

Jeferson Mazzini

Doença de von Willebrand

- **Determinação da Prevalência numa População Brasileira**
- **Estudo Molecular - Determinação da Frequência Alélica de 3 VNTRs no intron 40 do Gene do Fator de von Willebrand**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Fonte Financiadora: FAPESP

Orientadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi



Campinas

1999

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

M459d Mazzini, Jeferson
Doença de von Willebrand – determinação da prevalência numa
população brasileira – Estudo molecular – Determinação da frequência
alélica de 3 VNTRs no intron 40 do gene do fator de von Willebrand /
Jeferson Mazzini . Campinas, SP : [s.n.], 1999.

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

 1. Doadores de sangue . I. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Jeferson Mazzini

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Doença de von Willebrand

- Determinação da Prevalência numa População Brasileira
- Estudo Molecular - Determinação da Frequência Alélica de 3 VNTRs no intron 40 do Gene do Fator de von Willebrand

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico Jeferson Mazzini.

Campinas, 17 de dezembro de 1999.

Orientadora: Profa. Dr

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
- Orientadora -



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora:

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Membros:

1. Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi

2. Prof. Dr. Elbio Antonio D'Amico

3. Profa. Dra. Maria de Lourdes Barjas de Castro

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

Data: 17/12/99

Aos meus pais, Fernando e Dora, pelo incentivo constante, amor, carinho, compreensão e todos os tipos de auxílios prestados.

Aos meus irmãos Kleber e Sheila, meus avós e familiares pelo incentivo.

À Giovana, que desde o início deste trabalho esteve ao meu lado, por todo o seu amor, carinho e compreensão.

À Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, por ter acreditado em mim, orientado com muita dedicação este trabalho, por todos os ensinamentos e idéias, e por ter sido uma orientadora extremamente atenciosa e participativa.

À Profa. Dra. Christine Hackel por todo o auxílio na confecção dos dados estatísticos, pelas excelentes idéias e por sua dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Heleno R. Corrêa Filho por todas as sugestões na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Elbio Antonio D'Amico e à bióloga Cristina, do Laboratório de Hemostasia da Fundação Pró-Sangue de São Paulo, pela colaboração ao na dosagem do antígeno de von Willebrand, de algumas das amostras dos nossos doadores de sangue.

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

À Tânia, Andréa e Mônica pelos ensinamentos, amizade e pelo grande auxílio na realização deste trabalho.

Às amigas Sandra e Rosana, pela atenção, e compreensão, e pelo excelente trabalho de arte final desta tese.

À amiga Luciana Pugliese, pela padronização de grande parte das técnicas utilizadas no laboratório, pelos ensinamentos e fornecimento de inúmeros e sugestões a este trabalho.

Às amigas Cristina, Ucha, e Devanira pelo excelente auxílio técnico e organização do laboratório.

À colega Lucimar por ter me ajudado em uma das partes mais difíceis deste trabalho “coleta, separação e armazenamento das amostras de plasma dos doadores de sangue”.

Aos todos os supervisores e funcionários do Hemocentro pela importante colaboração.

À colega Edilene, e as assistentes sociais Rosana e Maria Luiza pela colaboração nas convocações.

À secretária Arlete pelos pelo auxílio na área administrativa.

Aos Secretários da pós-graduação, Vanderlei e Tereza pela orientação e organização da parte burocrática.

Aos colegas de pós-graduação Liliane, Jorge, Dalva, Yajaira, Pio e Simone pela convivência agradável.

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

Aos doadores de sangue do Hemocentro, pacientes do ambulatório de Hemostasia e seus familiares, pois sem a colaboração dos mesmos, este trabalho não seria possível.

Enfim à todos as pessoas, que de maneira direta ou indireta ajudaram na realização deste ideal.

RESUMO	xvii
SUMMARY	xxi
INTRODUÇÃO	25
Aspectos Gerais da Hemostasia	26
Hemostasia Primária	27
Vias da Coagulação Sangüínea	29
Intrínseca da Coagulação	30
Via Extrínseca da Coagulação	31
Mecanismos Reguladores da Coagulação	33
Fator de von Willebrand	35
Estrutura e Função do Fator de von Willebrand	35
Caracterização Molecular do Fator de von Willebrand	37
Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR)	39
Doença de von Willebrand	45
Classificação dos Subtipos da Doença de von Willebrand	47
Alterações Moleculares na Doença de von Willebrand	50
OBJETIVOS	53
CASUÍSTICA	55
População de Doadores de Sangue	56
Controle Caucasóide	56
Pacientes e Famílias com Doença de von Willebrand	57
MATERIAIS e MÉTODOS	61
Coleta de Sangue	62
Determinação do Fator de von Willebrand	62
Determinação do Cofator de Ristocetina	62
Determinação do Antígeno do Fator de von Willebrand	64
Determinação da Atividade do Fator VIII	64

Crêterios para Padronização de Condutas, Quando da Análise dos Resultados	
Obtidos na Dosagem de Fator VIII e Cofator de Ristocetina, nos Doadores de Sangue	65
Crêterios Empregados para Exclusão de Resultados / Amostras de Dosagem	
de Fator VIII e Cofator de Ristocetina, para o Cálculo da M�dia e Desvio Padrão	66
Tipagem Sang�nea	66
Extração do DNA	67
Amplificação pela PCR	67
Fórmulas e Programas Utilizados	68
Sequ�nciamento de DNA para os 3 VNTRs	70
RESULTADOS	71
Prevalência da doença de von Willebrand	72
Cofator de Ristocetina	89
Fator VIII	91
Prevalência da vWD	93
Identificação e Determinação da Freqüência Alélica dos 3 VNTRs em Caucasóides	
e Pacientes com vWD	94
VNTR-3	94
VNTR-2	99
VNTR-1	104
Teste de Desequilíbrio de Ligação para Todos os Pares de Locos	
(Pacientes / VNTR-1, 2 e 3)	109
Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 3 VNTRs nos Pacientes com vWD ..	110
Estudo da Segregação em Famílias com Doença de von Willebrand	112
DISCUSSÃO	115
Prevalência da vWD	116
VNTR	120
CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

Figura 1:	Diagrama Simplificado da Adesão Plaquetária ao Colágeno	29
Figura 2:	Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea.....	32
Figura 3:	Esquema do Gene do Fator de von Willebrand, cDNA, e Domínio Estrutural da Proteína	38
Figura 4:	Análise à partir da Unidade Repetitiva, da Sequência de Bases do VNTR-1	42
Figura 5:	Árvore Genealógica, Originalmente Descrita por von Willebrand.....	45
Figura 6:	Mutações nas Repetições A1 e A2 do Fator de von Willebrand	51
Figura 7:	Demonstração dos 3 Padrões Homozigotos Encontrados na População Caucasóide para o VNTR-3.....	94
Figura 8:	Sequenciamento dos 3 Padrões Homozigotos da População Caucasóide para os VNTR-3	95
Figura 9:	Determinação do Tamanho dos Fragmentos da PCR de Heterozigotos para o VNTR-3	96
Figura 10:	Demonstração dos 2 Padrões Homozigotos Encontrados na População Caucasóide para o VNTR-2.....	99
Figura 11:	Sequenciamento dos 2 Padrões Homozigotos da População Caucasóide para o VNTR-2	100
Figura 12:	Determinação do Tamanho dos Fragmentos da PCR de Heterozigotos para o VNTR-2	101
Figura 13:	Demonstração do Único Padrão Homozigoto Encontrado na População Caucasóide para o VNTR-1	104
Figura 14:	Sequenciamento do Único Padrão Homozigoto Encontrado na População Caucasóide para o VNTR-1.....	105
Figura 15:	Determinação do Tamanho dos Fragmentos da PCR de Heterozigotos para o VNTR-1	106
Figura 16	Análise dos Haplótipos da Família vW-54, através dos VNTR-1, 2 e 3	113
Figura 17	Eletroforese dos Produtos da PCR da Família vW-54, VNTR-3	114

Tabela 1:	Classificação da Doença de von Willebrand	49
Tabela 2:	Pacientes Pertencentes ao Estudo da Frequência dos 3 VNTRs	58
Tabela 3:	Resultados Cofator de Ristocetina, Fator VIII e Antígeno do Fator de von Willebrand	73
Tabela 4:	Correlação entre o Tipo Sangüíneo e a Dosagem do Cofator de Ristocetina	89
Tabela 5:	Correlação entre o Tipo Sangüíneo e a Dosagem do Fator VIII	91
Tabela 6:	Correlação entre o Tamanho dos Fragmentos da PCR do VNTR-3 e o Número de Repetições ATCT	96
Tabela 7:	Frequências Alélicas do VNTR-3 nos Controles e em Pacientes.....	97
Tabela 8:	Distribuição dos Genótipos para os Alelos do VNTR-3 em Controles e em Pacientes.....	98
Tabela 9:	Correlação entre o Tamanho dos Fragmentos da PCR do VNTR-2 e o Número de Repetições ATCT	101
Tabela 10:	Frequências Alélicas do VNTR-2 nos Controles e em Pacientes.....	102
Tabela 11:	Distribuição dos Genótipos para os Alelos do VNTR-2 em Controles e em Pacientes.....	103
Tabela 12:	Correlação entre o Tamanho dos Fragmentos da PCR do VNTR-1 e o Número de Repetições ATCT	106
Tabela 13:	Frequências Alélicas do VNTR-1 nos Controles e em Pacientes.....	107
Tabela 14:	Distribuição dos Genótipos para os Alelos do VNTR-1 em Controles e em Pacientes.....	108
Tabela 15:	Distribuição da Frequência dos Haplótipos para os 3 VNTRs.....	111
Gráfico 1:	Correlação entre o Tipo Sangüíneo e a Dosagem do Cofator de Ristocetina	90
Gráfico 2:	Correlação entre o Tipo Sangüíneo e a Dosagem do Fator VIII	92

DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FVIII	Fator VIII da coagulação sanguínea
GPIb	Glicoproteína Ib da membrana plaquetária
GPIIb/IIIa	Complexo glicoprotéico IIb/IIIa da membrana plaquetária
Kb	Kilobases
Kda	Quilodalton
Pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
TBE	Tampão Tris borato EDTA
TEMED	(N, N, N', N' – tetrametilenodiamino)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
VNTR	Número variável de repetições em tandem
vWD	Doença de von Willebrand
vWF	Fator de von Willebrand
vWF_{Ag}	Antígeno do Fator de von Willebrand

Resumo

O vWF é uma glicoproteína multimérica, que tem uma função essencial na adesão das plaquetas ao subendotélio e como carreador do fator VIII da coagulação.

A doença de von Willebrand de herança autossômica, resulta de uma deficiência quantitativa ou qualitativa do vWF.

O gene do vWF possui 178 kb, contém 52 exons e está localizado no braço curto do cromossomo 12. O intron 40 do gene do vWF contém uma região de aproximadamente 670pb, com um número variável de repetições em tandem (VNTRs), tipo (ATCT)_n, mostrando um polimorfismo de comprimento.

Prevalência da vWD

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência da vWD e a faixa de normalidade da concentração plasmática de fator VIII e do cofator de ristocetina, numa população brasileira constituída por 795 doadores de sangue do Hemocentro/Unicamp.

Este estudo demonstrou que a prevalência da vWD nesta população brasileira, composta por 795 doadores de sangue, do sexo masculino, foi de 1,63%.

A prevalência encontrada em nossa população foi muito superior a descrita nos centros especializados de outros países, mas semelhante ao descrito em outros dois estudos populacionais realizados na Itália (0,57% a 1,15%) e EUA (1,3%).

Para o grupo geral, o fator VIII e o cofator de ristocetina mostraram uma média de 106% e 84%, com um desvio padrão de 28% e 23% respectivamente. Diante desse resultado, a faixa definida como normal a partir de 1,5 desvios padrões, foi de 64% a 148% e 49,5% a 118,5% respectivamente. Como houve diferença nos parâmetros analisados em relação ao grupo sanguíneo, os cálculos também foram realizados com os indivíduos separados em grupo O e Não O. De acordo com essa separação, os valores definidos para o grupo O foram 62% a 138% e 48% a 116% para o FVIII e cofator, respectivamente. No grupo Não O, os valores definidos foram 70,4% a 155,5% e 51,5% a 122,5%. Um outro cálculo da variação da normalidade pode ser definido como os valores compreendidos entre 2,5 e 97,5 percentis, o que no nosso estudo ficou praticamente semelhante ao obtido pelo cálculo de 1,5 desvios padrões. Como nossa amostra

tinha uma distribuição normal esse cálculo pode ser realizado sem correções, e considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

VNTR

O objetivo foi determinar a frequência alélica de 3 VNTRs no intron 40 do gene do vWF, numa população brasileira normal composta por 51 caucasóides, e em 25 portadores de vWD. Determinamos também a frequência alélica dos 3 VNTRs em 8 famílias com diagnóstico de vWD, para análise de informatividade.

A heterozigozidade observada (0,66; 0,66 e 0,86 para os VNTRs 1, 2 e 3) estavam de acordo com a heterozigosidade esperada para a frequência alélica (0,64, 0,70 e 0,81 respectivamente).

O alelo mais freqüente para o VNTR-1 (7 repetições ATCT) também foi o mais freqüente em todas as populações estudadas. Comparado aos dois outros estudos feitos em populações brasileiras, detectou-se o alelo com 14 repetições, que ainda não tinha sido descrito.

Como descrito na literatura, o VNTR-3, que ainda não tinha sido estudado na população brasileira, também foi o mais informativo em nossa amostra, além de verificarmos um novo alelo, caracterizado por 7 repetições.

Esses 3 VNTRs foram analisados em 8 famílias afetadas com vWD tipos I e II. Um ou mais desses marcadores foram informativos em sete casos. O VNTR-3 foi informativo em sete famílias (87,5% de informatividade), VNTR-2 em seis famílias (75% de informatividade) e o VNTR-1 somente em quatro famílias (50% de informatividade).

Summary

VWF is a multimeric glycoprotein which has an essential adhesion function of the platelets to the subendothelium and as a Factor VIII coagulation carrier.

Von Willebrand disease is an autosomal disease which results from a quantitative or qualitative deficiency of vWF.

The vWF gene has 178kb, contains 52 exons and is located in the short arm of chromosome 12. Intron 40 of the vWF gene contains a region of approximately 670pb, with a variable number of tandem repeats (VNTRs) type (ATCT)_n, showing a length polymorphism.

Prevalence of vWD

The aim of this study was to determine the prevalence of vWD and the normality range of the plasmatic concentration of factor VIII and of the ristocetine cofactor, in a Brazilian population formed by 795 blood donors from the Hematology and Hemotherapy Center of the State University of Campinas.

This study showed that the prevalence of vWD in this Brazilian population, composed by 795 blood donors, males, was 1.63%.

The prevalence found in our population was greater than that described in specialized centers of other countries, but similar to that described in two other population studies performed in Italy (0.57% to 1.15%) and EUA (1.3%).

For the general group, Factor VIII and the ristocetine cofactor showed a mean value of 106% and 84%, with a standard deviation of 28% and 23% respectively. In face of this result, the range defined as normal using 1.5 standard deviations, was 64% to 148% and 49.5% to 118.5% respectively. As there was a difference in the parameters analyzed in respect to the blood group, the calculations were also performed with the individuals separated in group O and Not O. According to this separation, the values defined for group O were 62% to 138% and 48% to 116% for FVIII and cofactor respectively. In group Not O, the values defined were 70.4% to 155.5% and 51.5% to 122.5%. Another calculation of the normality variation can be defined as the values between 2.5 and 97.5 percentis, which in our studies was similar to that obtained by the calculation of 1.5 standard deviations. As our sample had a normal distribution it was possible to perform this calculation without corrections, and considering the CI= 95%.

VNTR

The aim was to determine the allelic frequency of 3 VNTRs in intron 40 of the vWF gene, in a normal Brazilian population composed by 51 Caucasoids, and in 25 vWD carriers. We also determined the allelic frequency of 3 VNTRs in 8 families with a diagnosis of vWD, as an informative analysis.

The heterozygosity observed (0.66; 0.66 and 0.86 for VNTRs 1,2 and 3) were in accordance with the heterozygosity expected for the allelic frequency (0.64, 0.70 and 0.81 respectively).

The most frequent allele for VNTR-1 (7 repeats ATCT) was also the most frequent in all the populations studied. Compared to the two other studies performed in Brazilian populations, it was also the most informative in our sample, in addition to verifying a new allele characterized by 7 repeats.

These 3 VNTRs were analyzed in 8 families affected with vWD types I and II. One or more of these markers were informative in seven cases. VNTR-3 was informative in 7 families (87.5% of informability), VNTR-2 in six families (75% of informability) and VNTR-1 in only four families (50% of informability).

Introdução

Aspectos Gerais da Hemostasia

Hemostasia é o conjunto de mecanismos utilizados pelo organismo para manter o sangue fluido no interior dos vasos, sem extravasamento, o que caracteriza a hemorragia, e sem solidificação, o que caracteriza a trombose. É pois um estado de equilíbrio do organismo onde não há hemorragia ou trombose.

Basicamente, três sistemas interagem para manutenção da hemostasia normal: os vasos, as plaquetas, os fatores de coagulação e a fibrinólise, incluindo os inibidores naturais.

1. Hemostasia Primária- Inúmeras plaquetas se acumulam no local onde houve lesão da parede do vaso, aderindo-se ao colágeno subendotelial exposto (adesão plaquetária), agregando-se posteriormente (agregação plaquetária). O colágeno e as primeiras moléculas de trombina que se formam no local da lesão estimulam a agregação plaquetária.
2. A resposta secundária envolve a coagulação sangüínea, que compreende uma série de reações entre fatores inativos, presentes no plasma sob forma de pró-enzimas ou zimógenos e de cofatores, culminando com a formação do coágulo de fibrina. Estas enzimas e cofatores podem exercer funções distintas; favorecendo, inibindo ou modulando tal processo, resultando numa ação equilibrada e dinâmica.
3. Lise de fibrina - À medida que o coágulo de fibrina aumenta, são desencadeadas reações para dissolver a fibrina e restringir o coágulo à área lesada da parede vascular. A ativação da fibrinólise é normalmente uma resposta fisiológica ao depósito de fibrina *in vivo*. Este sistema é constituído por um zimógeno (o plasminogênio), uma protease ativa (plasmina), além de ativadores (ativador tecidual do plasminogênio, uroquinase e calicreína plasmática) e inibidores (inibidor do ativador do plasminogênio e α_2 -antiplasmina).

Hemostasia Primária

A vasoconstrição após uma lesão parece ser uma reação intrínseca de pequenos vasos sanguíneos, particularmente as pequenas arteríolas e os esfíncteres precapilares. A vasoconstrição após a lesão pode produzir uma grande redução ou estancar o fluxo sanguíneo, que sozinho pode ser hemostático em pequenos vasos (KWAAN HC *et al.*, 1971).

Grandes quantidades de serotonina (5-Hidroxitriptamina) são liberadas pelas plaquetas, na fase da hemostasia primária, tendo uma provável importância na vasoconstrição local. Estudos experimentais demonstraram que a infusão de serotonina diminui a fragilidade vascular e a formação espontânea de petéquias em animais trombocitopênicos (SHEPRO D, 1982).

O tromboxane A₂ é um peróxido lipídico que é sintetizado e liberado pelas plaquetas ativadas e induz a contração da musculatura lisa, efeito este que constitui um importante mecanismo hemostático (ELLIS EF *et al.*, 1976). Várias outras substâncias vasoconstritoras podem ser liberadas ou geradas durante a formação do coágulo de fibrina, como o fibrinopeptídeo B (COLMAN RW *et al.*, 1967), a adrenalina e a noradrenalina (MILLS DCB, ROBERTS GC, 1967).

Por outro lado, alguns produtos da degradação do fibrinogênio inibem a contratilidade da musculatura lisa. A prostaglandina E₂, a histamina (BAEZ S. 1969) e a prostaciclina atuam como vasodilatadores. A trombina pode atuar de forma vasoconstritora (HAVER VM, NAMM DH, 1984; YONCE LR *et al.*, 1977) ou vasodilatadora (JANSSENS WJ, VERHAEGHE RH, 1982).

O endotélio é um importante regulador da hemostasia e fisiologicamente exerce um papel anti-trombótico, através de vários mecanismos como a síntese e liberação de prostaciclina, produção do fator de relaxamento do endotélio (EDRF), ligação e clivagem da trombina, expressão do receptor trombomodulina e síntese do ativador tecidual do plasminogênio. Ao mesmo tempo, as células endoteliais participam da ativação da coagulação, pela liberação ou expressão de substâncias procoagulantes quando ocorre uma lesão (GALDAL KS *et al.*, 1983) ou exposição a endotoxinas, interleucina-1 ou fator de necrose tumoral. O endotélio é a maior fonte

de subunidades de grande peso molecular de vWF (vWF), que é liberado pelas células endoteliais após exposição à fibrina (RIBES JÁ *et al.*, 1987), uma lesão, ou à administração de vasopressina.

As células endoteliais possuem receptores de membrana para os fatores IX e X (HEIMARK RL, SCHWARTZ SM, 1983), facilitando a aproximação destes com os fatores V (ANNAMALAI AE *et al.*, 1986) VIII, e o fator tissular secretado pelas células endoteliais, constituindo “in situ” uma via de coagulação capaz de formar trombina na superfície do endotélio (NAWROTH PP *et al.*, 1986). As células endoteliais também ligam grandes quantidades de fibrinogênio, fibronectina (WITTE S., 1983) e trombina.

Em mamíferos, a maior função das plaquetas é a hemostasia (MACFARLANE RG, *et al.*, 1970), em que essas células desempenham um papel tanto mecânico quanto bioquímico. As plaquetas circulantes normalmente não interagem com a superfície endotelial ou com outras células sangüíneas, pelo fluxo sangüíneo laminar e concêntrico. Qualquer alteração do fluxo ou da parede endotelial pode desencadear uma ativação plaquetária.

A adesão plaquetária é definida como a união das plaquetas à superfícies não plaquetárias (MICHAELI D, ORLOFF KG, 1976). Em feridas experimentais, este processo é o primeiro evento detectável após a lesão vascular (ADAMS GA, 1985). As plaquetas aderem principalmente às fibras de colágeno do subendotélio exposto, que servem como sítio de adesão plaquetária (HUGUES J, MATHIEU P, 1970; JAMIESON GA, 1974), havendo um consumo de energia (COPOBIANCO JO *et al.*, 1981). Este processo é multifatorial (ANTTINEN H *et al.*, 1979; SHADLE PJ, BARONDES SH, 1984) e envolve receptores específicos em ambos; colágeno e plaqueta (KOTITE NJ, CUNNINGHAM LW, 1986) e o vWF (vWF).

As subunidades de alto peso molecular do vWF são essenciais para a adesividade plaquetária, constituindo a ligação inicial entre as plaquetas e o colágeno subendotelial (Figura 1) (BOCKENSTEDT P *et al.*, 1986). Este fator é produzido e secretado pelas células endoteliais e megacariócitos. O vWF liga-se a receptores de membrana plaquetária, denominados glicoproteína Ib e glicoproteína IIb-IIIa.

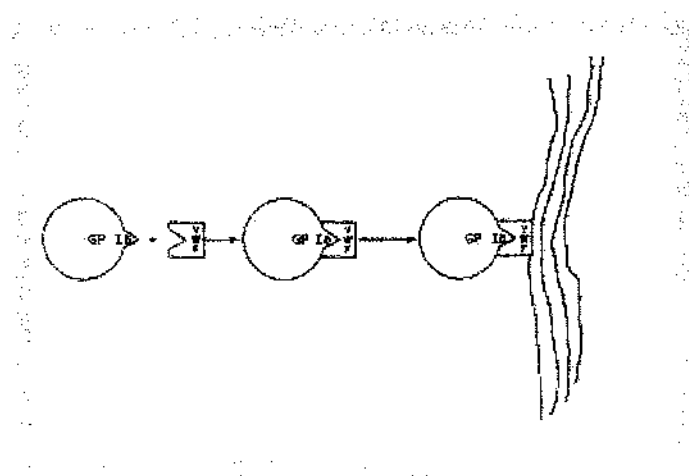


Figura 1: Diagrama Simplificado da Adesão Plaquetária ao Colágeno. Outras proteínas adesivas além do vWF podem estar envolvidas. vWF – fator de von Willebrand, GP Ib- glicoproteína plaquetária Ib.

A importância da glicoproteína Ib para a adesividade plaquetária fica evidente na Síndrome de Bernard-Soulier (COLLER BS *et al.*, 1983), caracterizada pela deficiência dessa glicoproteína e um quadro clínico de sangramento cutâneo-mucoso.

O vWF também se liga a glicoproteína IIb-IIIa em plaquetas trombina-ativadas (NOKES TJC *et al.*, 1984), e portanto participa da agregação plaquetária (FUJIMOTO T, HAWIGER J, 1982), particularmente quando a quantidade de fibrinogênio presente é deficiente (HAWIGER J, 1986).

Vias da Coagulação Sangüínea

A coagulação pode ser ativada por duas vias diferentes: pela via extrínseca, que é iniciada pela liberação de fator tecidual dos tecidos adjacentes ao vaso lesado, ou pela via intrínseca, que se inicia pela ligação do fator XII a uma superfície ativadora, o colágeno exposto do subendotélio. Estas duas vias convergem em uma via comum, após a ativação do fator X. Em ambas as vias -

extrínseca e intrínseca - uma série de proteínas plasmáticas, os fatores de coagulação sanguínea, em sua grande maioria formas inativas de enzimas proteolíticas, são convertidas em sua forma ativa, e desencadeiam as reações enzimáticas sucessivas, conhecidas como cascata da coagulação (TUDDENHAM & COOPER, 1994), (Figura 2).

Via Intrínseca da Coagulação

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

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

Via Extrínseca da Coagulação

A Via Extrínseca da coagulação leva somente alguns segundos para produzir o coágulo, ao contrário da via intrínseca, que leva alguns minutos. Por ser acionada a partir de um componente externo ao sangue, é chamada portanto de Via Extrínseca. O fator responsável pelo início da Via Extrínseca é o fator tecidual, uma apoproteína integrada à superfície das membranas de diferentes tipos celulares, e particularmente evidente nas células subendoteliais da parede vascular, cérebro e placenta (TUDDENHAM & COOPER, 1994). O fator tecidual, na coagulação, é totalmente ativo na sua forma nativa, não necessitando de modificações para seu papel de cofator. Isto somente é possível já que em condições normais ele não está exposto na circulação. O rompimento da parede vascular permite que o fator VII presente no plasma se ligue aos sítios do fator tecidual, originando o complexo fator VII/fator tecidual. Observa-se também a formação de um complexo entre o fator VII ativado e o fator tecidual, que circula no sangue em menor proporção, e este complexo cliva o fator X da mesma forma que é clivado no complexo tenase. O fator X ativado gerado a partir desta via é responsável pela ativação do fator VII complexado com o fator tecidual, amplificando a resposta do organismo aos danos do sistema vascular (RAO e RAPAPORT, 1988). O complexo fator VII ativado/fator tecidual ativa o fator IX que quando ativado, age no complexo tenase, na via intrínseca. O fator X ativado interage com o fator V ativado no complexo protrombinase que é responsável pela formação de trombina e polimerização dos monômeros de fibrina.

