

**Factores que influenciam o doseamento da Proteína S e  
consequente dificuldade de diagnóstico da Deficiência  
hereditária desta proteína**

**Factores que influenciam o doseamento da Proteína S e  
consequente dificuldade de diagnóstico da Deficiência  
hereditária desta proteína**

**ANA SOFIA VILELA NOGUEIRA**

Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto PORTUGAL

Dissertação realizada no âmbito da disciplina Dissertação / Projecto / Relatório de Estágio do Mestrado Integrado em Medicina

Orientador(a): Dra. Sara Maria Teixeira Simões Morais, Assistente Hospitalar Graduada do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto

Porto | Junho 2009

## **Resumo**

A proteína S é uma proteína plasmática, dependente da vitamina K, que funciona como inibidor fisiológico da coagulação, ao actuar como co-factor de activação da proteína C activada, inibindo os factores da coagulação Va e VIIIa.

A deficiência da PS pode ser hereditária ou adquirida e, predispõe a um estado de hipercoaguabilidade que aumenta o risco de doença tromboembólica.

A Deficiência hereditária de proteína S é das Trombofilias hereditárias de mais difícil diagnóstico pois diversas situações clínicas podem mimetizar esta patologia, pelo que o objectivo desta revisão é identificar os principais factores que afectam a concentração plasmática de proteína S e o seu modo de acção.

A idade e o sexo implicam oscilações na concentração de proteína S, estando definidos diferentes intervalos de referência consoante o sexo e idade.

A gravidez e puerpério estão associados à diminuição da concentração de proteína S, pelo que se deve evitar o seu doseamento durante esta fase.

O uso de contraceptivos orais combinados, terapia de reposição hormonal e fármacos antagonistas da vitamina K está associado a diminuição da concentração de proteína S por vezes, para níveis compatíveis com deficiência de proteína S.

Estados inflamatórios e infecciosos, tal como o Lupus eritematoso sistémico, a infecção por Varicela Zoster ou pelo vírus HIV, estão relacionados com a produção de anticorpos anti-proteína S assim como, com a diminuição dos valores de proteína S. Uma relação oposta ocorre entre os níveis de colesterol total e triglicéridos e a concentração de proteína S.

Assim, conclui-se que são diversas as situações que cursam com oscilação da concentração de proteína S e que é necessário a sua exclusão antes de se confirmar um diagnóstico de Deficiência hereditária de proteína S.

**Palavras-Chave:** Proteína S; Deficiência hereditária de proteína S, Contracepção oral combinada; Varicela; Anticorpos antifosfolípidos; Anticoagulação oral.

## **Introdução**

O termo Trombofilia refere-se a uma alteração da hemostase em que ocorre um desequilíbrio entre as proteínas procoagulantes e anticoagulantes, o que implica uma maior predisposição para a ocorrência de trombose. Essa tendência pode ser hereditária ou adquirida e, geralmente, nas Trombofilias hereditárias acarreta uma maior predisposição para tromboembolismo venoso do que arterial (Merriman e Greaves, 2006).

A proteína S é uma glicoproteína plasmática, dependente da vitamina K, que funciona como inibidor fisiológico da coagulação, ao actuar como co-factor de activação da proteína C activada, inibindo os factores da coagulação Va e VIIIa e como co-factor da via inibitória do factor tecidual (TFPI) inactivando o factor Xa e o factor tecidual (TF) /Factor VIIa (Castoldi e Hackeng, 2008).

A Deficiência de Proteína S é um tipo de Trombofilia que, tal como as restantes Trombofilias, pode ser hereditária ou adquirida e, predispõe a um estado de hipercoaguabilidade que aumenta o risco de doença tromboembólica (Kaba et al., 2003). A prevalência da Deficiência hereditária de proteína S não está, ainda, bem definida, estimando-se que ronde os 0,03%-0,13% na população geral e, 1-5% em indivíduos com antecedentes de trombose venosa (Guermazi e Conard, 2008).

A concentração plasmática de proteína S demonstra grande variabilidade intra e interindividual em relação a diversos factores nomeadamente, sexo, idade, estado hormonal, metabolismo lipídico, factores genéticos, uso de anticoagulantes orais, estados inflamatórios agudos e diversas patologias agudas ou crónicas, o que está associado a um sobre ou subdiagnóstico de deficiência hereditária de proteína S (Serra et al., 2002).

Neste contexto, deve procurar eliminar-se, sempre que possível, a interferência destes factores ou realizar um estudo familiar a fim de produzir um diagnóstico correcto da deficiência hereditária de proteína S.

## **Objectivo**

Pretende-se, com esta revisão bibliográfica, efectuar uma revisão sobre quais os principais factores que afectam os níveis de proteína S e seu modo de acção. Ao ter em conta a sua influência será possível realizar um diagnóstico mais sensível e específico da deficiência hereditária de proteína S.

## **Proteína S**

A Proteína S (PS) foi pela primeira vez isolada por Di Scipio, em 1979 (Serra et al., 2002).

A PS é uma glicoproteína plasmática, dependente da vitamina K, com diversas funções a nível da coagulação, inflamação e apoptose (Rezende et al., 2004 e Castoldi e Hackeng, 2008). Actua como anticoagulante natural através de duas vias de acção: como co-factor da proteína C activada (aPC) inactivando os factores Va e VIIIa e como co-factor para a via inibitória do factor tecidual (TFPI) inactivando os factores Xa e o factor tecidual (TF) /factor VIIa (Castoldi e Hackeng, 2008). Mais recentemente tem sido descrita uma acção inibitória directa sobre os factores Va, VIIIa e Xa (Guermazi e Conard, 2008).

Este inibidor da coagulação é essencialmente sintetizado nos hepatócitos, mas também nas células endoteliais, megacariócitos, células de Leydig, entre outros. A PS circula no plasma na concentração de 20-25mg L<sup>-1</sup>, sendo que 60% circula ligada a uma proteína do sistema complemento – C4bBP – e, apenas 40% circula na forma livre. A PS tem uma semi-vida plasmática de 40h (British Society of Haematology, 2001, Guermazi e Conard, 2008 e Ten Kate e Van der Meer, 2008).

