1993). Alanine-scanning Mutagenesis of the Epidermal Growth Factor-like Domains of Human Thrombomodulin Identifies Critical Residues for its Cofactor Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, **268**: 2888-2892.
- NEWMAN, P.J., DERBES, R.S., ASTER, R.H. (1989). The Human Platelets Alloantigens, Pl A1 and PlA2, Are Associated with a Leucine33/Proline33 Amino Acid Polymorphism in Membrane Glycoprotein IIIa, and Are Distinguishable by DNA Typing. **Journal of Clinical Investigation**, **83**: 1778-1781.
- NICHOLS, W.C., AMANO, K., CACHERIS, P.M., FIGUEIREDO, M.S., MICHAELIDES, K., SCHWAAB, R., HOYER, L., KAUFMAN, R.J., GINBURG, D. (1996). Moderation of Hemophilia A Phenotype by the Factor V R506Q Mutation. **Blood**, **88**: 1183-1187.
- NICHOLS, W.C., TERRY, V.H., WHEATLEY, M.A., YANG, A., ZIVELIN, A., CIAVARELLA, N., STEFANILE, C., MATSUSHITA, T., SAITO, H., BOSCH, N.B., RUIZ-SAEZ, A., TORRES, A., THOMPSON, A.R., FEINSTEIN, D.I., WHITE, G.C., NEGRIER, C., VINCIGUERRA, C., AKTAN, M., KAUFMAN, R.J., GINSBURG, D., SELIGSOHN, U. (1998). ERGIC-53 Gene Structure and Mutation Analysis in 19 Combined Factors V and VIII Deficiency Families. **Blood**, **93**: 2261-2266.
- NILSSON, I.M., LJUNGNÉR, H., TENGBORN, L. (1985) Two Different Mechanisms in Patients with Venous Thrombosis and Defective Fibrinolysis: Low Concentration of Plasminogen Activator or Increased Concentration of Plasminogen Activator Inhibitor. **British Medical Journal**, **290**: 1453-1456.
- NORLUND, L., HOLM, J., ZÖLLER, B., ÖHLIN, A-K. (1997). A Common Thrombomodulin Amino Acid Dimorphism is Associated with Myocardial Infarction. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 248-251.
- NOVOTNY, W.F., GIRARD, T.J., MILETICH, J.P., BROZE, G.J. (1988). Platelets Secrete a Coagulation Inhibitor Functionally and Antigenically Similar to the Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor. **Blood**, **72**: 2020-2025.

- NOVOTNY, W.F., GIRARD, T.J., MILETICH, J.P., BROZE, G.J. (1989). Purification and Characterization of the Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor from Human Plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, **264**: 18832-18837.
- ODAWARA, M., MATSUNUMA, A., YAMASHITA, K. (1996). Platelet Glycoprotein IIIa Pl^A Polymorphism and Japanese Diabetic Patients with Coronary Heart Disease. **The Lancet**, **348**: 1310.
- O'DONNELL, J., MUNFORD, A.D., MANNING, R.A., LAFFAN, M. (2000). Elevation of FVIII:C in Venous Thromboembolism Is Persistent and Independent of the Acute Phase Response. **Thrombosis and Haemostasis**, **83**: 10-13.
- O'HARA, P.J., GRANT, F.J., HALDEMAN, B.A., GRAY, C.L., INSLEY, M.Y., HAGEN, F.S., MURRAY, M.J. (1987). Nucleotide Sequence of the Gene Coding for Human Factor VII, a Vitamin K-dependent Protein Participating in Blood Coagulation. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **84**: 5158-5162.
- ÖHLIN, A-K. & MARLAR, R.A. (1995). The First Mutation Identified in the Thrombomodulin Gene in a 45-Year-Old Man Presenting with Thromboembolic Disease. **Blood**, **85**: 330-336.
- ÓLAFSON, I., HJALTADÓTTIR, S., ÖNUNDARSON, P.T., PÓRARINSDÓTTIR, R., HARALDSDÓTTIR, V. (1998). Prevalence of Factor VQ506 and Prothrombin 20210A mutations in an apparently Healthy Icelandic Population and Patients Suffering from Venous Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 685:686.
- OLDS, R.J., LANE, D.A., CHOWDHURY, V., DeSTEFANO, V., LEONE, G., THEIN, S.L. (1993). Complete Nucleotide Sequence of the Antithrombin Gene: Evidence for Homologous Recombination Causing Thrombophilia. **Biochemistry**, **33**: 4216-4244.
- ORDÓÑEZ, A.J.G., ALVAREZ, C.R.F., RODRÍGUEZ, J.M.M., GARCÍA, E.C., ALVAREZ, M.V. (1999). Genetic Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Venous Thromboembolism: a Case-Control Study. **Haematologica**, **84**: 190-191.