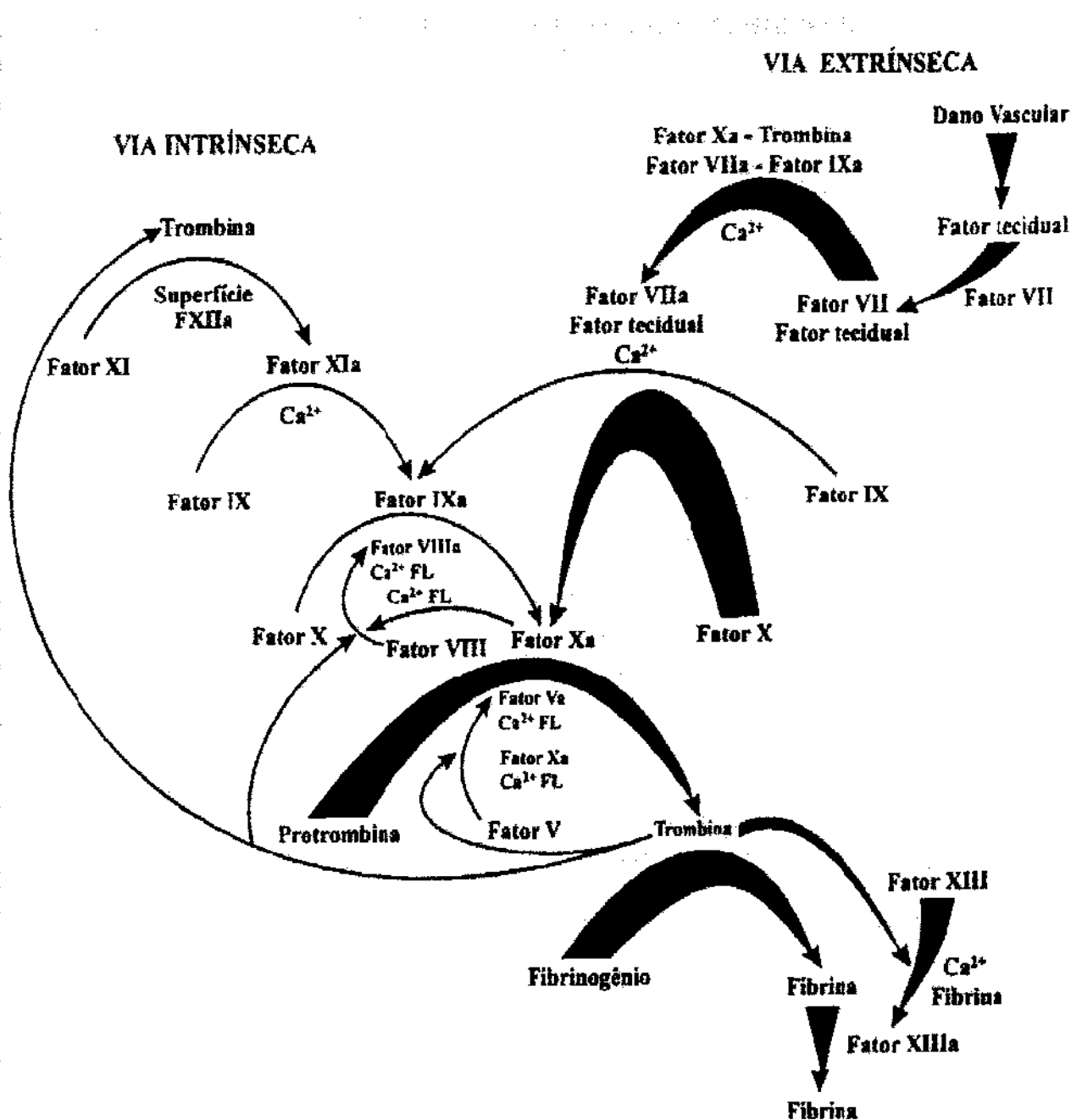


Figura 2: Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação Sangüínea. A ativação da via extrínseca da coagulação ocorre após dano vascular e exposição do fator tecidual ao sangue. A via intrínseca se inicia a partir da ativação do fator XII e também pode ser iniciada quando a trombina gerada, levando à ativação do fator XI. As duas vias convergem na ativação do fator X. Os fatores ativados são indicados pela letra "a" (XIa, Xa, IXa, etc.) e FL são fosfolípidios. Retirado de DAVIE *et al.*, 1991.

Mecanismos Reguladores da Coagulação

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

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

O TFPI é uma proteína relacionada com a formação de um complexo inibitório com o fator X ativado. Este complexo se liga ao complexo fator tecidual/fator VII ativado formando portanto um complexo inibitório quaternário com perda da atividade catalítica do complexo fator VII ativado/fator tecidual.

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

A formação de trombina também tem um papel importante na anticoagulação já que esta participa da Via Anticoagulante da Proteína C. Nesta etapa é necessária a presença de um receptor, a trombomodulina, que é expresso na superfície das células endoteliais e tem alta afinidade pela trombina (ESMON, 1987b; ESMON & OWEN, 1981). Quando a trombina se liga a esse receptor, sua atividade procoagulante é perdida e ao mesmo tempo, esse complexo trombina-trombomodulina ativa a anticoagulação através da ativação do zimógeno da proteína C em uma potente serina protease anticoagulante, a proteína C ativada, com especificidade pelos fatores V e VIII ativados, dando início a Via Anticoagulante da Proteína C (ESMON & OWEN, 1981; ESMON & ESMON, 1984).

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

Notou-se que a atividade anticoagulante e pró-fibrinolítica da proteína C podia ser aumentada na presença de uma outra proteína vitamina K-dependente: a proteína S (WALKER, 1980; GARDINER *et al.*, 1984; WALKER, *et al.*, 1987; DE FOUW, *et al.*, 1986). Da mesma forma que a proteína C, esta proteína é um importante inibidor da coagulação, exercendo seu papel tanto como cofator da proteína C como com uma atividade direta sobre o fator V ativado.

Fator de von Willebrand

Estrutura e função do fator de von Willebrand

O vWF atua na hemostasia primária formando uma ponte entre as plaquetas e as estruturas subendoteliais vasculares. Na hemostasia secundária, atua como proteína carreadora do fator VIII coagulante.

O vWF é uma glicoproteína multimérica, sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos (Jaffe *et al.* 1973, Nachman *et al.* 1977). Ele circula sob a forma de vários multímeros de tamanho crescente, e o maior deles tem peso molecular estimado em cerca de 20×10^6 Da (Titani *et al.* 1986). Protômeros de aproximadamente 2×10^5 Da constituem os multímeros, e cada protômero é constituído por duas subunidades monoméricas idênticas de 22×10^4 Da. A repetição da estrutura é importante porque proporciona grande número de sítios de ligação, entre o vWF e as plaquetas, e entre as plaquetas e o colágeno do subendotélio vascular. Os maiores multímeros do vWF estão presentes nas plaquetas e células endoteliais e em virtude do seu tamanho e da maior quantidade de sítios de ligação, são funcionalmente mais ativos.

O produto primário de síntese do vWF é um polipeptídeo denominado pré-pró-vWF. Logo após sua síntese, ocorre a dimerização destes monômeros polipeptídicos, através de pontes dissulfídicas formadas entre os resíduos de cisteína na porção C-terminal. Simultaneamente, ocorre a glicosilação pela adição de carboidratos ricos em manose à porção N-terminal. Posteriormente, as formas ricas em manose multimerizam-se, conhecido como antígeno II de von Willebrand. Este antígeno é essencial para que os dímeros polimerizem-se constituindo os grandes multímeros. A interrupção da polimerização é atribuída à clivagem da porção terminal do pró-peptídeo, antes que um novo dímero seja adicionado. Este tipo de interrupção de polimerização “ao acaso”, poderia explicar a enorme variação no tamanho dos multímeros formados.

A regulação fisiológica da secreção do vWF, depende da manutenção de um nível basal para ligação ao fator VIII, e de uma resposta à injúria vascular, com a liberação de multímeros de alto peso molecular nos locais de ligação entre as plaquetas e o colágeno subendotelial.

O vWF circula no plasma numa concentração de aproximadamente $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou 50-200 U dL^{-1} quando comparado a um plasma de referência normal (Kelly *et al.* 1985).

Um fragmento de 116 kDa, localizado na posição 449-728, é responsável pela agregação plaquetária induzida pela ristocetina, e possui o sítio de ligação com a glicoproteína de membrana plaquetária Ib (Mohri *et al.* 1989). Este segmento contém 2 pontes dissulfídicas internas, Cys 471-474 e Cys 509-695. Um loop na posição 187, relacionado ao domínio A1, é crítico para a formação do sítio de ligação com a glicoproteína Ib. Mutações nessa região são responsáveis por fatores hiperreativos, encontrados na vWD tipo IIB.

Inicialmente ocorre a ligação do vWF ao colágeno subendotelial, seguida da ligação à glicoproteína plaquetária Ib. Como esta reação não ocorre na circulação sanguínea, acredita-se que a ligação com o colágeno induz alterações conformacionais na molécula do vWF, para que o mesmo se ligue a glicoproteína Ib. O antibiótico ristocetina promove essas mudanças conformacionais na molécula, induzindo a aglutinação plaquetária em solução, podendo ser utilizado como método laboratorial de auxílio no diagnóstico da vWD. O tamanho dos multímeros é um fator importante na adesão plaquetária, sendo necessária a presença de multímeros de alto peso molecular.

O vWF também se liga à glicoproteína IIb/IIIa, um receptor de membrana plaquetária exposto após a ativação da plaqueta. A própria ligação do vWF à glicoproteína Ib pode ativar a plaqueta, com exposição da glicoproteína IIb/IIIa, resultando numa ligação com uma maior quantidade de moléculas do vWF e de outras proteínas de aderência e, por fim, na agregação plaquetária. O vWF presente dentro da plaqueta também é secretado e liga-se principalmente à glicoproteína de superfície IIb/IIIa. O sítio de ligação com a glicoproteína IIb/IIIa é um tetrapeptídeo encontrado na posição 1744-1747 (Weiss *et al.* 1987, Fressinaud *et al.* 1986).

Resultados de vários estudos *in vitro* (GRALNICK HR *et al.*, 1985; RUGGERI ZM, ZIMMERMAN TS, 1985, SHADLE PJ, BARONDES SH, 1984) tem confirmado que, durante a adesão ao colágeno, o vWF, mais particularmente a subunidade dimérica de 440.000 Daltons, primeiro se liga ao NH_2 terminal 670 da GP Ib plaquetária (HANDA M *et al.*, 1986; KOA KJ *et al.*, 1979), e subsequente ao sítio de ativação plaquetária GP IIb-IIIa (PIETU G *et al.*,

1987). O vWF que é secretado pelas plaquetas liga-se preferencialmente ao sítio da GP IIb-IIIa (PARKER RI, GRALNICK HR, 1986). A adesão ao colágeno não requer a presença de Ca^{2+} , mas depende de uma síntese normal de prostaglandina (COWAN DH, 1981; DIMINNO G *et al.*, 1984), e pode envolver preferencialmente grandes multímeros de vWF (SANTORO AS, 1983).

O vWF liga-se ao fator VIII de forma não covalente, e essa ligação é essencial para a sobrevivência plasmática do fator VIII. A proporção de ligação é de 15 moléculas de vWF para 1 de fator VIII. O sítio de ligação com o fator VIII está localizado na porção N-terminal do vWF, entre os resíduos Thr 28-Thr 96. A presença do pró-poli-peptídeo do vWF e de pontes dissulfídicas é indispensável para a formação desse sítio de ligação com o fator VIII. Níveis reduzidos, ou um sítio de ligação anômalo na molécula do vWF, acarretam a depuração rápida e concentração plasmática diminuída do fator VIII, nos pacientes com a vWD. Em geral, a redução do nível do fator VIII é proporcional a redução do vWF nos pacientes com a forma clássica da doença; porém, se houver um sítio de ligação anômalo, o fator VIII apresentará níveis mais reduzidos e o diagnóstico inclusive pode ser confundido com hemofilia A (Foster *et al.* 1987b, Leyte *et al.* 1991b).

Caracterização molecular do fator de von Willebrand

O cDNA do vWF compreende 8794 pb, e um mRNA de 8825 pb. Uma porção de 8439 pb codifica a síntese de uma sequência de 2813 aminoácidos, que compreende um peptídeo sinalizador de 22 aminoácidos, seguido por um pró-peptídeo de 741 aminoácidos (que corresponde ao antígeno II) e uma sequência de 2050 aminoácidos. Em adição, há uma região 5' e 3' não transcrita, de 250 e 136 pb, respectivamente, totalizando os 8825 pb.

O gene do vWF possui 178 kb e compreende 52 exons e 51 introns, sendo portanto o mais complexo gene relacionado a uma proteína de coagulação (Mancuso *et al.* 1989).

Um número significativo de repetições Alu estão presentes no gene, e são potencialmente importantes para o estudo de mutações, uma vez que essas repetições foram frequentemente

implicadas em eventos de recombinação ilegítimos, levando a duplicações ou deleções (Assouline *et al.* 1988).

Somente 6 dinucleotídeos Cpg foram identificados numa sequência de 1100 pb a montante do gene, incluindo o exon 1, sendo uma frequência muito baixa e em contraste com o restante do gene. Portanto, a metilação parece não ter nenhum papel na regulação do gene.

Aproximadamente, 20 RFLPs bialélicos foram detectados no gene do vWF, com a utilização de 6 enzimas de restrição. Contudo, um problema potencial é a hibridização cruzada com a sequência homóloga do vWF no cromossomo 22.

O gene do vWF está localizado no cromossomo 12, locus 12p12 (Ginsburg *et al.* 1985). Uma cópia correspondente aos exons 23-34 do gene do vWF está presente no cromossomo 22, apesar de haver uma divergência de 3,1% na sequência de nucleotídeos (Mancuso *et al.* 1991). Como essa sequência contém um número de sítios de junção, “frameshifts” e mutações nonsense, parece corresponder a um pseudogene, (Figura 3).

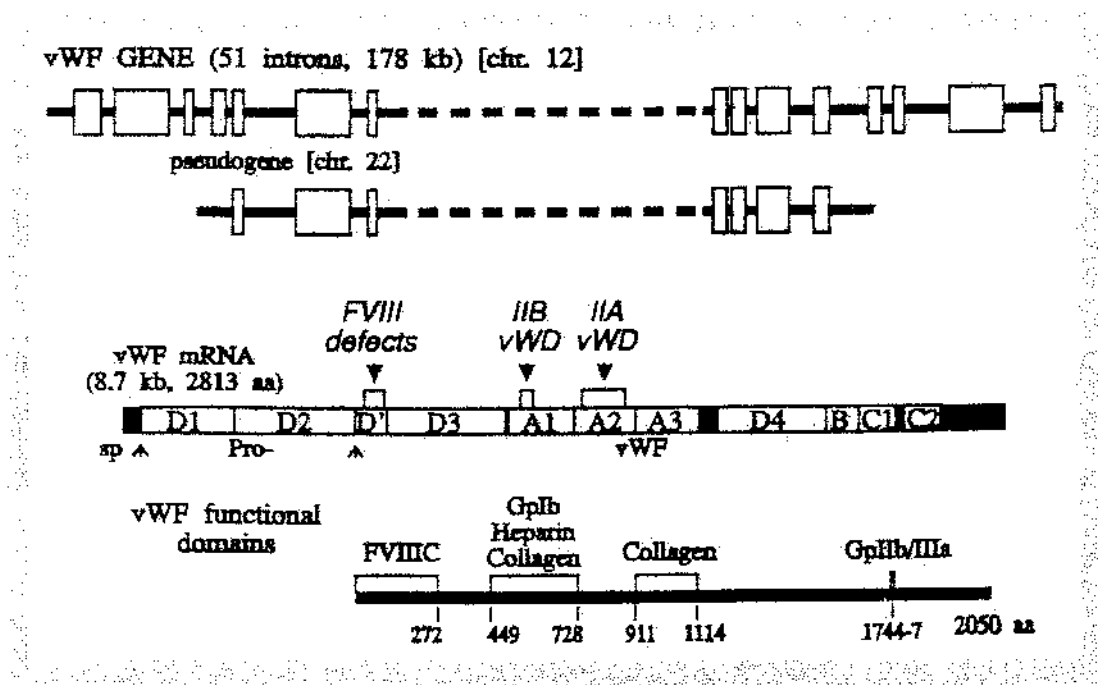


Figura 3: Esquema do Gene do Fator de von Willebrand, cDNA, e Domínio Estrutural da Proteína. Retirado de Ginsburg D., Bowie E.J.W. Molecular genetics of von Willebrand Disease. *Blood* 79:2507-2519, 1992.

Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR)

Quatro repetições de nucleotídeos em número variável (VNTR) foram encontrados no intron 40 do gene. Esses VNTRs são altamente informativos, exibindo 66 e 77% de heterozigosidade, e como podem ser detectados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), são muito úteis para o estudo de segregação da doença (Casaña *et al.* 1995, Gaucher *et al.* 1992).

O DNA repetitivo consiste de famílias de seqüências que, embora não sejam necessariamente iguais, são bastante relacionadas. Os membros de uma determinada família são seqüências nucleotídicas geralmente curtas e suficientemente similares para, renaturarem umas com as outras. As diferenças entre membros individuais são o resultado de substituições, inserções e deleções que acontecem com freqüência relativamente elevada, facilitada pela ocorrência de *crossing-over* desigual. A proporção de ocorrência de tais modificações é que estabelece o nível de “parentesco” entre essas seqüências, posicionando-as dentro de famílias específicas. Todos os eucariotos superiores possuem DNA repetitivo em abundância, havendo uma tendência ao longo da escala evolutiva, de aumento de sua proporção com o aumento do tamanho do genoma.

No genoma humano, aproximadamente 30% é constituído por seqüências repetidas pelo menos 20 vezes, entre elas as seqüências Alu, os elementos genéticos móveis, e os DNAs satélites.

Os DNAs satélites são seqüências altamente repetitivas que apresentam densidades de flutuação distintas, podendo ser isoladas do restante do DNA por ultracentrifugação, como bandas satélites. Essas seqüências têm uma participação no processo de alinhamento dos cromossomos, durante a divisão celular.

Os microssatélites constituem repetições de no máximo 6 bases, e devido a alta taxa de mutação parecem ter um papel importante na evolução. O genoma humano contém aproximadamente 100.000 microssatélites, e 10% destes estão localizados no gene. Muitos dos microssatélites estão localizados dentro ou próximos a genes envolvidos na regulação de processos celulares essenciais. Uma variação no comprimento desse microssatélites pode ocorrer na fase inicial do desenvolvimento de uma neoplasia. Ainda pelo fato desses microssatélites variarem de um indivíduo para outro, podem ser utilizados nos testes de paternidade e em processos criminais. Também tem sido descritas doenças associadas com alterações nos números de repetições de trinucleotídeos, a maioria relacionada a doenças neurológicas, e mais da metade

envolvendo a codificação de glutaminas. Outras estão tão próximas do gene envolvido na doença, que alterações dos microssatélites provavelmente podem afetar sua função.

Uma substancial variação alélica no número de unidades repetitivas ocorre por um *crossing-over* desigual ou por uma “escorregada” na replicação (Jeffreys AJ *et al.*, 1998). Essas mutações são esporádicas, e podem envolver o ganho ou perda de um número substancial de unidades repetitivas.

Em 1989, Mancuso DJ *et al.* descreveram toda a estrutura do gene do vWF humano e encontraram no intron 40 uma região com um número variável de repetições em *tandem* (VNTRs), tipo (TCTA)_n, caracterizando um polimorfismo de comprimento.

Posteriormente, essas repetições do ATCT (VNTR1) foram empregadas no estudo da segregação da doença e para o diagnóstico pré-natal da vWD Tipo III (Peake IR *et al.*, 1990; Standen GR *et al.*, 1990).

Posteriormente duas novas regiões de repetições no intron 40 foram descritas, e designadas de VNTR2 (Ploos van Amstel HK and Reitsma PH, 1990) e VNTR3 (Kimpton C *et al.*, 1992), respectivamente.

Mutações espontâneas resultando em alelos de tamanhos diferentes foram encontradas, caracterizadas por acréscimo ou decréscimo no número de repetições, em estudos familiares (Eikenboom JCJ *et al.*; 1993; Casaña P. *et al.*, 1995; Haddad AP *et al.*, 1997).

Estas observações enfatizaram a possibilidade de erro em estudos familiares, diagnóstico pré-natal, estudo forense e teste de paternidade, devido à instabilidade dos VNTRs. Portanto, é altamente aconselhável a análise de polimorfismos diferentes, quando um novo alelo é identificado em um indivíduo.

A análise dos 3 VNTRs em indivíduos normais e em pacientes com vWD, demonstrou que esses 3 marcadores, especialmente o VNTR-3, constituem um rápido e confiável método para estudo de segregação da doença nas famílias estudadas (Casaña P *et al.*, 1995).

Na população brasileira alguns desses VNTRs já foram avaliados. Em 1994, Pena *et al.*, estudaram os VNTRs 1 e 2, mas utilizando como base de repetições o GATA (CTAT) e não o ATCT. Encontrou 7 alelos para o VNTR1 e 8 alelos para o VNTR2.

Zago M.A. *et al.* (1996) avaliou a frequência do VNTR 1 em 4 grupos étnicos da população brasileira, e verificou a presença de 8 alelos, com número de repetições de TCTA variando de 5 a 12.

Pelo exposto anteriormente, um importante ponto a se notar é a identidade da unidade repetitiva. Ela foi referida como **ATCT** (Peake *et al.*, 1990; Standen *et al.*, 1990; Mercier *et al.*, 1991; Gaucher *et al.*, 1992); **TCTA** (Cumming *et al.*, 1992; Ploos van Amstel & Reitsma, 1990, Eikenboom *et al.*, 1993) ou **CTAT** (Pena *et al.*, 1994). De acordo com a unidade repetitiva empregada para caracterização do alelo, o mesmo tamanho de fragmento pode ter 7 repetições **ATCT**, 6 repetições **TCTA** ou 6 repetições **CTAT**, quando obtido pela reação de PCR para o VNTR-1, utilizando-se o par de primers descrito por Cumming *et al.* (1992). A figura a seguir demonstra esquematicamente o que foi explicado anteriormente. Portanto, a padronização da unidade que se repete é necessária, quando da comparação do número de alelos entre os diversos estudos populacionais (Figura 4).

Região parcial do intron 40 do vWF humano, descrito por Mancuso DJ, 1989. Notam-se 7 repetições **ATCT**, 6 repetições **TCTA** e 6 repetições **CTAT**, em um mesmo tamanho de fragmento.

$\overbrace{\text{CTATTTATCATCTATCCTCTATC}}^{\text{1 2 3 4 5}} \text{ATCTATCTATCTATCTATCT}$
 $\overbrace{\text{ATCTATCT}}^{\text{6 7}} \text{CTATTGTATCTAGTTATCTATCCTATATCT} \text{ATGTAT}$
GTATCTATCTGTCTG

$\overbrace{\text{CTATTTATCATCTATCCTCTATCA}}^{\text{1 2 3 4 5}} \text{TCTATCTATCTATCTATCTA}$
 $\overbrace{\text{TCTA}}^{\text{6}} \text{ATCTCTATTGTATCTAGTTATCTATCCTATATCT} \text{ATGTATG}$
TATCTATCTGTCTG

$\overbrace{\text{CTATTTATCATCTATCCTCTATCAT}}^{\text{1 2 3 4 5}} \text{CTATCTATCTATCTATCTAT}$
 $\overbrace{\text{CTAT}}^{\text{6}} \text{CTCTATTGTATCTAGTTATCTATCCTATATCT} \text{ATGTATGT}$
ATCTATCTGTCTG

Figura 4: Análise à partir da Unidade Repetitiva, da Sequência de Bases do VNTR-1, localizada no intron 40.

A seguir, apresentamos um resumo dos resultados encontrados pelos diversos autores, de acordo com a unidade repetitiva empregada, no estudo dos VNTRs do intron 40 do vWF.

Unidade repetitiva: ATCT

VNTR-1

- Peake *et al.*, 1990 → Encontrou os alelos com 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, e 14 repetições
Não encontrou o alelo com 9 repetições
- Standen *et al.*, 1990 → Encontrou os alelos com 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, e 14 repetições
Não encontrou o alelo com 9 repetições
- Mercier *et al.*, 1991 → Amplificou toda a região que compreende o intron 40 do vWF, após, fez uma digestão
- Gaucher *et al.*, 1992 → Encontrou os alelos com 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, e 14 repetições
Não encontrou o alelo com 9 repetições
- Casaña P *et al.*, 1995 → Encontrou os alelos com 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, e 13 repetições
- Haddad AP *et al.*, 1997 → Encontrou os alelos com 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 repetições
- Haddad AP *et al.*, 1997 → Detectou uma mudança: alelo paterno 12 do VNTR-1 mutado p/ alelo 13 no filho

VNTR-2

- Casaña P *et al.*, 1995 → Detectou uma mudança: alelo paterno 2 do VNTR-2 mutado para alelo 3 no filho.
- Casaña P *et al.*, 1995 → Encontrou 7 alelos, mas não referiu o número de repetições de cada alelo.

VNTR-3

- Casaña P *et al.*, 1995 → Encontrou 7 alelos, mas não referiu o número de repetições de cada alelo.

Unidade repetitiva: TCTA

VNTR-1

- Eikenboom *et al.*, 1993 → Estudo familiar, analisando os VNTR-1 e 2 do intron 40.
- Zago *et al.*, 1996 → Encontrou os alelos com 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, e 12 repetições.

VNTR-2

- Ploos *et al.*, 1990 → Encontrou 6 alelos, com número de repetições de 9 a 14.
- Eikenboom *et al.*, 1993 → Fez um estudo familiar, utilizando os VNTRs 1 e 2. Encontrou uma mutação com acréscimo de uma repetição do alelo paterno para o alelo da filha, no VNTR-2.

VNTR-3

- Kimpton C *et al.*, 1992 → Encontrou 7 alelos, com número de repetições de 9 a 15.
- Khatib H *et al.*, 1997 → Encontrou 9 alelos, com número de repetições de 7,9,10,11,12,13,14,15,e,16.

Unidade repetitiva: CTAT

VNTR-1

- Pena *et al.*, 1994 → Encontrou 6 alelos com número de 6, 7, 8, 10, 11, 12, e 13 repetições CTAT.

VNTR-2

- Pena *et al.*, 1994 → Encontrou 7 alelos, mas não identificou com precisão o número de repetições, pois não realizou o seqüenciamento das amostras.

Doença de von Willebrand

Pela primeira vez descrita por Erik Adolf von Willebrand, um professor Finlandês de Helsinque (Helsingfors) em 1926 (WILLEBRAND E A von, 1926), a doença caracterizava-se por uma história de episódios de sangramento severo em muitos membros de uma família proveniente da ilha de Foglo, Åland, Golfo da Bósnia. Nesta família, vários membros morreram de sangramentos incontroláveis (Springer - Verlag *et al.*, 1996). (Figura 5)

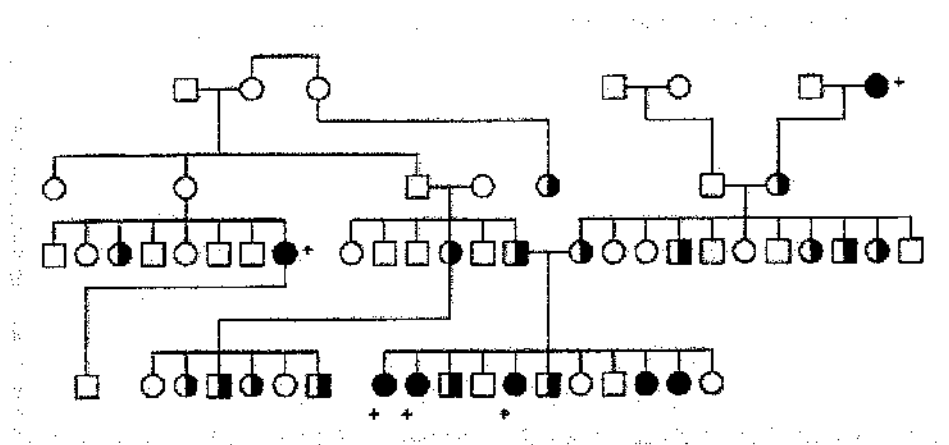


Figura 5: Árvore Genealógica da Família das Ilhas de Åland, Originalmente Descrita por von Willebrand (WILLEBRAND E A von, 1926). Membros da família com símbolo preenchido - severos sintomas de sangramento. Membros da família com meio símbolo preenchido - moderados sintomas de sangramento. Membros da família com o símbolo + significa que morreram devido à hemorragia.

Von Willebrand descreveu a doença como uma “Pseudohemofilia Hereditária” caracterizada por um defeito combinado; vascular e plaquetário, sendo transmitida por herança autossômica. Na revisão da literatura, von Willebrand verificou que já em 1876, Kehrler RA havia descrito pacientes com o diagnóstico de “hemofilia feminina”, claramente diferenciada da hemofilia clássica e outras doenças hemorrágicas. Em 1933, como resultado da cooperação entre von

Willebrand e o hematologista alemão Jürgens, à desordem hereditária com alta penetrância e expressão variável foi atribuído o nome de Trombopatia de Willebrand-Jürgens (WILLEBRAND E A von, JÜRGENS R, 1933). Todavia, o nome vWD é o mais comumente usado na literatura inglesa.