A C4bBP é uma proteína de fase aguda, estando documentado o seu aumento no decorrer de estados inflamatórios agudos, o que vai alterar a proporção de PS livre e complexada (Kaba et al., 2003). Durante muitos anos acreditou-se que apenas a forma livre tinha acção como co-factor da aPC. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que ambas as formas de PS existentes em circulação têm actividade anticoagulante apesar, de a forma complexada ser, aparentemente, menos activa (Maurissen et al., 2008)

Tendo em conta que a PS actua como anticoagulante, quando se encontra em défice vai predispor a um estado de hipercoaguabilidade que predispõe à ocorrência de tromboembolismo venoso em idades precoces, abortamento e, em casos raros, trombose arterial, pelo que o estudo da PS faz parte das análises requeridas em indivíduos com suspeita de Trombofilia.

Os testes que estão, actualmente, disponíveis para o estudo da PS medem o antigénio plasmático total e livre da PS e a PS funcional. Em geral, a medição da concentração livre de PS é o teste preferido (Goodwin et al., 2002).

A quantificação da PS plasmática pode ser realizada por testes de Imunofluorescência e por testes funcionais. No entanto, é de salientar que existem diversas dificuldades metodológicas

relativamente ao doseamento da PS, o que continua a gerar muita incerteza quanto à quantificação desta complexa proteína (Goodwin et al., 2002).

Os testes funcionais baseiam-se na capacidade da PS para servir como co-factor para a aPC. Tipicamente, uma amostra pré-definida de aPC é adicionada à amostra plasmática que se pretende analisar. Após um período de incubação inicia-se o processo de coagulação. O prolongamento do tempo de coagulação é proporcional à actividade da PS (Kolde, 2004).

No entanto, alguns desses testes não são específicos para a PS. Como resultado, o seu uso pode levar a um diagnóstico erróneo de deficiência funcional de PS num paciente com outras causas de resistência à aPC. Uma estratégia para eliminar este problema consiste em realizar uma análise da resistência à aPC antes de proceder ao teste da PS funcional (Goodwin et al., 2002).

A especificidade dos testes da PS é alvo de muita discussão. O factor V Leiden, níveis elevados de factor VIII ou anticoagulante lúpico podem interferir. A comparação entre os diferentes testes é limitada. Obviamente, que a qualidade de plasma deficiente e da preparação de aPC, assim como a composição de fosfolípidos do reagente tem um grande impacto nos resultados (Kolde, 2004).

A medição mais fiável da PS total é por técnicas de Imunofluorescência (ELISA). Estes testes envolvem a diluição de amostras de plasma, o que favorece a dissociação da proteína S-C4bBP (Goodwin et al., 2002).

Os testes para a medição de PS livre baseiam-se na precipitação com polietilenoglicol (PEG) para remover a PS complexada com C4bBP. A PS é posteriormente medida por imunoensaio da fracção sobrenadante. Posteriormente, é possível medir a PS livre usando anticorpos monoclonais que eliminam o PEG (Goodwin et al., 2002).

A deficiência de PS pode ser hereditária ou adquirida devido a terapêutica com antagonistas da vitamina K, contraceptivos orais, gravidez, estados inflamatórios e diversas patologias agudas ou crónicas. (Castoldi e Hackeng, 2008).

Assim, quando se pretende realizar um diagnóstico de Deficiência hereditária de PS é importante excluir os factores que se sabe estar associados a deficiências adquiridas, de forma a efectuar um diagnóstico mais sensível e específico.

## **Deficiência Hereditária de proteína S**

Em 1984, foram publicados os primeiros casos clínicos de Deficiência de PS como factor de risco para tromboembolismo venoso (Gandrille et al., 2000).

A prevalência da Deficiência hereditária de PS na população geral permanece por esclarecer, provavelmente, devido à dificuldade de diagnóstico causada pela sua raridade, assim como à dificuldade de um correcto diagnóstico devido à influência de diferentes agentes (Ten Kate e Van der Meer, 2008). No entanto, estima-se que ronde os 0,03%-0,13% na população geral e, 1-5% em indivíduos com antecedentes de trombose venosa (Guermazi e Conard, 2008).

A Deficiência hereditária de PS é uma doença de transmissão autossómica dominante, que está associada a aumento do risco de tromboembolismo venoso e sua recorrência (Gandrille et al., 2000). O gene que codifica a PS é o PROS1 e o seu pseudogene transcripcional inactivo PROS2, que se localizam próximo do centrómero do cromossoma 3 (Ten Kate e Van der Meer, 2008). Sabe-se que a base genética da Deficiência de PS é muito heterogénea, visto que quase todas as famílias têm uma mutação genética diferente. Actualmente, estão identificadas mais de 200 mutações do gene PROS1 em pacientes com Deficiência de PS (Castoldi e Hackeng, 2008).

A Deficiência de PS quando presente em homozigotia está frequentemente associada a um fenótipo clinicamente severo conhecido como púrpura fulminante, que se caracteriza pela ocorrência de extensas tromboses na microcirculação, pouco tempo após o nascimento (Franco e Reitsma, 2001). No entanto, na maioria dos indivíduos a Deficiência de PS encontra-se em heterozigotia. Contudo, ocorre frequentemente penetrância incompleta ou variável (Guermazi e Conard, 2008 e Ten Kate e Van der Meer, 2008).

Actualmente, são reconhecidos três tipos de Deficiência de PS:

- Tipo I – ocorre diminuição dos valores de PS livre e total;
- Tipo II – os valores de PS livre e total encontram-se dentro do intervalo normal, ocorrendo uma diminuição da sua actividade;
- Tipo III – ocorre diminuição da PS livre, com valores normais de PS total (Lijfering et al., 2009).

Aproximadamente 95% dos indivíduos com deficiência de PS possui uma deficiência quantitativa (tipo I ou tipo III) e, os restantes 5% têm uma deficiência qualitativa (tipo II).

O tipo I e o tipo III surgem frequentemente na mesma família (deficiência tipo I/tipo III) o que revela tratar-se, aparentemente, de uma variação fenotípica da mesma alteração genética e, a sua expressão fenotípica depende da idade do indivíduo e/ou do número de alelos mutados (Castoldi e Hackeng, 2008). Enquanto a deficiência tipo I constitui um factor de risco inegável para trombose venosa, relativamente à deficiência isolada tipo III existe alguma controvérsia (Lijfering et al., 2009).

A deficiência tipo II é extremamente rara, embora a sua prevalência possa estar subestimada pois nem todos os laboratórios avaliam rotineiramente a actividade da PS (Castoldi e Hackeng, 2008).