- OSBORN, S.V., HAMPTON, K.K., SMILLIE, D., CHANNER, K.S., DALY, M.E. (1996) Platelet Glycoprotein IIIa Gene polymorphism and Myocardial Infarction. **The Lancet**, **348**: 1309-1310.
- ÖZBEK, U. & TANGÜN, Y. (1996). Frequency of Factor V Leiden in Turkey. **International Journal of Hematology**, **64**: 291-292.
- PANAHLOO, A., MOHAMED-ALI, V., LANE, A., GREEN, F., HUMPHRIES, S.E., YUDKIN, J.S. (1995). Determinants Plasminogen Activator Inhibitor 1 Activity in Treated NIDDM and Its Relation to a Polymorphism in the Plasminogen Activator Inhibitor 1 Gene. **Diabetes**, **44**: 37-42.
- PATRACCHINI, P., AIELLO, V., PALAZZI, P., CALZOLARI, E., BERNARDI, F. (1989). Sublocalization of the Human Protein C Gene on Chromosome 2q13-q14. **Human Genetics**, **81**: 191-192.

- PENNICA, D., HOLMES, W.E., KOHR, W.J., HARKINS, R.N., VE HAR, G.A., WARD, C.A., BENNETT, W.F., YELVERTON, E., SEEBURG, P.H., HEYNEKER, H.L., GOEDDEL, D.V., COLLÉN, D. (1983). Cloning and Expression of Human Tissue-type Plasminogen Activator cDNA in *E. coli*. **Nature**, **301**: 214-221.
- PEPE, G., RICKARDS, O., VANEGAS, O.C., BRUNELLI, T., GORI, A.M., GIUSTI, B., ATTANASIO, M., PRISCO, D., GENSISNI, G.F., ABBATE, R. (1997). Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Non-European populations. **Thrombosis and Haemostasis**, **77**: 329-331.
- PEREIRA, P., QUIROGA, T., GOYCOOLEA, M., MUNOZ, B., HIDALGO, P., KALTWASSER, G., MEZZANO, D. (1996). Activated C Protein Resistance Laboratory Study and Prevalence of the Defect in Chile. **Revista Medica de Chile**, **124**: 663-668.
- PETERSEN, E.E., DUDECK-WOJCIECHOWSKA, G., SOTTRUP-JENSEN, L., MAGNUSSEN, S. (1979). The Primary Structure of Antithrombin III (heparin cofactor): Partial Homology between Alpha-1-antitrypsin and Antithrombin III. in: Collén, D., Wiman, B., Vertstraete, M. (eds) **The Physiological Inhibitors of Coagulation and Fibrinolysis**. Amsterdam, Elsevier, North Holland p.43.
- PETERSEN, T.E., MARTZEN, M.R., ICHINOSE, A., DAVIE, E.W. (1990). Characterization of the Gene for Human Plasminogen a Key Enzyme in the Fibrinolytic System. **The Journal of Biological Chemistry**, **265**: 6104-6111.
- PLOOS van AMSTEL, H.K., van der ZANDEN, A.L., BAKKER, E., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M. (1987). Two Genes Homologous with the Protein S cDNA are Located on Chromosome 3. **Thrombosis and Haemostasis**, **58**: 982-987.
- PLUTSKI, J., HOSKINS, J.A., LONG, G.L., CRABTREE, G.R. (1986). Evolution and Organization of the Human Protein C Gene. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, **83**: 546-550.
- POORT, S.R., ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H., BERTINA, R. (1996) A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene is Associated with Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. **Blood**, **88**: 3698-3703.
- POTTINGER, P., SIGURDSSON, F., BERLINER, N. (1996). Detection of the Factor V Leiden Mutation in a Nonselected Black Population. **Blood**, **87**: 2091.
- PRESTON, A.E. & BARR, A. (1964). The Plasma Concentration of Factor VIII in the Normal Population II. The Effects of Age, Sex, and Blood Group. **British Journal of Haematology**, **10**: 238-245.
- PROCHWNIK, E.V., BOCK, S.C., ORKIN, S.H. (1985). Intron Structure of the Human Antithrombin III Gene Differs from that of other Members of the Serine Protease Inhibitor Superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, **262**: 9004-9010.

- RANA, S.V., REIMERS, H.J., PATHIKONDA, M.S., BAJAJ, S.P. (1988). Expression of Tissue Factor and Factor VIIa/tissue Factor Inhibitor Activity in Endotoxin or Phorbol Ester Stimulated U937 Monocyte-like Cells. **Blood**, **71**: 259-262.
- REDONDO, M., WATZKE, H.H., STUCKI, B., SULZER, I., BIASIUTTI, F.D., BINDER, B.R., FURLAN, M., LÄMMLER, B., WUILLEMIN, W.A. (1999). Coagulation Factors II, V, VII and X, Prothrombin Gene 20210G→A Transition, and Factor V Leiden in Coronary Artery Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1020-1025.
