

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Polimorfismo de inserção ou deleção do Ativador de Plasminogênio
Tecidual e Risco de Trombose Venosa

Autor
Fais Husein Abdalla

Porto Alegre, RS
Março, 2008

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Polimorfismo de inserção ou deleção do Ativador de Plasminogênio Tecidual e Risco de Trombose Venosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Autor
Fais Husein Abdalla

Orientador
Prof^a. Dr^a. Virgínia Minghelli Schmitt

Porto Alegre, RS
Março, 2008

Aos meus pais, Fernando e Mirian, por acreditarem em mim e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram.

Às minhas Irmãs e Irmãos, que, mesmo de longe, torceram e acreditaram no meu sucesso.

A todos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Virgínia Minghelli Schmitt, pela paciência e compreensão ao longo de todo o trabalho.

À Dr^a Terezinha Paz Munhoz pelo auxílio em diversos momentos de dificuldades.

A todos os estagiários do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação, por serem tão prestativas e por estarem sempre dispostas a ajudar e solucionar as inúmeras dúvidas e problemas que surgiram no decorrer do curso.

Aos demais colegas e professores do PPGBCM e a todas as pessoas que de alguma forma me deram apoio e contribuíram para que eu pudesse trilhar meu caminho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	v
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	vii
Resumo	viii
Abstract	x
Introdução	01
Referencial teórico	02
Mecanismo de coagulação	02
O fator tecidual	03
Sistema plasminogênio / plasmina	05
Ativador do plasminogênio tecidual	06
Tromboembolismo venoso	07
Predisposição Genética	08
Fator V de Leiden	08
Mutação da Protromina	09
Polimorfismo de inserção (I) e deleção (D) de seqüências Alu no íntron 8 do gene que codifica o ativador do plasminogênio tecidual	09
Objetivos	13
Objetivo geral	13
Objetivos específicos	13
Artigo Científico: Tissue Plasminogen Activator Gene I/D Polymorphism in patients with venous thromboembolism from the south of Brazil	14
Abstract	16
1 Introduction	18
2 Population and Methods	18
3 Results	20
4 Discussion	21
Reference	25
Considerações Finais	31
Conclusões	33
Referências	34

LISTA DE ABREVIATURA

D	Alelo de deleção do gene t-PA
DVT	<i>Deep Venous Thrombosis</i>
DD	Genótipo homocigoto para o alelo de deleção do polimorfismo I/D do gene t-PA
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
FT	Fator Tecidual
I	Alelo de inserção do gene t-PA
I/D	Inserção / Deleção
ID	Genótipo heterocigoto para o polimorfismo I/D do gene t-PA
II	Genótipo homocigoto para o alelo de inserção do polimorfismo I/D do gene t-PA
IM	Infarto do miocárdio
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
OR	Razão de chance (<i>Odds ratio</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDF	Produtos de Degradação de Fibrina
TEP/PTE	Tromboembolismo pulmonar / <i>Pulmonary Thromboembolism</i>
TEV/VTE	Tromboembolismo venoso / <i>Venous Thromboembolism</i>
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual (<i>Tissue plasminogen activator</i>)
TV	Trombose venosa
TVP	Trombose venosa profunda
u-PA	Ativador do plasminogênio da uroquinase (<i>Urokinase plasminogen activator</i>)
UV	Luz ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos complexos procoagulantes -----03

Figura 2: Reações de ativação de cofatores-----05

Figura 3: Representação esquemática do sistema fibrinolítico -----06

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de fatores de risco para trombose venosa-----08

Tabelas do Artigo Científico

Tabela 2: Características da população estudada-----28

Tabela 3: t-PA Genótipos e alelos dos Grupos estudados-----29

Tabela 4: Frequência alélica e genotípicas em outros estudos-----30

RESUMO

Introdução: A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial constitui um processo crucial para a manutenção da integridade vascular. Porém, os mecanismos do sistema hemostático devem ser regulados para, simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina. Por isso, um equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise é essencial.

O ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) é o principal ativador do sistema fibrinolítico derivado de células endoteliais, desempenhando importante papel na fibrinólise. Nos últimos anos, tem sido estudada a relação entre o polimorfismo de inserção e deleção (I/D) de uma sequência *Alu* do gene t-PA e o risco de desenvolver doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, como infarto do miocárdio e trombose venosa, em diferentes populações do mundo.

Objetivo: Esse estudo tem por objetivo pesquisar a relação entre o polimorfismo de inserção/deleção do gene t-PA e trombose venosa (TV), comparando um grupo de indivíduos com episódio de tromboembolismo pulmonar (TEP) ou trombose venosa profunda (TVP) e um grupo de indivíduos sem história de TV.

Materiais e Métodos: Foram avaliados 89 indivíduos com episódio de tromboembolismo venoso (grupo caso) e 81 indivíduos sem histórico de doença tromboembólica (grupo controle). O genótipo do t-PA foi determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as amostras identificadas como genótipo DD eram confirmadas mediante a realização de uma nova PCR utilizando um primer interno que reconhece e hibridiza especificamente na sequência de inserção, possibilitando uma identificação precisa dos genótipos.

Resultados: A frequência do alelo D foi de 41,6% entre os pacientes e 46,9% entre os controles; a do alelo I foi 58,4% e 53,1%, respectivamente. O genótipo DD foi encontrado em 14,6% dos pacientes e 17,3% dos controles, e o genótipo ID, em 53,9% dos casos e 59,3% dos controles. Os homozigotos II representaram 31,5% dos indivíduos do grupo caso e 23,4% dos indivíduos do grupo controle.

Discussão e Conclusões: Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do gene t-PA nos grupos de indivíduos estudados. No entanto, o genótipo II foi mais freqüente no grupo caso do que no grupo controle, sugerindo uma tendência de associação entre o genótipo II do gene t-PA e o desenvolvimento de doenças tromboembólicas. Não foram encontrados dados na literatura sobre a freqüência do polimorfismo I/D do gene t-PA na população brasileira. Este relato representa, portanto, o primeiro relato sobre a freqüência deste polimorfismo no Brasil, em grupos de indivíduos com e sem histórico de trombose, contribuindo para o conhecimento da relação entre este polimorfismo e tromboembolismo venoso (TEV).

Abstract

Introduction: The formation of the fibrin clot in the site of the endothelial lesion constitutes a crucial process for the maintenance of the vascular integrity. However, the mechanisms of the hemostatic system should be regulated, simultaneously, to oppose the excessive loss of blood and to avoid formation of intravascular thrombus, due to excessive formation of fibrin. Therefore, a balance between the coagulation and the fibrinolysis is essential. The tissue plasminogen activator (t-PA) is the main activator of the fibrinolytic system derived from endothelial cells, playing important role in the fibrinolysis. In the last years, the I/D polymorphism (insertion or deletion of an *Alu* sequence) of the t-PA gene has been studied as a potential risk factor for developing cardiovascular diseases, as myocardial infarction and venous thrombosis, in different populations of the world.

Objective: This study investigate the relationship between the insertion/deletion polymorphism of the t-PA gene and venous thrombosis (VT), comparing a group of individuals with episode of pulmonary thromboembolism (PTE) or deep venous thrombosis (DVT) and a group of individuals with no history of VT.

Material and methods: Case group was composed of 89 individuals with episode of venous thromboembolism and control group represented 81 individuals with no history of thromboembolic disease. The t-PA genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR). All samples identified as DD genotype were retested for confirmation by means of a PCR using an internal primer that recognizes and hybridizes specifically with the inserted sequence, assuring an accurate genotype identification.

Results: The frequency of D allele among patients was 41.6% and controls, 46.9%; for I allele, frequency was 58.4% and 53.1%, respectively. The DD genotype was found in 14.6% of patients and 17.3% of controls, and the ID genotype, in 53.9% of the cases and 59.3% of the controls. The II homozygote represented 31.5% individuals in the case group and 23.4% individuals in the control group.

Discussions and Conclusions: No statistically significant difference was observed among genotypes of the t-PA gene in individuals of studied groups. However, the II genotype was more frequent in the case group than in the control group, suggesting a tendency of association between the II genotype of t-PA gene and the development of thromboembolic diseases. As no data was found in the literature on the frequency of the I/D polymorphism of t-PA gene in the Brazilian population, we consider this report as the first study involving the frequency of this polymorphism in groups of individuals with and without thrombosis historical event in Brazil, contributing to the knowledge of the relationship between this polymorphism and VTE in our country.

INTRODUÇÃO

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença multifatorial e multigênica, que resulta de alterações nos mecanismos de coagulação e anticoagulação. Suas manifestações clínicas são a trombose venosa (TV) e o tromboembolismo pulmonar (TEP), sendo uma doença bastante comum que acomete cerca de 1/1000 indivíduos anualmente (1, 2, 3,4).

O ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) é uma glicoproteína da família das serino-proteases de 70 kDa (quilodaltos), tendo como função ativar a conversão do plasminogênio para plasmina, proteína fibrinolítica que remove a fibrina, transformando-a em seus produtos de degradação (PDF). O t-PA é sintetizado e secretado por diferentes tipos celulares, por exemplo, células do endotélio e da musculatura lisa. Esses dois tipos celulares são os principais responsáveis pelos níveis de t-PA na corrente circulatória (5,6).