Clinicamente, a Deficiência de PS caracteriza-se pela ocorrência de Trombose venosa profunda (TVP), Tromboembolismo pulmonar (TEP) ou ambos em idades jovens (inferior a 55 anos). Em aproximadamente metade dos casos não existe nenhum outro factor predisponente. Está também descrito um aumento da infertilidade assim como, de abortamento precoce, o que pode ser reduzido pela instituição de tromboprolaxia (Ten Kate e Van der Meer, 2008).

No entanto, a sua expressão clínica pode variar dentro da mesma família, desde casos assintomáticos em oposição a outros que sofrem trombozes recorrentes. Estas evidências sugerem a existência de factores protectores e de factores agravantes, que podem ser genéticos ou adquiridos (Guermazi e Conard, 2008).

O diagnóstico da Deficiência hereditária de PS é evidentemente difícil, seja pela sobreposição de valores entre portadores de deficiência hereditária ou adquirida, seja pela variação de valores com a idade, sexo, estado hormonal e diversas patologias, o que faz com que os indivíduos sejam frequentemente diagnosticados incorrectamente (Ten Kate e Van der Meer, 2008). De forma a minimizar o número de resultados falso-positivos a colheita de sangue deve ser realizada após cessação da toma de estrogéneos ou antagonistas da vitamina K. Os resultados positivos devem posteriormente ser confirmados numa segunda amostra de sangue, que deverá ser colhida passados 3-6 meses. (Ten Kate e Van der Meer, 2008).

A amostra de sangue deverá ser obtida através de uma punção venosa por sistema de vácuo para um tubo de vidro contendo citrato de sódio.

Para comprovar a natureza hereditária da Deficiência de PS deve proceder-se a um estudo familiar, que deverá envolver parentes em grau ascendente, descendente e em linha horizontal (Guermazi e Conard, 2008 e Ten Kate e Van der Meer, 2008).

Estudos moleculares não estão indicados para o diagnóstico da Deficiência hereditária da PS, devido à existência de grande número de mutações genéticas, o que faz com que um grande número de mutações não seja detectado (Ten Kate e Van der Meer, 2008).

A análise da PS funcional permite, teoricamente, diagnosticar todos os tipos de deficiência congénita quer seja quantitativa ou qualitativa. Contudo, seria necessário que estivesse disponível um teste que avaliasse todas as actividades anticoagulantes da PS actualmente conhecidas (Guermazi e Conard, 2008). No entanto, tal teste não existe no mercado e aqueles que estão actualmente disponíveis avaliam apenas a actividade da aPC e podem, além disso, sofrer numerosas interferências que podem induzir a uma subestimação ou uma sobrestimação do valor de PS. A utilização em primeira linha destes testes funcionais antes dos doseamentos imunológicos é por conseguinte muito discutível, ou mesmo arriscada. A importância fisiológica das actividades anticoagulantes independentes da aPC ainda não é bem conhecida e, é provável que certos défices funcionais de PS não sejam detectados pelas técnicas actualmente disponíveis (Guermazi e Conard, 2008).

Como os verdadeiros défices qualitativos da PS são raros, muitos laboratórios doseiam apenas a PS livre. Esta opção pode ser aceitável na medida em que a maioria das mutações genéticas da PS traduz-se num défice quantitativo de PS livre (Guermazi e Conard, 2008).

Contudo, a associação imediata do doseamento da fracção livre da PS e da PS funcional parece constituir a melhor opção, apesar desta medida aumentar consideravelmente os custos de um estudo de Trombofilia. A questão que continua a ser colocada pelos laboratórios que optam pelo doseamento da PS livre numa primeira fase é saber se é necessário, mesmo assim, dosear a PS funcional quando o nível de PS livre é normal, sobretudo se, além disso, o estudo dos outros indicadores de Trombofilias for normal (Guermazi e Conard, 2008).

A quantificação da PS total não está indicada, pois apenas permite o diagnóstico do tipo de deficiência hereditária de PS (Guermazi e Conard, 2008).

Os valores de PS total observados nos indivíduos heterozigóticos são, geralmente, compreendidos entre 40 e 60-65%. Consequentemente, é necessário considerar que a zona compreendida entre 60 e 70% é uma zona de sobreposição e, por conseguinte de incerteza na interpretação dos resultados (Guermazi e Conard, 2008).

O momento do doseamento relativamente ao acontecimento trombótico, é um factor a ter em conta pois um valor baixo ou, pelo contrário, um valor aumentado, pode observar-se transitoriamente no caso de trombose recente. Assim, o estudo da PS deverá ser realizado, após a fase aguda do evento trombótico. É igualmente importante estudar os valores normais

da população tendo em conta a idade, o sexo e as influências hormonais na mulher, assim como, excluir factores adquiridos que afectem a análise da PS (Guermazi e Conard, 2008).

## **Factores que afectam os valores de Proteína S**

A Deficiência hereditária de PS é a Trombofilia de mais difícil diagnóstico pois, a PS está sujeita a inúmeras variações inter e intraindividuais, podendo ocorrer sobreposição entre indivíduos normais e indivíduos com Deficiência hereditária heterozigótica molecularmente reconhecida (Makris et al., 2000 e Dykes et al., 2001).

A Deficiência adquirida de PS não é incomum e pode ser causada por diversos agentes, nomeadamente idade, sexo, estado hormonal fisiológico, uso de contraceptivos orais (CO), terapia de reposição hormonal (TRH), metabolismo lipídico, infecções víricas, estados inflamatórios agudos ou crónicos e terapêutica com antagonistas da vitamina K (Makris et al., 2000, Dykes et al., 2001 e Castoldi e Hackeng, 2008).

Estas inúmeras situações estão na génese da dificuldade de diagnóstico da Deficiência hereditária de PS.

### **Idade, sexo e estado hormonal fisiológico**

A PS varia consoante a idade, sexo e estado hormonal dos indivíduos.

A PS, essencialmente a PS total, aumenta com idade, essencialmente na mulher e, tanto a PS livre como a PS total apresentam valores mais baixos na mulher do que no homem (Dykes et al., 2001 e Castoldi e Hackeng, 2008). No entanto, Dykes et al. (2001) demonstraram que nos homens não ocorre variação da PS total com a idade, embora ocorra diminuição da PS livre clinicamente insignificativa.