- REES, D.C., COX, M., CLEGG, J.B. (1995). World Distribution of Factor V Leiden. **The Lancet**, **346**: 1133-1134.
- REES, D.C. (1996). The Population Genetics of Factor V Leiden. **British Journal of Haematology**, **95**: 579-556.
- REES, D.C., CLARKE, K., MARTIN, P.G., KEELING, D.M. (1998). Factor V Leiden Haplotypes in Two Homozygotes of Asian Origin. **British Journal of Haematology**, **102**: 1380-1385.
- REES, D.C., CHAPMAN, N.H., WEBSTER, M.T., GUERREIRO, J.F., ROCHETTE, J., CLEGG, J.B. (1999). Born to Clot: the European Burden. **British Journal of Haematology**, **105**: 564-566.
- REITSMA, P.H., BERNARDI, F., DOIG, R.G., GANDRILLE, S., GREENGARD, J.S., IRELAND, H., KRAWCZAK, M., LIND, B., LONG, G.L., POORT, S.R., SAITO, H., SALA, N., WITT, I., COOPER, DN. (1995). Protein C Deficiency: A Database of Mutations, 1995 Update. **Thrombosis and Haemostasis**, **73**: 876-889.
- RAHIMY, M.C., KRISHNAMOORTHY, R., AHOUGNAN, G., LAFFAN, M., VULLIAMY, T. (1998). The 20210A Allele of Prothrombin Is not Found among Sickle Cell Disease Patients from West Africa. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 444-445.
- RIDKER, P.M., HENNEKENS, C.H., LINDPAINTEK, K., STAMPFER, M.J., EISENBERG, P.R., MILETICH, J.P. (1995). Mutation in the Gene Coding for Coagulation Factor V and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, and Venous Thrombosis in Apparently Healthy Men. **The New England Journal of Medicine**, **332**: 912-917.
- RIDKER, P.M., BAKER, M.T., HENNEKENS, C.H., STAMPFER, M.J., VAUGHAN, D.E. (1997a). Alu-repeat Polymorphism in the Gene Coding for Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA) and Risks of Myocardial Infarction Among Middle-aged Men. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 1687-1690.
- RIDKER, P.M., HENNEKENS, C.H., SCHMITZ, C., STAMPFER, M.J., LINDPAINTEK, K. (1997b). PIA1/A2 Polymorphism of Platelet Glycoprotein IIIa and Risks of Myocardial Infarction, Stroke and Venous Thrombosis. **The Lancet**, **349**: 385-388.
- RIDKER, P.M., HENNEKENS, C.H., SELHUB, J., MILETICH, J.P., MALINOW, M.R., MEIR, J., STAMPFER, M.J. (1997c). Interrelation of Hyperhomocyst(e)inemia, Factor V Leiden, and Risk of Future Venous Thromboembolism. **Circulation**, **95**: 1777-1782.

- RIDKER, P.M., MILETICH, J.P., HENNEKENS, C.H., BURING, J.E. (1997d). Ethnic Distribution of Factor V Leiden in 4047 Men and Women. **Journal of the American Medical Association**, **277**: 1305-1307.
- RIDKER, P.M., HENNEKENS, C.H., LINDPAINTER, K., STAMPFER, M.J., EISENBERG, P.R., MILETICH, J.P. (1997e). Arterial and Venous Thrombosis Is Not Associated with the 4G/5G Polymorphism in the Promoter of the Plasminogen Activator Inhibitor Gene in a Large Cohort of US Men. **Circulation**, **95**: 59-62.
- RIVERA, J., CORRAL, J., GONZALEZ-CONEJERO, R., LOZANO, M.L., INIESTA, J.A., VICENTE, V. (1996). Prevalence of the HPA-1b Polymorphism in Patients with Ischaemic Cerebrovascular Disease, or Venous Thrombosis. Influence of the HPA-1 Genotype in Platelet Function. **Blood**, **88**: 178 (abstract).
- ROBINSON, V.M. & ROISENBERG, I. (1980). Venous Thromboembolism and ABO Blood Groups in a Brazilian population. **Human Genetics**, **55**: 129-131.
- ROSE, N.C., WANG, Y.L., NEUBERT, A.G., ROTH, N.W., LI, M.R., WILSON, R.B. (1998). An Evaluation of the Factor V Leiden Mutation in a Cohort of African-american Pregnant. **Prenatal Diagnosis**, **18**: 315-317.
- ROSENDAAL, F.R. (1997). Risk Factors for Venous Thrombosis: Prevalence, Risk, and Interaction. **Seminars in Hematology**, **34**: 171-187.