Um inesperado aumento do FVIII plasmático foi observado no plasma de pacientes com vWD, cada vez que esses pacientes eram transfundidos com plasma de pacientes com Hemofilia A, mas não vice-versa (CORNU P, LARRIEU MJ, CAEN J, BERNARD J, 1963). Este fenômeno paradoxal indicou a postulação de fator de correção do tempo de sangramento que era claramente diferente do FVIII. O novo fator, agora chamado de vWF foi também muitas vezes referido como um monômero-FVIII antígeno. A caracterização bioquímica e imunológica tem mostrado que o vWF e FVIII, embora ligados não covalentemente no plasma, são o produto de genes localizados em cromossomos separados e que suas deficiências ou anormalidades resultam em desordens sangüíneas distintas (ZIMMERMAN TS, RATNOFF OD, POWELL AE, 1971).

A vWD resulta de defeitos quantitativos ou qualitativos do vWF. Como as funções do vWF na hemostasia primária e secundária estão associadas a domínios funcionais particulares, que podem independentemente serem alterados por mutações de ponto, vários fenótipos da vWD foram identificados até o momento (SPRINGER-VERLAG, 1996).

A vWD é o mais comum dos distúrbios hemorrágicos hereditários, com prevalências descritas de 0,8 a 2% na população geral. (Rodeghiero, F; Castaman, G, Enrico, D. *et al.*, 1987; Werner-EJ; Broxson-EH, Tucker-EL *et al.*, 1993)

As manifestações hemorrágicas na maioria dos pacientes com a vWD estão relacionados com a anormalidade na hemostasia primária, caracterizando-se por sangramento cutâneo-mucoso. Muitas vezes, os pacientes são diagnosticados devido a sangramento prolongado após traumatismo ou após procedimentos cirúrgicos. Os pacientes com o tipo III são afetados mais gravemente, devido à redução significativa dos níveis do fator VIII. A história familiar geralmente é positiva nos pacientes homozigotos, porém pode ser negativa nos heterozigotos; e as anormalidades nos pais podem ser detectáveis apenas por estudos genéticos. A frequência dos pacientes gravemente afetados é estimada de 1 em um milhão.

A gravidade do sangramento pode ser variável em cada família e vários estudos têm demonstrado que esta não se correlaciona necessariamente com o grau da anormalidade nos parâmetros laboratoriais, como o tempo de sangramento, a atividade do cofator de ristocetina, a concentração do antígeno do vWF e do fator VIII, a menos que eles estejam acentuadamente alterados. Inúmeros fatores podem influir nessa expressão variável e incluem idade, grupo sanguíneo, níveis de estrógeno e gestação, estímulos adrenérgicos e inflamação (Ogston *et al.* 1983). Pessoas normais do grupo sanguíneo O têm níveis 25% menores do vWF, do que os indivíduos dos grupos sanguíneos A, B ou AB. Idade crescente, níveis elevados de estrógeno, gestação, estados inflamatórios, exercícios físicos e estímulos adrenérgicos aumentam a concentração do vWF.

Classificação dos subtipos da doença de von Willebrand

A evolução do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da vWD resultou na recente reformulação do conceito de classificação da doença, e em 1994 o Subcomitê da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose (ISTH) introduziu uma classificação revisada da vWD, apresentada na Tabela 1 (Sadler, J.E. 1994).

Esta nova classificação define a vWD como um distúrbio hemorrágico causado por mutações no locus gênico do vWF, e reflete diferenças no mecanismo fisiopatológico que resulta em fenótipos distintos. (Sadler, J. E.; Gralnick, J. R. 1994) / (Sadler, J. E.; Matsushita, T.; Dong, Z. *et al.* 1995)

Desta forma, defeitos quantitativos são divididos em deficiência parcial (vWD tipo 1) e virtualmente completa (vWD tipo 3) do fator. Defeitos qualitativos (vWD tipo 2) são divididos em 4 subcategorias (2A, 2B, 2M, e 2N) de acordo com o mecanismo pelo qual a função do vWF é alterada, a saber:

2A - Refere-se a variantes qualitativas com decréscimo da função dependente das plaquetas, que estão associadas a ausência de multímeros de alto peso molecular do vWF;

2B - Refere-se a todas as variantes qualitativas com aumento da afinidade pela glicoproteína Ib plaquetária;

2M - Refere-se a variantes qualitativas com decréscimo da função plaqueta-dependente, mas que não são causadas pela ausência dos multímeros de alto peso molecular.

2N - Refere-se a todas as variantes qualitativas de vWF com afinidade diminuída pelo fator VIII da coagulação.

Topônimos podem ser adicionados para identificar famílias individualizadas (por exemplo: “vWD tipo 2A Miami”). Heterozigose composta é indicada por dupla classificação, separadas por uma barra (por exemplo: “vWD 1 / 2N”). Quando o defeito molecular é conhecido, pode ser adicionado à classificação fenotípica para uma descrição completa (por exemplo: “vWD tipo 2M Vicenza R1308C”). Distúrbios correlatos, tais como vWD do tipo plaquetário ou pseudo-vWD, que não são decorrentes de defeitos no gene do vWF, são genericamente designados “pseudo-vWD”. Quadros não herdados que mimetizam a vWD são referidos como “Síndrome de von Willebrand Adquirida”.

A nova nomenclatura possibilita a discussão de como mutações no gene do vWF resultam em determinadas alterações em sua função biológica, e facilita a classificação da vWD na medida em que elimina a confusão do sistema previamente adotado, que fora introduzido quando a necessidade de padronizar a nomenclatura das formas variantes do vWF ainda não existia.

Tabela 1: Classificação da Doença de von Willebrand

1. Toda vWD é causada por mutações no locus gênico do vWF
 2. **vWD tipo 1:** deficiência quantitativa parcial do vWF

 vWD tipo 2: deficiência qualitativa do vWF

 vWD tipo 3: deficiência virtualmente completa do vWF
 3. **Tipo 2A:** Variantes qualitativas com diminuição da função dependente das plaqueta, que estão associadas a ausência de grandes multímeros do vWF
 4. **Tipo 2B:** Variantes qualitativas com afinidade aumentada pela glicoproteína Ib plaquetária
 5. **Tipo 2M:** Variantes qualitativas com diminuição de função dependente de plaqueta, mas que não são causadas pela ausência dos grandes multímeros do vWF
 6. **Tipo 2N:** Variantes qualitativas com diminuição da afinidade pelo fator VIII
 7. Na presença de um fenótipo misto causado por heterozigose composta, sua classificação é indicada pela separação de cada alelo, usando-se uma barra (/)
 8. Para a descrição de mutações, sistemas de numeração são sugeridos para aminoácidos e nucleotídeos
-

Alterações moleculares na doença de von Willebrand

O estudo de pacientes e famílias com vWD tipo III, através de sondas de cDNA, demonstraram grandes deleções em homozigose em vários casos. Também foi descrita deleção de um alelo associado a outro tipo de mutação no outro alelo, configurando uma dupla heterozigose (Shelton-Inloes *et al.* 1987b, Ngo *et al.* 1988, Peake *et al.* 1990a). Outros estudos falharam em mostrar deleções ou rearranjos no gene do vWF (Ginsburg *et al.* 1985, Bernardi *et al.* 1988, Schiach *et al.* 1987b, Lindstedt *et al.* 1987). Por outro lado, esses estudos, através da metodologia empregada, não avaliaram a deleção de apenas um gene, uma vez que nenhuma medida da intensidade da banda, por densitometria foi realizada.

Apesar desta crítica, muitos casos de vWD tipo III não ficam esclarecidos quando avaliados apenas pela técnica de Southern Blotting.

A pesquisa de mutações de ponto até recentemente era complicada pelo grande tamanho do gene do vWF, além da presença do pseudogene, altamente homólogo, presente no cromossomo 22.

O advento da reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitiu ultrapassar este problema e primers específicos para a seqüência do gene foram delineados.

Atualmente são inúmeras as publicações que descrevem mutações de ponto nos tipos III, II e Normandy (Ginsburg e Sadler 1993).

Em resumo, as bases moleculares dos diferentes subtipos da vWD estão relativamente estabelecidas.

A maioria das mutações responsáveis pelo tipo IIA ocorrem no exon 28, numa região que codifica um segmento de 134 aminoácidos, homólogo ao domínio A2 do vWF.

Essas mutações podem subsequenteemente ser subdivididas em mutações associadas com o transporte intracelular anormal, resultando num decréscimo na secreção do vWF e numa perda seletiva dos multímeros de alto peso molecular (grupo 1), ou na secreção de multímeros que apesar de aparentemente normais, são muito sensíveis à proteólise plasmática (grupo 2).

As mutações que causam o tipo IIB estão localizadas numa porção do exon 28, que codifica uma região homóloga ao domínio A1. É nessa região que está presente o sítio de ligação com a glicoproteína Ib, e a mutação leva a uma alta afinidade pela glicoproteína Ib, (Figura 6).

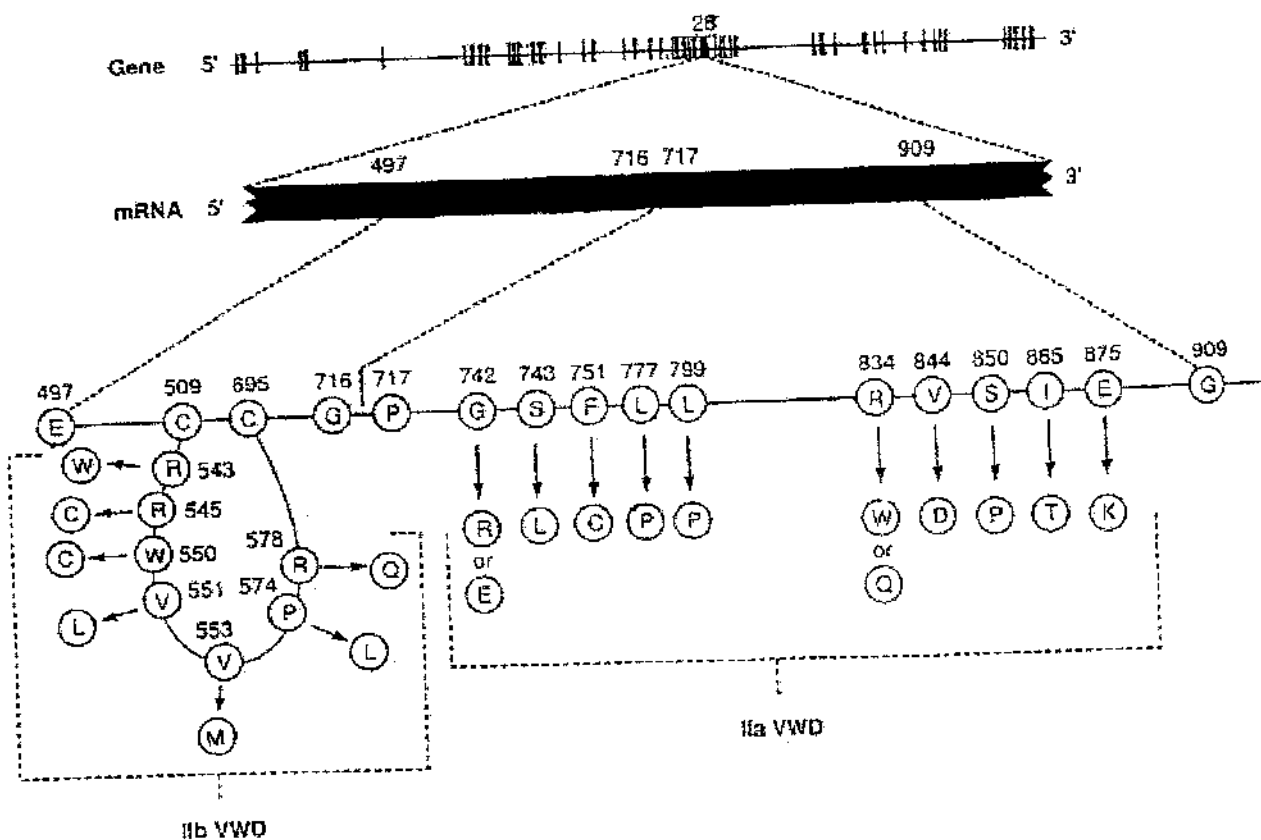


Figura 6: Mutações nas repetições A1 e A2 do Fator de von Willebrand, causando respectivamente o tipo IIB e IIA da vWD são descritas. As repetições A1 e A2 são codificadas pelo exon 28 do gene do vWF. Retirado de Ewenstein BM, Handin RI, von Willebrand's disease. In: Handin RI, Stossel TP, Lux, eds. *Blood: Principles and practice of hematology*. Philadelphia: J.B. Lippincott., In press.

Por fim, o tipo III geralmente decorre de deleções ou de mutações nonsense nos códons 365, 896 ou 1772.

Objetivos

Tendo em vista que:

- A doença de von Willebrand é a doença hemorrágica mais freqüente;
- Que em nossa região sua prevalência não é conhecida;
- Que nossa população difere de outras populações estudadas quanto a freqüência de outras doenças;
- Que o VNTR-3 ainda não foi caracterizado na população brasileira;
- Que os 3 VNTRs no gene do vWF ainda não foram determinados em pacientes brasileiros com vWD;

Este projeto teve por objetivos:

- Determinar a prevalência da vWD numa população brasileira.
- Determinar a faixa de normalidade da concentração plasmática de fator VIII e de cofator de ristocetina numa população brasileira considerada normal.
- Determinar a freqüência alélica de 3 VNTRs no intron 40 do gene do vWF, numa população brasileira normal composta por 51 caucasóides, e em 25 portadores de vWD.
- Determinar a freqüência alélica dos 3 VNTRs no intron 40 do gene do vWF em 8 famílias com diagnóstico vWD, para análise de informatividade.

Casuística

População de Doadores de Sangue

Para determinação da concentração plasmática de fator VIII e de cofator de ristocetina, assim como da prevalência da vWD foram analisados 813 doadores de sangue do Hemocentro/Unicamp. Esses doadores vêm de toda macro-região de Campinas, sendo portanto uma amostra representativa da região.

É importante ressaltar que esses doadores de sangue só chegaram ao setor de coleta após terem passado pelo processo de seleção do Hemocentro, onde são observados alguns critérios de exclusão como relacionamento sexual de risco, anemia, utilização de medicamentos, doenças virais, hipertensão/hipotensão arterial, história de neoplasia, diabetes, infecção recente, transfusão nos últimos 12 meses, e presença de tatuagem.

O nosso único critério de exclusão na seleção foi o doador ser do sexo feminino, devido a variação do nível de Fator VIII e vWF nas mulheres, devido a influência hormonal.

Os doadores foram convidados a participar do Projeto de Pesquisa, e somente após responderem a um questionário (**cópia em anexo 1**) e assinarem uma Autorização (**cópia em anexo 2**), é que o sangue foi coletado.

A anamnese somente foi considerada “positiva” para doença hemorrágica, quando o doador apresentava pelo menos 2 sintomas hemorrágicos. O antecedente familiar somente foi considerado “positivo” quando 2 membros da família apresentavam história familiar de sangramento.

Controle Caucasóide

A frequência alélica dos 3 VNTRs do gene do vWF, foi determinada em um banco de DNA composto por 51 amostras de caucasóides do Laboratório de Pesquisa em Hemostasia do Hemocentro. Para seleção desse grupo, os indivíduos foram entrevistados e selecionados somente quando na família não havia qualquer miscigenação nos ascendentes até a terceira geração.

Pacientes e Famílias com Doença de von Willebrand

Foram incluídos no estudo dos VNTRs, 25 pacientes do Ambulatório de Hemostasia com diagnóstico de vWD. Após a revisão de prontuários médicos, o diagnóstico foi confirmado, baseado na história clínica, estudo familiar e pelos resultados laboratoriais do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro (dosagem de fator VIII, cofator de ristocetina, dosagem de antígeno do vWF e agregação plaquetária).

Os casos em que estavam disponíveis somente amostras de DNA do paciente e de 1 ou 2 familiares, foram incluídos apenas no estudo da frequência dos VNTRs na população com vWD.

Todos os familiares dos pacientes foram convocadas para estudo da segregação dos VNTRs com a vWD. Apenas 8 pacientes nos quais havia disponibilidade de amostras de DNA de vários familiares é que foram selecionados para o estudo.

A seguir, apresentamos uma relação de pacientes, com nº de registro, nome e classificação do tipo de vWD, utilizados no estudo da frequência dos VNTRs (Tabela 2).

Critérios Empregados para o Diagnóstico de vWD

- Dosagem de fator VIII e cofator de ristocetina diminuídos, com pelo menos um deles repetidamente diminuído, com ou sem diminuição do antígeno do vWF.
- Dosagem de fator VIII e/ou cofator de ristocetina diminuídos, associado à diminuição do antígeno do vWF.
- Os resultados de fator VIII e cofator de ristocetina foram considerados diminuídos após o cálculo da variação normal na população de doadores, de acordo com o grupo sanguíneo O e Não °

Tabela 2: Pacientes Pertencentes ao Estudo da Frequência dos 3 VNTRs

Paciente	Nome	Tipo de vWD
vW-1	N. C. F.	Tipo I
vW-6	F. D. R.	Tipo III
vW-23	S. da S. C.	Tipo III
vW-28	G. R. A.	Tipo II
vW-30	T. L. de L. C.	Tipo II
vW-31	E. M. de S.	Tipo II
vW-35	R. de F. M.	Tipo III
vW-36	V. M. M.	Tipo II N
vW-41	R. L.	Tipo II B
vW-43	J. M. R.	Tipo I
vW-54	F. de S. F.	Tipo II
vW-56	A. M. M. B. S.	Tipo I
vW-58	R. G. dos S.	Tipo III
vW-64	D. E. O. M.	Tipo II N
vW-65	K. L.P.	Tipo II
vW-68	S. B. M.	Tipo I
vW-69	A. B.	Tipo II
vW-70	M. R. B.	Tipo II
vW-71	R. P.	Tipo I
vW-75	R. P. da S.	Tipo II
vW-76	E. E. de F.	Tipo II
vW-79	K. D. B.	Tipo I
vW-88	F. de F. G. C.	Tipo III
vW-91	A. M. P.	Tipo I
vW-102	M. S.	Tipo III

A seguir, apresentamos as famílias utilizadas no Estudo da Segregação dos 3 VNTRs com a vWD.

vW	14	R. M. R.	(Paciente)	Tipo I
	14-1	M. C. G. R..	(Esposa)	Normal
	14-2	M. M. G. R..	(Filha)	Normal
	14-3	R. H. G. R.	(Filho)	Normal
	14-4	A. F. G. R	(Filho)	Tipo I
vW	36	V. M. M.	(Paciente)	Tipo II N
	36-1	T. R. M.	(Mãe)	Normal
	36-2	M. M.	(Irmã)	Normal
HB	27	O. M.	(Pai)	Hemofílico B
vW	41	R. L.	(Paciente)	Tipo II B
	41-1	N. S. L.	(Mãe)	Tipo II B
	41-2	E. L.	(Pai)	Normal
	41-3	M. C. L.	(Irmã)	Tipo IIB
	41-4	J. H. L.	(Irmão)	Normal
vW	54	F. de S. F.	(Paciente)	Tipo II
	54-1	E. M. F.	(Pai)	Tipo II
	54-2	H. B. de S.	(Mãe)	Normal
	54-3	E. de S. F.	(Irmão)	Normal
	54-4	F. S. F.	(Irmão)	Normal
	54-5	L. de S. F.	(Irmão)	Tipo II
vW	65	K. L. P.	(Paciente)	Tipo II
	65-1	V. N. P.	(Pai)	Tipo II
	65-2	N. A. S. P.	(Mãe)	Normal
	65-3	J. M. P.	p. (Irmã)	Tipo II

<i>vW</i>	68	S. B. M.	(Paciente)	<i>Tipo I</i>
	68-1	S. B. M. P.	(Irmã)	<i>Tipo I</i>
	68-2	S. B. M.	(Irmã)	<i>Normal</i>
	68-3	J. R. M.	(Pai)	<i>Normal</i>
	68-4	M. B. L. M.	(Mãe)	<i>Tipo I</i>
<i>vW</i>	79	K. D. B.	(Paciente)	<i>Tipo I</i>
	79-1	A. D. B.	(Mãe)	<i>Tipo I</i>
	79-2	J. M. I. B.	(Pai)	<i>Normal</i>
	79-3	C. D. B.	(Irmã)	<i>Normal</i>
	79-4	K. J. B.	(Irmão)	<i>Tipo I</i>
<i>vW</i>	109	T. F. G. S. M.	(Paciente)	<i>Tipo I</i>
	109-1	L. S. C. M.	(Filho)	<i>Normal</i>
	109-2	K. S. C. M.	(Filha)	<i>Normal</i>
<u><i>TR</i></u>	<u>855</u>	<u>M. A. C. M.</u>	<u>(Marido)</u>	<u><i>Normal</i></u>

Material e Métodos

Coleta de Sangue

O sangue foi colhido de veia periférica, em tubos Vacutainer.

Para o exame de coagulação foi colhido sangue em citrato de sódio, numa concentração de 3,8%, na proporção de 9:1. Após a coleta, o sangue foi centrifugado no máximo em 30 minutos, “aliquotado” e congelado a -80°C até sua utilização.

Para extração do DNA foi colhido sangue com EDTA, e os leucócitos foram separados conforme as etapas seguintes: (1) centrifugação da amostra por 10 minutos a 2000 rpm para desprezar o plasma; (2) lise das hemácias por adição de uma mistura de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01M; (3) repouso à temperatura ambiente por 15 minutos; (4) centrifugação por 20 minutos a 2000 rpm, com remoção do sobrenadante e congelamento do *pellet* de leucócitos a -70°C .

Determinação do Fator de von Willebrand

A atividade do vWF foi realizada pela técnica de cofator de ristocetina (Macfarlane *et al.*, 1975).

Determinação do Cofator de Ristocetina

Foram colhidos 6 tubos cônicos de sangue de um único doador, perfazendo 60 ml, na proporção de 9:1 de anticoagulante ACDC. O sangue foi centrifugado a 1000 rpm por 16 minutos; para obtenção do plasma rico em plaquetas. O plasma foi transferido para 2 novos tubos cônicos e somente se a contagem das plaquetas nesse plasma estivesse acima de 300 K/ μl é que o mesmo foi utilizado. Quando a contagem de plaquetas foi inferior a esse número, realizava-se uma nova coleta, de outro doador.

A partir desta etapa, o plasma foi novamente centrifugado a 2100 rpm por 11 minutos, para que as plaquetas se precipitassem e o sobrenadante foi desprezado.

Em cada tubo contendo as plaquetas adicionou-se 2 ml de Tampão de Lavagem, ressuspendeu-se as plaquetas com cuidado e completou-se o volume para 10 ml com o mesmo tampão.

Os tubos foram novamente centrifugados a 2100 rpm por 11 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Cada precipitado foi ressuspenso cuidadosamente com 2 ml de Krebs, e após juntar o volume dos 2 tubos em só um, completou-se com 8 ml de Krebs.

O número de plaquetas desse concentrado de plaquetas foi padronizado entre 300 e 400 K/ μ l, fazendo-se as diluições necessárias com o tampão de Krebs.

O agregômetro (marca *Payton*) foi então zerado com as soluções a seguir:

90%	200 μ l de Pool	+	200 μ l de Krebs
0%	200 μ l de Pool	+	200 μ l de suspensão plaquetária

Iniciou-se então a realização de uma curva, através de diluições obtidas com o concentrado de plaquetas preparado anteriormente e o tampão de Krebs.

100%	1/4→	300 μ l de Pool	+	900 μ l de Krebs
50%	1/8→	600 μ l 1/4	+	600 μ l de Krebs
25%	1/16→	600 μ l 1/8	+	600 μ l de Krebs

Para cada diluição foi realizada uma agregação, colocando-se em uma cuveta 200 μ l da diluição + 200 μ l de suspensão plaquetária. Apenas após 2 minutos, para que a temperatura da cuveta e dos reagentes adquirissem a temperatura do aparelho, é que o mesmo foi acionado. Após 2 minutos de corrida adicionou-se 50 μ l de ristocetina 10mg/ml, previamente descongelada e mantida em banho de gelo.

Com os resultados da agregação obtidos nas 3 diluições, traçou-se uma curva, utilizando-se papel milimetrado.

Somente curvas reprodutíveis foram consideradas para dosagem das amostras dos doadores.

Posteriormente, realizou-se a dosagem de cofator de ristocetina em um pool de plasmas normais, contendo pelo menos amostras de 20 indivíduos diferentes, considerando-se aceitável se o resultado estivesse entre 90-110%. Também realizou-se a dosagem de um plasma controle, que anteriormente apresentava resultado de 100% de cofator de ristocetina.

Para dosagem das amostras dos doadores, fez-se uma diluição como descrita a seguir:

1/4 → 300µl de Krebs + 100µl da amostra em um tubo plástico.

O método de dosagem no agregômetro foi o mesmo utilizado na confecção da curva padrão.

Determinação do Antígeno do Fator de von Willebrand

O antígeno do vWF foi determinado utilizando-se um anticorpo monoclonal, baseado na técnica de ELISA (Furlong *et al.*, 1988), utilizando-se o kit Asserachrom da Diagnostica Stago, e os resultados expressos em %; ou, pela técnica de eletroimunodifusão, utilizando-se o kit Rellplate vWF da American Diagnostica, e os resultados expressos em %.

Determinação da Atividade do Fator VIII

Para a execução do teste, foi empregado o método cogulométrico de um estágio, utilizando-se plasma deficiente em fator VIII, da marca Dade, reagente de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e coagulômetro de leitura foto-óptica Koagulab 32-S, da marca Ortho Diagnostic Systems. Os resultados foram obtidos a partir de uma curva de calibração realizada com um “pool” de plasmas normais em diluições seriadas que partiram de 1:5 (100%) até 1:320 (1.56%) em tampão veronal. Somente quando a curva era reprodutível é que a dosagem tanto do controle comercial como das amostras do doadores foi realizada. Antes

de iniciar a dosagem no plasma dos doadores, foi realizada a dosagem de fator VIII em um plasma de referência comercial, cujo resultado não poderia ser maior ou menor que 10% do valor fornecido pelo fabricante. A diluição da amostra foi realizada em tampão veronal 1:5 (100%). Os valores foram expressos em porcentagem.

Crêterios para Padronização de Condutas, Quando da Análise dos Resultados Obtidos na Dosagem de Fator VIII e Cofator de Ristocetina, nos Doadores de Sangue

- a) As dosagens foram sempre realizadas em duplicata.
- b) Na presença de valores discordantes, o teste foi repetido por mais uma vez. Para fins de resultado, foram considerados os dois resultados concordantes.
- c) Na presença de resultados acima de 180% ou abaixo de 60%, para fator VIII; e acima de 150% ou abaixo de 50% para cofator de ristocetina, uma nova dosagem foi realizada com outra alíquota do mesmo período de coleta. Nos resultados discordantes, o teste foi repetido por mais uma vez. Para fins de resultado, foram considerados os dois resultados concordantes.
- d) Quando o resultado final mostrasse dosagem do fator VIII abaixo de 60% ou acima de 180%; ou dosagem do cofator de ristocetina abaixo de 50% ou acima de 150%, os doadores foram convocados para uma nova dosagem.
- e) Para as dosagens laboratoriais dos doadores convocados, foram empregados os cr terios dos itens a, b, c, d. Quando os resultados estavam abaixo de 60% para o fator VIII e de 50% para o cofator de ristocetina, o doador foi reconvocado.

Critérios Empregados para Exclusão de Resultados/Amostras de Dosagem de Fator VIII e Cofator de Ristocetina, para o Cálculo da Média e Desvio Padrão

O critério utilizado para exclusão de uma **amostra** foi:

- Diferença (acima ou abaixo) entre as várias dosagens com a mesma amostra, superior a 30% do valor mais elevado.