Estes resultados estão, aparentemente, relacionados com o estado hormonal dos indivíduos. A mulher pré-menopausa apresenta valores inferiores aos dos homens e mulheres pós-menopausa e, os homens e mulheres na fase pós-menopausa apresentam valores semelhantes (Henkens et al., 1995 e Castoldi e Hackeng, 2008). No entanto, é de salientar a dificuldade em isolar a variável idade da variável menopausa (Dykes et al., 2001 e Castoldi e Hackeng, 2008). Dykes et al. (2001) concluíram que o aumento de PS na mulher pós-menopausa se deve essencialmente ao factor idade e não às variações hormonais decorrentes da menopausa. É de salientar que, geralmente, ocorre aumento de colesterol total e triglicéridos com a idade e, que este aumento está associado a aumento da concentração de PS, o que pode actuar como factor confundidor relativamente à idade (McCallum et al., 1998).

Os estados estrogênicos elevados, tal como os que ocorrem durante a gravidez e puerpério, estão associados a diminuição da PS livre, essencialmente do segundo trimestre de gravidez até às 6 semanas pós-parto (Dykes et al., 2001 e Guermazi e Conard, 2008). Ocorre uma associação semelhante ao longo do ciclo de vida de mulher, visto que na fase pré-menopausa os níveis de estrogêneos são mais elevados que na fase pós-menopausa, ocorrendo variação dos valores de PS livre na razão inversa (Henkens et al., 1995). Por outro lado, os homens mantêm níveis de estrogêneos relativamente constantes durante a sua vida e, os valores de PS não sofrem oscilações significativas.

Assim, quando se faz doseamento da PS em homens é necessário apenas um intervalo de referência quer para a PS total quer para a PS livre. Por outro lado, na mulher são necessários diferentes intervalos de referência consoante a idade da mulher em estudo, ver tabela 1 (Dykes et al., 2001).

O rastreio de Deficiência hereditária de PS realizado durante a gravidez tem de ser cautelosamente interpretado. Pelo que deverá ser repetido, em caso de resultado positivo, cerca de 6 semana após o parto (Guermazi e Conard, 2008 e Simioni, 2009).

	IDADE			Total
	<25	25-45	≥45	
<b>PS total (%)</b>				
<b>Homem</b>	72-168	72-162	73-171	<b>72-164</b>
<b>Mulher</b>				
<b>Hormonas exógenas</b>	56-136	56-148	57-157	57-142
<b>Sem hormonas exógenas</b>	<b>65-141</b>	<b>67-152</b>	<b>71-146</b>	<b>68-148</b>
<b>PS livre (%)</b>				
<b>Homens</b>	71-177	68-177	67-175	<b>68-176</b>
<b>Mulheres</b>	<b>51-155</b>	<b>55-156</b>	<b>60-152</b>	<b>54-155</b>

Tabela 1 – Intervalos de referência para a PS total e PS livre consoante a idade, sexo e estado hormonal. Adaptado de Dykes et al. (2001).

## **Contraceção oral e Terapia de reposição hormonal**

Desde a década de 60 que se sabe que os contraceptivos orais estão associados a aumento do risco de doença venosa tromboembólica, sendo bem conhecidas as alterações hemostáticas decorrentes do uso de CO, entre elas a diminuição de Proteína S (Mackie et al., 2001 e Martinez et al., 2007).

Com o uso de contraceptivos orais combinados (COC) ocorre diminuição da PS total, livre e funcional, o que se justifica pelos efeitos procoagulantes produzidos pelas altas doses de estrogéneo exógeno. A PS retoma aos valores basais 4 semanas após interrupção dos COC (Mackie et al., 2001 e Wiegratz et al., 2008).

No decorrer dos anos, foram efectuadas alterações na composição dos COC no que diz respeito ao tipo e dose de estrogéneo e progestativo, no sentido de diminuir os efeitos laterais a nível cardiovascular e metabólico. Os contraceptivos de primeira geração já não estão disponíveis no mercado, estando, actualmente, disponíveis os contraceptivos de segunda e terceira gerações, constituídos por Etinilestradiol e Levonorgestrel e, Etinilestradiol e Desogestrel, respectivamente (Kemmeren et al., 2004 e Lippi e Franchini, 2008).

No entanto, estudos realizados desde 1995 têm demonstrado que o uso de contraceptivos de terceira geração está associado a maior risco de doença venosa tromboembólica, quando comparado com o uso de COC de segunda geração.

No que diz respeito à PS, estudos têm demonstrado que os COC de terceira geração estão associados a valores de PS livre e total inferiores aos encontrados em mulheres que fazem COC de segunda geração, o que vai de encontro ao proposto por Kluft, em 1999, de que o Levonorgestrel tem efeitos “anti-estrogénicos” no que diz respeito aos efeitos procoagulantes (Dykes et al., 2001 e Mackie et al., 2001).

Relativamente ao regime de toma, segundo Wiegratz et al. (2008), não existem diferenças hemostáticas significativas. Wiegratz et al. (2008) compararam a oscilação da PS livre e total aos 3 e 12 meses, em indivíduos em regime de toma convencional de COC de terceira geração (21 dias + 7 dias pausa) com indivíduos em regime de toma contínuo (84 dias + 7 dias de pausa), tendo concluído que não havia diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos aos 3 e 12 meses, embora ocorresse diminuição, sem significado estatístico, da PS livre dos 3 para os 12 meses no grupo de toma convencional. No entanto, ocorreu uma diminuição de, aproximadamente, 20% da PS total e livre em ambos os grupos, relativamente

ao grupo controlo. O que mais uma vez demonstra que os COC de terceira geração estão associados a diminuição da PS.

Segundo Kemmeren et al. (2004), os COC produzem alterações que vão no mesmo sentido das produzidas pelos estrogéneos em altas doses, mas menos pronunciadas, visto que as propriedades anti-estrogénicas dos progestativos implicam aumento da PS livre, embora seja menos acentuado com os progestativos de terceira geração.

Quando avaliado o efeito dos CO progestativos, verificou-se aumento da PS livre, sendo este aumento menos significativo no grupo que fazia desogestrel (Kemmeren et al., 2004).

Com o surgimento de novas formas de contraceção hormonal, nomeadamente contraceptivos de aplicação transdérmica e anel vaginal, surgiu a necessidade de avaliar o seu impacto nas proteínas da coagulação.

Segundo Jensen et al. (2008) a aplicação de anel vaginal está associada a aumento da PS livre entre 6.1-0.3%, enquanto o uso de contraceptivo transdérmico está associado a diminuição da PS livre entre 4.6-18.3%, consoante o uso prévio de CO ou não.

Estes resultados sugerem que mudança de COC para anel vaginal implica benefícios no que concerne aos valores de PS, enquanto a passagem de COC para contraceptivo transdérmico está associada a alterações desfavoráveis (Jensen et al., 2008).