Em 1992, Ludwig e colaboradores identificaram um polimorfismo de inserção e deleção (I/D) de repetições *Alu* no intron 8 do gene t-PA. Alguns estudos realizados na última década têm sugerido este polimorfismo como mais um provável fator de risco genético para o desenvolvimento de episódios tromboembólicos. No entanto, essa relação ainda não está totalmente esclarecida (7).

Por ser a trombose venosa uma doença bastante comum, influenciada por diferentes combinações de fatores genéticos e adquiridos, é de grande importância a realização de estudos que possam contribuir para o conhecimento da relação entre fatores de risco ainda controversos, como o polimorfismo I/D do gene t-PA, e eventos trombóticos.

REFERENCIAL TEÓRICO

Mecanismo de Coagulação

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da enzima trombina, que por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel.

Os mecanismos hemostáticos, fisiologicamente relevantes estão associados com três complexos enzimáticos pró-coagulantes, os quais envolvem serino-proteases dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X) associadas a cofatores (V e VIII), todos localizados em uma superfície de membrana contendo fosfolipídeos (8, 9).

As diversas enzimas da coagulação convertem seus substratos pró-cofatores em cofatores, os quais localizam as proteases sobre as superfícies celulares, contendo fosfolipídeos (em especial das plaquetas), em que essas reações acontecem (Fig. 1). Os elementos biológicos que contribuem para o componente de fosfolipídeos da coagulação incluem tecidos vasculares lesados, células inflamatórias e plaquetas ativadas. O principal contribuinte, em termos de números de sítios, são as membranas de plaquetas, que, quando ativadas, expressam sítios de ligação para os complexos fator IXa/fator VIIIa (complexo “tenase”) e fator Xa/fator Va (complexo “protrombinase”). Adicionalmente, íons cálcio são necessários em diversos passos das reações da coagulação.

O início do processo de coagulação depende da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (por ex., liberação de citocinas). Qualquer que seja o evento desencadeante, a iniciação da coagulação do sangue se faz mediante expressão do seu componente crítico, o fator tecidual (FT), e sua exposição ao espaço intravascular.

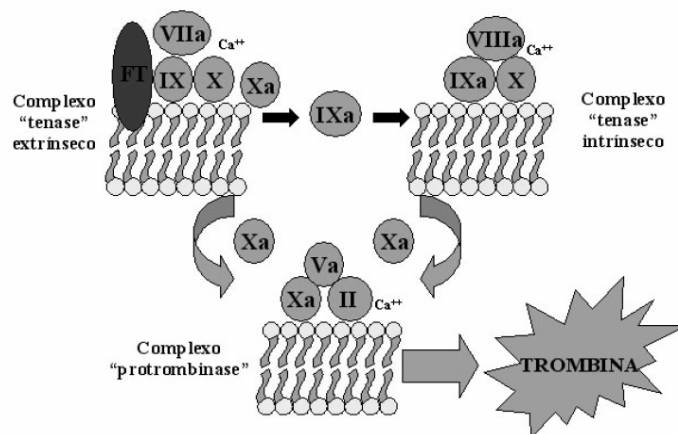


Figura 1: Representação esquemática dos complexos procoagulantes. O início da coagulação se faz mediante ligação do fator VIIa ao fator tecidual (FT), com subsequente ativação dos fatores IX e X. O complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência ainda maior, e o fator Xa forma complexo com o fator Va, convertendo o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). Também estão representadas as superfícies das membranas celulares às quais os fatores se associam (8).

O Fator Tecidual

O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína de membrana de 45KDa (quilodaltons), que funciona como receptor para o fator VII da coagulação. O FT não é normalmente expresso em células em contato direto com o sangue (tais como células endoteliais e leucócitos), mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular (2, 10). O FT é também encontrado em queratinócitos, células epiteliais do trato respiratório e trato gastrointestinal, cérebro, células musculares cardíacas e glomérulos renais. Células endoteliais e monócitos, que normalmente não expressam o fator tecidual, podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (TNF-a e interleucina-1) (8,11,12).

Em indivíduos normais, níveis mínimos da forma ativada do fator VII da coagulação (FVIIa) estão presentes na circulação, correspondendo a aproximadamente 1% da concentração plasmática total de fator VII. O FVIIa é capaz de se ligar ao FT expresso em membranas celulares, e a exposição do FT ao plasma resulta na sua ligação ao FVII e FVIIa, sendo que somente o complexo FT-FVIIa exibe função enzimática ativa; o complexo é também capaz de ativar o FVII em processo

denominado “auto-ativação”. O complexo FT-FVIIa tem como substratos principais o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na formação de FIXa e FXa, respectivamente, com subsequente formação de trombina e fibrina (Fig. 2). Deve ser ressaltado, no entanto, que quantidades mínimas de trombina são geradas a partir do complexo “protrombinase” extrínseco. Todavia, uma vez que há gênese inicial de trombina, esta enzima é capaz de ativar o fator V em fator Va, e o fator VIII em fator VIIIa. As duas reações, envolvendo ativação de pró-cofatores são fundamentais para a geração do complexo “tenase” intrínseco (fator IXa/fator VIIIa), o qual converte o fator X em fator Xa, e do complexo “protrombinase” (fator Va/fator Xa), que converte a protrombina em trombina (Fig. 1). Um importante aspecto dessas reações é que o complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo fator VIIa/FT. O produto principal das citadas reações, a trombina (IIa), exibe atividades pró-coagulantes, convertendo o fibrinogênio em fibrina, promovendo ativação plaquetária e ativando o fator XIII da coagulação, que, por sua vez, estabiliza o coágulo de fibrina.

A Figura 2 mostra, em maior detalhe, o conjunto de reações envolvidas na coagulação do sangue, com ênfase para as etapas seqüenciais em que zimogênios de serinoproteases são transformados em enzimas proteolíticas. Dessa forma, fica enfatizado o conceito de que não há distinção clara entre os sistemas intrínseco e extrínseco, que atuam de modo altamente interativo *in vivo*. Em condições fisiológicas, as reações esquematizadas nas Figuras 1 e 2 resultam na produção equilibrada de quantidades apropriadas de trombina e do coágulo de fibrina, em resposta adequada e proporcional à injúria vascular existente. Com efeito, no estado fisiológico não há formação e deposição de fibrina intravascular, em decorrência das propriedades anticoagulantes do endotélio, à forma inativa das proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação (que circulam como zimogênios ou cofatores), e à presença de inibidores fisiológicos da coagulação. Por outro lado, a perda do equilíbrio dinâmico das reações da coagulação tem como consequência clínica o aparecimento de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos.

V e o fator VIII, a fibrinólise ocorre em condições fisiológicas, como processo altamente específico para a fibrina. A ativação da fibrinólise localizada e restrita, e não sistêmica, cumprindo sua função de remover de modo equilibrado o excesso de fibrina do meio intravascular. Esta especificidade dependente de fibrina é o resultado de interações moleculares específicas entre os ativadores do plasminogênio, o plasminogênio, a fibrina, e os inibidores da fibrinólise. Por exemplo, o t-PA exibe baixa afinidade pelo plasminogênio na ausência de fibrina ($KM = 65 \text{ mM}$), afinidade que é muito aumentada na presença de fibrina ($KM = 0,15\text{-}1,5 \text{ mM}$), o que ocorre porque a fibrina representa uma superfície ideal para ligação do t-PA ao plasminogênio, e em tal reação, o plasminogênio liga-se à fibrina via resíduos de aminoácido lisina (*lysine-binding sites*). Ao contrário desses mecanismos fisiológicos, a maior ativação do sistema fibrinolítico ocorre na presença de agentes trombolíticos do tipo estreptoquinase e uroquinase, que não são específicos para a presença de fibrina.

A inibição do sistema fibrinolítico ocorre ao nível dos ativadores do plasminogênio, mediante a ação de inibidores específicos (PAIs, *plasminogen activator inhibitors*), cujo principal representante é o PAI-1, e diretamente sobre a plasmina, função inibitória exercida pela $\alpha 2$ -antiplasmina (Figura 3) (2).

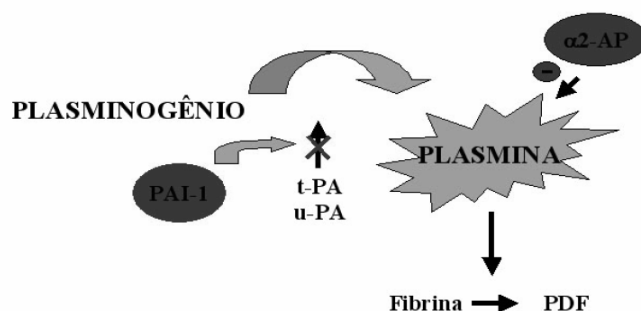


Figura 3: Representação esquemática do sistema fibrinolítico. PDF: produtos de degradação da fibrina. $\alpha 2$ -AP: alfa2-antiplasmina. t-PA: ativador do plasminogênio tecidual. u-PA: ativador do plasminogênio da uroquinase. PAIs: inibidores do ativador do plasminogênio. Adaptado de Franco RF 2001 (2).

Ativador do plasminogênio tecidual

O ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) é uma glicoproteína da família das serino-proteases de 70 kDa. O gene que codifica o t-PA foi seqüenciado e mapeado no cromossomo 8p12-p11.2, contém 14 éxons e 37kb (5).