Os critérios empregados para exclusão de um **doador** foram:

- Resultado discrepante entre as amostras, superior a 50% da amostra de maior valor.
- Amostra com uma dosagem muito baixa ou muito alta, em que o doador foi convocado e não compareceu para confirmação do resultado obtido.

Caso o doador respondesse à convocação, e os resultados altos ou baixos se confirmassem, essas dosagens foram consideradas para cálculo da média e desvio padrão.

Os resultado final utilizado para o cálculo da média e desvio padrão da população, foi a média das dosagens obtidas em todas as coletas, levando-se em conta os critérios previamente descritos.

Tipagem Sangüínea

A tipagem sangüínea ABO e Rh foi realizada por método *standard*, em microplaca manual até o ano de 1998 e, a partir de 1998, feita pelo sistema automático de microplaca PK-7200, da marca OLYMPUS.

Extração do DNA

Lise de leucócitos: Ao *pellet* ainda congelado e mantido em gelo adicionou-se tampão de lise de leucócitos (NaCl 0,3M, EDTA 10M, Tris/HCl 10mM pH 7,5 e uréia 7M). Após a dissolução do *pellet*, o tubo foi mantido no gelo, adicionando-se 100 µL de SDS 20% por ml de tampão de lise.

O DNA foi extraído do sangue total, pelo fenol/clorofórmio (Blin e Stafford 1976). (1) adicionou-se ao lisado de leucócitos o mesmo volume de fenol saturado com Tris/HCl e clorofórmio/álcool isoamílico (24/1); (2) agitou-se por inversão lentamente por 10 minutos; (3) centrifugou-se a 3000 rpm por 20 minutos; (4) transferiu-se o sobrenadante para outro tubo, deixando intacta a camada protéica inferior; (5) repetiram-se as etapas 1, 2, 3, e 4; (6) realizaram-se duas extrações só com clorofórmio/álcool isoamílico, repetindo-se as etapas 1, 2, 3, e 4; (7) ao sobrenadante da última extração adicionou-se 10% de acetato de sódio 3M pH 5,2 do volume do sobrenadante; (8) agitou-se por inversão; (9) adicionou-se 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e misturou-se por inversão delicadamente até a precipitação do DNA; (10) transferiu-se o DNA precipitado para tubo *Eppendorf* contendo etanol 70% e centrifugou-se em microcentrífuga por 5 a 10 minutos; (11) removeu-se o etanol completamente por inversão do tubo e deixou-se o *pellet* secar à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA obtido foi ressuspenso em quantidade apropriada de TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM) e deixado durante a noite a 4°C para dissolução total. Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro através do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260nm.

Amplificação pela PCR

Após o isolamento para a determinação dos 3 VNTRs, o DNA genômico foi amplificado pela reação de PCR (Saiki *et al.*, 1988), utilizando-se os pares de iniciadores descritos a seguir:

VNTR 1 – nucleotídeo - 1890-1991 (Cumming AM *et al.*, 1992)

5' CTA TTT ATC ATC TAT CCT CTA 3'

5' CAG ACA GAT AGA TAC ATA CAT 3'

VNTR 2 - nucleotídeo - 2215-2396 (modificado neste trabalho à partir dos primers utilizados por Ploos *et al.*, 1990)

5' TGT ACC TAG TTA TCT ATC CTG 3'
5' CTA CTG TTT TAG GTA AGT GAT 3'

VNTR 3 - nucleotídeo - 1640-1794 (Kimpton C. *et al.*, 1992)

5' CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC 3'
5' GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG 3'

Fórmulas e Programas Utilizados

VNTR-3

200ng do DNA
1,5U de Taq DNA polimerase
200 μ M de dNTPs
0,25 μ M de cada Primer
Tampão
Volume final de 50 μ l

Desnaturação: 94°C por 5 minutos

35 ciclos: 94°C - 1 minuto
 58°C - 1 minuto
 72°C - 1 minuto

Finalização: 72°C por 7 minutos

VNTR-1

200ng do DNA
1,5U de Taq DNA polimerase
100 μ M de dNTPs
0,5 μ M de cada Primer
Tampão
Volume final de 50 μ l

Desnaturação: 94°C por 5 minutos

35 ciclos: 94°C - 1 minuto

 57°C - 1 minuto

 72°C - 1 minuto

Finalização: 72°C por 7 minutos

VNTR-2

200ng do DNA

1,5U de Taq DNA polimerase

100 μ M de dNTPs

0,5 μ M de cada Primer

Tampão

Volume final de 50 μ l

Desnaturação: 94°C por 5 minutos

35 ciclos: 94°C - 1 minuto

 56°C - 1 minuto

 72°C - 1 minuto

Finalização: 72°C por 7 minutos

O DNA amplificado foi submetido a eletroforese em um gel não denaturante de poliacrilamida (Acrilamida / Bisacrilamida) na concentração de 8% para o VNTR-1 e 12% para os VNTR-2 e 3. As bandas de DNA foram visualizadas através da coloração pelo brometo de etídio, em luz ultravioleta.

O número de alelos para o VNTR 1, VNTR 2 e VNTR 3 foram arbitrados em tamanho decrescente, utilizando-se um marcador de peso de DNA.

Seqüenciamento de DNA para os 3 VNTRs

Para uma determinação exata do número de repetições ATCT, e o tamanho do fragmento da PCR em pares de bases, foi realizado seqüenciamento direto pelo método de Sanger (1977) dos fragmentos de PCR, utilizando-se os mesmos pares de iniciadores “primers” da amplificação por PCR, e os kits de seqüenciamento *Sequenase PCR Product Sequencing Kit*, United States Biochemical da marca Amersham Life Science ou *Thermo-Sequenase Cycle Sequencing kit*, também da marca Amersham Life Science. As reações foram feitas seguindo-se o protocolo de cada kit.

Análise Estatística

Para a análise da distribuição das dosagens de fator VIII e cofator de ristocetina foram utilizados testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

A média, desvio padrão, percentis e frequência foram calculados utilizando-se o Software Microsoft Excel.

Os cálculos de Skwness e Kurtosis foram calculados pelo programa SSPS.

A comparação entre as médias de FVIII e cofator de ristocetina foi realizada pelo teste-T, considerando-as como amostras independentes.

Resultados

Prevalência da Doença de von Willebrand

No **anexo 2A**, apresentamos uma tabela dos doadores, com nº de registro, nome, idade, tipo sanguíneo, e resposta (positiva ou negativa) ao questionário sobre história pessoal e familiar de sangramento.

Diante dos critérios empregados, descritos em casuística e métodos, de 813 doadores entrevistados e dos quais foram colhidas amostras de sangue, foram considerados para análise de fator VIII e cofator de ristocetina, 772 e 754 doadores, respectivamente.

A idade média dos doadores foi de 32,2 anos, com idade mínima de 18 anos e máxima de 61 anos.

Na Tabela 3 apresentamos os resultados das dosagens do cofator de ristocetina, fator VIII e antígeno de vWF realizadas no plasma dos doadores de sangue, com suspeita de vWD.

Os resultados da 1º, 2º, e 3º dosagem referem-se às convocações, portanto, amostras diferentes do mesmo doador.

- NR ⇒ Não realizado
- NC ⇒ Não compareceu após a convocação
- ⇒ resultado **não utilizado** para o cálculo da Média e Desvio Padrão

Tabela 3. Resultados das Dosagens do Cofator de Ristocetina, Fator VIII e Antígeno do Fator de von Willebrand de Doadores de Sangue

Doador	Nome	1º Amostra Cofator	2º Amostra Cofator	3º Amostra Cofator	Valor Utilizado para Média	1º Amostra Fator VIII	2º Amostra Fator VIII	3º Amostra Fator VIII	Valor Utilizado para Média	vWFAg
01	E. F. M.	NR	NC			123%			123%	
02	J. F. da S.	69%			69%	78%			78%	
03	R. V. S.	100%			100%	98%			98%	
04	F. M. de L.	126%			126%	143%			143%	
05	L. C. de C.	21%	NC			47%	NC			
07	S. R.	74%			74%	195%	NC			
08	A. C. da S.	39%	55%		55%	61%	105%	93%	61%	96%
09	C. M. P. R.	NR	92%		92%	89%			89%	105%
10	M. J. L.	54%			54%	117%			117%	
11	J. A. V.	50%			50%	62%	83%		62%	78%
12	J. F. M.	38%	NC			66%	115%		66%	
13	N. L. da S.	100%			100%	174%			174%	
15	C. D.	50%			50%	62%			62%	
16	L. L. da S.	100%			100%	88%			88%	
18	O. A. de F.	50%			50%	71%			71%	
19	J. L. T.	25% 100%	86%		86%	176%	170%		173%	88%
20	M. G.	100%			100%	106%			106%	
21	R. P. P.	21%	NC			87%			87%	
22	D. S. da P.	77%			77%	202%	159%		180.5%	79%
23	G. A. dos S.	31%	38% 178%			103%	65%		103%	
24	C. P. P.	65%			65%	68%	57%	62%	68%	
25	R. F.	21%	73%		73%	93%			93%	139%
26	W. B. C.	125%			125%	83%			83%	
28	N. S. de C.	42%	45%		43.5%	55%	96%		96%	48%
29	D. V. S.	100%			100%	83%			83%	
30	M. A. M.	89%			89%	139%	138%		138.5%	100%
31	G. da S.	NR	100%		100%	103%			103%	
32	P. R. da S.	74%			74%	63%	125%		63%	78%
33	J. B. de M.	62%			62%	134%			134%	97%
34	N. R.	105%			105%	35%	53%		44%	53%
35	J. L. A.	25%	85%		85%	78%			78%	
36	F. de A. S.	100%			100%	100%			100%	
37	J. A. de F.	141%			141%	117%			117%	
38	J. B. de F.	36%	NR			64%	106%		64%	86%
39	O. P.	75%			75%	65%	112%		65%	83%
40	G. D. R. J.	72%			72%	89%			89%	
41	O. P.	100%			100%	103%			103%	
42	M. T.	NR	123%		123%	117%			117%	
44	E. R. da S.	100%			100%	85%			85%	
45	E. R. F. B.	NR	NC			91%			91%	
46	A. J. dos S.	100%			100%	87%			87%	
47	R. de S. S.	NR	NC			148%			148%	

48	S. F. de C.	68%			68%	80%			80%	
49	N. J. B.	NR	40%	54%	47%	72%	117%	68%	72%	61%
50	H. L. S.	25%	76%		76%	114%			114%	100%
51	N. C.	190%	NC			136%			136%	
52	L. J. L.	100%			100%	81%			81%	
53	S. R. B. N.	NR	NC			118%			118%	
55	F. J. de S.	190%				73%			73%	
56	E. S. F.	56%			56%	101%			101%	
57	I. A de O.	132%			132%	199%	NC			
58	W. X. C.	100%			100%	77%			77%	
59	M. J. G.	135%			135%	93%			93%	
60	R. M. de P.	50%			50%	88%			88%	
61	A. L. de O.	50%			50%	132%			132%	
62	J. A. de T.	28%	43%	57%	50%	113%	92%	91%	113%	67%
63	M. A. B.	91%			91%	143%			143%	
64	R. M. P. S.	63%			63%	151%			151%	
65	P. C. M.	132%			132%	178%			178%	
66	H. A.	74%			74%	238%	NC			
67	D. D. G.	100%			100%	162%			162%	
68	A. J. da S.	138%			138%	246%	NC			
69	V. M. S.	87%			87%	122%			122%	
70	P. R. da S.	117%			117%	202%	60%		60%	
71	P. R. de S.	117%			117%	134%			134%	
72	P. F. P.	78%			78%	82%			82%	
73	J. F. da S.	117%			117%	174%			174%	
74	A. O. S.	25% 78%	92%		92%	146%	101%		146%	
75	I. J. B.	100%			100%	173%			173%	
76	J. A. P.	78%			78%	126%			126%	
77	M. G. T.	74%			74%	87%			87%	
78	J. S. F.	100%			100%	171%			171%	
79	A. C.	100%			100%	108%			108%	
80	W. Q.	100%			100%	148%			148%	
81	E. A.	100%			100%	126%			126%	
82	P. H. A. S.	72%			72%	127%			127%	
83	E. F.	100%			100%	119%			119%	57%
84	R. F.	81%			81%	91%			91%	
85	R. P. F.	100%			100%	174%			174%	
86	E. H. M.	100%			100%	130%			130%	
87	A. F. B.	100%			100%	102%			102%	
88	M. B.	138%			138%	112%			112%	
89	J. C. F.	72%			72%	167%			167%	
90	J. L. F. A.	18%	NC			93%			93%	
91	L. C. M.	100%			100%	121%			121%	
92	E. C. L.	100%			100%	112%			112%	
94	E. O. M.	69%			69%	98%			98%	
95	A. P.	100%			100%	101%			101%	
96	S. L. de C.	132%			132%	143%			143%	
97	F. M. M.	115%			115%	87%			87%	
98	R. M. S.	72%			72%	96%			96%	
99	A. J. F.	72%			72%	123%			123%	
100	D. A. A.	115%			115%	167%			167%	
101	J. A. da A.	85%			85%	103%			103%	

102	F. K.	70%			70%	118%			118%	
103	A. de S. E.	85%			85%	257%	NC			
104	R. R. F. A.	85%			85%	216%	191%		203.5%	
105	C. C. C.	115%			115%	129%			129%	
106	A. G. B.	87%			87%	189%	122%		122%	
107	G. S. A.	100%			100%	131%			131%	
108	C. A. F.	132%			132%	114%			114%	
109	O. da C. A.	132%			132%	167%			167%	
110	W. J. S.	87%			87%	129%			129%	
111	M. P. V.	132%			132%	166%			166%	
112	G. R. C.	100%			100%	137%			137%	
113	W. L. M.	55%			55%	82%			82%	
114	J. S. D. F.	132%			132%	106%			106%	
115	J. B. de A.	100%			100%	157%			157%	
116	A. de L. R.	100%			100%	173%			173%	
117	G. F. de G.	100%			100%	117%			117%	
118	M. R. F.	66%			66%	152%			152%	
119	F. P.	132%			132%	205%	252%		205%	
120	R. C. de O.	100%			100%	141%			141%	
121	E. A. S.	132%			132%	187%	126%		126%	
122	W. G. V.	100%			100%	126%			126%	
123	G. R. B.	87%			87%	153%			153%	
124	A. N. da S.	87%			87%	117%			117%	
125	A. P. da S.	100%			100%	104%			104%	
126	S. J. F.	100%			100%	110%			110%	
127	J. C. de M.	100%			100%	132%			132%	
128	W. P. da S.	100%			100%	140%			140%	
129	F. A. F. J.	100%			100%	97%			97%	
130	I. R. dos S.	89%			89%	97%			97%	
131	Z. de F. R.	100%			100%	110%			110%	
132	P. de S. B.	135%			135%	192%	NC			
134	V. S. de L.	89%			89%	111%			111%	
135	O. P.	117%			117%	148%			148%	
136	G. F.	100%			100%	107%			107%	
137	N. P. da S.	78%			78%	201%	218%		209.5%	
138	R. F.	33% 68%	50%		50%	70%	61%		70%	
139	C. F. P. B. P.	66%			66%	102%			102%	
140	A. C.	66%			66%	129%			129%	
141	A. F. dos S.	63% 126%	67%		67%	104%	90%		97%	
142	A. J. da R.	126%			126%	108%			108%	
143	F. M. S. B.	79%			79%	72%			72%	
144	J. de S. A.	100% 55%	59%		59%	123%	86%		104.5%	
145	T. M. C.	105%			105%	147%			147%	
146	G. G.	100%			100%	88%			88%	
147	W. A. B.	126%			126%	190%	191%		190.5%	
148	D. E. do N.	141%			141%	141%			141%	
149	R. A. F.	126%			126%	111%			111%	
150	A. de F. B.	126%			126%	176%			176%	
151	M. S. A.	100%			100%	118%			118%	
152	N. de S.	100%			100%	181%	110%		110%	
153	A. D. R.	66%			66%	107%			107%	
154	R. J. P. E.	73%			73%	84%			84%	

155	A. L. R.	66%			66%	98%			98%	
156	A. P. C. G.	76%			76%	95%			95%	
157	V. G. Z.	38%	69%		69%	56%	78%		67%	
158	G. G. da S.	100%			100%	100%			100%	
159	J. S. dos R.	66%			66%	107%			107%	
160	Z. G.	59%			59%	188%	187%		187.5%	
161	E. de A. F.	76%			76%	134%			134%	
162	R. A. de S.	50%			50%	103%			103%	
163	J. L. dos S.	100%			100%	78%			78%	
164	M. L. J.	12%	48%		30%	35%	38%		36.5%	52%
165	A. C. C.	76%			76%	118%			118%	
166	J. V. de S.	87%			87%	119%			119%	
167	D. R. de S.	47%	NC			90%			90%	
168	E. R. L.	50%			50%	126%			126%	
169	J. A. M.	50%			50%	133%			133%	
170	O. G.	85%			85%	135%			135%	
171	A. M. S. A.	43% 151%	70%	108%	70%	63%	49%	38%	56%	82%
172	M. P.	71%			71%	134%			134%	
173	F. C. N.	120%			120%	103%			103%	
174	L. R. G.	100%			100%	90%			90%	
175	F. V. L.	85%			85%	98%			98%	
176	R. L. de S.	37% 151%	102%		102%	161%			161%	
177	S. F. S.	31%	71%		71%	150%			150%	
178	M. Z.	50%			50%	113%			113%	
179	O. M. C.	71%			71%	110%			110%	
180	S. R. N.	85%			85%	107%			107%	
181	A. J. da R.	30%	65%		65%	118%			118%	
182	J. B. C.	46%	54%		50%	204%	115%		115%	
183	J. H. V. B.	35%	70%		70%	198%	137%		137%	
184	A. T. M.	61%			61%	84%			84%	
185	C. R. M.	72%			72%	159%			159%	
186	C. C. F.	56%			56%	108%			108%	
187	J. C. dos S.	57%			57%	189%	128%		128%	
188	E. A. M.	93%			93%	358%	NC			
189	N. A. de S.	89%			89%	144%			144%	
191	R. D. P. S.	100%			100%	100%			100%	
192	F. B. S.	58%			58%	164%			164%	
193	C. A. B.	72%			72%	149%			149%	
194	D. M. B.	72%			72%	118%			118%	
195	L. G. C.	81%			81%	146%			146%	
196	M. L.	58%			58%	217%	254%		235.5%	
197	J. B. P.	72%			72%	124%			124%	
198	E. L. C.	81%			81%	136%			136%	
199	R. V. F.	66%			66%	105%			105%	
200	J. P. D.	65%			65%	178%			178%	
201	M. D. G.	27%	NC			67%			67%	
202	A. F. P. F.	46%	55%	54%	51%	61%	56%		58.5%	66%
203	J. G. dos S.	57%			57%	89%			89%	
204	G. A. S.	138%			138%	93%			93%	
205	R. A. B.	87%			87%	92%			92%	
206	A. B.	138%			138%	180%			180%	
207	J. B. dos S.	63%			63%	86%			86%	

208	W. P. A.	100%			100%	89%			89%	
209	A. P.	138%			138%	103%			103%	
210	M. R. de S.	138%			138%	128%			128%	
211	J. A. T. T.	100%			100%	147%			147%	
212	C. A. P.	117%			117%	114%			114%	
213	D. R. N.	63%			63%	125%			125%	
215	D. B.	100%			100%	191%	137%		164%	
216	L. A. P.	117%			117%	65%			65%	
217	A. A. C.	117%			117%	104%			104%	
218	L. C. S.	51%			51%	110%			110%	
219	E. S. G.	112%			112%	117%			117%	
220	J. P. S. A.	117%			117%	105%			105%	
221	M. A. R.	100%			100%	183%	NC			
222	I. C.	63%			63%	145%			145%	
223	C. A. C.	76%			76%	126%			126%	
224	F. C. L.	76%			76%	136%			136%	
225	J. L. Q.	57%			57%	121%			121%	
226	J. C. G. S.	100%			100%	123%			123%	
227	E. W. C.	68%			68%	159%			159%	
228	M. C. R.	100%			100%	137%			137%	
229	J. H. C.	83%			83%	77%			77%	
230	J. C. Z. S.	60%			60%	117%			117%	
231	M. A. F. C.	83%			83%	155%			155%	
232	A. C. D.	57%			57%	76%			76%	
233	S. S. M.	36% 91%	NC			92%			92%	
234	J. L. dos S.	60%			60%	164%			164%	
235	M. R. M.	60%			60%	112%			112%	
236	K. E. D.	71%			71%	136%			136%	
237	M. J. E.	77%			77%	125%			125%	
238	V. R. O. L.	60%			60%	87%			87%	
239	R. C. J.	80%			80%	110%			110%	
240	J. A. P.	60%			60%	101%			101%	
241	G. L. P. S.	63%			63%	107%			107%	
242	D. de S.	50%			50%	114%			114%	
243	A. P. F.	56%			56%	89%			89%	
244	J. S. de S.	85%			85%	110%			110%	
245	A. S.	50%			50%	116%			116%	
246	E. T. S.	74%			74%	105%			105%	
247	F. C.	87%			87%	134%			134%	
248	M. A. B.	74%			74%	90%			90%	
249	D. P.	74%			74%	120%			120%	
250	F. de A.	36%	NC			66%			66%	
251	R. B.	57%			57%	78%			78%	
252	J. A. N.	52%			52%	90%			90%	
253	L. S. da C.	74%			74%	99%			99%	
254	A. da S.	30% 50%	50%		50%	84%			84%	46%
255	J. R. G. S.	69%			69%	83%			83%	
256	N. B. da S.	83%			83%	177%			177%	
257	A. R. da S.	83%			83%	103%			103%	
258	S. B.	55%			55%	68%			68%	
259	D. S. de L.	83%			83%	66%			66%	
260	M. R. Z.	50%			50%	70%			70%	

261	S. de S.	83%			83%	80%			80%	
262	A. M. P.	69%			69%	81%			81%	
263	S. C. G.	100%			100%	107%			107%	
264	M. C. A.	69%			69%	100%			100%	
265	J. dos S. R.	50%			50%	90%			90%	
266	J. V. A.	59%			59%	120%			120%	
267	A. A. C.	28%	NC			93%			93%	
268	N. S. J.	66%			66%	200%	NC			
269	E. S. da S.	66%			66%	123%			123%	
270	J. S.	36% 81%	NC			120%			120%	
271	A. C. G.	58%			58%	113%			113%	
272	V. S. da S.	89%			89%	115%			115%	
273	M. F. A.	66%			66%	107%			107%	
274	C. C. S.	70%			70%	153%			153%	
275	R. C. A. B.	141%			141%	118%			118%	
276	R. S.	53%			53%	74%			74%	
277	R. L. da S.	117%			117%	122%			122%	
278	C. A. R. R.	NR				95%			95%	
279	H. L. da S.	83%			83%	71%			71%	
280	J. F. de S.	100%			100%	170%			170%	
281	C. R. A. H.	100%			100%	164%			164%	
282	L. C. A.	71%			71%	86%			86%	
283	E. M. R.	117%			117%	117%			117%	
284	I. dos S. C.	67%			67%	104%			104%	
285	R. M.	83%			83%	91%			91%	
286	V. F.	83%			83%	92%			92%	
287	J. R. do N.	50%			50%	90%			90%	
288	S. Q. de A.	58%			58%	147%			147%	
289	S. S. A.	61%			61%	114%			114%	
290	J. S. da S.	58%			58%	136%			136%	
291	L. G.	66%			66%	149%			149%	
292	L. O.	58%			58%	115%			115%	
293	I. F.	71%			71%	86%			86%	
294	J. L. de S.	60%			60%	82%			82%	
295	R. de L. F.	117%			117%	88%			88%	
296	C. V. H.	141%			141%	154%			154%	
297	C. L. A.	100%			100%	139%			139%	
298	H. A. R.	83%			83%	83%			83%	
299	J. G. J.	70%			70%	83%			83%	
301	A. I. da M.	70%			70%	66%			66%	
302	J. S.	100%			100%	121%			121%	
303	P. R. F.	68%			68%	73%			73%	
304	A. B. de A.	120%			120%	111%			111%	
305	J. de O.	151%			151%	135%			135%	
306	P. I. L. S.	45%	45%		45%	48%	48%	38%	44%	63%
307	J. P. S. R.	50%			50%	73%			73%	
308	M. M.	83%			83%	110%			110%	
309	D. G. V.	50%			50%	104%			104%	
310	A. F.	91%			91%	147%			147%	
311	L. M. da S.	120%			120%	106%			106%	
312	J. C.	68%			68%	85%			85%	
313	J. P. dos S.	83%			83%	105%			105%	

314	E. M.	81%			81%	85%			85%	
315	D. A. Q.	112%			112%	123%			123%	
316	S. C. M. J.	81%			81%	82%			82%	
317	J. C. M.	100%			100%	75%			75%	
318	V. F.	66%			66%	68%			68%	
319	V. R.	112%			112%	63%			63%	
320	S. A. B.	72%			72%	72%			72%	
321	M. R. M.	72%			72%	111%			111%	
322	M. C. M.	100%			100%	116%			116%	
323	W. L. T.	91%			91%	92%			92%	
324	N. R. de C.	56%			56%	71%			71%	
326	A. F. A.	91%			91%	112%			112%	
327	O. de M.	100%			100%	91%			91%	
328	J. N. F.	81%			81%	97%			97%	
329	E. L.	100%			100%	103%			103%	
330	N. H. P.	91%			91%	100%			100%	
331	A. J. M. G.	100%			100%	119%			119%	
332	A. J. do A.	81%			81%	105%			105%	
333	E. M. M.	81%			81%	76%			76%	
334	R. R. F. P.	120%			120%	75%			75%	
335	J. B. B.	71%			71%	87%			87%	
336	M. Z.	85%			85%	74%			74%	
337	M. M.	85%			85%	144%			144%	
338	A. D. G.	120%			120%	75%			75%	
339	J. R. dos S.	71%			71%	96%			96%	
341	C. dos S.	100%			100%	93%			93%	
342	L. R. V.	120%			120%	97%			97%	
343	N. B. M.	85%			85%	69%			69%	
344	R. A. G.	141%			141%	128%			128%	
345	C. C. da S.	50%	64%		50%	43%	47%	67%	52%	92%
346	G. de O.	100%			100%	65%			65%	
347	R. C. C.	85%			85%	123%			123%	
348	F. N. da S.	85%			85%	32%	59%		59%	
349	E. P. M.	141%			141%	84%			84%	
350	F. A.	141%			141%	106%			106%	
351	D. B.	36%	70%		70%	118%			118%	82%
352	J. A. B.	60%			60%	55%	22%		39%	55%
354	A. O. C. S.	141%			141%	103%			103%	
355	G. L.	60%			60%	77%			77%	
356	F. P. S. M.	50%			50%	162%			162%	
357	U. S. M.	125%			125%	95%			95%	
358	M. A. F.	63%			63%	109%			109%	
359	J. F. dos R.	79%			79%	85%			85%	
360	F. J. O.	125%			125%	79%			79%	
361	R. T. G.	63%			63%	72%			72%	
362	D. R.	100%			100%	202%	NC			
363	J. F. da S.	63%			63%	92%			92%	
364	C. B. da S.	100%			100%	110%			110%	
365	B. G. da S.	51%			51%	79%			79%	
366	E. C. M.	50%			50%	92%			92%	
367	E. da C.	79%			79%	73%			73%	
368	M. L.	125%			125%	177%			177%	