Conclui-se que a COC está associada a diminuição da PS, mais acentuada com os COC de terceira geração e, que os CO progestativos produzem alterações no sentido oposto. O uso de anel vaginal acarreta aumento da PS comparativamente com os COC, ocorrendo o contrário com o uso de contraceptivo transdérmico (Dykes et al., 2001, Mackie et al., 2001, Kemmeren et al., 2004 e Jensen et al., 2008).

Ao contrário do que acontecia com os COC, a TRH, até há 10 anos atrás, parecia não estar associada a aumento do risco de trombose, pelo contrário, acreditava-se que teria efeitos benéficos a nível cardiovascular, o que era explicado pelo uso de doses “fisiológicas” de estrogéneos (Dykes et al., 2001 e Norris et al., 2008).

No entanto, sabe-se, actualmente, que a TRH está associada ao aumento de risco de doença tromboembólica e a alterações na hemostase (Norris et al., 2008).

A Terapia de reposição hormonal (TRH) causa diminuição da PS funcional, na ordem dos 20%, sendo mais significativa naquelas que fazem estroprogestativos do que naquelas que fazem estrogéneos isolados. O modo de emprego do fármaco, também tem implicações nos

valores de PS, tendo os dispositivos transdérmicos um efeito menos marcado que as preparações orais (Norris et al., 2008). De salientar que os valores de PS retornam ao valores basais 4 semanas após interrupção do tratamento (Norris et al., 2008).

### **Estados Inflamatórios**

A PS é regulada por estados inflamatórios, devido à produção de C4bBP que ocorre na presença de uma situação inflamatória. Quando a C4bBP aumenta para valores 2-3 vezes superiores ao normal pode adquirir-se Deficiência de PS decorrente do aumento de PS complexada ou da inativação da restante PS livre. Assim, muitos pacientes com estados inflamatórios apresentam diminuição dos níveis antigénicos e funcionais de PS (Taylor et al., 1995).

Esta situação tem sido observada em doentes com doença hepática, sépsis, coagulação intravascular disseminada e provavelmente em doentes com Lupus eritematoso sistémico (LES) e doenças infecciosas.

A Deficiência de PS apresenta um papel relevante no estado de hipercoaguabilidade e aumento do risco de eventos tromboembólicos arteriais e venosos observado em doentes com Doença Inflamatória Intestinal (DII) (Saibeni et al., 2001).

Saibeni et al. (2001) constataram um ligeiro, mas significativo decréscimo dos valores de PS livre em doentes com DII, sendo que um doente apresentava Deficiência de PS. No entanto, esta diminuição não tinha correlação com a produção de anticorpos anti-PS ou anticorpos antifosfolípidos, apesar de a produção de ambos os anticorpos ser maior nos doentes com DII.

### **Anticorpos antifosfolípidos**

A presença de anticorpos antifosfolípidos, como o anticorpo anticardiolipina e o anticoagulante lúpico (LA) está associada a aumento da ocorrência de trombose (Lippi e Franchini, 2008). A sua presença em doentes com LES foi associada à ocorrência de complicações trombóticas nestes doentes, visto que pacientes com LES e anticorpos antifosfolípidos positivos apresentavam maior prevalência de complicações tromboembólicas

que os pacientes com LES e anticorpos antifosfolípidos negativos (Nojima et al., 2001 Lippi e Franchini, 2008).

Por outro lado, tem sido descrita uma associação entre a presença de anticorpos antifosfolípidos e diminuição da PS livre, com conseqüente aumento do risco de trombose venosa.

Segundo Nojima et al. (2001), existe uma prevalência elevada de anticorpos anti-PS nos pacientes com LES. Contudo, não foi encontrada uma associação significativa entre a presença de anticorpos anti-PS e anticorpos antifosfolípidos. No entanto, constataram que 95% dos indivíduos com doença venosa tromboembólica apresentava anticorpo anti-PS.

Ginsberg et al. (1995) avaliaram a relação entre Deficiência adquirida de PS livre e a presença de anticorpos antifosfolípidos em pacientes com LES. Neste estudo foi concluído que os doentes com LES apresentavam valores inferiores de PS livre relativamente ao grupo controlo (30% vs 43%) e, que uma elevada proporção apresentava Deficiência de PS. Uma elevada percentagem de doentes apresentava anticorpos antifosfolípidos e, apenas os indivíduos com anticorpos antifosfolípidos positivos apresentava Deficiência de PS.

A PS total apresentava-se diminuída ou dentro dos valores normais, o que sugere que a diminuição da PS livre não se deve a aumento da C4bBP.

Este estudo sugere que indivíduos com anticorpos antifosfolípidos apresentam menores níveis de PS livre.

Crowther et al. (1996) avaliaram a existência de Deficiência de PS em doentes com anticorpos antifosfolípidos positivos sem LES ou doença tromboembólica, tendo constatado diminuição da PS livre relativamente aos indivíduos com anticorpos antifosfolípidos negativos, respectivamente 30% vs 39%.

De salientar que os dois últimos estudos consideram como referência para a PS livre valores compreendidos entre 24-62%.

Num estudo realizado por Soon Song et al. (2000), demonstrou-se uma aparente associação entre a diminuição de PS livre, a presença de anticorpos anti-PS e a presença de anticorpos antifosfolípidos em doentes com LES. Contudo, esta associação não foi estatisticamente significativa, pelo contrário, a única pessoa com complicação tromboembólica tinha deficiência de PS livre (PS livre: 10%), mas não tinha anticorpos anti-PS ou anticorpos antifosfolípidos. No entanto, apesar do aumento de C4bBP a fraca associação entre a PS funcional e os níveis de C4bBP sugere que a Deficiência de PS não pode ser apenas atribuída ao aumento fracção de C4bBP.

Todavia, todos os pacientes com anticorpos anti-PS apresentam diminuição da PS funcional, não tendo sido demonstrada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com anticorpo anti-PS positivo ou negativo, o que parece ser explicado pela existência de artefactos no doseamento da PS funcional no grupo com anticorpo anti-PS negativo.

Conclui-se que o anticorpo anti-PS está aparentemente associado a Deficiência de PS em alguns pacientes com LES, independentemente da presença de anticorpos antifosfolípidos.

Um estudo realizado em 2004 por Brouwer et al. em doentes com LES demonstrou diminuição da PS livre em 70% dos indivíduos (PS livre média: 22%), o que sugere uma etiologia adquirida.