O t-PA é o ativador da conversão do plasminogênio para plasmina, proteína fibrinolítica que remove a fibrina, transformando-a em seus produtos de degradação (PDF). O t-PA é sintetizado e secretado por diferentes tipos celulares, por exemplo, células do endotélio e da musculatura lisa. Esses dois tipos celulares são os principais responsáveis pelos níveis de t-PA na corrente circulatória (6).

Tromboembolismo venoso

Trombose venosa (TV) é o resultado da hiperativação do mecanismo de coagulação, hipoativação dos mecanismos anticoagulantes naturais ou hipoativação da fibrinólise, com a subsequente formação de um trombo intravascular, composto principalmente de fibrina e eritrócitos. O tromboembolismo venoso (TEV) tem como manifestações clínicas usuais a trombose venosa profunda (TVP) e o tromboembolismo pulmonar (TEP), que têm fatores de risco similares (14).

A incidência de trombose venosa profunda nos EUA é 1-2 em 1000 indivíduos por ano. O tromboembolismo pulmonar afeta 1,3 em 1000 pessoas por ano (15).

As maiores complicações da trombose venosa são a incapacidade provocada pela síndrome pós-trombótica, que ocorre em 20% dos casos, comprometendo a qualidade de vida, e a morte por tromboembolismo pulmonar que ocorre em cerca de 2% dos pacientes. A incidência de trombose venosa aumenta consideravelmente com a idade: de 1/100.000 indivíduos por ano, na infância até próximo de 1/100 por ano em pessoas idosas, acima de 65 anos (16).

Denomina-se trombofilia a predisposição a tromboes e este termo tem sido mais usado para a tendência determinada geneticamente. A trombose venosa é uma doença multifatorial que está associada a fatores de risco genéticos e adquiridos. Várias são as condições predisponentes à trombose venosa incluindo, idade avançada, cirurgias, imobilização prolongada, gravidez, uso de contraceptivo oral, terapia de reposição hormonal, entre outras (1, 2, 3). Além disso, muitas patologias estão associadas à trombose como neoplasias, síndromes mieloproliferativas e síndrome anti-fosfolípido. Importante também são as condições hipercoaguláveis hereditárias associadas à deficiência dos anticoagulantes naturais, já bem caracterizadas (17). É comum a presença de vários fatores em um mesmo indivíduo, o que mostra que múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento de trombose.

Predisposição genética

O impacto de um fator de risco é dependente da sua prevalência e risco relativo. A Tabela 1 mostra a prevalência de vários fatores de risco, entre caucasianos na população em geral, em pacientes com trombose venosa. As deficiências de antitrombina, proteína C e proteína S são raras, mesmo em pacientes com trombose e uma estimativa aproximada sugere um aumento de risco de trombose de 10 vezes para estas deficiências. O fator V de Leiden (FVL), a mutação da protrombina e níveis aumentados de fator VIII são os mais comuns na população em geral e são responsáveis pela maior parte dos casos de trombose.

Tabela 1: Prevalência de fatores de risco para trombose venosa.

Fator de risco	% população em geral	% pacientes com trombose
Deficiência de Proteína C	0,2-0,4	3
Deficiência de Proteína S	Desconhecido	1-2
Deficiência de antitrombina	0-0,2	1
Fator V de Leiden	5	20
Mutação protrombina	2	6
Níveis elevados Fator VIII (>150 UI/L)	11	25

Adaptado de Rosendaal, 1999 (16).

Importante também é a prevalência de anormalidades trombogênicas em famílias com trombofilia. As deficiências dos principais inibidores da coagulação ocorrem em 15%, a mutação da protrombina está próxima de 20% e o FVL em 40% a 60% destes indivíduos e o risco de trombose também é muito maior do que entre outros indivíduos com alterações similares (16).

Fator V de Leiden

Dahlbäck e cols, em 1993, observaram que a resposta plasmática à inativação pela proteína C ativada (PCa) era reduzida em famílias com história de trombose. Este fenômeno foi chamado de *resistência à proteína C ativada*.

A mutação do fator V de Leiden resulta em ganho de função do fator Va que por sua vez causa um estado de hipercoagulabilidade. O aumento do risco de trombose, na presença desta mutação, é de 7 vezes em heterozigose e em homozigose chega a 80 vezes (18).

Mutação da protrombina

A segunda causa mais comum de trombofilia hereditária está relacionada a níveis aumentados de protrombina, associado a um polimorfismo na região 3'-não traduzida do gene, causado pela substituição de uma guanina por adenina na posição 20210 (G20210A). Indivíduos heterozigotos para a mutação apresentam níveis de protrombina mais altos, muitas vezes ainda dentro do intervalo de referência para pessoas com o genótipo normal (19).

Outros polimorfismos têm sido estudados como fator de risco para o desenvolvimento de doenças tromboembólicas, assim como o polimorfismo I/D do ativador de plasminogênio tecidual.

Polimorfismo de inserção (I) e deleção (D) de seqüências Alu no íntron 8 do gene que codifica o ativador do plasminogênio tecidual

O polimorfismo de inserção (I) e deleção (D) de seqüências *Alu* no íntron 8 do gene t-PA foi primeiramente descrito por Ludwig e colaboradores em 1992 (7). As seqüências *Alu* consistem de aproximadamente 300pb, intercalados por todo o genoma humano (17). Este polimorfismo tem sido estudado como possível fator de risco para várias doenças, como infarto do miocárdio, derrame e trombose venosa (2).

Van der Bom e colaboradores, em 1997, realizaram um estudo buscando uma relação entre o polimorfismo I/D do gene t-PA e as concentrações plasmáticas de t-PA (proteína e atividade) com a prevalência de IM. Este estudo envolveu 121 pacientes com história de IM e 250 controles sem história prévia de doença cardiovascular, todos participantes do Estudo de Rotterdam, um estudo coorte de base populacional

desenvolvido com 7.983 indivíduos com idade igual ou superior a 55 anos. O alelo de inserção (I) do gene t-PA mostrou associação com um aumento de risco para IM não fatal, de forma independente da concentração plasmática de t-PA e da presença de outros fatores de risco conhecidos para IM. Portanto, este marcador polimórfico pode ser um fator preditivo de IM não fatal. A concentração plasmática de t-PA apresentou associação positiva com o risco de IM, porém, depois de ajustado para outros fatores de risco para doenças cardiovasculares, esta associação ficou fortemente atenuada. A atividade aumentada do t-PA, normalmente interpretada como o principal determinante da capacidade de dissolução do coágulo pelo sistema hemostático, mostrou uma tendência de associação com o aumento de risco para IM. Os autores concluíram que o alelo I está associado de forma independente com IM não fatal (20).

Iacoviello e colaboradores em 1996 desenvolveram um estudo com 327 indivíduos italianos que compareciam em laboratórios de hospitais em toda a Itália, selecionados consecutivamente. Foram investigados o polimorfismo I/D do gene t-PA e a concentração e atividade de t-PA, sendo realizada uma entrevista sobre a história familiar de trombose. No grupo caso, foram incluídos pacientes que sofreram um episódio de IM e relataram ter pelo menos um parente de primeiro grau que sofreu um IM e/ou derrame antes dos 65 anos. Não foi observada diferença na distribuição dos genótipos do t-PA entre pacientes com IM e história familiar de trombose e os controles. Uma avaliação da distribuição dos genótipos de acordo com o gênero não mostrou uma diferença significativa, quando comparados separadamente homens e mulheres frente aos controles. A conclusão deste estudo foi que o polimorfismo I/D do gene t-PA não representa um importante papel na determinação do aumento do risco de IM na população italiana (6).

Um estudo realizado por Hooper e colaboradores em 2000, analisou a distribuição do genótipo I/D do gene t-PA e a frequência do alelo D em um grupo de pacientes com IM e outro com TEV. O grupo caso foi constituído de pacientes afro-americanos com história de TEV (n=91) que freqüentavam uma clínica de anticoagulação e pacientes com história de IM (n=108) atendidos na clínica de cardiologia no Hospital Grady Memorial, em Atlanta, EUA. Os controles (n=185) foram selecionados entre os indivíduos afro-americanos, sem história prévia de problemas cardíacos, derrame ou trombose, que compareceram ao laboratório do mesmo hospital para exames de sangue de rotina. Os autores observaram uma razão de chance (OR)

de IM maior para o genótipo DD do que do ID, quando comparados ao genótipo II, porém sem significância estatística. A OR para TEV dos pacientes com genótipo DD foi maior e estatisticamente significativa do que a dos com genótipo ID, quando comparados ao genótipo II. A prevalência do alelo D entre pacientes com histórico de IM foi de 63%, com histórico de TEV, 65% e entre os controles, 56%. A diferença da prevalência do alelo D em relação aos controles não foi significativa para os pacientes com IM, mas para os pacientes com TEV, foi significante ($p=0,045$). Os autores observaram, na população de afro-americanos estudada, uma associação significativa entre o alelo D do polimorfismo I/D do gene t-PA e TEV, mas não significativa entre o alelo D e IM (21).

Em 2001, Hooper e colaboradores pesquisaram o polimorfismo I/D do t-PA em mulheres grávidas com história de TEV e tromboembolismo pulmonar (TEP). Foram incluídos neste estudo 41 casos, com média de idade de 28 anos, e 76 controles (mulheres grávidas, sem histórico de TEV ou TEP), com média de idade de 30 anos, ambos dos mesmos hospitais. Nas mulheres caucasianas, foi observada uma diferença significativa entre OR do genótipo II (8,8) e do ID (8,2), quando comparados com o do genótipo DD ($p<0,05$). Nas mulheres afro-americanas, porém, essa diferença não foi significativa. Com esses resultados, os autores mostram uma associação entre o genótipo II e ID com TEV associada à gravidez em mulheres caucasianas, mas não em mulheres afro-americanas (22).