369	J. L. S. Q.	100%			100%	99%			99%	
370	J. F.	63%			63%	91%			91%	
371	E. de S.	125%			125%	118%			118%	
372	C. R. B. J.	63%			63%	117%			117%	
373	R. A. R.	63%			63%	101%			101%	
374	E. A. R.	100%			100%	92%			92%	
375	P. G. F. O.	50%			50%	169%			169%	
376	H. M. T.	63%			63%	100%			100%	
377	M. dos S.	125%			125%	85%			85%	
378	P. S. P.	50%			50%	98%			98%	
380	F. D. M.	50%			50%	77%			77%	
381	M. A. L.	79%			79%	91%			91%	
382	R. M.	63%			63%	89%			89%	
383	S. M. M.	63%			63%	70%			70%	
384	J. R. de S.	79%			79%	124%			124%	
385	R. L. de S.	18% 100%	NC			132%			132%	
386	E. R. S.	50%			50%	130%			130%	
387	D. J. R.	36%	NC			94%			94%	
388	M. R.	45%	NC			114%			114%	
389	S. L. da S.	55%			55%	73%			73%	
390	B. L. M.	79%			79%	147%			147%	
391	E. C. L.	79%			79%	149%			149%	
392	R. J. da S.	63%			63%	90%			90%	
393	C. F. B.	100%			100%	96%			96%	
394	J. M. da C.	100%			100%	129%			129%	
395	C. A. S.	126%			126%	135%			135%	
396	J. M.	79%			79%	170%			170%	
397	R. R. P.	79%			79%	150%			150%	
398	A. J. S.	100%			100%	129%			129%	
399	V. J. F.	79%			79%	111%			111%	
400	A. C. N.	100%			100%	134%			134%	
401	E. A. M.	100%			100%	194%	181%		187.5%	
402	M. S. S.	35%	NC			115%			115%	
403	M. B. B.	63%			63%	112%			112%	
404	J. M. E.	100%			100%	114%			114%	
405	A. de S. C.	32%	NC			96%			96%	
406	P. S. M.	56%			56%	162%			162%	
407	C. P. S.	63%			63%	134%			134%	
408	E. F. T.	158%	NC			78%			78%	
409	W. C. T.	100%			100%	101%			101%	
410	A. N.	50%			50%	125%			125%	
411	O. M.	79%			79%	93%			93%	
413	O. do A.	79%			79%	141%			141%	
414	J. C. R.	126%			126%	150%			150%	
415	S. D. M.	92%			92%	105%			105%	
416	C. A. R.	85%			85%	92%			92%	
417	J. C. G.	50%			50%	75%			75%	
418	J. C. C. M.	53%			53%	79%			79%	
419	D. A. O.	39%	41%		40%	135%			135%	129%
420	M. P.	100%			100%	124%			124%	
421	A. A. G.	100%			100%	158%			158%	
422	J. B. T. S.	85%			85%	249%	NC			

423	D. de A. B.	100%			100%	127%			127%	
424	A. J.	60%			60%	178%			178%	
425	A. F. F.	45%	50%		47.5%	93%	97%		95%	
426	S. M. S.	35%	45%		40%	50%	65%		57%	43%
427	L. de L.	71%			71%	99%			99%	
428	S. M. M.	75%			75%	69%			69%	
429	L. C. S.	60%			60%	94%			94%	
430	C. F. S.	71%			71%	95%			95%	
431	D. M.	85%			85%	121%			121%	
432	J. S. de A.	60%			60%	80%			80%	
434	E. J. S. S.	85%			85%	178%			178%	
435	O. C. F.	85%			85%	104%			104%	
436	F. D. S. J.	77%			77%	105%			105%	
437	M. N. O.	71%			71%	104%			104%	
438	M. A. G.	100%			100%	253%	228%		240.5%	
439	J. T. G.	56%			56%	115%			115%	
440	L. A. L. J.	100%			100%	132%			132%	
441	P. S. C. B.	66%			66%	106%			106%	
442	O. F. de S.	76%			76%	103%			103%	
443	M. R. F.	87%			87%	109%			109%	
444	A. A. B.	76%			76%	172%			172%	
445	L. C. A.	76%			76%	146%			146%	
446	E. H.	87%			87%	232%	NC			
447	V. R.	100%			100%	122%			122%	
448	M. S. B.	87%			87%	53%	NC			
449	F. R. C. N.	42%	NC			106%			106%	
450	D. A. A. J.	43%	NC			210%	NC			
451	S. G. S.	76%			76%	187%	NC			
452	A. G. R.	76%			76%	103%			103%	
453	O. da S.	76%			76%	157%			157%	
454	D. B. M.	87%			87%	145%			145%	
455	I. L. F.	52%			52%	139%			139%	
456	J. D.	66%			66%	173%			173%	
457	V. V.	95%			95%	120%			120%	
458	J. M. S.	57%			57%	170%			170%	
459	M. A. S.	66%			66%	106%			106%	
460	F. J. B. R.	75%			75%	90%			90%	
461	O. C.	71%			71%	104%			104%	
462	R. R. B.	55%			55%	107%			107%	
463	J. A. F. F.	71%			71%	106%			106%	
464	O. B. M.	71%			71%	133%			133%	
465	O. A. M.	100%			100%	127%			127%	
466	J. T. T.	85%			85%	77%			77%	
467	H. B. G.	60%			60%	100%			100%	
468	R. S. O.	100%			100%	93%			93%	
469	R. C. M.	75%			75%	141%			141%	
470	S. W.	60%			60%	90%			90%	
471	A. F. M.	71%			71%	134%			134%	
472	C. A. M.	50%			50%	86%			86%	
473	M. J. S. F.	71%			71%	132%			132%	
474	M. A. B.	120%			120%	116%			116%	
475	M. C. S.	60%			60%	101%			101%	

476	R. J. A.	60%			60%	101%			101%	
477	J. A. S.	85%			85%	78%			78%	
478	J. A. P.	33%	NC			143%			143%	
479	A. M. N.	60%			60%	96%			96%	
480	E. T. M.	71%			71%	70%			70%	
481	A. V.	50%			50%	54%	86%		86%	86%
482	N. R. de L.	71%			71%	121%			121%	
483	A. A. R.	100%			100%	91%			91%	
484	R. de S.	100%			100%	80%			80%	
485	P. R. da S.	71%			71%	81%			81%	
486	J. B. B.	39%				57%	45%		51%	65%
487	N. E.	60%			60%	50%	74%		74%	108,5%
488	J. C. de S.	71%			71%	53%	NC			
489	D. R.	85%			85%	115%			115%	
490	L. F. F.	51%			51%	46%	NC			73%
491	W. V. S.	50%			50%	72%			72%	
492	A.H. S. N.	50%			50%	70%			70%	
493	M. A. A.	50%			50%	152%			152%	
494	E. J. S.	100%			100%	75%			75%	
495	P. H. S.	60%			60%	71%			71%	
496	M. A. C.	85%			85%	166%			166%	
497	A. B. F.	50%			50%	104%			104%	
498	E. G. M. R.	60%			60%	91%			91%	
499	A. L. M.	60%			60%	108%			108%	
500	M. M. P. A.	79%			79%	160%			160%	
501	M. S. B.	100%			100%	73%			73%	
502	J. O. P.	100%			100%	80%			80%	
503	N. S. M.	126%			126%	82%			82%	
504	W. C. F.	36%	NC			69%			69%	
505	A. de S.	32%	100%		100%	77%			77%	64%
506	L. P.	50%			50%	135%			135%	
507	J. A. S. J.	79%			79%	139%			139%	
508	J. C.	63%			63%	145%			145%	
509	R. C.	50%			50%	75%			75%	
510	M. P. M. C.	100%			100%	100%			100%	
511	W. R. S.	60%			60%	102%			102%	
512	P. R. B.	36%	86%		86%	124%			124%	
513	W. D. F. R.	63%			63%	105%			105%	
514	M. R. O.	100%			100%	87%			87%	
515	L. da S.	50%	100%		50%	93%			93%	
516	J. D. da S.	100%			100%	95%			95%	
517	J. D. M.	100%			100%	131%			131%	
518	E. M. S.	63%			63%	74%			74%	
519	A. B.	50%			50%	89%			89%	
520	J. R. B.	126%			126%	113%			113%	
521	J. C. V.	57%			57%	123%			123%	
522	C. A. C.	126%			126%	122%			122%	
523	V. M. P.	100%			100%	120%			120%	
524	L. C. R.	50%			50%	89%			89%	
525	L. G.	126%			126%	100%			100%	
526	A. B. V. S.	100%			100%	92%			92%	
527	M. G. A.	71%			71%	109%			109%	

528	F. L. C.	117%			117%	184%	NC			
529	J. de O. M.	59%			59%	109%			109%	
530	M. T. F. R.	100%			100%	147%			147%	
531	M. M. F.	32%	65%		65%	46%	47%	56%	49%	47%
532	J. C. de F.	83%			83%	60%			60%	
533	A. A. S. R.	71%			71%	124%			124%	
534	P. A. do N.	71%			71%	96%			96%	
535	A. G. T.	100%			100%	92%			92%	
536	C. A. N.	59%			59%	104%			104%	
537	R. C. S.	50%			50%	121%			121%	
538	J. G. S.	100%			100%	80%			80%	
539	A. R. L. M.	55%			55%	105%			105%	
540	L. F. S.	83%			83%	96%			96%	
541	W. M.	71%			71%	69%			69%	
542	D. P. S.	83%			83%	124%			124%	
543	A. da S. B.	71%			71%	130%			130%	
544	A. M.	83%			83%	70%			70%	
545	L. B. N.	71%			71%	123%			123%	
546	W. C. G. H.	28%	57%		57%	80%			80%	
547	H. S.	100%			100%	131%			131%	
548	J. F.	76%			76%	115%			115%	
549	O. da C. J.	87%			87%	84%			84%	
550	E. da C.	100%			100%	84%			84%	
551	J. P. O. N.	64%			64%	115%			115%	
552	J. A. R.	87%			87%	100%			100%	
553	E. C. R.	100%			100%	55%	69%		62%	
554	L. V. G.	87%			87%	107%			107%	
555	E. R. E.	57%			57%	105%			105%	
556	C. A. D. B.	87%			87%	81%			81%	
557	N. F. da S.	NR	NC			90%			90%	
558	A. C. da S.	100%			100%	81%			81%	
559	J. R. da S.	87%			87%	168%			168%	
560	R. C.	76%			76%	90%			90%	
561	O. J. C.	66%			66%	77%			77%	
562	W. de S. L.	66%			66%	153%			153%	
563	M. A. C.	35%	60%		60%	56%	55%		55,5%	148%
564	J. S. S.	76%			76%	117%			117%	
565	J. F. L.	46%	113%		113%	128%			128%	87%
566	U. D. F.	66%			66%	84%			84%	
567	J. dos S. A.	76%			76%	93%			93%	
568	R. D. S. M.	57%			57%	86%			86%	
569	W. A. V.	92%			92%	81%			81%	
570	V. A.	120%			120%	103%			103%	
571	L. R. da S.	120%			120%	118%			118%	
572	J. de A.	85%			85%	108%			108%	
573	R. A. G.	85%			85%	112%			112%	
574	E. C. C.	85%			85%	103%			103%	
575	L. C. da S.	85%			85%	106%			106%	
576	A. H. M.	100%			100%	131%			131%	
577	A. A. da S.	85%			85%	144%			144%	
578	A. T. D.	85%			85%	99%			99%	
579	N. A. de L.	85%			85%	75%			75%	

580	A. T. F.	60%			60%	69%			69%	
581	L. C. S. A.	85%			85%	108%			108%	
582	L. F.	85%			85%	101%			101%	
583	V. M.	71%			71%	128%			128%	
584	A. N. S.	100%			100%	127%			127%	
585	S. S. F.	50%			50%	69%			69%	
586	M. R. C.	39%	46%		42.5%	75%			75%	52%
587	E. L. da S.	60%			60%	126%			126%	
588	W. R. T. M.	60%			60%	67%			67%	
589	V. S.	87%			87%	138%			138%	
590	L. E. M. S.	87%			87%	102%			102%	
591	M. A. B.	66%			66%	104%			104%	
592	H. C. G.	100%			100%	94%			94%	
593	P. da P.	115%			115%	129%			129%	
594	L. O. L.	100%			100%	114%			114%	
595	W. A. B.	87%			87%	83%			83%	
596	R. F.	87%			87%	91%			91%	
597	R. C.	87%			87%	82%			82%	
598	W. C. B.	76%			76%	98%			98%	
599	E. M. D.	42%	NC			115%			115%	
600	J. N. B.	76%			76%	66%			66%	
601	W. C. B.	87%			87%	115%			115%	
602	V. A. S.	100%			100%	98%			98%	
603	M. A. A. S.	100%			100%	81%			81%	
604	W. L. R. S.	87%			87%	71%			71%	
605	L. G. de S.	87%			87%	118%			118%	
606	J. O. de S.	66%			66%	84%			84%	
607	V. V. B.	100%			100%	95%			95%	
608	L. R. G.	100%			100%	68%			68%	
609	G. C. de L.	115%			115%	136%			136%	
610	D. A. A.	66%			66%	81%			81%	
611	C. B. M.	76%			76%	146%			146%	
612	R. M. S.	79%			79%	76%			76%	
613	D. de S.	100%			100%	102%			102%	
614	C. A. M.	79%			79%	124%			124%	
615	N. de S.	63%			63%	77%			77%	
616	J. C. da C.	100%			100%	83%			83%	
617	S. P. dos S.	63%			63%	109%			109%	
618	L. C. F.	126%			126%	167%			167%	
619	F. de L.	63%			63%	116%			116%	
620	J. J. dos S.	158%	NC			192%	NR			
621	R. M. P.	100%			100%	119%			119%	
622	L. de A.	100%			100%	151%			151%	
623	C. C. de A.	126%			126%	86%			86%	
624	L. de M.	100%			100%	149%			149%	
625	V. D. G.	51%			51%	76%			76%	
626	S. G.	100%			100%	149%			149%	
627	E. B. da S.	100%			100%	86%			86%	
628	C. M. R.	79%			79%	100%			100%	
629	O. de O. B.	79%			79%	86%			86%	
630	M. F. P.	63%			63%	97%			97%	
631	J. C. F.	79%			79%	128%			128%	

632	M. A. L.	100%			100%	97%			97%	
633	M. L. B.	89%			89%	73%			73%	
634	P. D. S. A.	63%			63%	95%			95%	
635	C. R. A. A.	56%			56%	89%			89%	
636	L. J. da C.	69%			69%	91%			91%	
637	O. S. de F.	100%			100%	145%			145%	
638	G. E. T. T.	63%			63%	86%			86%	
639	E. B. R.	63%			63%	105%			105%	
640	M. B.	100%			100%	100%			100%	
641	J. C. F.	71%			71%	88%			88%	
642	V. C. da S.	100%			100%	108%			108%	
643	J. M. de T.	100%			100%	112%			112%	
644	C. E. do R.	100%			100%	74%			74%	
645	R. F. N. A.	63%			63%	103%			103%	
646	L. M. da S.	71%			71%	63%			63%	
647	J. C. M.	100%			100%	169%			169%	
648	S. R. P.	112%			112%	106%			106%	
649	A. R. de S.	112%			112%	106%			106%	
650	E. L. F.	79%			79%	87%			87%	
651	P. R. F.	79%			79%	104%			104%	
652	A. J. D.	65%			65%	92%			92%	
653	O. O. A.	61%			61%	78%			78%	
654	P. M. L. C.	158%	NC			117%			117%	
655	R. C. de O.	57%			57%	124%			124%	
656	G. Z. A.	55%			55%	81%			81%	
657	M. J. S.	57%			57%	92%			92%	
658	E. M. S.	100%			100%	100%			100%	
659	D. D.	112%			112%	215%	NC			
660	J. M. A. S.	57%			57%	95%			95%	
661	G. A. da F.	59%			59%	64%			64%	
662	E. de L.	83%			83%	151%			151%	
663	A. N. P.	100%			100%	129%			129%	
664	L. A. S.	100%			100%	73%			73%	
665	F. M. B.	71%			71%	95%			95%	
666	J. A. S.	71%			71%	163%			163%	
667	S. D.	71%			71%	98%			98%	
668	A. da S. S.	83%			83%	69%			69%	
669	M. D. B. O.	120%			120%	102%			102%	
670	H. T. T.	83%			83%	83%			83%	
671	A. A. P.	71%			71%	108%			108%	
672	L. C. S.	83%			83%	78%			78%	
673	O. N. da S.	32%	44%		38%	59%	45%		52%	
674	L. R. S.	71%			71%	65%			65%	
675	M. G. R.	71%			71%	107%			107%	
676	J. D. M.	79%			79%	85%			85%	
677	P. J. D. S.	100%			100%	63%			63%	
678	C. L. S. P.	63%			63%	110%			110%	
679	M. S.	79%			79%	65%			65%	
680	E. S.	100%			100%	78%			78%	
681	C. B.	32%	81%			101%			101%	98,5%
682	J. C. dos S.	60%			60%	68%			68%	
683	L. R. V.	126%			126%	108%			108%	

684	J. S. D.	126%			126%	144%			144%	
685	A. B. da S.	63%			63%	93%			93%	
686	V. B.	63%				158%			158%	
687	P. C. B.	53%				145%			145%	
688	F. A. V.	100%				94%			94%	
689	M. dos S.	63%				88%			88%	
690 *	J. J. da S.	35%	21% Lipêmico			80%			80%	
691	M. A. S.	116%			116%	90%			90%	
692	L. P. da S.	100%			100%	124%			124%	
693	J. P. dos S.	76%			76%	91%			91%	
694	C. G.	55%			55%	111%			111%	
695	B. de L. G.	66%			66%	119%			119%	
696	J. B.	58%			58%	76%			76%	
697	O. S. S.	66%			66%	69%			69%	
698	L. V. B. R.	132%			132%	90%			90%	
699	F. J. P.	132%			132%	100%			100%	
700	G. B. S. F.	100%			100%	122%			122%	
701	L. R. N.	115%			115%	130%			130%	
702	R. R. F.	85%			85%	106%			106%	
703	L. A. C. M.	100%			100%	74%			74%	
704	A. G.	120%			120%	113%			113%	
705	W. F.	60%			60%	98%			98%	
706	A. dos S.	50%			50%	95%			95%	
707	J. C. R. Q.	85%			85%	96%			96%	
708	L. A. R. G.	120%			120%	124%			124%	
709	G. A. C.	85%			85%	90%			90%	
710	J. L. da S.	60%			60%	119%			119%	
711	A. L. de O.	71%			71%	104%			104%	
712	F. P.	71%			71%	105%			105%	
713	O. H. de L.	13%	25%		19%	52%	57%	56%	55%	89%
714	R. N. A. O.	60%			60%	72%			72%	
715	V. J. F. P.	71%			71%	83%			83%	
716	L. B. D.	71%			71%	94%			94%	
717	M. V.	60%			60%	86%			86%	
718	O. P. C.	85%			85%	76%			76%	
719	J. B. da C.	72%			72%	96%			96%	
720	A. M. S.	85%			85%	82%			82%	
721	M. V. S.	100%			100%	74%			74%	
722	J. R. R.	100%			100%	66%			66%	
723	J. C. S.	112%			112%	91%			91%	
724	V. M.	83%			83%	80%			80%	
725	M. F.	123%			123%	58%	73%		65.5%	
726	D. T.	91%			91%	55%	94%		94%	
727	V. C. R.	112%			112%	147%			147%	
728	V. F. M.	91%			91%	86%			86%	
729	J. B. de S.	64%			64%	69%			69%	
730	J. C. N.	76%			76%	65%			65%	
731	M. A. R.	91%			91%	82%			82%	
732	V. A. N.	76%			76%	80%			80%	
733	A. C. da S.	69%			69%	86%			86%	
734	A. A. J.	55%			55%	81%			81%	
735	V. F. de J.	91%			91%	85%			85%	

736	R. V. G.	83%			83%	94%			94%	
737	S. F. C.	112%			112%	68%			68%	
738	B. dos S.	91%			91%	88%			88%	
739	E. F. V. C.	112%			112%	88%			88%	
740	D. M.	100%			100%	84%			84%	
741	E. A. da S.	NR				55%	101%		101%	
742	R. dos S.	76%			76%	56%	121%		121%	64%
743	C. A. G. S.	91%			91%	75%			75%	
744	R. P. de L.	89%			89%	106%			106%	
745	A. F. R.	89%			89%	74%			74%	
746	D. R. V.	89%			89%	110%			110%	
747	M. S. V.	79%			79%	82%			82%	
748	M. L.	63%			63%	57%	NC			
749	L. M.	112%			112%	127%			127%	
750	A. T.	126%			126%	122%			122%	
751	J. R. G.	100%			100%	79%			79%	
752	A. J. dos S.	89%			89%	71%			71%	
754	A. N. P.	89%			89%	92%			92%	
755	R. F. da S.	100%			100%	115%			115%	
756	R. C. P.	79%			79%	111%			111%	
757	J. P. N.	71%			71%	122%			122%	
758	J. C. O.	100%			100%	87%			87%	
759	A. F. de G.	100%			100%	81%			81%	
760	J. B. G.	71%			71%	75%			75%	
761	J. M. de S.	79%			79%	102%			102%	
762	K. D. V.	89%			89%	97%			97%	
763	R. A. T. C.	71%			71%	120%			120%	
764	D. A. da S.	56%			56%	82%			82%	
765	A. L. M.	55%			55%	100%			100%	
766	J. F. S.	27%	107%		107%	95%			95%	
767	A. A. S.	135%			135%	106%			106%	
768	V. de J.	112%			112%	105%			105%	
769	J. I. C.	56%			56%	63%			63%	
770	C. D. M.	100%			100%	146%			146%	
771	C. Z.	83%			83%	138%			138%	
772	J. C. da S.	135%			135%	97%			97%	
773	C. J. F.	65%			65%	71%			71%	
774	M. A. B.	123%			123%	74%			74%	
775	W. L. R.	135%			135%	102%			102%	
776	C. C. C.	100%			100%	74%			74%	
777	S. G. da S.	123%			123%	92%			92%	
778	T. G. S. C.	42%	74%		74%	83%			83%	79%
779	E. C. O.	123%			123%	85%			85%	
780	G. D. M.	76%			76%	120%			120%	
781	J. D. da S.	112%			112%	128%			128%	
782	E. L. de S.	112%			112%	124%			124%	
783	E. N.	100%			100%	87%			87%	
784	M. A. O.	123%			123%	107%			107%	
785	J. D. da C.	135%			135%	85%			85%	
786	J. E. B.	112%			112%	139%			139%	
787	E. A. de F.	120%			120%	109%			109%	
788	R. R.	85%			85%	79%			79%	

789	R. A. F.	100%			100%	129%			129%	
790	C. A. G. V.	85%			85%	115%			115%	
791	J. A. F.	56%			56%	70%			70%	
792	L. R. F.	100%			100%	92%			92%	
793	C. R. R.	85%			85%	163%			163%	
794	R. A. S.	100%			100%	84%			84%	
795	E. A. B.	71%			71%	125%			125%	
796	L. D.	120%			120%	113%			113%	
797	M. O. G. S.	85%			85%	150%			150%	
798	E. R.	100%			100%	73%			73%	
799	C. R. T.	85%			85%	77%			77%	
800	G. L. V.	120%			120%	239%	NC			
801	M. D.	85%			85%	107%			107%	
802	G. A. B.	120%			120%	112%			112%	
803	S. Q. S.	71%			71%	155%			155%	
804	A. D. P.	85%			85%	118%			118%	
805	E. S.	71%			71%	86%			86%	
806	D. de O.	60%			60%	80%			80%	
807	M. B. A. C.	60%			60%	120%			120%	
808	G. M. G.	120%			120%	125%			125%	
809	M. A. C.	60%			60%	105%			105%	
810	F. C. S.	71%			71%	115%			115%	
811	J. A. R.	120%			120%	170%			170%	
812	R. H.	120%			120%	85%			85%	
813	J. P.	100%			100%	145%			145%	

Cofator de Ristocetina

Os resultados do cofator de ristocetina mostraram uma distribuição normal mesmo quando separados pelo grupo sanguíneo. Os cálculos do desvio lateral (Skewness) para o cofator de ristocetina, nos grupos O e Não O foram 0,479 e 0,364, respectivamente. Os cálculos da concentração (Kurtosis) para o cofator de ristocetina nos grupos O e Não O foram -0,568 e -0,429, respectivamente.

A análise da média e desvio padrão do cofator de ristocetina, separando-se os doadores de acordo com o grupo sanguíneo estão apresentados na Tabela 4 e Gráfico 1. A análise estatística mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo O e Não O ($p < 0.01$).

O grupo geral mostrou uma média de 84%, com um desvio padrão de 23%. Diante desse resultado, a faixa definida como normal a partir de 1,5 desvios padrões, foi de 49,5% a 118,5%.

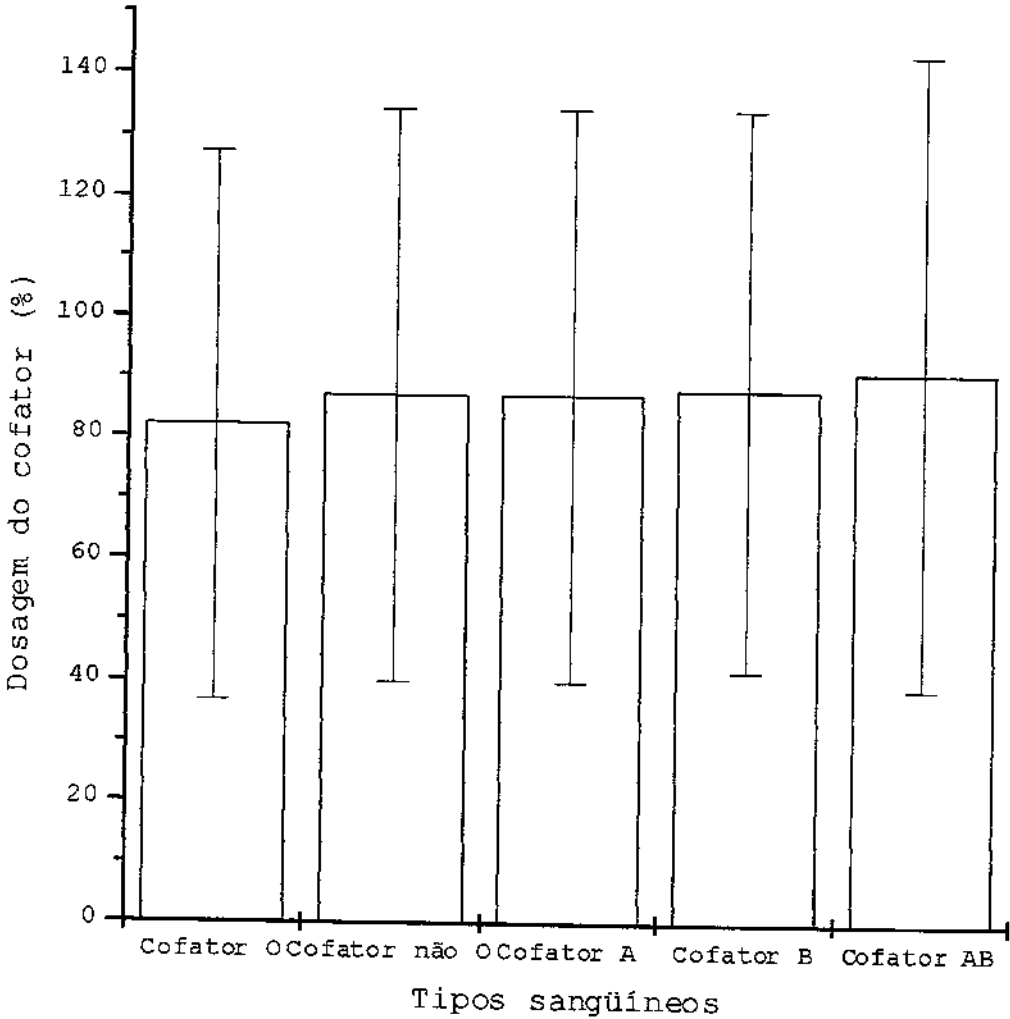
A variação normal do cofator de ristocetina para o grupo O e o grupo não O, levando-se em conta 1,5 desvios padrões, foi de 48 a 116%, e de 51,5 a 122,5%, respectivamente.

O resultado da variação normal nos grupos O e não O de acordo com os percentis 2,5 e 97,5 foi de 48,7 a 132% e 50 a 138%, respectivamente.