O mecanismo de diminuição da PS livre permanece por conhecer. Foram propostas quatro hipóteses explicativas:

- Diminuição da produção;
- Aumento do consumo;
- Aumento dos valores de C4bBP;
- Ligação a um componente sanguíneo que cause inactivação da PS e/ou que impeça o seu doseamento (Ginsberg et al., 1995 e Crowter et al., 1996).

No entanto, as duas primeiras hipóteses parecem improváveis, pois não ocorre diminuição dos restantes anticoagulantes naturais. O facto de os níveis de PS total estarem reduzidos ou no limite inferior do intervalo normal nos indivíduos em que ocorre diminuição da PS livre, elimina a hipótese de que o aumento da C4bBP seja a causa de diminuição de PS livre nestes indivíduos.

A possibilidade da existência, nos doentes com LES, de um componente sanguíneo que inactive *in vivo* a PS e/ou a torne indetectável por técnicas de ELISA, parece ser a melhor hipótese explicativa até agora proposta. Implicar os anticorpos antifosfolípidos neste mecanismo é muito atractivo mas, não existe evidência científica suficiente para o fazer (Ginsberg et al., 1995 e Crowter et al., 1996).

Estes diferentes estudos sugerem a existência de uma associação entre a presença de LES e anticorpos antifosfolípidos com a produção de anticorpo anti-PS e diminuição da PS livre e funcional. No entanto, existe alguma controvérsia entre os diferentes dados disponíveis, não existindo evidência científica suficiente para comprovar e explicar esta associação, sendo

necessária a realização de mais estudos, cuidadosamente elaborados, para comprovar esta associação.

### **Doenças Infeciosas**

As infecções víricas parecem estar associadas a estados de hipercoaguabilidade, nomeadamente à Deficiência de proteína S (Regnault et al., 2005).

Nas últimas décadas foram descritos em crianças mais de 50 casos de complicações tromboembólicas após infecção por *Varicella Zoster*. Foram, também, relatados alguns casos em adultos (Larakeb et al., 2008).

A ocorrência de Púrpura Fulminante, causada por Deficiência de PS transitoriamente adquirida, tem sido a situação mais descrita, tendo sido, também, descritos casos de Trombose venosa profunda e Necrose renal cortical aguda e Necrose testicular (D' Angelo et al., 1993, Levin et al., 1995 e Van Ommen et al., 2002).

Nos diversos casos relatados tem-se detectado uma redução muito acentuada da PS livre, frequentemente para níveis indetectáveis, resultantes da presença de anticorpos anti-PS (Campanelli et al., 2004 e Regnault et al., 2005).

A PS livre tende a normalizar à medida que ocorre diminuição da concentração dos anticorpos anti-PS, atingindo valores dentro do normal no espaço de 1 mês. No entanto, os anticorpos anti-PS tendem a persistir durante 3 meses (D' Angelo et al., 1993, Levin et al., 1995 e Regnault et al., 2005).

De salientar que têm sido detectados anticorpos anticardiolipina e anti-coagulante lúpico em alguns destes doentes, que normalizam progressivamente após resolução da infecção, o que sugere a existência de uma resposta imune inadequada à infecção (Levin et al., 1995, Van Ommen et al., 2002, Regnault et al., 2005 e Larakeb et al., 2008).

As alterações hemostáticas encontradas em pacientes com complicações tromboembólicas pós-varicela, também têm sido encontradas em pacientes com varicela não complicada, embora sejam menos acentuadas (Larakeb et al., 2008).

A ocorrência de trombose em pacientes com infecção crónica pelo HIV tem sido explicada devido à ocorrência de anomalias vasculares e hemostáticas neste grupo de doentes. A deficiência adquirida de PS tem sido a alteração hemostática mais descrita (Mochan et al., 2005).

Segundo Stahl et al. (1995), indivíduos infectados pelo HIV apresentam níveis de PS livre e total significativamente menores que os indivíduos saudáveis, independentemente de terem sofrido algum evento tromboembólico.

A duração da doença está associada a níveis inferiores de PS, não se verificando a mesma associação com a severidade da infecção (Stahl et al., 1995).

O facto da infecção pelo HIV estar associada à diminuição da PS livre e total e a valores normais de PS complexada, sugere que a deficiência de PS não se deve a um estado inflamatório agudo.

A diminuição da PS parece estar associada à produção de anticorpos anti-PS, que tal como na varicela vão ser responsáveis pela diminuição de PS livre.

Durante o Inverno ocorre aumento da morbidade e mortalidade por doença cardio e cerebrovascular na população idosa. Estes factos podem estar associados à ocorrência de alterações hemostáticas protrombóticas causados por infecções agudas do trato respiratório ou pelas alterações ambientais sazonais (Kaba et al., 2003).

Segundo Kaba et al. (2003), ocorre diminuição da PS livre, para valores na ordem dos 70%, diminuição da PS funcional e aumento da PS total com as infecções agudas do trato respiratório, quer em indivíduos jovens quer em idosos.

Contudo, estas alterações parecem dever-se, essencialmente, às oscilações ambientais sazonais e não à infecção propriamente dita. O facto da PS complexada apresentar valores dentro do intervalo normal apoia estes achados, visto que esta tende a aumentar nos estados inflamatórios agudos (Taylor et al., 1995 e Kaba et al., 2003).

A produção de anticorpos anti-PS tem sido descrita associada a outros estados infecciosos, nomeadamente à infecção por *Coxiella Burnetti*, o que implica diminuição da PS livre (Boinot et al., 2007).

Existem raras descrições de casos de deficiência adquirida de PS em crianças com tuberculose pulmonar (Casanova-Román et al., 2001).

Conclui-se que parece existir uma associação entre a diminuição da concentração plasmática de PS e a ocorrência de alguns estados infecciosos agudos ou crónicos. Todavia, não existe evidência científica suficiente para comprovar esta relação e estabelecer a sua etiologia, muito devido à sua raridade.

### **Anticoagulantes orais**

Os dicumarínicos (varfarina e acenocumarol) são os fármacos anticoagulantes mais prescritos para a prevenção e tratamento de doença tromboembólica arterial e venosa (Shikata et al., 2004).

O tratamento com varfarina pode causar diminuição dos níveis de PS. Segundo D'Angelo et al. (1988), a PS funcional pode atingir valores na ordem dos 29%, o que se traduz numa diminuição de 50%, comparativamente com os valores normais. Ocorre, também, diminuição da PS total (PS total média: 68%) e da PS livre (PS livre média: 40%).