- ROSENDAAL, F.R., DOGGEN, C.J.M., ZIVELIN, A., ARRUDA, V.R., AIACH, M., SISCOVICK, D.S., HILLARP, A., WATZKE, H.H., BERNARDI, F., CUMMING, A.M., PRESTON, F.E., REITSMA, P.H. (1998). Geographic Distribution of the 20210G to A Prothrombin Variant. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 7006-708.
- ROSENDAAL, F.R. (1999). Risk Factor for Venous Thrombotic Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 610-619.
- ROUSE, D.J., GOLDENBERG, R.L., WENSTROM, K.D. (1997). Antenatal Screening for Factor V Leiden Mutation: A Critical Appraisal. **Obstetrics and Gynecology**, **90**: 848-850.
- ROZEN, R. (1997). Genetic Predisposition to Hyperhomocysteinemia: Deficiency of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 523-526.
- ROZEN, E., RENBAUM, P., HEYD, J., LECY-LAHAD, E. (1999). High Frequency of Factor V Leiden in a Population of Israeli Arabs. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 1768.
- RUGGERI, Z.M. (1999). Structure and Function of von Willebrand Factor. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 576-584.
- SAKATA, Y., GRIFFIN, J.H., LOSKUTOFF, D.J. (1988). Effect of Activated Protein C on the Fibrinolytic Components Released by Cultured Bovine Endothelial Cells. **Fibrinolysis**, **2**: 5-7.

- SALDEN, A., KEENEY, S., HAY, C.R.M., CUMMING, A.M. (1997). The C677T MTHFR Variant and the Risk of Venous Thrombosis. **British Journal of Haematology**, **99**: 272.
- SALOMON, P., STEINBERG, D.M., ZIVELIN, A., GITEL, S., DAIDIK, R., ROSENBERG, N., BERLINER, S., INBAL, A., MANY, A., LUBESTKY, A., VARON, D., MARTINOWITZ, U., SELIGSOHN, U. (1999). Single and Combined Prothrombotic Factors in Patients with Idiopathic Venous Thromboembolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 511-518.
- SARTORI, M.T., GIROLAMI, A., THEODORIS, P., GAVASSO, S., PERIN, A., PATRASSI, G.M. (1994). Congenital Hypoplasminogenemia and Thrombosis: A Study in Twenty-one Patients Belonging to Five New Kindreds. **Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia**, **7**: 83-86.
- SARTORI, M.T., WIMAN, B., VETTORE, S., DAZZI, F., GIROLAMI, A., PATRASSI, G.M. (1998). 4G/5G Polymorphism of PAI-1 Gene Promoter and Fibrinolytic Capacity in Patients with Deep Vein Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 956-960.
- SCARABIN, P.Y., AILLAUD, M-F., AMOUYEL, P., EVANS, A., LUC, G., FERRÈRES, J., ARVELLIER, D., JUHAN-VAGUE, I. (1998). Associations of Fibrinogen, Factor VII and PAI-1 with Baseline Findings among 10,500 Male Participants in a Prospective Study of Myocardial Infarction. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 749-756.
- SCHAMBECK, C.M., SCHWENDER, S., HAUBITZ, I., GEISEN, U.E., GROSSMANN, R.E., KELLER, F. (1997). Selective Screening for the Factor V Leiden Mutation: It is Advisable Prior to the Prescription of Oral Contraceptives? **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 1480-1483.
- SCHMIDEL, D.K., TATRO, A.V., PHELPS, L.G., TOMCZAK, J.A., LONG, G.L. (1990). Organization of the Human Protein S Genes. **Biochemistry**, **29**: 7845-7852.
- SCHWARTZ, H.P., HEEB, M.J. LOTTENBERG, R., GRIFFIN, J.H. (1989). Familial Protein S Deficiency with a Variant Protein S Molecule in Plasma and Platelets. **Blood**, **74**: 213-221.
- SCHWARTZ, H.P., FISCHER, M., HOPMEIER, P., BATARD, M.A., GRIFFIN, J.H.(1984). Plasma Protein S Deficiency in Familial Thrombotic Disease. **Blood**, **64**: 1297-1300.
- SCOPES, D., BERG, L.P., KRAWCZAK, M., KAKKAR, V.V., COOPER, D.N. (1995). Polymorphic Variation in the Human protein C (PROC) Gene Promoter can Influence Transcriptional Efficiency in Vitro. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, **6**: 317-321.
- SELHUB, J. & D'ANGELO, A. (1997) Hiperhomocysteinemia and Thrombosis: Acquired Conditions. **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 527-531.
- SELIGSOHN, U., BERGER, A., ABEND, M., RUBIM, L., ATTIAS, D., ZIVELLIN, A., RAPAPORT, S.I. (1984). Homozygous Protein C deficiency manifested by Massive Venous Thrombosis in the Newborn. **The New England Journal of Medicine**, **310**: 559-562.

- SELIGSOHN, U. & ZIVELIN, A. (1997). Thrombophilia as a Multigenic Disorder. **Thrombosis and Haemostasis**, **78**: 297-301.