Tabela 4. Correlação entre o Tipo Sanguíneo e a Dosagem do Cofator de Ristocetina

	<i>Tipo O</i> (n=387)	<i>Tipo Não O</i> (n=396)	<i>Tipo A</i> (n=285)	<i>Tipo B</i> (n=88)	<i>Tipo AB</i> (n=23)
<i>Média</i>	82%	87%	86%	88%	91%
<i>Desvio Padrão</i>	22,6%	23,6%	23%	23%	26%

Gráfico 1. Correlação entre o Tipo Sangüíneo e a Dosagem do Cofator de Ristocetina



Fator VIII

Os resultados do fator VIII mostraram uma distribuição normal mesmo quando separados pelo grupo sanguíneo. Os cálculos do desvio lateral (Skewness) para o fator VIII, nos grupos O e Não O foram 0,990 e 0,587, respectivamente. Os cálculos da concentração (Kurtosis) para o fator VIII nos grupos O e Não O foram 1,72 e 0,188, respectivamente.

A análise da média e desvio padrão do fator VIII, separando-se os doadores de acordo com o grupo sanguíneo estão apresentados na Tabela 5 e Gráfico 2. A análise estatística mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo O e não O ($p < 0.01$).

O grupo geral mostrou uma média de 106%, com um desvio padrão de 28%. Diante desse resultado, a faixa definida como normal a parti de 1,5 desvios padrões, foi de 64% a 148%.

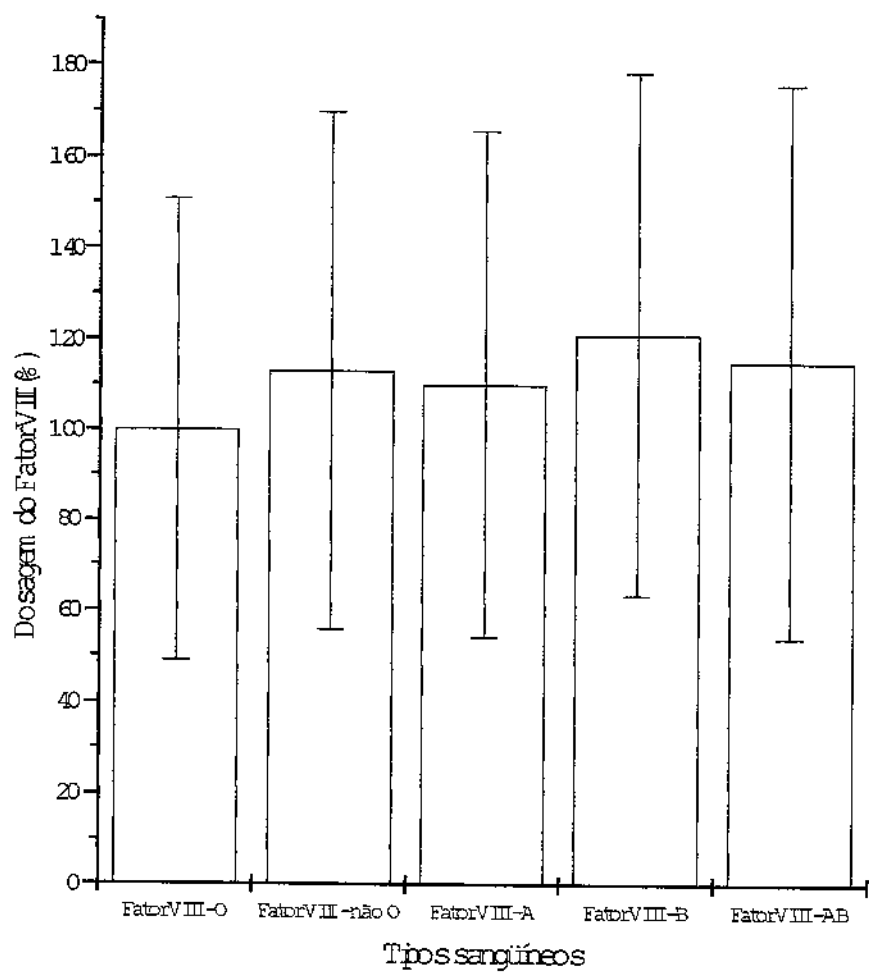
A variação normal do fator VIII para o grupo O e o grupo não O, levando-se em conta 1,5 desvios padrões, foi de 62 a 138% para o grupo O, e de 70,4 a 155,5% no grupo Não O.

O resultado da variação normal nos grupos O e não O de acordo com os percentis 2,5 e 97,5 foi de 60 a 170% e 64 a 176%, respectivamente.

Tabela 5. Correlação entre o Tipo Sanguíneo e a Dosagem do Fator VIII

	<i>Tipo O</i> (<i>n</i> =387)	<i>Tipo não O</i> (<i>n</i> =396)	<i>Tipo A</i> (<i>n</i> =285)	<i>Tipo B</i> (<i>n</i> =88)	<i>Tipo AB</i> (<i>n</i> =23)
<i>Média</i>	100%	113%	110%	121%	115%
<i>Desvio Padrão</i>	25,4%	28,4%	28%	28%	30%

Gráfico 2. Correlação entre o Tipo Sangüíneo e a Dosagem de Fator VIII



Prevalência da vWD

A análise das respostas ao questionário quanto a história pessoal de sangramento, revelou que 72 doadores (9,05%) tinham uma ou mais queixas positivas, caracterizado por equimoses frequentes (1,63%), epistaxe (6,66%), gengivorragia (6,03%), sangramento prolongado após ferimento cortante (0,12%), extração dentária (3,64%) ou cirurgias (0,75%).

A análise do antecedente familiar revelou que 32 doadores (4,1%) apresentaram história familiar positiva.

Sete doadores (0,89%) apresentaram antecedente pessoal e familiar de sangramento.

Baseado nos critérios para o diagnóstico de vWD, 13 indivíduos dessa população, constituída por 795 homens doadores de sangue foram considerados como portadores dessa doença, indicando portanto, uma prevalência de 1,63%. Quando também consideramos a dosagem do antígeno de vWF, essa prevalência foi de 1%.

Encontra-se em **anexo 3** o resultado da dosagem do cofator de ristocetina, fator VIII e antígeno do vWF, nos doadores de sangue com *diagnóstico confirmado* de vWD.

No **anexo 4**, encontra-se o resultado da dosagem do cofator de ristocetina, fator VIII e antígeno do vWF, nos doadores de sangue com *provável diagnóstico* de vWD.

Identificação e Determinação da Frequência Alélica dos 3 VNTRs em Caucásóides e Pacientes com vWD

VNTR-3

A Figura 7 demonstra o padrão dos genótipos homozigotos encontrados na população caucasóide para o VNTR3. Como pode ser observado, detectou-se 3 padrões diferentes de homozigotos.

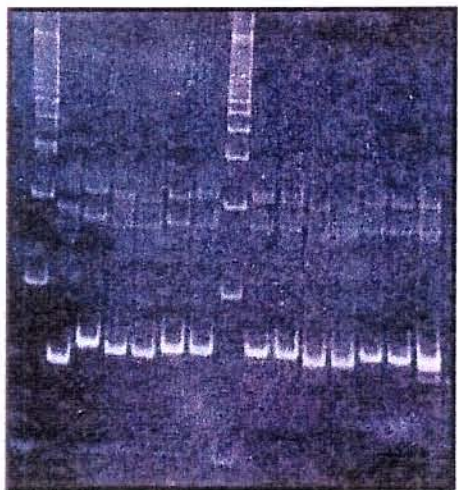


Figura 7: Demonstração dos 3 Padrões Homozigotos Encontrados na População Caucasóide para o VNTR-3

Nas linhas 1 e 8 encontra-se o marcador de peso molecular Ladder 100pb da Pharmacia. Na linha 15 encontra-se o Pool, feito à partir da mistura de 2µl de cada Homozigoto encontrado.

Após o seqüenciamento desses 3 padrões homozigotos, determinamos o número de repetições ATCT e o tamanho do fragmento da PCR em pares de bases, como mostra a Figura 8.

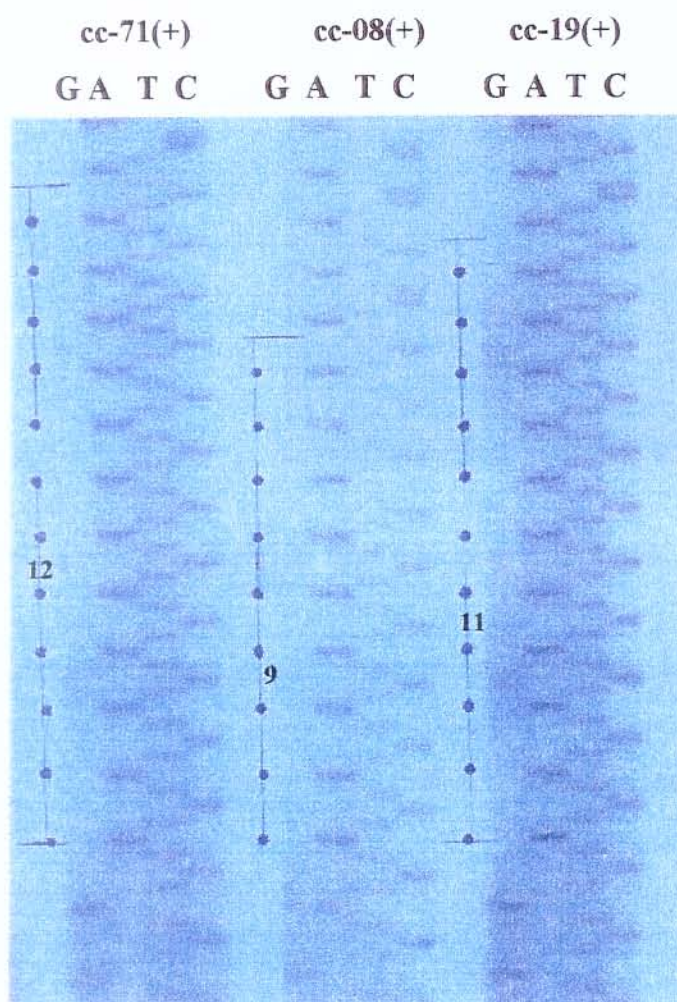


Figura 8: Seqüenciamento dos 3 Padrões Homozigotos da População Caucasóide para os VNTR-3

- cc-71 com 12 repetições ATCT em seqüência no sentido 5' → 3'. A comparação do número dessas repetições ATCT com as do gene do vWF, que também possui 12 repetições, e tamanho de fragmento de 154pb do Primer VNTR 3A ao VNTR 3B, demonstra que esse padrão homozigoto também tem 154 pb.
- cc-08 com 9 repetições ATCT em seqüência no sentido 5' → 3'. Esse homozigoto possui 3 repetições ATCT à menos do que o gene do vWF, e portanto, um fragmento de PCR de 142 pb.
- cc-19 com 11 repetições ATCT em seqüência no sentido 5' → 3'. Esse padrão homozigoto apresenta um fragmento de PCR com tamanho de 150 pb.

A partir dos dados obtidos com estes 3 padrões homozigotos, confeccionou-se o nosso próprio marcador de peso molecular, misturando uma alíquota da PCR de cada um dos padrões de homozigotos ao Marcador Ladder Pharmacia. Para tornar esse marcador “caseiro” o mais informativo possível na região de 100 a 200 pb, região que compreende todos os fragmentos da PCR obtidos com os primers do VNTR-3, incluímos também uma alíquota de PCR de um padrão homozigoto, com 178 pb, referente ao VNTR-2.

Esse marcador, designado *Ladder J-2*, permitiu identificar o tamanho e o número de repetições de todos os alelos dos padrões heterozigotos do VNTR-3, como mostra a Figura 9.

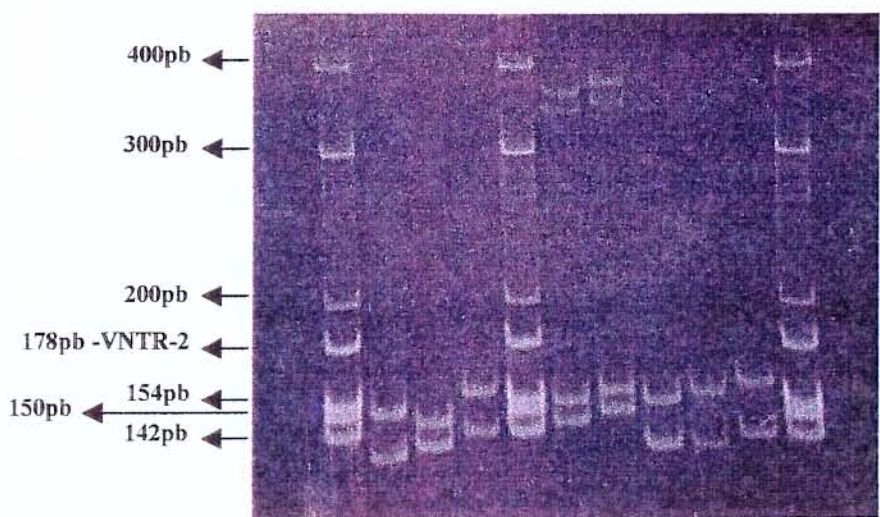


Figura 9: Determinação do Tamanho dos Fragmentos da PCR de Heterozigotos para os VNTR-3

Da esquerda para a direita: **Ladder J-2**, cc-49 (134/150pb), cc-05 (138/146pb), cc-50 (142/158pb), **Ladder J-2**, cc-12 (146/154pb), cc-07 (150/158pb), cc-21 (138/154pb), cc-27 (138/158pb), cc-22 (142/162pb), **Ladder J-2**.

A Tabela 6 discrimina o tamanho dos fragmentos da PCR e o respectivo número de repetições de ATCT.

Tabela 6. Correlação entre o Tamanho dos Fragmentos da PCR e o Número de Repetições ATCT - VNTR-3

Tamanho dos Fragmentos	134 pb	138 pb	142 pb	146 pb	150 pb	154 pb	158 pb	162 pb
Nº de repetições	7 ATCT	8 ATCT	9 ATCT	10 ATCT	11 ATCT	12 ATCT	13 ATCT	14 ATCT

Após a identificação dos padrões obtidos, procedeu-se à genotipagem dos controles e de pacientes com vWD.

O resultado dos genótipos obtidos nos controles estão apresentados no **anexo 5**. O cálculo da heterozigozidade esperada foi de 81.27%, e da encontrada foi de 86.27% (p=0.57), indicando que a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à esse loco.

A seguir, a Tabela 7 apresenta as frequências alélicas do VNTR-3 no grupo controle caucasóide e nos pacientes com vWD:

Tabela 7. Freqüências Alélicas do VNTR-3 nos Controles e em Pacientes

Alelo (pb)	Nº de repetições	Controles	Pacientes
		Total de alelos = 102 (%)	Total de alelos = 50 (%)
134	7	0,98	0
138	8	9,80	6
142	9	13,72	14
146	10	26,47	30
150	11	27,45	20
154	12	12,74	24
158	13	6,86	6
162	14	1,96	0

A Tabela 8 apresenta a distribuição dos genótipos para os alelos do VNTR-3 em controles caucasóides e pacientes com vWD.

Tabela 8. Distribuição dos Genótipos para os Alelos do VNTR-3 em Controles e em Pacientes

Genótipo (pb)	Controles (n = 51)	Pacientes (n = 25)
134 / 150	1	0
138 / 146	3	1
138 / 150	4	1
138 / 154	2	0
138 / 158	1	1
142 / 142	1	1
142 / 146	6	0
142 / 150	5	1
142 / 154	0	3
142 / 158	0	1
142 / 162	1	0
146 / 146	3	4
146 / 150	5	1
146 / 154	3	4
146 / 158	4	1
150 / 150	3	2
150 / 154	6	3
150 / 158	1	0
154 / 154	0	1
154 / 158	1	0
154 / 162	1	0
Porcentagem de <u>homozigotos</u>	13,72%	32%
Porcentagem de <u>heterozigotos</u>	86,27%	68%

O teste do χ^2 não revelou diferença significativa entre a proporção de homozigotos e heterozigotos entre os controles e pacientes (χ^2 corrigido = 2,477; P = 0,1155).

VNTR-2

A Figura 10 demonstra o padrão dos genótipos homozigotos encontrados na população caucasóide para o VNTR2. Como pode ser observado, detectou-se 2 padrões homozigotos diferentes.

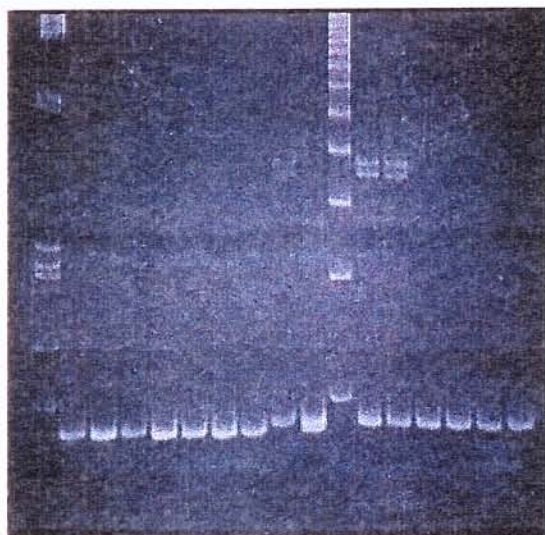


Figura 10: Demonstração dos 2 Padrões Homozigotos Encontrados na População Caucasóide para o VNTR-2

Da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular ϕ x-174, cc-25, cc-26, cc-52, cc-15, cc-28, cc-38, cc-03, cc-22, Pool, Ladder 100 pb Pharmacia, cc-27, cc-32, cc-53, cc-41, cc-49, e cc-51.

Pool: mistura de 3 μ l de cada homozigoto: cc-22, cc-41, cc-52, cc-53, e cc-03.

Após o seqüenciamento desses 2 padrões homozigotos, determinou-se o número de repetições ATCT e o tamanho do fragmento da PCR em pares de bases, como mostra a Figura 11.

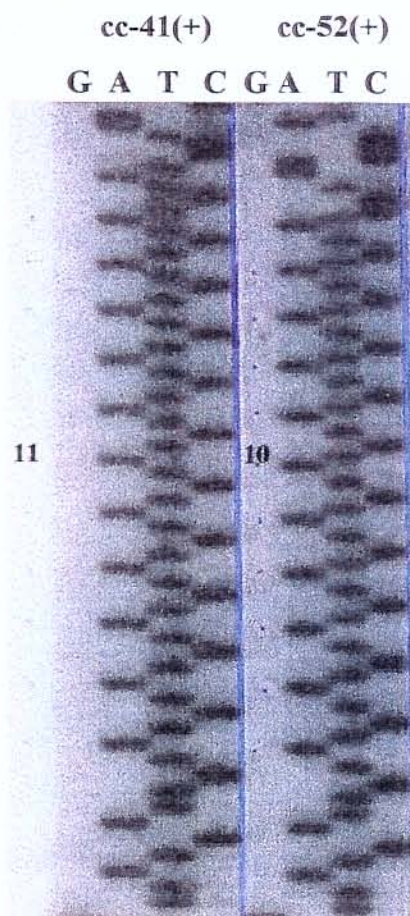


Figura 11: Sequenciamento dos 2 Padrões Homozigotos da População Caucasóide para os VNTR-2

- cc-41 com 11 repetições ATCT em sequência no sentido 5'→3'. O tamanho do fragmento sequenciado foi de 182 pb. A comparação do número dessas repetições ATCT com as do gene do vWF, que também possui 11 repetições, e tamanho de fragmento de 182 pb do Primer VNTR 2A ao VNTR 2B, confirma que esse padrão homozigoto tem 182 pb.
- cc-52 com 10 repetições ATCT em sequência no sentido 5'→3'. Esse padrão homozigoto possui 10 repetições ATCT, e um tamanho de 178pb.

À partir dos dados obtidos com estes 2 padrões homozigotos, confeccionou-se o nosso próprio marcador de peso molecular, misturando uma alíquota da PCR de cada um dos padrões homozigotos ao Marcador Ladder Pharmacia. Para tornar o nosso marcador “caseiro” o mais informativo possível na região de 100 a 200 pb, região que compreende todos os fragmentos da PCR obtidos com os primers VNTR-2, incluímos também uma terceira amostra de padrão homozigoto, com 154 pb, referente ao VNTR-3.

Esse marcador, designado *Ladder J-3*, permitiu identificar o tamanho e o número de repetições de todos os alelos dos padrões heterozigotos do VNTR-2, como mostra a Figura 12.

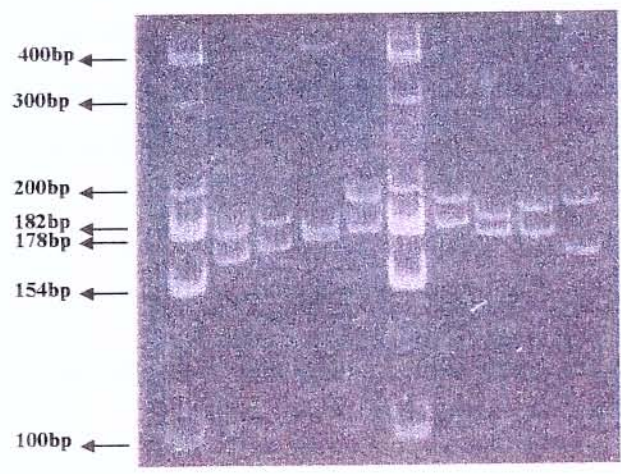


Figura 12: **Determinação do Tamanho dos Fragmentos da PCR de Heterozigotos para os VNTR-2.**

Da esquerda para a direita: **Ladder J-3**, *vW*-23 (166 / 178pb), cc-48 (170 / 182pb), cc-19 (174 / 178pb), cc-18 (178 / 194pb), **Ladder J-3**, cc-35 (182 / 194pb), cc-14 (178 / 186pb), cc-34 (178 / 190pb), e cc-24 (170 / 194pb).

A Tabela 9 discrimina o tamanho dos fragmentos da PCR e o respectivo número de repetições ATCT, do VNTR 2.

Tabela 9: **Correlação entre o Tamanho dos Fragmentos de PCR e o Número de Repetições ATCT – VNTR-2**

Tamanho dos Fragmentos	166 pb	170 pb	174 pb	178 pb	182 pb	186 pb	190 pb	194 pb
Nº de repetições	7 ATCT	8 ATCT	9 ATCT	10 ATCT	11 ATCT	12 ATCT	13 ATCT	14 ATCT

Após a identificação dos padrões obtidos, procedeu-se à genotipagem dos controles e de pacientes com vWD.

Os resultados obtidos nos controles estão apresentados no **anexo 6**. O cálculo da heterozigotidade esperada foi de 70,01%, e da encontrada foi de 66,66% ($p = 0,84$), indicando que a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à esse loco.

A Tabela 10 apresenta as frequências alélicas do VNTR-2 no grupo controle caucasóide e nos pacientes com vWD.

Tabela 10: Frequências Alélicas do VNTR-2 nos Controles e em Pacientes

Alelo (pb)	Nº de repetições	Controles	Pacientes
		Total de alelos = 102 (%)	Total de alelos = 50 (%)
166	7	0	2
170	8	7,84	6
174	9	0,98	2
178	10	34,31	50
182	11	42,15	30
186	12	4,90	2
190	13	5,88	8
194	14	3,92	0

A Tabela 11 apresenta a distribuição dos genótipos para os alelos do VNTR-2 em controles caucasóides e pacientes com vWD.

Tabela 11: Distribuição dos Genótipos para os Alelos do VNTR-2 em Controles e em Pacientes

Genótipo (pb)	Controles (n = 51)	Pacientes (n = 25)
166 / 178	0	1
170 / 174	0	1
170 / 178	2	1
170 / 182	3	0
170 / 186	0	1
170 / 190	2	0
170 / 194	1	0
174 / 178	1	0
178 / 178	8	8
178 / 182	13	7
178 / 186	2	0
178 / 190	2	0
178 / 194	1	0
182 / 182	9	2
182 / 186	3	0
182 / 190	2	4
182 / 194	2	0
Porcentagem de <u>Homozigotos</u>	33,33%	40%
Porcentagem de <u>Heterozigotos</u>	66,66%	60%

O teste do χ^2 não revelou diferença significativa entre a proporção de homozigotos e heterozigotos entre os controles e pacientes (χ^2 corrigido = 0,100 P = 0,7524)

VNTR-1

Para o VNTR 1 houve apenas um padrão homozigoto, como mostra a Figura 13.

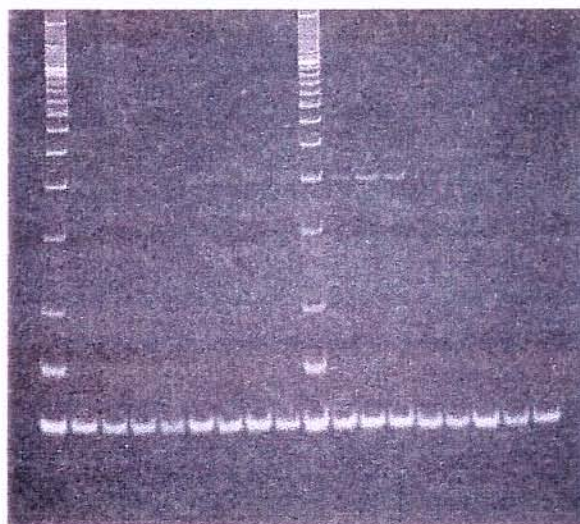


Figura 13: Demonstração do Único Padrão Homozigoto Encontrado na População Caucasóide para o VNTR-1

Da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular Ladder 100pb Pharmacia, cc-1, cc-4, cc-6, cc-9, cc-11, cc-15, cc-20, cc-22, Ladder 100pb Pharmacia, cc-27, cc-30, cc-39, cc-41, cc-49, cc-50, cc-51, e cc-53.

Após o sequenciamento, verificou-se 7 repetições ATCT em sequência no sentido 5'→3', com um tamanho de 102 pb, Figura 14.

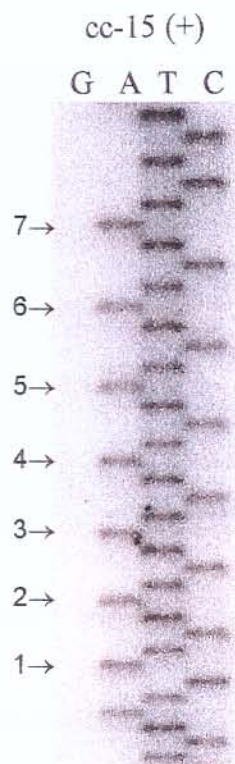


Figura 14: Seqüenciamento do Único Padrão Homozigoto Encontrado na População Caucasóide para os VNTR-1

- cc-15 com 7 repetições ATCT em seqüência no sentido 5'→3'. O tamanho do fragmento seqüenciado foi de 102pb. A comparação do número dessas repetições ATCT com as do gene do vWF, que também possui 7 repetições no sentido 5'→3, e tamanho de fragmento de 102 pb do Primer VNTR 1A ao VNTR 1B, confirma que esse padrão homozigoto tem 102 pb.

O marcador de peso molecular para o VNTR 1 foi realizado, misturando-se uma amostra desse padrão homozigoto ao Marcador Ladder Pharmacia. Para tornar o nosso marcador “caseiro” o mais informativo possível na região de 100 a 200 pb, região que compreende todos os fragmentos da PCR obtidos com os primers VNTR-1, incluiu-se também uma segunda amostra de um padrão homozigoto, com 142 pb, referente ao VNTR-3.

Com este marcador, que recebeu a designação Ladder J-5, foi possível determinar o tamanho e o número de repetições de todos os padrões heterozigotos do VNTR-1, Figura 15.

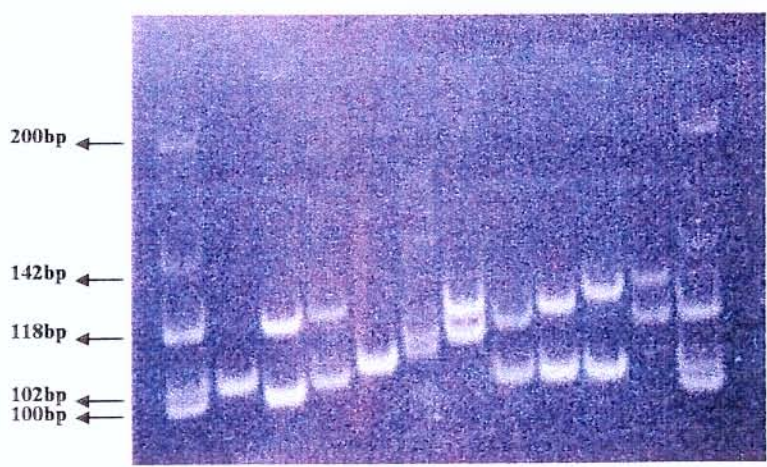


Figura 15: Determinação do Tamanho dos Fragmentos da PCR de Heterozigotos para os VNTR-1

Da esquerda para a direita: Ladder J-5*, cc-50, cc-37, cc-16, vW-35, cc-23, cc-21, cc-05, cc-35, cc-18, vW-75 e Ladder J-5*.