Um estudo realizado por Wang e colaboradores, em 2002, avaliou a relação entre o polimorfismo I/D do gene t-PA e/ou os níveis de t-PA plasmático com hipertensão em pacientes chineses, incluindo 126 casos e 102 controles. A análise da distribuição dos genótipos do gene t-PA nos pacientes hipertensos e controles mostrou ser similar, não havendo uma diferença estatística significativa da frequência dos alelos entre os grupos caso e controle. Os autores concluíram que neste estudo não houve associação entre os genótipos do t-PA nem dos níveis de t-PA plasmático com risco de hipertensão (23).

Em 2005, Oguzulgen e colaboradores pesquisaram a relação do polimorfismo I/D do gene t-PA em um grupo de indivíduos na Turquia. Esse estudo foi desenvolvido com 93 pacientes com TEV documentada e 146 controles sem histórico de TEV. Os resultados obtidos não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre as frequências do alelo I e dos genótipos nos grupos caso e controle (24).

Os dados da literatura relatados acima mostram que a relação entre o polimorfismo I/D do gene t-PA com doenças associadas ao sistema cardiovascular, como infarto do miocárdio e trombose venosa, ainda é controverso. Além disso, não foram encontrados relatos na literatura científica de estudos realizados no Brasil relacionando este polimorfismo com TEV.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Esse estudo teve por objetivo pesquisar a relação entre o polimorfismo de inserção/deleção (I/D) do gene t-PA e trombose venosa (TV), comparando um grupo de indivíduos com episódio de TEP (tromboembolismo pulmonar) ou TVP (trombose venosa profunda) e um grupo de indivíduos sem história de TV.

Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos genótipos DD, ID e II nos grupos estudados.
- Determinar a frequência dos alelos I e D em indivíduos com episódio de trombose venosa (grupo caso) e em indivíduos sem histórico de trombose venosa (grupo controle).
- Verificar se existe relação entre o polimorfismo I/D do gene t-PA e trombose venosa nos grupos de indivíduos estudados.

ARTIGO CIENTÍFICO

“Tissue Plasminogen Activator Gene I/D Polymorphism in patients with venous thromboembolism from the south of Brazil”

A ser submetido ao periódico *Blood coagulation & fibrinolysis* (Revista Qualis A - Área CB1 da CAPES - Fator de Impacto 1.370) (orientações para os autores em anexo).

Original Article

Full Title:

“Tissue Plasminogen Activator Gene I/D Polymorphism in patients with venous thromboembolism from the south of Brazil”

Short Title:

“Tissue plasminogen activator (t-PA) and VTE in the south of Brazil”

Authors:

Fais H Abdalla^{1,2}, Terezinha P Munhoz^{2,3}, Virgínia M Schmitt^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), ²Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), ³Faculdade de Farmácia; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Virgínia Minghelli Schmitt
Av. Ipiranga, 6681, 2º andar
Instituto de Pesquisas Biomédicas - PUCRS
Laboratório de Biologia Molecular
90610-000 - Porto Alegre - Brazil

Abstract

Introduction: The formation of fibrin clot in the site of the endothelial lesion constitutes a crucial process for the maintenance of the vascular integrity. However, the mechanisms of the hemostatic system should be regulated, simultaneously, to oppose the excessive loss of blood and to avoid formation of intravascular thrombus, due to excessive formation of fibrin. Therefore, a balance between the coagulation and the fibrinolysis is essential. The tissue plasminogen activator (t-PA) is the main activator of the fibrinolytic system derived from endothelial cells, playing important role in the fibrinolysis. In the last years, the I/D polymorphism (insertion or deletion of an *Alu* sequence) of the t-PA gene has been studied as a potential risk factor for developing cardiovascular diseases, as myocardial infarction and venous thrombosis, in different populations of the world.

Objective: This study investigate the relationship between the insertion/deletion polymorphism of the t-PA gene and venous thrombosis (VT), comparing a group of individuals with episode of pulmonary thromboembolism (PTE) or deep venous thrombosis (DVT) and a group of individuals with no history of VT.

Material and methods: Case group was composed of 89 individuals with episode of venous thromboembolism and control group represented 81 individuals with no history of thromboembolic disease. The t-PA genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR). All samples identified as DD genotype were retested for confirmation by means of a PCR using an internal primer that recognizes and hybridizes specifically with the inserted sequence, assuring an accurate genotype identification.

Results: The frequency of D allele among patients was 41.6% and controls, 46.9%; for I allele, frequency was 58.4% and 53.1%, respectively. The DD genotype was found in 14.6% of patients and 17.3% of controls, and the ID genotype, in 53.9% of the cases and 59.3% of the controls. The II homozygote represented 31.5% individuals in the case group and 23.4% individuals in the control group.

Discussions and Conclusions: No statistically significant difference was observed among genotypes frequency of t-PA gene in individuals of study groups. However, the II

genotype was more frequent in the case group than in the control group, suggesting a tendency of association between the II genotype of t-PA gene and the development of thromboembolic diseases. As no data was found in the literature on the frequency of the I/D polymorphism of t-PA gene in the Brazilian population, we consider this report as the first study involving the frequency of this polymorphism in groups of individuals with and without thrombosis historical event in Brazil, contributing to the knowledge of the relationship between this polymorphism and VTE in our country.

Keywords: Venous thrombosis; tissue plasminogen activator; polymorphism; *Alu* repeat.

1 Introduction

Venous thromboembolism (VTE) is a common vascular disease with an estimated annual incidence of 1-2 in 1000 individuals every year, in the USA [1]. The two major clinical manifestations are deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), which is usually considered to be a complication of DVT. The pathogenesis of VTE is complex and is associated to inherited and acquired predisposing factors such as advanced age, prolonged immobilization, surgery, malignancies, antiphospholipid syndrome, oral contraception and hormone replacement therapy [2, 3].

Clinical and epidemiological studies have established that VTE may occur as a result of several interacting factors. Environmental factors cause hypercoagulability of the blood or deficiency of fibrinolysis. Tissue plasminogen activator (t-PA) is a proteinase activator of plasminogen and the main activator of the fibrinolytic system. It has been shown that impaired fibrinolysis caused by decreased function of t-PA might be a risk factor for thrombosis [4]. A decrease of the fibrinolytic potential, due to a decrease of t-PA activity or to an increase in PAI-I, has been associated with both arterial and venous thrombosis. Also, increased t-PA antigen levels were correlated with thrombotic events in coronary, cerebral and peripheral arteries [5]. Increased plasma t-PA levels have been associated with increased risk of coronary thrombotic disease [6,7].

Ludwig et al, in 1992, have described an *Alu* insertion/deletion (I/D) polymorphism in the exon 8 of the t-PA gene, which has been associated with an increased risk for myocardial infarction (MI) and venous thromboembolism (VTE) [8, 9]. In recent years a number of reports have been published investigating the relation between t-PA, its genetic polymorphisms and arterial or venous thrombosis in different populations.

The aim of this case-control study was to determine allele and genotype frequencies of the t-PA gene I/D polymorphism in patients with VTE and individuals with no VTE history, investigating its association with venous thromboembolism, in a population from the south of Brazil.

2 Population and Methods

2.1 Population

This case-control study included 89 patients and 81 controls recruited from 2001 through 2003. Case group were patients attending the Cardiovascular Surgery or Hematology Ambulatory and from the Coronarian Treatment Unit at Hospital Sao Lucas of Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul - PUCRS (Porto Alegre, Brazil). Controls were recruited among participants of a cohort study conducted by the Institute of Geriatrics and Gerontology, PUCRS, with no history of thromboembolic event. Subjects reporting surgery in the past year, malignant disorder or antiphospholipid syndrome were not eligible for the study.

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Research of Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul - PUCRS and a written informed consent was obtained from all subjects.

2.2 Specimen Collection and Genotype Analysis

Peripheral blood was collected into EDTA-containing tubes. Genomic DNA was extracted with GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham Biosciences, EUA) according to the manufacturer's protocol and was stored at -20°C. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) and products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose (Invitrogen) gel with 5ug/mL ethidium bromide (Invitrogen) , under UV light (Transilluminator, BioRad).

For PCR, about 1µg of genomic DNA was used in a total reaction volume of 25µL containing 1.5U *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, Brazil), 100µM dNTP mix (Invitrogen), 2,5mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl pH8.4, 50mM KCl, 1% DMSO (Sigma-Aldrich), 50pmol of each primer (forward PAF: 5'-GTA AGA GTT CCG TAA CAG GAC AGC T-3'; reverse PAR: 5'-CCC CAC CCT AGG AGA ACT TCT CTT T-3') (IDT®).

PCR amplification was performed in 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 58°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds (MJ Research PT200). An initial denaturation at 95°C for 5 min and a final extension step at 72°C for 5 min were performed. For genotype confirmation, in samples identified as DD or having a faint band corresponding to the I allele (suggesting ID genotype), a PCR was performed using the reverse primer PAR and an internal forward primer PAP (5'-CAA AAA ATA GCC GGG CGT AGT GGC-3') (IDT®), which hybridizes within the insertion sequence. Reaction conditions were as described above. PCR amplified

products were: for I allele, 434bp; for D allele, 128bp; and for the confirmatory PCR, 234bp (Figure 1).