- SHEN, L., DAHLBÄCK, D. (1994). Factor V and Protein S as Synergistic Cofactors to Activated Protein C in Degradation of Factor VIIIa. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 18735-18738.
- SILVEIRA, A., GREEN, F., KARPE, F., BLOMBACK, M., HUMPHRIES, S., HAMSTEN, A. (1994). Elevated Levels of Factor VII Activity in the Postprandial State: Effect of the Factor VII Arg-Gln Polymorphism. **Thrombosis and Haemostasis**, **72**: 734-739.
- SILVERSTEIN, A.D., HEIT, J.A., MOHR, D.N., PETTERSON, T.M., O'FALLON, W.M., MELTON, J. (1998). Trends in the Incidence of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. **Archives of Internal Medicine**, **158**: 585-593.
- SIMMONDS, R.E., ZÖLLERR, B., IRELAND, H., THOMPSON, E., de FRUTOS, P.G., DAHLBÄCK, B., LANE, D.A. (1997). Genetic and Phenotypic Analysis of a Large (122-member) Protein S-deficient Kindred Provides an Explanation for the Familial Coexistence of Type I and Type III Plasma Phenotypes. **Blood**, **89**: 4364-4370.
- SOBEL, B.E. (1999). Coronary Artery Disease and Fibrinolysis: from the Blood to the Vessel Wall. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 8-13.
- SOUTO, J.C., COLL, I., LLOBE, D., del RIO, E., OLIVER, A., MATEO, J., BORRELL, M., FONTCUBERTA, J. (1998). The Prothrombin 20210A Allele is the Most Prevalent Genetic Risk Factor for Venous Thromboembolism in the Spanish Population. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 366-369.
- SPEK, C.A., POORT, S.R., BERTINA, R.M., REITSMA, P.H. (1994). Determination of the Allelic and Haplotype Frequencies of Three Polymorphism in the Promoter Region of the Human Protein C Gene. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, **5**: 309-311.
- SPRENGS, E.D. & KLUFT, C. (1987). Plasminogen Activators Inhibitors. **Blood**, **69**: 381-387.
- STEEDS, R., ADAMS, M., SMITH, P., CHANNER, K., SAMANI, N.J. (1998). Distributions of Tissue Plasminogen Activator Insertion/Deletion Polymorphism in Myocardial Infarction and Control Subjects. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 980-984.
- STEGNAR, M., UHRIN, P., PETERNEL, P., MAVRI, A., SALOBIR-PAJNIC, B., ATARE, J., BINDER, B.R. (1998). The 4G/5G Sequence Polymorphism in the Promoter of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene: Relationship to Plasma PAI-1 Level in Venous Thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 975-979.
- STEFANO, V., CHIUSOLO, P., PACIARONI, K., SERRA, F.G., VOSO, M.T., CASORELLI, I., ROSSI, E., LEONE, G. (1998). Prevalence of the 677C to T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Italian patients with Venous Thrombotic Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 686-687.

- STEFANO, V., MARTINELLI, I., MANNUCCI, P.M., PACIARONI, K., CHIUSOLO, P., CASORELLI, I., ROSSI, E., LEONE, G. (1999). The Risk of Recurrent Deep Venous Thrombosis among Heterozygous Carriers of Both Factor V Leiden and the G20210A Prothrombin Mutation. **The New England Journal of Medicine**, **341**: 801-806.
- STEVENSON, R.E., SCHWARTZ, C.E., DU, Y-Z., ADAMS, M.J. (1997). Differences in Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotype Frequencies, between Whites and Blacks. **American Journal of Human Genetics**, **60**: 229-230.
- SUZUKI, K., NISHIOKA, J., HASHIMOTO, S. (1983a). Protein-C Inhibitor: Purification from Human Plasma and Characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, **258**: 163-168.
- SUZUKI, K., NISHIOKA, J., KAMIY, T., SAITO, H. (1983b). Normal Titer of Functional and Immunoreactive Protein-C Inhibitor in Plasma of Patients with Congenital Combined Deficiency of Factor V and Factor VIII. **Blood**, **62**: 1266-1270
- SUZUKI, K., DEYASHIKI, Y., NISHIOKA, J., AKIRA, M., YAMAMOTO, S., HASHIMOTO, S. (1987a). Characterization of a cDNA for Human Protein C Inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, **262**: 611-616.
- SUZUKI, K., KUSUMOTO, H., DEYASHIKI, Y., NISHIOKA, J., MARUYAMA, I., ZUSHI, M., KAWAHARA, S., HONDA, G., YAMAMOTO, S., HORIGUCHI, S. (1987b). Structure and Expression of Human Thrombomodulin, a Thrombin Receptor on Endothelial Acting as a Cofactor for Protein C Activation. **The EMBO Journal**, **6**: 1891-1897.