A Tabela 12 discrimina o tamanho dos fragmentos da PCR e o respectivo número de repetições ATCT, do VNTR 1.

Tabela 12: Correlação entre o Tamanho dos Fragmentos da PCR e o Número de Repetições ATCT – VNTR-1

Tamanho dos Fragmentos	98 pb	102 pb	106 pb	110 pb	114 pb	118 pb	122 pb	126 pb	130 pb
Nº de repetições	6 ATCT	7 ATCT	8 ATCT	9 ATCT	10 ATCT	11 ATCT	12 ATCT	13 ATCT	14 ATCT

Após a identificação dos padrões obtidos, procedeu-se à genotipagem dos controles e de pacientes com vWD.

Os resultados obtidos nos controles estão apresentados no **anexo 7**. O cálculo da heterozigozidade esperada foi de 64,07%, e da encontrada foi de 66,6% ($p = 0,92$), indicando que a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à esse loco.

A Tabela 13 apresenta as frequências alélicas do VNTR-1 no grupo controle caucasóide e nos pacientes com vWD:

Tabela 13: Frequências Alélicas do VNTR-1 nos Controles e em Pacientes

Alelo (pb)	Nº de repetições	Controles	Pacientes
		Total de alelos = 102 (%)	Total de alelos = 50 (%)
98	6	9,80	10
102	7	56,86	48
106	8	0,98	6
110	9	0,98	2
114	10	11,76	12
118	11	11,76	14
122	12	6,86	6
126	13	0,98	0
130	14	0	2

A Tabela 14 apresenta a distribuição dos genótipos para os alelos do VNTR-1 em controles caucasóides e pacientes com vWD.

Tabela 14: Distribuição dos Genótipos para os Alelos do VNTR-1 em Controles e em Pacientes

Genótipo (pb)	Controles (n = 51)	Pacientes (n = 25)
98 / 102	6	3
98 / 114	1	1
98 / 118	2	1
98 / 122	1	0
102 / 102	17	5
102 / 106	1	1
102 / 110	0	1
102 / 114	6	4
102 / 118	6	2
102 / 122	4	3
102 / 126	1	0
106 / 106	0	1
110 / 114	1	0
114 / 118	3	1
114 / 122	1	0
118 / 118	0	1
118 / 122	1	0
118 / 130	0	1
% <u>Homozigotos</u>	33,33%	28%
% <u>Heterozigotos</u>	66,66%	72%

O teste do χ^2 não revelou diferença significativa entre a proporção de homozigotos e heterozigotos entre os controles e pacientes (χ^2 corrigido = 0,043 P = 0,8358)

Análise do Desequilíbrio de Ligação dos 3 VNTRs nos Controles Caucasóides e Pacientes com vWD

Teste de Desequilíbrio de Ligação para todos os pares de locos (Caucasóides/VNTR-1, 2 e 3) com o auxílio do programa ARLEQUIN (*).

Esse programa permite estimar a frequência dos haplótipos à partir de dados genotípicos com fase gamética desconhecida, e permite calcular um valor de *P exato* para o desequilíbrio de ligação de modo análogo ao teste exato de Fisher, aplicado a uma tabela de contingência de tamanho arbitrário.

Os valores calculados de *P*, para cada par de locus, seguem abaixo:

Entre o par VNTR-3 e VNTR-1:

$$P = 0.30205 \quad \pm 0.00141$$

Entre o par VNTR-3 e VNTR-2:

$$P = 0.00105 \quad \pm 0.00011$$

Entre o par VNTR-1 e VNTR-2:

$$P = 0$$

O resultado dessa análise indica que os VNTR-3 e 1 estão em equilíbrio de ligação, ou seja, não existe uma associação preferencial entre esses alelos na população caucasóide ($P = 0,30$). No entanto, existe desequilíbrio de ligação entre os VNTRs 3 e 2 ($P = 0.00105$) e entre os VNTRs 1 e 2 ($P = 0$).

Teste de Desequilíbrio de Ligação para todos os pares de locos (Pacientes/ VNTR-1, 2 e 3) com o auxílio do programa ARLEQUIN.

Entre o par VNTR-3 e VNTR-1:

$$P = 0.464341 \quad \pm 0.00161663$$

Entre o par VNTR-3 e VNTR-2:

$$P = 0.0236992 \quad \pm 0.000394529$$

Entre o par VNTR-1 e VNTR-2:

$$P = 0.073873 \quad \pm 0.000781232$$

A análise demonstra que os pares VNTR-3 e 1 e VNTR 1 e 2 estão em equilíbrio de ligação, ou seja, não existe uma associação preferencial entre esses alelos na população de pacientes ($P = 0,464341$ ou 46%; $P=0.073873$ ou 7.3%, respectivamente). Já o par VNTR-3 e 2 estão em desequilíbrio de ligação.

Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 3 VNTRs nos Pacientes com vWD (ARLEQUIM):

$$\text{VNTR-3:} \quad P = 0.21035 \quad \pm 0.00096$$

$$\text{VNTR-1:} \quad P = 0.74367 \quad \pm 0.00110$$

$$\text{VNTR-2:} \quad P = 0.01491 \quad \pm 0.00023$$

A análise indica que a distribuição dos VNTRs 3 e 1 estão em equilíbrio. Em relação ao loco VNTR-2, o fato de não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser decorrente do tamanho da amostra. No entanto, embora não significativo, observa-se um “excesso” de alelos de 178pb desse VNTR nos pacientes (50% dos alelos) em comparação com os cc's (34,31% dos alelos). Teste do χ^2 (corrigido) = 2,080 $P = 0,1493$

Tabela 15: Distribuição das Frequências dos Haplótipos para os 3 VNTRs do Intron 40 do gene do vWF em Pacientes e Controles Caucásios, Estimadas pelo Método de “maximum-likelihood estimation”, com Auxílio do ‘software’ ARLEQUIN

Haplótipo	VNTR (3, 1 e 2)	<i>Controles caucásios</i>		<i>Pacientes com vWD</i>	
		Frequência	Desvio Padrão	Frequência	Desvio Padrão
1	10 10 10	0.0216	0.01396	0.06000	0.03519
2	10 10 11	-	-	0.02000	0.02207
3	10 11 10	0.01343	0.01345	0.02000	0.02440
4	10 11 11	0.03338	0.01654		
5	10 12 12	0.00980	0.00973		
6	10 12 14	0.00980	0.00972		
7	10 6 8	0.01043	0.01226	0.02858	0.02747
8	10 6 10	-	-	0.02000	0.02594
9	10 7 10	0.10792	0.03669	0.13142	0.05247
10	10 7 11	0.04612	0.02516		
11	10 7 12	0.01221	0.01025		
12	10 13 11	-	-	0.02000	0.02515
13	11 10 7	-	-	0.02000	0.01971
14	11 10 10	0.04943	0.02603		
15	11 10 12	0.01720	0.01251		
16	11 11 9	0.00980	0.00875		
17	11 11 11	-	-	0.04000	0.02969
18	11 6 8	0.02365	0.01541		
19	11 7 9	-	-	0.02000	0.02087
20	11 7 10	0.02796	0.02040	0.04000	0.02757
21	11 7 11	0.13666	0.04086		
22	11 8 10	-	-	0.04000	0.02554
23	11 8 12	0.00980	0.01014		
24	11 9 10	-	-	0.02000	0.01407
25	11 12 11	-	-	0.02000	0.02159
26	12 12 10	0.03922	0.01907		
27	12 12 11	-	-	0.02000	0.02334
28	12 12 13	-	-	0.02000	0.02202
29	12 6 10	0.00980	0.01146		
30	12 6 11	-	-	0.02000	0.02009
31	12 6 8	0.02879	0.01772	0.03142	0.03135
32	12 7 10	0.02023	0.01477	0.10858	0.05194

33	12 7 11	0.00980	0.01061	0.04000	0.03237
34	12 7 8	0.00980	0.01028		
35	12 9 11	0.00980	0.01007		
36	13 11 10	0.01201	0.01013		
37	13 13 14	0.00980	0.01013		
38	13 6 8	0.00576	0.00765		
39	13 7 10	0.01769	0.01708		
40	13 7 11	0.02336	0.01536	0.02000	0.02196
41	13 7 12	-	-	0.02000	0.01689
42	13 10 10	-	-	0.02000	0.02211
43	14 10 10	0.00980	0.00960		
44	14 7 10	0.00980	0.00993		
45	7 7 11	0.00980	0.00790		
46	8 10 13	0.00980	0.01030		
47	8 10 14	0.00980	0.00849		
48	8 11 13	0.03922	0.02100	0.06000	0.03046
49	8 11 14	0.00980	0.01116		
50	8 12 13	0.00980	0.00762		
51	8 7 11	0.01961	0.01619		
52	9 6 10	0.00800	0.00817		
53	9 6 11	0.01161	0.01183		
54	9 7 10	0.01585	0.01216		
55	9 7 11	0.10180	0.02824	0.10000	0.04218
56	9 8 10	-	-	0.02000	0.01490
57	9 11 10	-	-	0.02000	0.02652

(*) - Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L : Arlequin ver. 1.1 : A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1997.

Estudo da Segregação em Famílias com Doença de von Willebrand

Após a determinação do genótipo dos 3 VNTRs nos pacientes e familiares, analisou-se a segregação entre algum alelo ou haplótipo e a doença, em cada uma das famílias. Nos **anexos 8, 9 e 10**, encontram-se tabelas que mostram os resultados obtidos da genotipagem dos VNTRs 3, 2 e 1, respectivamente, nas famílias com vWD.

No **anexo 11** encontram-se os heredogramas das famílias estudadas, assim como o genótipo dos 3 VNTRs.

Esses 3 VNTRs foram analisados em 8 famílias afetadas com vWD tipos I e II. Um ou mais desses marcadores foram informativos em sete casos. (Figura 16 e 17). O VNTR 3 foi informativo em sete famílias (87.5% de informatividade), o VNTR 2 em seis famílias (75% de informatividade) e o VNTR-1 somente em quatro famílias (50% de informatividade). Não foram detectadas, nestas famílias, nenhuma banda diferente entre pais e filhos, o que sugere que no nosso grupo essas repetições não foram instáveis.

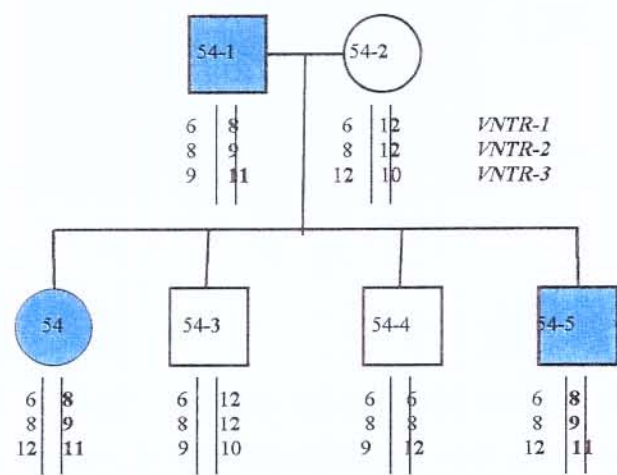


Figura 16: Análise dos Haplótipos da Família vW-54, através dos VNTR-1, 2 e 3. Quadrados significam homens; os círculos representam as mulheres. A cor azul presente nos membros 54-1, 54 and 54-5 significa pacientes com vWD tipo II. A doença estava ligada com os alelos 8/9/11 do VNTR-1, VNTR-2 and VNTR-3 respectivamente. Todos os VNTRs foram informativos nesta família

Família vW-54

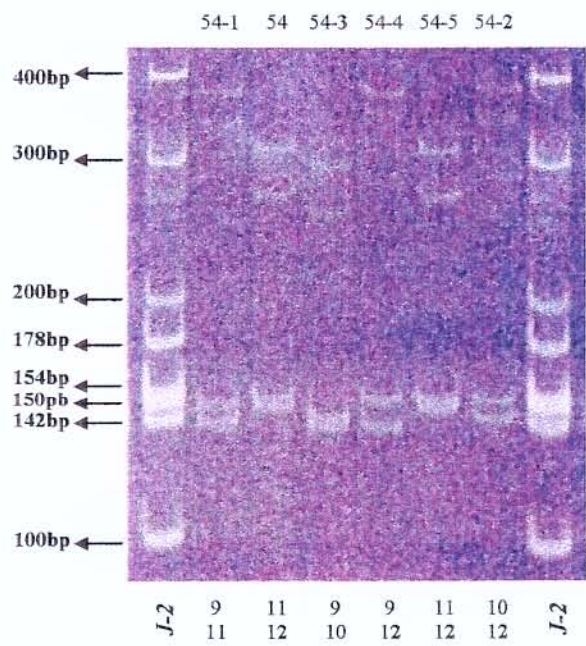


Figura 17: Eletroforese dos Produtos da PCR da Família vW-54, VNTR-3 em gel de Poliacrilamida Não Desnaturante (12%), corado pelo Brometo de Etídio. O número de pb do marcador do DNA é indicado à esquerda. J-2 é marcador de peso molecular, usado para identificar o tamanho e o número de repetições ATCT de cada amostra. Os números abaixo da figura representa o número de repetições ATCT.

Discussão

Prevalência da vWD

A vWD é a doença hemorrágica mais prevalente na população mundial. Estudos sobre a prevalência da vWD inicialmente baseavam-se no número de pacientes diagnosticados acompanhados em um centro de doenças hemorrágicas, divididos pelo número total da população acompanhada por aquele centro (BLOOM AL. 1980, NILSSON IM *et al.*, 1979). A limitação dessa análise está no fato de considerar que todos os potenciais pacientes da região foram avaliados pelo centro em questão, o que pode ter subestimado a prevalência em 3 a 10 casos para cada 100,000 habitantes.

Um estudo epidemiológico sobre a vWD foi realizado na Itália por Rodeghiero *et al.*, 1987, em que 1218 crianças investigadas apresentaram uma prevalência de 0.8%. O diagnóstico de vWD foi firmado pela associação da diminuição de cofator de ristocetina no paciente e em algum familiar com história hemorrágica positiva.

Werner *et al.*, 1993 ao analisarem 600 crianças americanas de várias etnias, verificaram que a prevalência da vWD foi de 1.3%, utilizando como critério diagnóstico a presença de história hemorrágica no paciente e familiar, e a dosagem de cofator de ristocetina abaixo de 2,5 percentis da distribuição da população.

Ainda com relação a prevalência, o estudo de pacientes com quadro clínico hemorrágico confirmam que a vWD é a doença mais freqüente, principalmente nos pacientes com queixa de sangramento cutâneo-mucoso ou após um procedimento cirúrgico (KADIR RA *et al.*, 1988; SHINMYOZU K *et al.*, 1991; DIEZ-EWALD M. *et al.*, 1991; CABRERA ME *et al.*, 1989; QUIROGA T *et al.*, 1997; EDLUND M. *et al.*, 1996).

O único estudo sobre a prevalência da vWD realizado no Brasil, analisou o modo de herança e a prevalência da forma grave da vWD, no Estado do Rio Grande do Sul, indicando que em 4 casos a herança foi recessiva e em 3 por dupla heterozigose. A freqüência foi a esperada considerando-se a população daquele estado, (FISCHER RR *et al.*, 1989).

Este estudo demonstrou que a prevalência da vWD nesta população brasileira, composta por 795 doadores de sangue, do sexo masculino, foi de 1,63%. Nosso grupo de estudo foi constituído presumivelmente por indivíduos sadios, uma vez que procuraram o Serviço para doação de sangue, o que já pressupõe que não são portadores de qualquer tipo de patologia. Além disso, passaram por uma triagem antes da doação de sangue, e a presença de qualquer condição clínica que não os considerasse como sadios, foi critério de exclusão no estudo. Este cuidado apesar de permitir uma análise de indivíduos saudáveis, o que evita a inclusão de amostras com

níveis elevados de fator VIII secundários a uma reação, pois o mesmo é uma proteína de fase aguda, também pode ter levado a um viés de análise, não podendo ser estendido à população em geral.

Apesar da dosagem de fator VIII e cofator de ristocetina poder variar na vWD em diferentes análises, nossos resultados mostraram que os indivíduos com esse diagnóstico apresentaram pouca variação. Na verdade 11 pacientes tiveram seu exames repetidamente diminuídos numa segunda ou terceira dosagem.

A prevalência encontrada em nossa população foi muito superior a descrita nos centros especializados de outros países, mas semelhante ao descrito nos outros dois estudos populacionais realizados na Itália (0,57% a 1,15%) e EUA (1,3%).

Um dos critérios empregados para o diagnóstico de vWD, como a dosagem de antígeno do vWF e a repetição dos exames, foram conservadores, com o intuito de reduzir ao máximo a inclusão de falsos-positivos. Contudo, para confirmação desse diagnóstico será importante a convocação dos familiares, para a demonstração de segregação da doença nas famílias.

Os outros trabalhos sobre prevalência da vWD levavam em consideração a história clínica de sangramento, tanto do paciente como dos familiares. Caso tivéssemos incluído esse critério, apenas 6 doadores com história pessoal positiva (prevalência de 0,75%) teriam o diagnóstico estabelecido, e se associado a história familiar, apenas 1 doador.

De qualquer forma, depois dos resultados laboratoriais, contatamos por telefone os 13 doadores por nós considerados como portadores de vWD e realmente ficou confirmado que a história hemorrágica pessoal e familiar conferia com a do questionário inicial.

O fato de termos selecionado apenas homens, para investigação da prevalência, deve-se ao fato da influência da variação hormonal sobre os níveis de fator VIII e atividade de vWF. Tanto isso é importante, que na investigação de mulheres de famílias com vWD, a dosagem de fator VIII e vWF é realizada nos primeiros 5 dias após a menstruação, quando os níveis estrogênicos estão mais baixos.

Outro fator a ser considerado é o grupo sanguíneo, pois é bem estabelecido que os indivíduos do grupo O apresentam níveis reduzidos de fator VIII e vWF (Orstavik KH *et al.*, 1985; Thomas B. Wahlberg *et al.*, 1980).

A quantidade de antígeno H decresce na seguinte ordem em relação aos grupos sanguíneos: O, A₂, B e A₁. Poderíamos tentar estabelecer uma relação inversa entre a quantidade de antígeno H e a concentração de fator VIII. Contudo, apesar de nossos resultados mostrarem

uma diminuição de fator VIII estatisticamente significativa no grupo O em relação ao não O, não houve um escalonamento da concentração em relação aos subtipos sanguíneos, de acordo com a ordem acima descrita.

Alguns estudos referem um aumento do fator VIII em relação a idade, provavelmente porque refletem o estado geral de saúde, que piora com o envelhecimento. Como apenas avaliamos indivíduos sadios, a maior parte com idade inferior a 50 anos, não realizamos nenhuma avaliação levando em consideração a idade.

A interpretação correta de resultados laboratoriais envolve não somente a padronização da coleta e dos métodos, mas também do emprego de testes estatísticos adequados.

Os métodos por nós empregados foram padronizados, utilizando-se uma curva de calibração diária, e um padrão com concentração previamente conhecida, em relação a um *standard* internacional. Além disso foram sempre utilizados os mesmos kits comerciais e o mesmo equipamento.

Quanto às amostras, as mesmas foram analisadas dentro de um curto intervalo de tempo após sua coleta.

Para análise estatística o primeiro passo, e fundamental, é verificar se as variáveis tem distribuição normal. Assim, os resultados da dosagem de fator VIII e cofator de ristocetina apresentaram uma distribuição normal, quando analisados de acordo com o grupo sanguíneo O e não O, evidenciados pelos resultados obtidos da medida do desvio lateral (Skewness) e da concentração (Kurtosis).

Como nossa amostragem foi constituída por um grande número de participantes, podemos afastar o tipo de erro que decorre de limites estreitos que podem ser encontrados na análise de um grupo reduzido de indivíduos.

Para definição da variação normal do fator VIII e cofator de ristocetina inicialmente optamos pela utilização de 1,5 desvio padrões, pois o objetivo era o emprego de um método sensível, em detrimento da especificidade, já que se tratava de uma avaliação de triagem da vWD.

Como houve diferença nos parâmetros analisados em relação ao grupo sanguíneo, os cálculos também foram realizados com os indivíduos separados em grupo O e não O.

Outra definição de variação normal de uma parâmetro laboratorial que pode ser utilizada é o cálculo da média $\pm 1,96$ desvios padrões. Mesmo se considerarmos este cálculo, os indivíduos que foram definidos como portadores de vWD continuariam com esse diagnóstico, pois o

resultado da dosagem tanto do fator VIII como de cofator de ristocetina que foram utilizados para a determinação da doença nesses doadores estiveram abaixo desse intervalo de normalidade.

Um outro cálculo da variação da normalidade pode ser definido como os valores compreendidos entre 2,5 e 97,5 percentis, o que no nosso estudo ficou praticamente semelhante ao obtido pelo cálculo de 1,5 desvios padrões. Como nossa amostra tinha uma distribuição normal esse cálculo pode ser realizado sem "correções", e considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

Deve-se ressaltar que talvez o mais correto para o cálculo da variação normal dos parâmetros estudados, seria a retirada dos indivíduos com história positiva para sangramento e/ou diagnóstico de vWD. Com essas considerações, a variação normal da população estudada considerando-se 1,5 desvios padrões seria de 50,5 à 119,5 % para o cofator de ristocetina e 65,5 à 148,5% para o fator VIII.

O estudo de portadores obrigatórios de vWD tipo III demonstrou que esses indivíduos apresentam níveis reduzidos de fator VIII e cofator de ristocetina, quando comparados aos indivíduos normais, e superiores aos dos pacientes com VWD tipo I. (BERLINER AS *et al.*, 1986).

Este achado demonstra a importância de se realizar o estudo familiar para elucidar o diagnóstico da vWD em todos os prováveis casos.

VNTR

Nós analisamos os 3 VNTRs do intron 40 do gene do vWF previamente descritos, tanto em indivíduos caucasóides, quanto em pacientes com vWD, de uma população brasileira. Esses polimorfismos foram previamente estudados em várias populações, mas na população brasileira somente o VNTR-1 foi caracterizado em dois estudos (Pena *et al.*, 1994; Zago *et al.*, 1996).

O alelo mais freqüente para o VNTR-1 (7 repetições ATCT) também foi o mais freqüente em todas as populações estudadas. Comparando aos dois outros estudos feitos em populações brasileiras, nós encontramos o alelo com 14 repetições, que ainda não tinha sido descrito.

Os alelos 10 e 11 foram os mais freqüentes para o VNTR-2, o que difere da população holandesa cujos alelos mais freqüentes possuíam 12 e 13 repetições (Ploos van Amstel HK *et al.*, 1990)

No VNTR-3, o alelo com 10 e 11 repetições foi o mais freqüente, similar à população palestina e diferente da população britânica, cujo alelo mais freqüente possuía 12 repetições

Na literatura, o VNTR-3 é descrito como o mais informativo e ainda não tinha sido descrito na população brasileira. Nosso estudo confirma esses dados, uma vez que o VNTR-3 apresentou o mais alto nível de heterozigosidade, comparado com o VNTR-1 e 2. É importante evidenciar que nós encontramos um novo alelo, que ainda não tinha sido previamente descrito, caracterizado por 7 repetições ATCT.

Nossos resultados confirmam a possível associação alélica entre o VNTR-1 e VNTR-2, uma vez que nós encontramos um desequilíbrio de ligação ($p=0$).

A análise dos genótipos e haplótipos sugere que o haplótipo 12 7 10 poderia freqüentemente estar associado com a vWD em nossa população, mas somente um estudo analisando um grande número de pacientes brasileiros poderia confirmar esta hipótese.

O estudo familiar revelou que o VNTR-2 e VNTR-3 poderiam render boas informações, sem a análise da terceira região, sendo útil para o diagnóstico prenatal, e para estudo de segregação em casos severos de vWD. Embora tenham sido descritas instabilidades nesses VNTRs, (Eikenboom J.C.J. *et al.*, 1993; Casanã P. *et al.*, 1995; Haddad A.P. *et al.*, 1997), nós não detectamos este fenômeno neste trabalho.

A metodologia aplicada para a análise desses polimorfismos é de fácil interpretação, relativamente rápida, com poucos artefatos, além de não precisar manusear material radioativo. Além disso, os resultados mostram que esses VNTRs, principalmente o VNTR-3, são altamente polimórficos, o que os torna úteis em investigação forense, na análise da segregação em famílias

com vWD, em diagnósticos prenatal da vWD tipo III severa e para determinação de quimerismo, consequente ao transplante de medula óssea.

Conclusões

- Este é o primeiro estudo sobre a prevalência da vWD numa população brasileira, que foi de 1,63%.
- A variação normal da concentração plasmática de FVIII e cofator de ristocetina foi diferente quando comparamos aos grupos sanguíneos O e Não O. De acordo com essa separação, os valores definidos para o grupo O foram 62% a 138% e 48% a 116% para o FVIII e cofator, respectivamente. No grupo Não O, os valores definidos foram 70,4 a 155,5% e 51,5 a 122,5% para o fator VIII e cofator, respectivamente.
- Os 3 VNTRs do intron 40 do gene do vWF estudados nesta população brasileira estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este foi o primeiro estudo do VNTR-3 numa população brasileira.
- Foram identificados dois novos alelos: de 14 repetições no VNTR-1, e de 7 repetições no VNTR-3.
- O estudo da segregação familiar revelou que os VNTRs foram informativos em 7 das 8 famílias estudadas.
- O VNTR-3 foi o mais informativo (87,5%) e o com maior índice de heterozigosidade (83,7%), sendo portanto, o polimorfismo de escolha para estudos em que seu emprego está indicado.

Referências Bibliográficas

- ADAMS G.A.: Platelet adhesion: Past and present, In *The Platelets: Physiology and Pharmacology*, Ed G Longnecker. New York: Academy Press, 1985.
- ANNAMALAI A.E. *et al.*: Expression of factor V on human umbilical vein endothelial cells is modulated by cell injury. *Arteriosclerosis* 6:196, 1986.
- ANTTINEN H. *et al.*: Intracellular enzymes of collagen biosynthesis in human platelets. *Blood* 50:29, 1979.
- APPLEBY, R. D. & OLDS, R. J. – The inherited basis of venous thrombosis. *Pathology* 29:341-47, 1997.
- Software ARLEQUIN (*): Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L: Arlequin ver. 1.1 : A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1997.
- ASSOULINE Z, KERBIRIOU-NABIAS DM, PIÉTU G, THOMAS N, BAHNAK BR, MEYER D (1988) The human gene for von Willebrand factor; identification of repetitive alu sequences 5' to the transcription initiation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 153: 1159-1166.
- BAEZ S. Antagonistic effects of histamine and betahistamine on the vasoconstrictor actions of catecholamines in mesentery microvessels. *Bibl Anat* 10:340, 1969.
- BATLE J, LOPEZ-FERNANDEZ MF, CAMPOS M, JUSTICA B, BERGES C, NAVARRO JL, DIAZ-CREMADES M, KASPER DK, DENT JA, RUGGERI ZM, ZIMMERMAN TS (1986) The heterogeneity of type IIA von Willebrand's disease: Studies With protease inhibitors. *Blood* 68:1207-1212.
- BERLINER AS, SELIGSOHN U, ZIVELIN A, ZWANG E, SOFFERMAN G. A relatively high frequency of severe (type III) von Willebrand's disease in Israel. *Br J Haematol* 1986, 62 (3): 535-43.