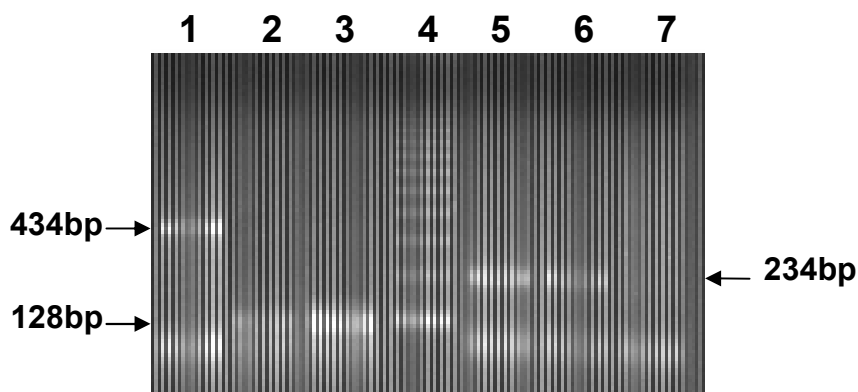


Figure 1: 1.5% agarose gel electrophoresis in TAE buffer. Lanes 1-3: PCR with primers PAF/PAR. Lanes 5-7: PCR with primers PAP/PAR. Lanes 1 and 5: genotype II. Lanes 2 and 6: genotype ID. Lanes 3 and 7: genotype DD. Lane 4: DNA Ladder 123bp (Life Technologies). Note that sample on lane 2 could have been misinterpreted as genotype II, if the PCR with the internal primer were not performed.

2.3 Statistical analysis

The allele and genotype frequencies were obtained by direct count. The genotype distribution and allele frequencies were compared using the chi-square test. Odds ratio was estimated with 95% confidence interval as a measure of risk. All statistic tests were two sided and P value ≤ 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 11.0.

3 Results

3.1 Characteristics of participants

Demographic, clinical and behavioral characteristics of participants are presented in Table 1. No significant differences were observed in mean age, gender or ethnics. Most individuals from case group (65.5%) presented a unique episode of VTE.

3.2 Allele and genotype distribution

Concerning the use of the internal primer for genotyping confirmation, 25 samples of case group and 43 of control group originally resulting homozygous DD or presenting a faint band for I allele were analyzed using the internal primer, which hybridizes only with the I allele. Among those, 12 (60%) of case group and 14 (33%) of control group confirmed DD genotype, all the others were retyped as heterozygous ID.

The overall frequency of the I allele in case group was 0.58 and 0.53 in the control group. The frequency of allele D was 0.42 and 0.47 in the case and control group, respectively. I allele frequency was slightly higher in the case group compared with control group, but with no statistical significance ($p>0.05$).

DD genotype was found in 13 (14.6%) individuals of case group and 14 (17.3%) of control group, ID genotype, in 48 (53.9%) cases and 48 (59.3%) controls, and II genotype, in 28 (31.5%) cases and 19 (23.4%) controls. The difference of II homozygosity frequency in patients and controls was not statistically significant ($p=0.244$) (Table 2).

Analysis of the Hardy-Weinberg equilibrium showed that both populations, case and control, are in equilibrium.

4 Discussion

In this study, the insertion and deletion polymorphism of the t-PA gene was evaluated as a risk factor for the development of venous thrombosis, involving 89 individuals with VTE (PTE or VT), corresponding to the case group, and 81, with no report of VTE history, representing the control group.

The relationship of the I/D polymorphism of the t-PA gene and VT has been investigated by some research groups, which results do not define the role of this polymorphism in the development of VT (Table 3).

Van der Bom et al, in 1997, investigated the relationship of the I/D polymorphism of t-PA gene, t-PA plasma concentrations and its activity with the prevalence of MI. This study involved 121 patients with history of MI and 250 controls without previous history of cardiovascular disease, all participants from the Rotterdam Study. The DD genotype frequency for the case group was 11.6% and for the control group, 19.2%. These frequencies are similar to those found in our study, with DD homozygous frequency of 14.6% for the case group and 17.3% for the control group. The heterozygous frequency

in control group reported by Van der Bom was 50.8%, which was the most different from our study (59.3%). Regarding the I and D allele frequencies demonstrated in the referred study, the case group presented a higher frequency of the I allele, profile also observed in our study: respectively, 64.5% and 58.4% for the I allele, and 35.5% and 41.6% for the D allele. Considering that the Rotterdam Study was accomplished with Caucasian individuals, this similarity among results is important, once in our population the vast majority of individuals (80%) were Caucasians [10].

In the study of Hooper et al, developed with an Afro-American population in 2000, the t-PA I/D genotype distribution and the D allele frequency were evaluated in a group of patients with MI and a group with VTE. The authors observed a statistically higher odds ratio (OR) for VTE patients with DD genotype than those with ID genotype, when compared to the II genotype. The prevalence of D allele among patients with reported history of VTE was 65.0% and among controls, 56.0%. The difference of D allele prevalence for patients with VTE was significant when compared to controls ($p=0.045$). The authors observed a significant association among the D allele of the I/D polymorphism of the t-PA gene and VTE [11].

In 2001, Hooper et al, studied the I/D polymorphism of the t-PA gene in a group of pregnant women with history of VTE and/or pulmonary thromboembolism (PTE). The frequency of ID heterozygous was 55.55%, very similar to our study (53.9%). These authors also report allele frequencies identical to those found in the control population of our study (53.1% for the I allele; 46.9% for the D allele). This similarity in the results was interesting, once both studies were conducted with individuals predominantly Caucasian and with episode of venous thromboembolism, however in our study no pregnant woman was included [12].

Oguzulgen et al, in 2005, in a study developed with a Turkish population, found no statistically significant relationship of the I/D polymorphism of the t-PA gene and the risk of developing VTE in the study population. These authors suggest that the different genotype and allele frequencies observed among several studies concerning this matter could be due to ethnic and racial factors. Among all these reports from the literature, the frequencies of II genotype reported by Oguzulgen et al are the most similar to those found in our study, either for the case or the control group. This data is interesting, as the population of our study is mainly Caucasian and possibly with no Turkish background in such a level that could explain this similarity in genetic frequencies [13].

The results presented here for t-PA I/D genotypes are in agreement with frequencies reported in some studies conducted in other countries, however different from others. In the present study, besides traditional PCR, using direct and reverse primers which hybridize with sequences present in both I and D allelic variants, a specific PCR for confirmation of the DD or ID genotype was performed, using an internal primer that hybridizes with the *Alu* sequence present exclusively in the I allelic variant. This strategy was based on the publication of Ueda et al on I/D polymorphism of the ACE gene, where the authors demonstrate that the use of an internal primer avoids misgenotyping in the presence of I allele [14]. The use of an internal primer in our study may have contributed for the higher ID genotype frequency detected for individuals with no history of thrombosis, when comparing with most of the studies found in the literature.

Jern et al observed an association between t-PA release and the *Alu* polymorphism at the t-PA locus in healthy subjects [15]. Wolf and collaborators, considering that this *Alu* polymorphism is neutral (ie, unlikely to be the causal variant by itself), screened the t-PA gene for putative functional variants. By resequencing the promoter, the 3' untranslated region (3'-UTR), and all coding regions of the t-PA gene, the research group identified 8 novel single-nucleotide polymorphisms (SNPs) [16]. Three of these were associated with t-PA release: -7351C>T, 20,099T>C, and 27,445T>A. The coding 20,099T>C SNP is synonymous and the intronic 27,445T>A SNP is not located in a splice site. The authors state that the t-PA -7351C>T variant is a functional candidate, since it is located within an enhancer region. Reports show that t-PA -7351T allele carriers have an increased risk of myocardial infarction, and increased risk of ischemic stroke for the t-PA TT genotype [17,18]. Also, Asselbergs et al, investigating the epistatic effects of polymorphisms in genes from the renin-angiotensin, bradykinin and fibrinolytic systems on plasma t-PA and PAI-1 levels in a large population-based sample (n=2,527), found a borderline significant interaction between *PAI 4G5G* and *ACE I/D* on plasma t-PA and PAI-1 levels, supporting the idea that the interplay between the renin-angiotensin, bradykinin, and fibrinolytic systems might play an important role in t-PA and PAI-1 biology [19]. These observations show that interactions of the various systems controlling blood pressure and coagulation is a complex matter and the actual influence of t-PA gene polymorphisms in the development of diseases, including VTE, and its relation with t-PA concentration and activity still need further investigation.

Acknowledgements

We acknowledge the Hematology and Cardiovascular Surgery Departments and the Coronarian Treatment Unit of Hospital São Lucas (PUCRS). We also thank the staff and students of the Molecular Biology Laboratory (IPB-PUCRS) for their technical assistance. This work was partially supported by PUCRS.