- SVENSSON, P.J. & DAHLBÄCK, M.D. (1994). Resistance to Activated Protein C as a Basis for Venous Thrombosis. **The New England Journal of Medicine**, **330**: 517-522.
- SVENSSON, P.J., ZÖLLER, B., MATTIASSON, I., DAHLBÄCK, M.D. (1997). The Factor V R506Q Mutation Causing APC Resistance is Highly Prevalent Amongst Unselected Outpatients with Clinically Suspected Deep Venous Thrombosis. **Journal of Internal Medicine**, **241**: 379-385.
- TAIT, R.C., WALKER, I.D., PERRY, D.J., ISLAM, S.I.A.M., DALY, M.E., MacCALL, F., CONKIE, J.A., CARREL, R.W. (1994a). Prevalence of Antithrombin Deficiency in the Healthy Population. **British Journal of Haematology**, **87**: 106-112.
- TAIT, R.C., WALKER, I.D., PERRY, D.J., ISLAM, S.I.A.M., MacCALL, F., CONKIE, J.A. (1994). High Prevalence of Plasminogen Deficiency in Healthy Blood Donors. **British Journal of Haematology**, **87**: 187 (abstract)
- TANAKA, S., OHNOKI, S., SHIBATA, H., OKUBO, Y., YAMAGUCHI, H., SHIBATA, Y. (1996). Gene Frequencies of Human Platelet Antigens on Glycoprotein IIIa in Japanese. **Transfusion**, **36**: 813-817.
- THALER, E. & LECHNER, K. (1981). Antithrombin III Deficiency and Thromboembolism. **Clinics in Haematology**, **10**: 369-390.

- TISHKOFF, S.A., RUANO, G., KIDD, J.R., KIDD, K.K. (1996). Distribution and Frequency of Polymorphic Alu Insertion at the Plasminogen Activator Locus in Humans. **Human Genetics**, **97**: 759-764.
- TOSETTO, A., MISSIAGLIA, E., FREZZATO, M., RODEGHIERO, F. (1997). The VITA Project: C667T Mutation in the Methylene-Tetrahydrofolate Reductase Gene and Risk of venous Thromboembolism. **British Journal of Haematology**, **97**: 804-806.
- TOSETTO, A., RODEGHIERO, F., MARTINELLI, I., STEFANO, V., MISSIAGLIA, E., CHIUSOLO, P., MANNUCCI, P.M. (1998). Additional Genetic Risk Factor for Venous Thrombosis in Carriers of the Factor V Leiden Mutation. **British Journal of Haematology**, **103**: 871-896.
- TRACY, R.P., ARNOLD, A.M., ETTINGER, W., FRIES, L., MEILAHN, E., SAVAGE, P. (1999). The Relationship of Fibrinogen and Factors VII and VIII to Incident Cardiovascular Disease and Death in the Elderly. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, **19**: 1776-1783.
- TSIANG, M., LENTZ, S.R., SADLER, J.E. (1992). Functional Domains of Membrane-bound Human Thrombomodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, **267**: 6164-6170.
- TUDDENHAM, E.G.D., TAKASE, T., THOMAS, A.E., AWIDI, A.S., MADANAT, F.F., HAJIR, AM.M.A., KERNOFF, P.B.A., HOFFBRAND, A.V. (1989). Homozygous Protein C Deficiency with Delayed Onset of Symptoms at 7 to 10 Months. **Thrombosis Research**, **53**: 475-484.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. (1994). **The Molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders**. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 585pp.
- VANDENBROUCKE, J.P., KOSTER, T., BRIËT, E., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M., ROSENDAAL, F.R. (1994). Increases Risk of Venous Thrombosis in Oral-Contraceptive Users Who are Carriers of Factor V Leiden Mutation. **The Lancet**, **344**: 1453-1457.
- van den EIJDEN-SCHRAUWEN, LAKENBERG, N., EMEIS, J.J., KNIJFF, P. (1997). Alu-repeat Polymorphism in the Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA) Gene does not Affect Basal Endothelial tPA Synthesis. **Thrombosis and Haemostasis**, **74**: 1197-1207.
- van der BOM, J., KNIJFF, P., HAVERKATE, F., BOTS, M.L., MEIJER, P., JONG, P.T.V.M., HOFMAN, A. (1997). Tissue Plasminogen Activator and Risk of Myocardial Infarction. **Circulation**, **95**: 2623-2627.
- van der LOGT, .P.E., REISTMA, P.H., BERTINA, R.M. (1991a). Intron-exon Organization of Human Gene Coding for the Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor. **Biochemistry**, **30**: 1571-1577.
- van der VELDEN, P.A., KROMMENHOEK-VAN., E.T., ALLAART, C.F., BERTINA, R.M., REITSMA, P.H. (1991). A Frequent Thrombomodulin Amino Acid Dimorphism is not Associated with Thrombophilia. **Thrombosis and Haemostasis**, **65**: 511-513.