Assim, está recomendado um intervalo livre de um mês antes de se realizar um estudo de Trombofilia. No entanto, doentes que necessitem manter terapêutica anticoagulante, deverão realizar heparina de baixo peso molecular pois, esta não interfere com a concentração plasmática de PS (Castoldi e Hackeng, 2008 e Guermazi e Conard, 2008).

Têm sido descritos casos de deficiência severa de PS adquirida com o tratamento com varfarina, que estiveram na génese de alguns eventos tromboembólicos (Haran et al., 2007).

### **Metabolismo lipídico**

O metabolismo lipídico parece estar associado a oscilação nos valores de PS (Castoldi e Hackeng, 2008).

Nos últimos anos foram descritas associações entre o nível de PS e os valores de colesterol total e triglicéridos (Lowe et al., 1997, Woodmark et al., 1997).

Segundo McCallum et al. (1998), os valores de PS total aumentam com o aumento dos valores de colesterol total, por cada 1 mmol/L de aumento do colesterol total ocorre aumento de 4% da PS total. Enquanto a PS livre está associada, apenas, aos valores de triglicéridos, o aumento de 1mmol/L de triglicéridos implica o aumento de 10% do valor de PS livre.

## **Conclusão**

Após a realização desta revisão bibliográfica pude constatar que o diagnóstico da Deficiência hereditária de proteína S é de difícil realização, devido à multiplicidade de factores que interferem com a sua concentração plasmática.

Desde factores intrínsecos ao indivíduo, como a idade e sexo, passando por situações fisiológicas como a gravidez, até diversas situações patológicas associadas a estados inflamatórios, infecciosos e auto-imunes, são diversas as situações que causam diminuição da concentração de proteína S e sua deficiência adquirida.

De salientar que o estudo da proteína S não deve ser realizado durante situações inflamatórias agudas, ou até quatro semanas após o uso de Contraceptivos orais ou terapêutica com dicumarínicos.

Assim, deve ter-se sempre em conta a existência de múltiplos factores que podem simular a Deficiência hereditária de proteína S, pelo que o seu diagnóstico deve ser confirmado numa segunda amostra de sangue e deve realizar-se um estudo familiar de forma a determinar a natureza hereditária da Deficiência de proteína S.

## Referências

- Boinot C, Planchard D, Giraudeau G, Turhan A, Agius G, Guicheteau M (2007) Autoimmune protein S activity deficiency following a Q fever. *Thromb Haemost* 98: 255-7.
- British Society of Haematology: Guidelines (2001) Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 114: 512-528.
- Brouwer JLP, Bijl M, Veeger JGM, Kluin-Nelemans hC, van der Meer J (2004) The contribution of inherited and acquired thrombophilic defects, alone or combined with antiphospholipid antibodies, to venous and arterial thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 104: 143-148.
- Campanelli A, Kaya G, Ozsahin AH, La Scala G, Jacquier C, Stauffer M, Boehlen F, DE Moerloose P, Saurat JH (2004) Purpura fulminans in a child as a complication of chickenpox infection. *Dermatology* 208: 262-264.
- CasaNova-Román M, Rios J, Sánchez-Porto A, Casanova-Belliso M (2002) Deep venous thrombosis associated with pulmonary tuberculosis and transient protein S deficiency. *Scand j Infect Dis* 34: 393-394.
- Castoldi E, Hackeng TM (2008) Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol* 15: 529-536.
- Crowther MA, Johnston M, Weitz J, Ginsberg JS (1996) Free protein S deficiency may be found in patients with antiphospholipid antibodies who do not have systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 76: 689-691.
- D'Angelo A, Della Valle P, Crippa L, Pattarini E, Grimaldi L, D'Angelo SV (1993) Autoimmune Protein S Deficiency in a Boy with Severe Thromboembolic Disease. *N Engl J Med* 328:1753-1757
- D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Esmon CT, Comp PC. Acquired deficiencies of protein S: Protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease, and in disseminated intravascular coagulation. *J. Clin. Invest.* 81:1445-1454.
- Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SIAM, Tait RC (2001) A study of protein S antigen in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 113: 636-641.
- Franco RF, Reitsma PH (2001) Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 109: 369-384.

- Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, Lind B, Mannhalter C, Pabinger I, Reitsma PH, Formstone C, Cooper DN, Saito H, Suzuki K, Bernardi F, Aiach M (2000) Scientific and standardization committee communication protein S deficiency: A database of mutations – first update. *Thromb Haemost* 84: 918
- Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, Bona R, Johnston M, Wong A, Denburg JA (1995) Acquired free protein S Deficiency is associated with antiphospholipid antibodies and increased thrombin generation in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 98: 379-383.
- Goodwin A, Rosendaal FR, Kottke-Marchant K, Bovill EG (2002) A review of the technical, diagnostics, and epidemiologic considerations for protein S assays. *Arch Pathol Lab Med* 126: 1349-1366.
- Guermazi S, Conard J (2008) Congenital protein S deficiencies; Diagnostic difficulties. *Pathol Biol*. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.016.
- Haran MZ, Lichman I, Berebbi A, Weinmann E, Rosenberg N (2007) Unbalanced protein S deficiency due to warfarin treatment as a possible cause for thrombosis. *Br J Haematol* 139: 310-311.
- Henkens CMA, Bom VJJ, Van Der Schaaf W, Pelsma PM, Sibinga CTS, De Kam PJ, Van Der Meer J (1995) Plasma levels of protein S, protein C, and factor X: Effects of sex, hormonal state and age. *Thromb Haemost* 74: 1271-1275.
- Jackson BR, Holmes K, Phansalkar A, Rodgers GM (2008) Testing for hereditary thrombophilia: a retrospective analysis of testing referred to a national laboratory. *BMC Clin Pathol*. 8: 3-9.
- Jensen JT, Burke AE, Barnhart KT, Tillotson C, Messerle-Forbes M, Peters D (2008) Effects of switching from oral to transdermal or transvaginal contraception on markers of thrombosis. *Contraception* 78: 451-58.
- Kaba NK; Francis CW, Hall WJ; Falsey Ar, Smith BH (2003) Protein S declines during winter respiratory infections. *J Throm Haemost* 1: 729-734.
- Kearon C, Julian JA, Kovacs MJ, Anderson DR, Wells P, MacKinnon B, Weitz JI, Crowther MA, Dolan S, Turpie AG, Geerts W, Solymoss S, Van Nguyen P, Demers C, Kahn SR, Kassis J, Rodger M, Hambleton J, Gent M, Ginsberg JS (2008) Influence of thrombophilia on risk of recurrent venous thromboembolism while on warfarin: results from a randomized trial. *Blood* 112: 4432-4436.