References

- [1] Salzman EW, Hirsh J: The epidemiology, pathogenesis and natural history of venous thrombosis; in Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al. Eds.: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Philadelphia: JB Lippincott; 1994, pp1275-1296.
- [2] Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ: 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. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(3):1004-1008.
- [3] Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. Hum Genet. 2001;109:369-84.
- [4] Lane DA, Grant PJ. Role of haemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. Blood 2000;95:1517-1532.
- [5] Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, et al. Alu-repeat polymorphism in the t-PA gene, tPA levels and the risk of familial AMI. Fibrinolysis. 1996;10:13.
- [6] Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH. Endogenous tissue-type plasminogen and risk of myocardial infarction. Lancet. 1993;341:1165-1168.
- [7] Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JCW, for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Hemostatic factors and risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. N Engl J Med. 1995;332:635-641.
- [8] Ludwig M, Wihn K-D, Scheuning W-D, Olek K. Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (tPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event. Hum Genet. 1992;(88):388.

- [9] Ichiro Nakazawa, Toshiaki Nakajima, Tonoaki Ishigani, Satoshi Umemura, Mitsuru Eni. Linkage Disequilibrium and haplotype analysis among eight novel single-nucleotide polymorphisms in the human tissue type plasminogen activator (t-PA) gene. *J. Human Genet*,2001;46:367-371.
- [10] Van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, et al. Tissue plasminogen activator and the risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997;(95):2623.
- [11] Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A. The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000;99:223–230.
- [12] Hooper WC, El-Jamil M, Dilley A, et al. The relation between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy. *Thromb Res* 2001;102:33–37.
- [13] I. Kivilcim Oguzulgen. Numan Ekim, Ferda Oner Erkeköl. Buket Altinok, Nejat Akar. Is Tissue-Plasminogen Activator Gene Polymorphism a Risk Factor for Venous Thromboembolism in Every Population? *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2005;19(1),61–63.
- [14] Ueda S, Heeley RP, Lees KR, et al. Mistyping of the human angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: frequency, causes and possible methods to avoid errors in typing. *J Mol Endoc*. 1992;17:27-30.
- [15] Jern C, Ladenvall P, Wall U, Jern S. Gene polymorphism of tissue-type plasminogen activator (t-PA) is associated with forearm vascular release rate of tPA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:454-459.
- [16] Ladenvall P, Jern S, Wall U, Jern C. Identification of eight novel single-nucleotide polymorphisms at human tissue-type plasminogen activator (t-PA) locus:

associations with vascular release rate of t-PA in vivo. *Thromb Haemost.* 2000;84:150-155.

- [17] Ladenvall P, Johansson L, Jansson J-H, et al. Tissue-type plasminogen activator -7,351C>T enhancer polymorphism is associated with a first myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2002;87: 105-109.

- [18] Jannes J, Hamilton-Bruce MA, Pilotto L, et al. Tissue plasminogen activator -7351C/T enhancer polymorphism is a risk factor for lacunar stroke. *Stroke.* 2004;35:1090-1094.

- [19] Asselbergs FW, Williams SM, Hebert PR, Coffey CS, Hillege HL, Navis G, Vaughan DE, van Gilst WH, Moore JH. Epistatic effects of polymorphisms in genes from the renin-angiotensin, bradykinin, and fibrinolytic systems on plasma t-PA and PAI-1 levels. *Genomics.* 2007 Mar;89(3):362-9.

Table 1: Characteristics of participants

	Case group	Control group	P
Mean age (years \pm SE)	51.71 (\pm 25.21)	51.71 (\pm 26.47)	0.801
Female (%)	56.5	61.6	0.479
Caucasian (%)	92.3	91.9	0.076
VTE unique episode (%)	65.5	---	---

VTE: Venous Thromboembolism; SE:

Table 2: t-PA genotype distribution and allele frequency in VTE patients and controls

		VTE patients	Controls	P*
		n (%)	n (%)	
t-PA genotype	DD	13 (14.6)	14 (17.3)	0.633
	ID	48 (53.9)	48 (59.3)	
	II	28 (31.5)	19 (23.4)	0.244
	Total	89 (100.0)	81 (100.0)	
Allele frequency	I	0,58	0,53	
	D	0,42	0,47	

* Statistically significant when $P \leq 0.05$

t-PA: tissue plasminogen activator; D: Deletion allele; I: Insertion allele; VTE: Venous Thromboembolism

Table 3: Studies from the literature reporting t-PA I/D polymorphism genotype and allele frequencies in individuals with VTE

Source and country	Sample size		t-PA genotype n (%)						Allele frequency			
			DD		ID		II		D		I	
			VT	healthy	VT	healthy	VT	healthy	VT	healthy	VT	healthy
van der Bom JG et al Netherlands 1997	121	250	14 (11.6)	48 (19.2)	58 (47.9)	127 (50.8)	49 (40.5)	75 (30.0)	0.36	0.45	0.64	0.55
Hooper WC et al US African Americans 2000	91	185	37 (41.0)	61 (33.0)	45 (49.0)	87 (47.0)	9 (10)	37 (20.0)	0.65	56.0	0.35	0.44
Hooper WC et al US Caucasian women 2001	41	76	1 (3.7)	12 (24.5)	15 (55.6)	22 (44.9)	11 (40.7)	15 (30.6)	0.31	0.47	0.69	0.53
Oguzulgen IK et al Turkey 2005	93	146	36 (38.7)	55 (37.7)	32 (34.4)	52 (35.6)	25 (26.9)	39 (26.7)	0.56	0.55	0.44	0.45
Our results	89	81	13 (14.6)	14 (17.3)	48 (53.9)	48 (59.3)	28 (31.5)	19 (23.4)	0.42	0.47	0.58	0.53

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabemos que o t-PA por ser o principal ativador do plasminogênio para a proteína fibrinolítica, a plasmina, exerce uma fundamental importância no controle da hemostasia. Desta forma, sendo capaz então de remover a fibrina e transformando-a em seus produtos de degradação evitando seu acúmulo na luz endotelial, podendo causar doenças tromboembólicas.

Tromboembolismo venoso é uma alteração que possui caráter multifatorial, como fatores de risco genético e adquirido, portanto estes estudos polimórficos são de grande valor científico, uma vez que este polimorfismo pode ser mais um fator de risco para o desenvolvimento de trombose venosa.

A relação entre o polimorfismo de inserção e deleção de uma repetição *Alu* do gene t-PA e o risco de desenvolver doenças tromboembólicas ainda é controverso. Foram encontrados na literatura apenas 4 estudos sobre este polimorfismo em casos de TV (Table 4, do artigo), sendo que os resultados dos estudos encontrados e populações apresentam diferenças nas distribuições dos genótipos e na frequência alélica. Essas diferenças podem ser decorrentes de vários fatores inerentes às populações, como diferenças étnicas dos grupos estudados, ou mesmo metodológicas, como o uso do primer interno que hibridiza na seqüência de inserção do polimorfismo do gene t-PA em nosso estudo.

As características étnicas dos grupos estudados realmente pode ser um fator importante nas divergências obtidas nos estudos do polimorfismo I/D do gene t-PA, porém ainda não confirmado, pois como foi relatado existem raras referências na literatura científica a respeito desse polimorfismo, e na sua grande maioria simplesmente sugerem essa possibilidade.

A utilização do primer interno para confirmação dos genótipos DD ou ID em nosso estudo foi inspirada no estudo de Ueda et al (1992) que buscava a prevalência genotípica do polimorfismo de inserção/deleção de seqüências *Alu* no gene da enzima conversora de angiotensina (ECA). Durante o período de padronização da PCR com os primers direto e reverso, foram visualizadas bandas muito fracas para o alelo I em algumas das amostras testadas, porém bandas intensas para o alelo D. Isto poderia sugerir uma amplificação preferencial do alelo D, cujo amplicon é de 128pb, enquanto o do alelo I é de 434pb. Assim, indivíduos heterozigotos poderiam estar sendo

genotipados como homozigotos DD, levando a uma interpretação equivocada do papel dos genótipos no risco para trombose venosa. Após a realização da PCR utilizando o primer interno, ficou evidenciado que alguns indivíduos inicialmente classificados como DD eram na realidade heterozigotos, mostrando a importância da utilização desta nova metodologia para a correta identificação dos genótipos. O uso desta PCR com primer interno poderia ser um dos motivos das divergências nas frequências das variantes polimórficas do t-PA observadas no nosso estudo em relação aos resultados encontrados por outros autores.

O presente estudo foi considerado o primeiro trabalho envolvendo o polimorfismo I/D de repetições *Alu* do gene t-PA na população brasileira, uma vez que não foram localizados estudos semelhantes na literatura. Os indivíduos envolvidos nesta pesquisa eram predominantemente caucasianos, o que explica, em parte, as semelhanças encontradas com alguns estudos, onde a população envolvida, apesar de não ser brasileira, era predominantemente caucasiana. Outros estudos, porém, apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo, apesar de realizados com grupos de origem étnica diferente, como afro-americanos. Estes dados vão ao encontro do estado de conhecimento atual, que mostra existir ainda um papel controverso do polimorfismo I/D do gene t-PA como fator de risco para o desenvolvimento de trombose venosa, e a influência da origem étnica das populações estudadas.

CONCLUSÕES

A prevalência dos genótipos do t-PA entre os pacientes foi de 14,6% de homozigotos DD, 53,9% de heterozigotos ID e 31,5% de homozigoto II, e entre os controles foi de 17,3% de homozigotos DD, 59,3% de heterozigotos e 23,4% de homozigotos II.

A frequência do alelo D foi 0,42 entre os pacientes e 0,47 entre os controles, e do alelo I foi 0,58 nos pacientes e 0,53 nos controles.