- van MOURIK, J.A., LAURENCE, D.A., LOSKUTOFF, D.J. (1984). Purification of an Inhibitor of Plasminogen Activator (antiactivator) Synthesized by Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, **259**: 14914-14921.
- VANEGAS, O.C., GIUSTI, B., FERNANDEZ, C.M.R., ABBATE, R., PEPE, G. Frequency of Factor V (FV) Leiden and C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutations in Colombians. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 883-884.
- van't HOOFT, SILVEIRA, A., TORNVALL., P., LLIADOU, A., EHRENBORG, E., ERIKSSON, P., HAMSTEN, A. (1999). Two Common Functional Polymorphisms in the Promoter Region of the Coagulation Factor VII Gene Determining Plasma Factor VII Activity and Mass Concentration. **Blood**, **93**: 3432-3441.
- van't VEER, C., GOLDEN, N.J., KALAFATIS, M., SIMIONI, P., BERTINA, R.M., MANN, K.G. (1997). An In Vitro Analysis of the Combination of Hemophilia A and Factor V^{Leiden}. **Blood**, **90**: 3067-3072.
- VÁRADI, K., ROSING, J., TANS, G., PABINGER, I., KEIL, B., SCHWARZ, H.P. (1996). Factor V Enhances the Cofactor Function of Protein S in the APC-Mediated Inactivation of Factor VIII: Influence of the Factor V^{R506Q} Mutation. **Thrombosis and Haemostasis**, **76**: 208-214.
- VARGAS, M., SOTO, I., PINTO, C.R., URGELLES, M.F., BATALLA, A., RODRIGUEZ-REGUERO, J., CORTINA, A., ALVAREZ, V., COTO, E. (1999). The Prothrombin 20210A allele and the factor V Leiden are Associated with Venous Thrombosis but not with Early Coronary Artery Disease. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, **10**: 39-41.
- WALTER, D.H., SCHÄCHINGER, V., ELSNER, M., DIMMELER, S., ZEIHNER, A.M. (1997). Platelet Glycoprotein IIIa Polymorphism and Risk of Coronary Stent Thrombosis. **The Lancet**, **350**: 1217-1219.
- WANG, H., RIDDEL, D.C., GUINTO, E.R., MacGILLIVRAY, R.T.A., HAMERTON, J.L. (1988). Localization of the Gene Encoding Human Factor V to Chromosome 1q21-25. **Genomics**, **2**: 324-328.
- WANG, X.L., WANG, J., McCREDIE, R.M., WILCKEN, D.E.L. (1997). Polymorphisms of Factor V, Factor VII, and Fibrinogen Genes. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, **17**: 246-251.
- WAR-CRANMER, B.J. ALMUS, F.E., RAPAPORT, S.I. (1989). Studies of the Factor Xa-dependent Inhibitor of Factor VIIa/tissue Factor (Extrinsic Pathway Inhibitor) from Cell Supernatants of Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Thrombosis and Haemostasis**, **61**: 101-105
- WATKINS, P.C., EDDY, R., FUKUSHIMA, Y., BYERS, M.G., COHEN, E.H., DACKOWISKI, W.R., WYDRO, R.M., SHOWS, T.B. (1988). The Gene for Protein S Maps Near the Centromere of Human Chromosome 3. **Blood**, **71**: 238-241.
- WATZKE, H.H., SCHÜTTRUMPF, J., GRAF, S., PANZER, S. (1997). Increased Prevalence of a Polymorphism in the Gene Coding for Human Prothrombin in Patients with Coronary Heart Disease. **Thrombosis Research**, **87**: 521-526.

- WAULTRECHT, J.C., GALLE, C., MOTTE, S., DEREUME, J.P., DRAMAIX, M. (1998). The Role of ABO Blood Groups in the Incidence of Deep Vein Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 688-689.
- WEISS, E.J., BRAY, P.F., TAYBACK, M., SCHULMAN S.P., KICKLER, T.S., BECKER, L.C., WEISS, J.L., GERSTENBLITH, G., GOLDSHIMIDT-CLERMONT, P.J. (1996). A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an inherited Risk factor for Coronary Thrombosis. **The New England Journal of Medicine**, **334**: 1090-1094.
- WEN, D., DITTMAN, W.A., YE, R.D., DEAVEN, L.L. MAJERUS, P.W., SADLER, J.E. (1987). Human Thrombomodulin: Complete cDNA Sequence and Chromosome Localization of the Gene. **Biochemistry**, **26**: 4350-4357.
- WHITE, G.C. & SHOEMAKER, C.B. (1989). Factor VIII Gene and Hemophilia A. **Blood**, **73**: 1-12.