- Kemmeren JM, Algra A, Meijers JCM, Tans G, Bouma BN, Curvers J, Rosing J, Grobbee DE (2004) Effect of second- and third generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation: a randomized trial. *Blood* 103: 927-933.
- Kolde JH (2004) *Haemostasis: Physiology, Pathology, Diagnostics*. Switzerland Publisher: Pentatharm Ltd, Basel.
- Larakeb AS, Evrard S, Louillet F, Kwon T, Djaffar H, Llanas B, Deschênes G, Hurtaud-Roux MF, Baudouin V (2009) Acute renal cortical necrosis due to acquired antiprotein S antibodies. *Pediatr Nephrol* 24:207-209.
- Levin M, Eley BS, Louis J, Coehen H, Young L, Heyderman RS (1995) Postinfectious purpura fulminans caused by an autoantibody directed against protein S. *J Pediatr* 127: 355-363
- Lijfering WM, Mulder R, Ten Kate MK, Veeger NJGM, Mulder AB, Van Der Meer J (2009) Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood* 113: 1225-1230.
- Limb J, Binning A (2009) Thrombosis associated with varicella zoster in an adult. *J Infect Dis*
- Lippi G, Franchini M (2008) Pathogenesis of venous thromboembolism: When the cup runneth over. *Semin Thromb Hemost* 34: 747-761.
- MacCallum PK, Cooper JA, Martin J, Howarth DJ; Meade TW, Miller GJ (1998) Associations of protein C and protein S with serum lipide concentrations. *Br J Haematol* 102: 609-615.
- Mackie IJ, Piegsa K, Furs SA, Johnson J, Bounds W, Machin SJ, Guillebaud J (2001) Protein S levels are lower in women receiving desogestrel-containing combined oral contraceptives (COCs) than in women receiving levonorgestrel-containing COCs at steady and on cross-over. *Br J Haematol* 113: 898-904.
- Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ, Preston FE (2000) Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood* 95: 1935-1941.
- Martinez F, Avecilla A (2007) Combined hormonal contraception and venous thrombembolism. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 12: 97-106.

- Maurissen LFA, Thomassen MCLGD, Nicolaes GAF, Dahlbäck B, Tans G, Rosing J, Hackeng TM (2008) RE-evaluation of the role of the protein S-C4b binding protein complex in activated C-catalyzed factor Va-inactivation. *Blood* 111: 3034-3041.
- Merriman L, Greaves M (2006) Testing for thrombophilia: an evidence-based approach. *Postgrad Med J* 82: 699-704.
- Mochan A, Modi M, Modi G (2005) Protein S deficiency in HIV associated ischaemic stroke. An epiphenomenon of HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1455-1456.
- Nojima J, Kuratsune H, Suehisa e, Futsukaichi Y, Yamanishi H, Machii t, Iwatani Y, Kanakura Y (2001) Association between the prevalence of antibodies to  $\beta$ 2-Glycoprotein I, prothrombin, protein c, protein S, and annexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications. *Clin Chem* 47: 1008-1015
- Norris LA, Brosnan J, Bonnar J, Conard J, Kluff C, Hellgren M (2008) Inhibitors and activation markers of the haemostatic system during hormone therapy: A comparative study of oral estradiol (2mg) / dydrogesterone and estradiol (2mg) trimegestone. *Thromb Haemost* 100: 253-260.
- Peyton BD, Cutler BS, Stewart FM (1998) Spontaneous tibial artery thrombosis associated with varicella pneumonia and free protein S deficiency. *J Vasc Surg* 27: 563-567.
- Regnault V, Boehlen F, Ozsahin H, Wahl D , De Groot PG, Lecompte T, De Moerloose P (2005) Anti-protein S antibodies following a varicella infection: detection, characterization and influence on thrombin generation. *J Throm Haemost* 3: 1243-1249.
- Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA (2008) Coagulation, inflammation and apoptosis: different roles for protein s and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 103: 1192-1201.
- Saibeni S, Vecchi M, Valsecchi C, Faioni E, Razzari C, Franchis R (2001) Reduced free protein S levels in patients with inflammatory bowel disease: Prevalence, Clinical relevance, and role of anti-protein S antibodies. *Dig Dis Sci* 46: 637-643.
- Seligsohn U, Lubetsky A (2001) Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 344: 1222-1231

- Serra J, Sales M, Chitolie A, Domènech P, Rossi E, Borrell M, Dahlbäck B (2002) Multicentre evaluation of IL test™ free PS: A fully automated assay to quantify free protein S. *Thromb Haemost* 88: 975-983.
- Shikata E, Ieiri S, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, Ohgi S, Otsubo K (2004) Association of pharmacokinetic (*CYP2C9*) and pharmacodynamic (*factors II, VII, IX and X; proteins S and C, and Y-glutamyl carboxylase*) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 103: 2630-2635.
- Simioni P (2009) Thrombophilia and gestational VTE. *Thrombosis Research* 123: Suppl. 2, S41-S44.
- Song KS, Park YS, Kim HK (2000) Prevalence of anti-protein S antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43: 557-560.
- Stahl CP, Wideman CS, Spira TJ, Haff EC, Hixon GJ, Evatt BL (1993) Protein S deficiency in men with long-term human immunodeficiency virus infection. *Blood* 81: 1801-1807.
- Taylor FB Jr, Dahlback B, Chang AC, Lockhart MS, Hatanaka K, Peer G, Esmon CT (1995) Role of free protein S and C4b binding protein in regulating the coagulant response to *Escherichia coli*. *Blood* 86: 2642-2652.
- Ten Kate MK, van der Meer J (2008) Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* 14:1222-1228.
- Van Ommen CH, Van Wijnen M, De Groot F, Van Der Horst CMAM, Peters M (2002) Postvaricella purpura fulminans caused by acquired protein S deficiency resulting from antiprotein S antibodies: Search for the Epitopes. *J Pediatr Hematol Oncol* 24: 413-416.
- Wiegatz I, Sthalberg S, Manthey T, Sängler N, Mittmann K, Lange E, Mellinger U, Kuhl H (2008) Effects of conventional or extended-cycle regimen of an oral contraceptive containing 30 mcg ethinylestradiol and 2 mg dienogest on various hemostasis parameters. *Contraception* 78: 384-391.