A prevalência do genótipo II mostrou uma tendência de associação com o desenvolvimento de tromboembolismo venoso, porém essa associação não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$), provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra.

REFERÊNCIAS

1. Robetorye R, Rodgers GM. Update on Selected Inherited Venous Thrombotic Disorders. *Am J Hematol* 2001; 68:256-268.
2. Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, 2001 jul/dez;(34):229-237.
3. Press, RD, DeLoughery TG. Thrombotic Risk Assessment. Molecular and Conventional Testing for a Common, Treatable Genetic Disease. *Clin Lab* 2000; 1:8-12.
4. Genoud V, Castanon M, Annichino-Bizzachi J, et al. Prevalence of Three Prothrombotic Polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T in Argentina. *Thromb Res* 2000;100:238-31.
5. Sandra J. Friezner Degeng, Bhanu Rajput, and E. Reich. The Human Tissue Plasminogen Activator Gene. *The Journal of Biological Chem.* 1986 May 25;261;(15):6972-6985.
6. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, et al. Alu-repeat polymorphism in the t-PA gene, t-PA levels and the risk of familial AMI. *Fibrinolysis*. 1996;10:13.
7. Ludwig M, Wihn K-D, Scheuning W-D, Olek K. Alleleic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event. *Hum Genet.* 1992;(88):388.
8. Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J & Marder VJ. Overview of hemostasis. In: Colman RW; Hirsh J; Marder VJ; Clowes AW & George JN, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001,3- 16.

9. Jenny NS & Mann KG. Coagulation cascade: an overview. In: Loscalzo J & Schafer AI, eds. Thrombosis and hemorrhage, 2nd ed, Williams & Wilkins, Baltimore, 1998,3-27.
10. Drake TA. Morrissey JH & Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol 1989; (134):1087-1097.
11. Van Deventer SJH. Buller HR. Ten Cate JW. Aarden LA. Hack CE & Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic and complement pathways. Blood 1990; (76):2520-2527.
12. Franco RF. de Jonge E. Dekkers PEP. Timmerman JJ. Spek CA. Van Deventer SJH. et al. The in vivo kinetics of tissue factor mRNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. Blood 2000; (96): 554-559.
13. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. Thromb Haemost 1999; (82):259-270.
14. Hirsh J, Crowther MA. Venous thromboembolism. In: Hoffmann R. editor. Basic principles and practice. 2 nd ed. Churchill Livingstone. Philadelphia, PA 2000; p.2074-2089.
15. Salzman EW, Hirsh J. The epidemiology, pathogenesis and natural history of venous thrombosis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al editors. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p.1275-1296.
16. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. Lancet 1999; 353:1167-1173.

17. Hwu HR, Roberts JW, Davidson EH, Britten RJ (1986) Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3875-3897.
18. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1004.
19. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 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* 1996;88:3698-3703.
20. Van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, et al. Tissue plasminogen activator and the risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997;(95):2623.
21. Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A, Wenger NK, et al. The Role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G Polymorphisms in African-American Adults With a Diagnosis of Myocardial Infarction or Venous Thromboembolism. *Thrombosis Research* 2000(99):223–230.
22. Hooper WC, El-Jamil M, Dilley A, et al. The relation between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy. *Thromb Res* 2001;102:33–37.
23. Wang B, Zhou X, Dang A, Liu G, He R. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator and the risk of hypertension in a Chinese Han population. *Hypertension Research: Official Journal Of The Japanese Society Of Hypertension*. 2002 November;25(6):949-953.

24. Oguzulgen IK. Ekim N. Erkekol FO. Altinok B. Akar N. Is Tissue-Plasminogen Activator Gene Polymorphism a Risk Factor for Venous Thromboembolism in Every Population? *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2005;19(1),61–63.

ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto guarda-chuva original

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Justificativa para não apresentação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico do projeto “Polimorfismo I/D do Ativador de Plasminogênio Tecidual e Risco de Trombose Venosa”

O presente projeto de mestrado será desenvolvido dentro de uma linha de pesquisa sobre polimorfismos genéticos que representam risco para trombose venosa. O projeto que deu início a esta linha de pesquisa intitulava-se “Estudo do Fator VIII, Fator V de Leiden e Protrombina Mutante em Pacientes com Eventos Trombóticos”, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, protocolo nº 01/897. Os indivíduos que aceitaram participar no referido estudo, tanto pacientes quanto controles, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que se encontra em anexo. Neste termo de consentimento, os participantes da pesquisa foram informados que o objetivo do projeto era identificar alterações genéticas no seu sangue e analisá-las como fatores de risco para a trombose venosa. Muitos pacientes estavam internados na UTC do HSL, e vieram a falecer. Outros tiveram alta e não mais compareceram ao hospital para acompanhamento clínico. Os indivíduos do grupo controle foram selecionados entre moradores do Município de Gravataí que participavam do Projeto Gênese, e atualmente o acesso a estes indivíduos não seria possível, por motivos independentes da nossa vontade. Os DNAs extraídos do sangue periférico de pacientes e controles participantes da pesquisa “Estudo do Fator VIII, Fator V de Leiden e Protrombina Mutante em Pacientes com Eventos Trombóticos” encontram-se depositados no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob a responsabilidade da Dra. Virgínia Minghelli Schmitt, coordenadora do Laboratório, atendendo aos requisitos considerados adequados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP - PUCRS) constantes na “Proposta de Normas e Diretrizes para a Institucionalização e Utilização de Dados e Amostras de Bancos de Material Biológico Humano em Projetos de Pesquisa” (BioBanco-PUCRS).

Desde a realização do projeto inicial, buscando polimorfismos genéticos associados a risco trombótico (iniciado em 2001), diversas pesquisas sugeriram que outros polimorfismos genéticos, como o C677T da metilenotetraidrofolato redutase e o C5178A mitocondrial, poderiam também influenciar no risco de trombose venosa. Um projeto anterior de mestrado analisou o polimorfismo C677T da metilenotetraidrofolato redutase na população previamente analisada para Fator VIII, Fator V de Leiden e Protrombina Mutante, utilizando os DNAs depositados no Laboratório de Biologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Estudo do Fator VIII e das Mutações do Fator V Leiden e da Protrombina em Eventos Trombóticos

A trombose é uma doença com influência genética. Algumas alterações genéticas já são conhecidas, e podem ser identificadas no laboratório. Este trabalho tem como objetivo identificar estas alterações e associá-las como fatores de risco para esta doença.

Para este estudo, vamos usar uma amostra de sangue, coletado nos procedimentos de rotina em pacientes com trombose. É importante ressaltar que este protocolo não modifica a rotina do tratamento e dos exames normais. Os resultados do estudo poderão determinar um diagnóstico mais precoce da doença e inclusive na sua prevenção. O senhor (a)

Eu,....., fui informado dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Desta forma, assino este termo de concordância para o projeto acima citado, de livre e espontânea vontade. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Também responderei a um questionário oralmente, por livre e espontânea vontade. O meu prontuário poderá ser estudado pelo investigador. Isto não acarretará qualquer ônus referente ao meu tratamento.

Os dados serão utilizados somente para objetivo de investigação, ficando assegurados seu sigilo e anonimato.

Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome do Paciente:

Assinatura:

Endereço:

Telefone:

Porto Alegre, ____/____/____.

Este formulário foi lido para

Em enquanto eu estava presente.

Testemunha:

Assinatura:

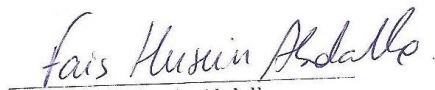
Responsável pela investigação: Dra. Terezinha Paz Munhoz

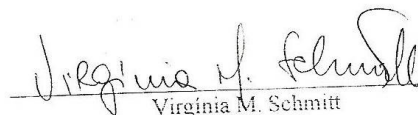
Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Este projeto se propõe a analisar o polimorfismo I/D do ativador de plasminogênio tecidual neste mesmo grupo de pacientes e controles, uma vez que publicações recentes sugerem um possível papel deste polimorfismo no aumento do risco para trombose venosa. A análise deste polimorfismo, como o da metilenotetraidrofolato redutase, não estava prevista inicialmente, mas baseado nos dados da literatura, consideramos importante a realização deste estudo, pois fornecerá dados adicionais para a análise de risco genético. A análise conjunta de todos os polimorfismos estudados poderia ser mais esclarecedora sobre os fatores de risco significativos para trombose venosa, permitindo uma prevenção adequada. Por exemplo, uma mulher portadora dos polimorfismos de risco, seria desaconselhada a fazer uso de contraceptivo oral, ou, ainda, um paciente com episódio de trombose portador dos polimorfismos de risco seria submetido a tratamento com anticoagulante com o intuito de prevenir recorrência.

Os procedimentos previstos no projeto de pesquisa "Polimorfismo I/D do Ativador de Plasminogênio Tecidual e Risco de Trombose Venosa" observam os quesitos da Resolução nº 340 do Conselho Nacional de Saúde, de 8 de julho de 2004, a qual define diretrizes para a análise ética e tramitação dos projetos de pesquisa da área temática especial da genética humana, como complementação às Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde).

Através deste documento, nos comprometemos a garantir a privacidade e anonimato dos indivíduos que participam da pesquisa, bem como a preservar a integridade destes indivíduos. Declaramos, também, que as amostras de material biológico utilizadas não serão remetidas para análises externas ao Laboratório de Biologia Molecular do IPB-PUCRS.