- WILLIAMSON, D., BROWN, K., LUDDINGTON, R., BAGLIN, C., BAGLIN, T. (1998). Factor V Cambridge: a New Mutation (Arg306→Thr) Associated with Resistance to Activated Protein C. **Blood**, **93**: 1271-1276.
- WIMAN, B. & COLLÉN, D. (1977). Purification and Characterization of Human Antiplasmin, the Fast Acting Plasmin Inhibitor in Plasma. **European Journal of Biochemistry**, **78**: 19-26.
- WINTER, J.H., BENNETT, B., WATT, J.L., BROWN, T., San ROMAN, C., SCHINZEL, A., KING, J., COOK, P.J.L. (1982). Confirmation of Linkage between Antithrombin III and Duffy Blood Group and Assignment of AT3 to 1q22-1q25. **Annals of Human Genetics**, **46**: 29-34.
- WORD HEALTH ORGANIZATION. (1995). Inherited Thrombophilia. **WHO/HGN/WG/95.5**: 1-51.
- WRIGTH, J.G., COOPER, P., MALIA, R.G., KULOZIK, A.E., VETTER, B., THOMAS, P., PRESTON, F.E., SERJEANT, G.R. (1997). Activated Protein C Resistance in Homozygous Sickle Cell Disease. **British Journal of Haematology**, **96**: 854-856.
- WUN, T.C., KRETZMER, K.K., GIRARD, T.J., MILETICH, J.P., BROZE, G.J. (1988). Cloning and Characterization of a cDNA Coding for the Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor Shows that it Consist of Three Tandem Kunitz Type Inhibitory Domains. **The Journal of Biological Chemistry**, **263**: 6001-6004.
- YANG-FENG, T.L., OPEDENAKKER, G., VOLCKAERT, G., FRANCKE, U. (1986). Human Tissue-type Plasminogen Activator Gene Located near Chromosomal Breakpoint in Myeloproliferative Disorder. **The American Journal of Human Genetics**, **39**: 79-87.
- ZABALEGUI, N., MONTES, R., ORBE, J., AYAPE, M.L., MEDARDE, A., PÁRAMO, J.A., ROCHA, E. (1998). Prevalence of FVR⁵⁰⁶ and Prothrombin 20210A Mutations in the Navarrese Population. **Thrombosis and Haemostasis**, **80**: 522-523.

- ZIMMER, C.L. (1993). Deficiências Hereditárias dos Inibidores Fisiológicos da Coagulação: Frequências Relativas, Idades e Manifestações Clínicas. Dissertação Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ZIVELIN, A., GRIFFIN, J.H., XU, X., PABINGER, I., SAMAMA, M., CONARD, J., BRENNER, B., ELDOR, A., SELIGSOHN, U. (1997). A Single genetic Origin for a Common Caucasian Risk Factor for Venous Thrombosis. **Blood**, **89**: 397-402.
- ZIVELIN, A., ROSENBERG, N., FAIER, S., KORNBROT, N., PERETZ, H., MANNHALTER, C., HORELLOU, M.H., SELIGSOHN, U. (1998). A Single Genetic Origin for the Common Prothrombotic G20210A Polymorphism in the Prothrombin Gene. **Blood**, **92**: 1119-1124.
- ZIVELIN, A., GITEL, S., GRIFFIN, J.H., XU, X., FERNADEZ, J., MARTINOWITZ, U., COHEN, Y., HALKIN, H., SELIGSOHN, U., INBAL, A. (1999). Extensive Venous and Arterial Thrombosis Associated with an Inhibitor to Activated Protein C. **Blood**, **94**: 895-901.
- ZÖLLER, B., SVENSSON, P.J., HE, X., DAHLBÄCK, B. (1994). Identification of the Same Factor V Gene Mutation in 47 out of 50 Thrombosis-prone Families with Inherited Resistance to Activated Protein C. **Journal of Clinical Investigation**, **94**: 2521-2524.
- ZÖLLER, B., HILLARP, A., DAHLBÄCK, B. (1997). Activated Protein C Resistance Caused by a Common Factor V Mutation Has a Single Origin. **Thrombosis Research**, **85**: 237-243.
- ZÖLLER, B., FRUTOS, P.G., DAHLBÄCK, B. (1998). A Common 4G Allele in the Promoter of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene as a Risk Factor for Pulmonary Embolism and Arterial Thrombosis in Hereditary Protein S Deficiency. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 802-807.
- ZOTZ, R.B., WINKELMANN, B.R., NAUCK, M., GIERS, G., MARUHN-DEBOWSKI, B., MÄRZ, W., SCHARF, R.E. (1998). Polymorphism of Platelet membrane Glycoprotein IIIa: Human Platelet Antigen 1b (HPA-1b/PI^{A2}) is an Inherited Risk factor for Premature Myocardial infarction in Coronary Artery Disease. **Thrombosis and Haemostasis**, **79**: 731-733.