Porto Alegre, 21 de março de 2006


Fais Husein Abdalla
Mestrando


Virginia M. Schmitt
Orientadora

Anexo 2: Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências

PUCRS
BIO
CIÊNCIAS

CC-FaBio

Porto Alegre, 15 de maio de 2006.

Senhor Coordenador

A Comissão Científica da Faculdade de Biociências acata a decisão do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular em relação ao projeto de pesquisa intitulado "*Polimorfismo I/D do ativador de plasminogênio tecidual e risco de trombose venosa*", protocolado sob o número 0017/2006, que obteve o seguinte parecer:

(x) APROVADO

Atenciosamente,


Prof. Dr. Anamaria Feljó
Presidente
Comissão Científica-FaBio

Ao Senhor
Prof Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS
Nesta Universidade

Anexo 3: Orientações para os autores da Revista

Blood Coagulation and Fibrinolysis

Online Submission and Review System

Author Resources

[Instructions for Authors \(this page\)](#)

[Copyright Transfer \(PDF\)](#)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

Guidance for Authors on the Preparation and Submission of Manuscripts to Blood Coagulation and Fibrinolysis

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors. For further details, authors should consult the following article: International Committee of Medical Journal Editors. "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" *N Engl J Med* 1997;336:309–315. The complete document appears at <http://www.icmje.org/>.

Full details concerning many of the points below, including standard forms, are provided in the guidelines on the journal's web site (<http://www.bloodcoagulation.com/>).

Scope

Blood Coagulation and Fibrinolysis is an international fully refereed journal that features review and original research articles on all clinical, laboratory and experimental aspects of haemostasis and thrombosis. The journal is devoted to publishing significant developments worldwide in the field of blood coagulation, fibrinolysis, thrombosis, platelets and the kininogen-kinin system, as well as dealing with those aspects of blood rheology relevant to haemostasis and the effects of drugs on haemostatic components. The journal publishes mutation reports detailing the mutated gene and giving a brief clinical history of the propositus. The journal also publishes correspondence, technical reports, mutation reports and reviews of books, software and new products. The emphasis is on speed of publication. The journal will normally publish within ten weeks of acceptance of manuscripts.

Points to consider before submission

We have prepared a standard covering letter (available from the journal website) to accompany your submission. Whether you use this letter or your own wording, please think carefully about the following points and make the appropriate declarations.

Redundant or duplicate publication

We ask you to confirm that your paper has not been published in its current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site), that it has not been accepted for publication elsewhere, and that it is not under consideration by another publication. The International Committee of Medical Journal Editors has provided details of what is and what is not duplicate or redundant publication (<http://www.icmje.org>). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals. In your covering letter to the editors, draw attention to any published work that concerns the same patients or subjects as the present paper.

Conflicts of interest

We ask authors to state all possible conflicts of interest, including financial and other relationships. If you are sure that there is no conflict of interest, please state this. You might like to look at an editorial in the British Medical Journal on Beyond conflict of interest (<http://bmj.com/cgi/content/short/317/7154/291>). Remember that sources of funding should be acknowledged in your paper.

Permissions to reproduce previously published material

Authors should include with their submission copies of written permission to reproduce material published elsewhere (such as illustrations) from the copyright holder. Authors are responsible for paying any fees to reproduce material.

Patient consent forms

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying details (written or photographic) should be omitted if they are not essential, but patient data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity. Complete anonymity is difficult to achieve, and a consent form should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

Ethics committee approval

All authors must sign a declaration that the research was conducted within the guidelines below and under the terms of all relevant local legislation. (Such a statement is included in the model submission letter on the journal's web site.) The Editors reserve the right to judge the appropriateness of the use and treatment of humans or animals in experiments for publication in the journal.

Human experiments: All work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>). Papers describing experimental work on human participants which carries a risk of harm must include (1) a statement that the experiments were conducted with the understanding and the consent of each participant, and (2) a statement that the responsible ethical committee has approved the experiments.

Animal experiments: In papers describing experiments on living animals, include (1) a full description of any anaesthetic and surgical procedure used, and (2) evidence that all possible steps were taken to avoid animals' suffering at each stage of the experiment. In experiments involving the use of muscle relaxants, describe the precautions taken to ensure adequate anaesthesia (J Physiol 1990; 420:xii-xiii).

Experiments on isolated tissues: Indicate precisely how you obtained the donor tissue. The NIH guide for the care and use of laboratory animals (National Institutes of Health Publications No. 80-23, revised 1978) gives guidelines for the acquisition and care of animals.

Authorship

All authors must sign the letter accompanying their submission to confirm that they have read and approved the paper, that they have met the criteria for authorship as established by the International Committee of Medical Journal Editors, that they believe that the paper represents honest work, and that they are able to verify the validity of the results reported. You might also be interested to read the debate on authorship in general in the British Medical Journal's Authorship collection (<http://bmj.com/cgi/collection/authorship>). Many of the points covered above are discussed in the New England Journal of Medicine's collection of papers entitled 'Editorials on Journal Policy'

(<http://authors.nejm.org/Misc/Policies.asp>).

Copyright assignment

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Authors are asked to sign a copyright assignment form after acceptance of their papers. They may use material from their paper in other works published by them.

Submissions

Authors are strongly encouraged to submit their manuscripts through the web-based tracking system at <http://www.editorialmanager.com/bcf/>. Signed author forms may be included in the submission as a 'supporting document' or mailed to the journal office. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office, unless you are supplying artwork, letters or files that cannot be submitted electronically, or have been instructed to do so by the editorial office. Include the following where appropriate: subject consent forms; transfer of copyright form; permission to reproduce previously published material; checklist. For those authors who have no option but to submit by mail please send one copy of the article, plus an electronic version on disk or CD-ROM, to either editor dependent on your geographical location. Authors from Europe, Asia (apart from Japan), Africa and Australia should submit to: **Evgueni Saenko**, Ph.D., University of Maryland, School of Medicine Center for Vascular and Inflammatory Diseases Department of Biochemistry and Molecular Biology 800 W. Baltimore Street Baltimore, MD 21201, email: esaenko@som.umaryland.edu. Authors from North and South America and Japan should submit to: **Dr. Richard Marlar**, Coagulation Services and Clinical Pathology, Oklahoma City VA Medical Center, University of Oklahoma Health Sciences Center, Pathology and Lab Medicine #113, Oklahoma City VAMC, 921 N.E. 13th St., Oklahoma City, OK73104, USA. Tel: +1 405 270 0501 ext. 5261; Fax: +1 405 297 5922; email: thrombosis@ouhsc.edu

Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: title page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the title page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided. Submit the required number of paper copies and a disk and keep copies of everything submitted.

Authors are invited to list up to four potential reviewers, including their full addresses, telephone and fax numbers, and e-mail addresses.

Presentation of papers

Title Page

The title page should carry the full title of the paper and a short title, of no more than 45 characters and spaces, to be used as a 'running head' (and which should be so identified). The first name, middle initial and last name of each author should appear. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. Any disclaimers should appear on the title page, as should the name and address of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the title page should include the sources of any support for the work in the form of grants, equipment, drugs, or any combination of these.

Abstracts

The second page should carry a structured abstract of no more than 250 words. The abstract should state the Objective(s) of the study or investigation, basic Methods (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main Results (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal Conclusions. It should emphasise new and important aspects of the study or observations.

Key Words

The abstract should be followed by a list of 3 - 10 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results and Discussion (including a conclusion), although reviews may require a different format.

Acknowledgements

Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text. They should be assigned Arabic numerals, which should be given in brackets, e.g. [17]. References should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add et al. References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in the *Index Medicus* (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html).

Articles in journals

Standard journal article:

Agno W, Garcia D, Libby E, Crowther MA. Managing oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves undergoing elective surgery: results of a survey conducted among Italian physicians. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; **15**:623-628.

More than seven authors:

Kurose I, Miura S, Fukumura D, Suzuki M, Nagata H, Sekizuka E, et al. Attenuation effect of antithrombin III on the fibrinolytic activation and microvascular derangement in rat gastric mucosa. *Thromb Haemost* 1994; **71**:119-123.

Books

Book:

Giddings JC. *Molecular Genetics and Immuno-analysis in Blood Coagulation*. Chichester: Ellis Horwood, 1988.

Chapter in a book:

Chong BH, Magnani HN. Danaparoid for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A (editors). *Heparin-Induced Thrombocytopenia*, 2nd edn. New York: Marcel Dekker; 2001, pp. 323-348.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Tables

Each table should be typed on a separate sheet in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

Illustrations

References to figures and tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2). Most file formats are accepted, but TIFF and EPS files, with fonts embedded, are preferred. If scanned, line art should be at a resolution of 800 dpi, and halftones and colour at 300 dpi. All colour values should be CMYK. If hard copies are submitted they should have a label pasted to the back bearing the figure number, the title of the paper, the author's name and a mark indicating the top of the figure. Illustrations should be presented to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 166 mm. Photomicrographs must have internal scale markers. If photographs of people are used, their identities must be obscured or the picture must be accompanied by written consent to use the photograph. If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain. Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor. Colour illustrations are acceptable but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher).

Legends for illustrations

Captions should be typed in double spacing, beginning on a separate sheet of paper. Each one should have an Arabic numeral corresponding to the illustration to which it refers. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

Units of measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, or litre) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

All haematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Offprints

Offprints may be purchased using the appropriate form that will be made available with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be fulfilled.