- BERNARDI F, GUERRA S, PATRACCHINI P, VOLINIA S, BUZZONI D, BALLERINI G, CASONATO A, MARCHETTI G (1988b) von Willebrand disease investigated by two novel RFLPs. *British Journal of Haematology* 68:243-248.
- BLIN N, STAFFORD DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryocytes. *Nucl Acids Res* 3: 2303-2308.
- BLOOM AL. The von Willebrand syndrome. *Sem Hematol* 1980, 17: 215-27.
- BOCKENSTEDT P. *et al.*: Structural basis of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib and collagen. *J. Clin. Invest.* 77:743, 1986.
- BUCHANAN M.R. *et al.*: The basement membrane underlying the vascular endothelium is not thrombogenic: In vivo and in vitro studies with rabbit and human tissue. *Thromb Haemost* 58:698, 1987.
- CABRERA ME, ARTIGAS CG, PAEZ E, MONSALVE V, ZOLEZZI P, ARAUCO G, ESPINOZA R, HEVIA C, VILLEGAS J. Von Willebrand's disease in the IX Region of Chile. *Rev Med Chil* 1989, 117: 423-30.
- CASAÑA P, MARTINEZ F, AZNAR JA, LORENZO JI, JORQUERA JI (1995). Practical application of three polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene. *Haemost* 25:264-271.
- CASAÑA P., MARTINEZ F, AZNAR JA, LORENZO JI, JORQUERA JI. Instability Of a Variable Number Tandem Repeat in Intron 40 Of The Human von Willebrand Factor Gene. *Br. J. Haematol.* 1995, Sep; 91 (1) 255-6.
- CIAVARELLA G, CIAVARELLA N, ANTONCECCHI S, DE MATTIA D, RANIERI P, DENT J, ZIMMERMAN TS, RUGGERI ZM (1985) High resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand's disease with aberrant structure but presence of all size multimers (Type IC). *Blood* 66: 1423-1429.

- COLLER B.S. *et al.*: Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: Additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood* 61:99, 1983.
- COLMAN R.W. *et al.*; New vasoconstrictor, bovine peptide B, release during blood coagulation. *Nature* 215:292, 1967.
- COMP, P.C. & ESMON, C.T. – Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J. Clin. Invest.* 68: 1221-28, 1981
- COPOBIANCO J.O. *et al.*: The role of metabolic energy in platelet collagen adhesion. *Thromb Res* 23:79, 1981.
- CORNU P., LARRIEU M.J., CAEN J., BERNARD J. (1963) Transfusion studies in von Willebrand's disease: effect on bleeding time and factor VIII. *Br J. Haematol.* 9: 189-202.
- COWAN D.H.: Platelet adherence to collagen: Role of prostaglandin-thromboxane synthesis. *Br. J. Haematol.* 49:425, 1981.
- DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K. & KISIEL, W. – The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30:10363-70, 1991
- DE FOUW, N.J.; HAVERKATE, F.; BERTINA, R.M.; KOOPMAN, J.; VAN WIJNGAARDEN, A. & VAN HINSBERGH, V. W. M. – The cofactor role of protein S in the acceleration of whole blood clot lysis by activated protein C in vitro. *Blood* 67: 1189-92, 1986.
- DENT JA, BERKOWITZ SD, WARE J, KASPER CK, RUGGERI ZM (1990) Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87:6306-6310.
- DENT JA, GALBUSERA M, RUGGERI ZM (1991) Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *Journal of Clinical Investigations* 88:774-782.

- DIEZ-EWALD M, VIZCAINO G, ARTEAGA-VIZCAINO M, FERNANDEZ N, WEIR-MEDINA J, GOMEZ O. Epidemiology of von Willebrand's disease in the state of Zulia, Venezuela. *Invest Clin* 1991, 32:187-99.
- DIMINNO G. *et al.*: The role of ADP secretion and tromboxane synthesis in factor VIII binding to platelets. *Blood* 62:186, 1983.
- EDLUND M, BLOMBACK M, SCHOULTZ B, ANDERSSON O On the value of menorrhagia as a predictor for coagulation disorders. *Am J Hematol* 1996, 53: 234-8.
- EIKENBOOM J.C. J., Reitsma P.H., Pieter A., Velden v.d. and Briët E. Instability of repeats of the Willebrand factor gene variable number tandem repeat sequence in intron 40. *British Journal of Haematology*, 1993, 84, 533-535.
- ELLIS E.F. *et al.*: Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: Evidence that it is tromboxane A₂. *Science* 193:1135, 1976.
- ESMON, N.L. – Thrombomodulin. *Semin. Thromb. Hemost.* 13:454-63, 1987b
- ESMON, C.T. & OWEN, W.G. – Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2249-52, 1981.
- ESMON, C.T. & ESMON, N.L. – Protein C activation. *Semin. Thromb. Hemost.* 10:122-30, 1984.
- FEDERICI AB, MANNUCCI PM, LOMBARDI R, LATTUADA A, COLIBRETTI ML, DENT JA, ZIMMERMAN TS (1989) Type IIB von Willebrand's disease: New structural abnormality of plasma and platelet von Willebrand factor in a patient with prolonged bleeding time and borderline levels of ristocetin cofactor activity. *American Journal of Haematology* 32:287-293.
- FISCHER RR, LERNER C, BANDINELLI E, FONSECA AS, ROISENBERG I. Inheritance and prevalence of von Willebrand's disease severe form in a Brazilian population. *J Inherit Metab Dis* 1989, 12: 293-301.

- FOSTER PA, FULCHER CA, MARTI T, TITANI K, ZIMMERMAN TS (1987b) A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 residues of von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* 262: 8443-8446.
- FRESSINAUD E, SAKARIASSEN RS, GIRMA JP, MEYER D, BAUMGARTNER HR (1986) Role of GPIIb/IIIa as well as GPIb in von Willebrand factor-mediated platelet adhesion to collagen. *Thrombosis Research Supplement* 6: 138 (Abstr.).
- FUJIMOTO T., HAWIGER J.: Adenosine diphosphate induces binding of von Willebrand factor to human platelets. *Nature* 297:154, 1982.
- GALDAL K.S. *et al.*: Thrombin-induced shape changes of cultured endothelial cells: Metabolic and functional observations. *Thromb Res.*32:57, 1983.
- GARDINER, J.E; MC GANN, M.A.; BERRIDGE, C.W.; FULCHER, C.A.; ZIMMERMAN, T.S. & GRIFFIN, J.M. – Protein S a cofactor for activated protein C in plasma and in the inactivation of purified factor VIII; C. *Circulation* 70:205 (suppl II), 1984.
- GAUCHER C, MERCIER B AND MAZURIER C. Von Willebrand disease family studies: comparison of three methods of analysis of the von Willebrand factor gene polymorphism related to a variable number tandem repeat sequence in intron 40. *British Journal of Haematology*, 1992, 82, 73-80.
- GINSBURG D, HANDIN RI, BONTHRON DT, DONLON TA, BRUNS GAP, LATT SA, ORKIN SH (1985) Human von Willebrand factor (vWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228:1401-1406.
- GINSBURG D, SADLER JE (1993) Von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions and deletions. *Thrombosis and haemostasis* 69:177-184.
- GRALNICK H.R. *et al.*: Assail von Willebrand factor interactions with platelets. *J Clin Invest* 75:19, 1985.

- GRALNICK HR, WILLIAMS SB, MCKEOWN LP, MAISONNEUVE P, JENNEAU C, SULTAN Y (1987) A variant type II von Willebrand disease with an abnormal triplet structure and discordant effects of protease inhibitors on plasma and platelet von Willebrand factor structure. *American Journal of Hematology* 24:259-266.
- HADDAD A.P. AND SPARROW R.L. Two novel alleles of the ATCT variable number tandem repeat locus VWF.VNTR I in intron 40 of the von Willebrand factor gene. *British Journal of Haematology*, 1997, 96, 298-300.
- HADDAD A.P. AND SPARROW R.L. Instability in the ATCT variable number tandem repeat locus VWF.VNTR I in intron 40 of the von Willebrand factor gene. *British Journal of Haematology*, 1997, 98, 662-664.
- HANDA M. *et al.*: The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem* 261, 12579, 1986.
- HAVER V.M., NAMM D.H.: Characterization of the thrombin-induced contraction of vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 21:53, 1984.
- HAWIGER J.: Binding of von Willebrand factor to platelets: Two receptor pathways. In *factor VIII/von Willebrand Factor Biological and Clinical Advances*, eds NL Ciavarella, ZM Ruggeri, TS Zimmerman. Italy: Wichtig Editore, 1986.
- HEIMARK R.L., SCHWARTZ S.M.: Binding of coagulation factors IX and X to the endothelial cell surface. *Biochem Biophys Res. Commun* 111:723, 1983.
- HOVIG T.: The ultrastructure of blood platelets in normal and abnormal states. *Sem Haematol* 1:3, 1968.
- HOYER LW (1983) (Ed.) Factor VIII inhibitors. *Progress in clinical and biological research*, Vol. 150. Alan R. Liss Inc. New York.
- HUGUES J., MATHIEU P.: Platelet aggregation induced by basement membranes. *Thromb Haemost* 24:395, 1970.

- INOSHITA S, HARRISON J, LAZERSON J, ABILDGAARD CV (1984) A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric pattern of factor VIII related antigen (type IID). *Blood* 63:1369-1371.
- JAFFE EA, HOYER LW, NACHMAN RL (1973) Synthesis of anti-hemophilic factor antigen by cultured endothelial cells. *Journal of Clinical Investigations* 52:1757-2764.
- JAMIESON G.A.: Interaction of platelets and collagen. In *Platelets Production, Function, Transfusion and Storage*, eds. M.G. Balbini, S. Ebbe. New York: Grune & Stratton, 1974.
- JAMIESON G.A.: Heat changes during platelet aggregation and inhibition, using the microcalorimeter. *Thromb Res* [Suppl] 60:283, 1974.
- JANSENS W.J., VERHAEGHE R.H.: Effect of thrombin on isolated canine blood vessels. *Blood vessels* 19:126, 1982.
- JEFFREYS A.J., NICOLA J. ROYLE, VICTORIA WILSON & ZILLA WONG.: Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* vol. 332 17 March 1988.
- KADIR RA, ECONOMIDES DL, SABIN CA, OWENS D, LEE CA. Frequency of inherited bleeding disorders in women with menorrhagia. *Lancet* 1998, 351: 485-9.
- KEHRER R.A. (1876) Die Haemophilie beim weiblichen Geschlechte. *Archiv Gynaekologie* 10:201-237.
- KELLY D, TUDDENHAM EGD, SUMMERFIELD JA (1985) The effect of an acute phase reaction and BCG inoculation on factor VIII in the guinea-pig. *Thrombosis Research* 40: 445-451.
- KHATIB H., EZZUGHAYYAR M., AYESH S. The Distribution of the Alleles and Genotypes in the Palestinian Population. *J Forensic Sci*, 1997; 42 (3):504-505.
- KIMPTON C, WALTON A. AND GILL P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Human Molecular Genetics*, Vol. 1, No. 4, 287.

- KISIEL, W.; CANFIELD, W.M.; ERICSSON, L.H. & DAVIE E.W. – Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* 16:5824-31, 1977.
- KOA K.J. *et al.*: Demonstration and characterization of specific binding sites of factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J Clin Invest* 63:656, 1979.
- KOTITE N.J., CUNNINGHAM L.W.: Specific absorption of a platelet membrane glycoprotein by human insoluble collagen. *J Biol Chem* 261:8342, 1986.
- KURACHI, K. & DAVIE, E.W. – Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry* 16:5831-9, 1977.
- KWAAN H.C. *et al.*: Platelet behavior in small blood vessels in vivo. In *The Platelet*, eds. K. BRINKHOUS, L. SHERMER. International Academy of Pathology Monograph. Baltimore: Williams & Wilkins, 1971.
- LEGRAND Y.J. *et al.*: The molecular interaction between platelet and vascular wall. *Blood Cells* 9:263, 1983.
- LEYTE A, VOORBERG J, VON SCHIJNDEL HB, DUM B, PANNEKOEK H, VAN MOURIK JA (1991b) The pro-polypeptide of von Willebrand factor is required for the formation of a functional factor VIII-binding site on mature von Willebrand factor VIII-binding site on mature von Willebrand factor. *Biochemical Journal* 274: 257-261.
- LINDSTEDT M, ANVRET M, BLOMBÄCK M (1987) Restriction enzyme mapping of families with von Willebrand disease. *Cytogenetics and Cell Genetics* 46:651.
- LORAND, L.; JEONG, J.M.; RADEK, J.T. & WILSON J. – Human plasma factor XIII: Subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol.* 222:22-35, 1993.
- MACFARLANE R.G., ed.: *The Haemostatic Mechanism in Man and Other Animals*. London: Academic Press, 1970.

- MACFARLANE DE, STIBBE J, KIRBY EP, ZUCKER MB, GRANT RA, MCPHERSON J. (1975). A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor) *Thromb Diath Haemorrh* 34:306.
- MANCUSO DJ, TULEY EA, WESTFIELD LA, WORRALL NK, SHELTON-INLOES BB, SORACE JM, ALEVY YG, SADLER JE (1989) Structure of the gene for human von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* 264: 19514-19527.
- MANN, K.G. & LORAND, L. -- Introduction: Blood Coagulation. *Methods Enzymol.* 222:1-10, 1993.
- MANNUCCI PM, LOMBARDI R, FEDERICI AB, DENT JA, ZIMMERMAN TS, RUGGERI ZM (1986a) A new variant of type II von Willebrand disease with aberrant multimeric structure of plasma but not platelet von Willebrand factor (Type IIF). *Blood* 68:269-274.
- MARCUS A.J.: Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes. *Semin Hematol* 16:188, 1979.
- MAZURIER C, JORIEUX DS, DELOBEL J, GOUDEMAND M (1990) A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood* 75: 20-26.
- MERCIER B, GAUCHER C, AND MAZURIER C. Characterization of 98 alleles in 105 unrelated individuals in the F8VWF gene. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 17.
- MICHAELI D., ORLOFF K.G.: Molecular considerations of platelet adhesion. *Prog Hemost Thromb* 3:29, 1976.
- MILLER CH, GRAHAM JB, GOLDIN LR, ELSTON RC (1979) Genetics of classic von Willebrand's disease. Phenotypic variation within families. *Blood* 54:117-136.
- MILLS D.C.B., ROBERTS G.C.: Effects of adrenaline on human blood platelets. *J. Physiol.* 193:443, 1967.

- MOHRI H, YOSHIOKA A, ZIMMERMAN TSL, RUGGERI ZM (1989) Isolation of the von Willebrand factor domain interactin with platelet glycoprotein Ib, heparin and collagen and characterization of its three distinct functional sites. *Journal of Biological Chemistry* 264: 17361-17367.
- NACHMAN R, LEVINE R, JAFFE EA (1977) Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea-pig megacaryocytes. *Journal of Clinical Investigations* 60: 914-921.
- NAWROTH PP *et al.*: A pathway of coagulation on bovine capillary endothelial cells. *Br. J. Haematol* 63:309, 1986.
- NILSSON IM, HOLMBERG L. von Willebrand's disease today. *Clin Hematol* 1979, 8:147-68.
- NGO KY, TRIFARD-GLOTZ V, KOZIOL JA, LYNCH DC, GITSCHIER J, RANIERI P, CIAVARELLA N, RUGGERI ZM, ZIMMERMAN TS (1988) Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:2753-2757.
- NOKES T.J.C. *et al.*: von Willebrand factor has more than one binding site for platelets. *Thromb Res* 34:361, 1984.
- OGSTON D (1983) *The physiology of Hemostasis*. Croom Helm, London.
- ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIYA T (1986) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism.
- ORSTAVIK KH, MAGNUS P, REISNER H, BERG K, GRAHAM JB, NANCE W. Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. *Am J Hum Genet* 1985, 37:89-101.
- PARKER R.I, GRALNICK H.R.: Identification of platelet glycoprotein IIb/IIIa as the major binding site for release platelet-von Willebrand factor. *Blood* 68:732, 1986.

- PEAKE IR, LIDDELL MB, MOODIE P, STANDEN G, MANCUSO KJ, TULEY EA, WESTFIELD LA, SORACE JM, SADLER JE, VERWEIJ CL, BLOOM AL (1990) Severe type III von Willebrand's disease caused by deletion of exon 42 of the von Willebrand factor gene: Family studies that identify carriers of the condition and a compound heterozygous individual. *Blood* 75:654-661.
- PEAKE IR, BOWEN D, BIGNELL P, LIDDELL MB, SADLER JE, STANDEN G, AND BLOOM AL. Family Studies and Prenatal Diagnosis in Severe von Willebrand Disease by Polymerase Chain Reaction Amplification of a Variable Number Tandem Repeat Region of the von Willebrand Factor Gene. *Blood*, vol. 76, No 3 (August 1), 1990: pp555-561
- PENA S.D.J., SOUZA K.T. DE, ANDRADE M. DE, CHAKRABORTY R. Allelic associations of two polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp. 723-727, January 1994.
- PIETU G. *et al.*: Binding of human von Willebrand factor to collagen and to collagen-stimulated platelets. *J Lab Clin Med* 109:637, 1987.
- PLOOS H.K., AMSTEL V AND REITSMA P.H. – Tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Nucleic Acids Research*, vol. 18, No. 16, 4957.
- QUIROGA T, PEREZ M, RODRIGUEZ S, ARANDA E, MORALES M, VERDUGO P, PEREIRA J, MEZZANO D. Skin and mucous membrane hemorrhages: clinical assessment, study sequence and relative frequency of hereditary diseases of the hemostasis in a Chilean population. *Rev Med Chil* 1997, 125: 409-18.
- RAO, L.V.M. & RAPAPORT, S.I. – Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. of USA* 85:6687-91, 1988.
- RIBES J.A. *et al.*: Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. *J. Clin Invest.* 79:117, 1987.

- ROBERTS D.D. *et al.*: von Willebrand factor binds specifically to sulfated glycolipids. *J Biol Chem* 261:3306, 1986.
- RODEGHIERO F, CASTAMAN G, DINI E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987, 69: 454-9.
- RUGGERI ZM, PARETI FL, MANNUCCI PM, CIAVARELLA N, ZIMMERMAN TS (1980) Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *New England Journal of Medicine* 302:1047-1051.
- RUGGERI ZM, NILSSON IM, LOMBARDI R, HOLMBERG L, ZIMMERMAN TS (1982b) Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (Type IIC). *Journal of Clinical Investigations* 70:1124-1127.
- RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S.: Platelets and von Willebrand disease. *Semin Hematol* 22:203, 1985.
- SADLER JE (1994). A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 71: 520-5.
- SADLER, J. E.; GRALNICK, J. R. Commentary: a new classification of von Willebrand disease. *Blood*, v. 84, p. 676-9, 1994.
- SADLER, J. E.; MATSUSHITA, T.; DONG, Z. *et al.* Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, v. 74, p. 161-6, 1995.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
- SALVESEN, G. & PIZZO, S.V. – Proteinase inhibitors: α -macroglobulins, serpins and kunitins. In Hemostasis and Thrombosis: Basics principles and clinical practice. 3^o ed. Colman, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J. & SALZMAN, E.W. eds. J.B. Lippincott Company – Philadelphia. pp. 241-258, 1994.

- SANTORO S.A.: Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen. *Biophys Acta* 756:123, 1983.
- SCHIACH C, SPOWART K, CONNOR JM, PETTIGREW AF, HANN IM (1987b) Application of a cDNA probe for von Willebrand factor in families with von Willebrand disease. *Journal of Medical Genetics* 24:245.
- SHADLE P.J., BARONDES S.H.: Platelet-collagen adhesion: Evidence for participation of antigenically distinct entities. *J Cell Biol* 99:2048, 1984.
- SHELTON-INLOES BB, CHEHAB FF, MANNUCCI PM, FEDERICI AB, SALDLER JE (1987b) Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *Journal of Clinical Investigations* 79:1459-1465.
- SHEPRO D: Physiology of the vessel wall. In Hemostasis and Thrombosis, eds. RW Colman *et al.* Philadelphia: J. B. Lippincott, 1982.
- SHINMYOZU K, OKADOME T, MARUYAMA Y, MARUYAMA I, OSAME M, TARA M. A study on the frequency of von Willebrand factor deficiency state. *Rinsho Ketsueki* 1991, 32: 67-8.
- SPRINGER-VERLAG 1996. Von Willebrand disease. *Eur. J. Pediatr.* (1996) 155: 751-752.
- STANDEN GR, BIGNELL P, BOWEN DJ, PEAKE IR AND BLOOM AL. Family studies in von Willebrand's disease by analysis of restriction fragment length polymorphisms and an intragenic variable number tandem repeat (VNTR) sequence. *British Journal of Haematology*, 1990, 76, 242-249.
- TANS, G. & ROSING, J. – Structural and functional characterization of factor XII. *Semin. Thromb. Hemost.* 13:1-14, 1987.
- TITANI K, KUMAR S, TAKIO K, ERICSSON LH, WADE RD, ASHIDA K, WALSH KA, CHOPEK MW, SADLER LE, FUJIKAWA K (1986) Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25: 3171-3184.

- THOMAS B. WAHLBERG, GEOFFREY F. SAVIDGE, MARGARETA BLOMBÄCK and BARBRO WIECHEL. Influence of Age, Sex and Blood Groups on 15 Blood Coagulation Laboratory Variables in Reference Material Composed of 80 Blood Donors. *Vox Sang.* 39: 301-308 (1980).
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Introduction. em The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders. 1° ed. Oxford University Press Inc. – New York. Pp. 1-18, 1994.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Tissue factor pathway inhibitor. em The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders. 1° ed. Oxford University Press Inc. – New York. pp. 204-211, 1994.
- TUDDENHAM, E.G.D. & COOPER, D.N. – Antithrombin III. em The molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders. 1° ed. Oxford University Press Inc. – New York. pp. 284-298, 1994.
- VEHAR, G.A. & DAVIE E.W. – Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochemistry* 19:401-410, 1980.
- WILLEBRAND E.A. von (1926) Hereditär Pseudoheemofili. *Finska Läk Sällsk Handl* 68:87-112.
- WILLEBRAND E.A. von, JÜRGENS R. (1933) Über ein neues vererbbares Blutungsübel: die Konstitutionelle Thrombopathie. *Dtsch Arch Klin Med* 175:453-483.
- WALKER, F.J. – Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J. Biol. Chem.* 255:5521-4, 1980.
- WALKER, F.J.; CHAVIN, S.I. & FAY, P.J. – Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arch. Biochem. Biophys.* 252:322-8, 1987
- WEISS HJ, HAWIGER J, RUGGERI ZM, TURRITTO VT, HOFFMANN T (1987) Evidence that von Willebrand factor and not fibrinogen is involved in glycoprotein IIb-IIIa mediated platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 70: 364a (abstr.)

- WITTE S: The endothelial lining as studied by a fluorescent labeling technique in situ. *Thromb Res*. 5:93, 1983.
- WERNER-EJ; BROXSON-EH; TUCKER-EL; GIROUX-DS; SHULTS-J; ALSHIRE-TC. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J-Pediatr*. 1993 Dec; 123 (6) : 893-8.
- YONCE L.R. *et al.*: Thrombin-induced vasodilatation in the hind limb (dog). *Blood Vessels* 14:129, 1977.
- ZAGO M.A., SILVA W.A., JR., MARLI H., TAVELLA S., E.B. SANTOS, GUERREIRO JF, FIGUEIREDO MS. Interpopulational and Intrapopulational Genetic Diversity of Amerindians as Revealed by Six Variable Number of Tandem Repeats. *Hum Hered*, 1996; 46:274-289.
- ZIMMERMAN TS, DENT JA, RUGGERI ZM, NANNINI LH (1986) Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal, individuals, minimal in variants with aberrant structure (Types IIC, IID and IIE). *Journal of Clinical Investigations* 77:947-951.
- ZIMMERMAN T.S., RATNOFF O.D., POWELL A.E. (1971) Immunologic differentiation of classic Haemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proacelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J. Clin. Invest.* 50:244-254.

Anexos

QUESTIONÁRIO

Cadastro Unicamp: _____

Data ____/____/____

Nº do doador _____

Nome _____ Fone _____

Idade _____ Data de Nascimento ____/____/____ Tipo sanguíneo _____

Cor:

☐ Caucasóide

☐ Negróide

☐ Amarelo

☐ Índio

Descendência:

Avós Paternos _____

Avós Maternos _____

Hemostasia:

Equimose: _____

Fica com marcas mesmo sem batidas: _____

Extração dentária: _____

Epistaxe _____ Frequência _____

Gengivorragia _____

Cirurgia _____ Necessitou transfusão _____

História de sangramento na família:

Filhos _____ Irmãos _____

Pais _____ Tios _____

Está fazendo uso de algum medicamento:

Sofre de alguma destas doenças:

☐ Diabetes

☐ Hipertensão

☐ Infarto

☐ Derrame

☐ Outras _____

**Eu, _____ concordo em participar do Projeto de Pesquisa
para detecção da frequência da vWD numa população de Campinas.**

Campinas, _____ de _____ 199__.

Abaixo segue uma relação dos doadores, com nº do registro, nome, idade, tipo sanguíneo, *questionário e antecedente familiar*.

Obs:

- A *História pessoal de Sangramento* só será positiva quando o doador apresentar pelo menos 2 sintomas hemorrágicos.
- O *Antecedente Familiar de sangramento* só será positivo quando pelo menos 2 membros da família apresentarem história de sangramento.

Doador	Nome	Idade	Tipo Sanguíneo	História pessoal de Sangramento	Antecedente familiar de sangramento
01	E. F. M.	20	O +	-	-
02	J. F. da S.	21	O -	-	-
03	R. V. S.	24	O +	-	-
04	F. M. de L.	28	A -	-	-
05	L. C. de C.	29	O -	-	-
07	S. R.	23	A +	-	-
08	A. C. da S.	36	B -	+	+
09	C. M. P. R.	27	O +	-	+
10	M. J. L.	31	A +	-	-
11	J. A. V.	40	O +	-	-
12	J. F. M.	39	A +	+	-
13	N. L. da S.	31	A +	-	-
15	C. D.	20	A -	-	-
16	L. L. da S.	21	O +	-	-
18	O. A. de S. F.	27	A +	-	-
19	J. L. T.	53	A +	+	-
20	M. G.	34	A +	-	-
21	R. P. P.	24	AB -	-	-
22	D. S. P.	38	A2+	-	-
23	G. A. dos S.	32	A +	-	-
24	C. P. P.	25	A +	-	-
25	R. F.	55	B +	+	-

26	W. B. C.	24	B+	-	+
28	N. S. de C.	50	O+	-	-
29	D. V. S.	21	O+	-	-
30	M. A. M.	43	O-	-	-
31	G. da S.	42	A+	-	-
32	P. R. da S.	29	B+	-	-
33	J. B. de M.	55	A2+	-	-
34	N. R.	48	O-	-	-
35	J. L. A.	45	O+	-	-
36	F. de A. da S.	27	B+	-	-
37	J. A. de F.	45	A+	-	-
38	J. B. de F.	40	O+	-	-
39	O. P.	54	A2+	-	-
40	G. D. R. J.	33	O-	+	-
41	O. P.	46	O+	-	-
42	M. T.	28	A2+	-	-
44	E. R. da S.	32	O-	-	-
45	E. R. F. B.	39	O-	-	-
46	A. J. dos S.	23	O-	-	-
47	R. de S. S.	42	B+	-	-
48	S. F. de C.	37	O-	-	-
49	N. J. B.	36	O+	-	-
50	H. L. dos S.	34	A+	-	-
51	N. C.	51	A+	-	-
52	L. J. L.	37	B+	-	-
53	S. R. de B. N.	31	O+	-	-
55	F. J. de S.	29	O+	-	-
56	E. S. F.	36	O+	-	-
57	I. A. de O.	20	A+	-	-
58	W. X. de C.	23	O+	-	-
59	M. J. G.	29	O-	+	+
60	R. M. de P.	39	O+	+	-
61	A. L. de O.	31	O+	+	-
62	J. A. de T.	25	A2+	-	-
63	M. A. B.	30	O+	-	-
64	R. M. P. da S.	23	O+	-	-
65	P. C. M.	31	A+	-	-
66	H. A.	42	B+	-	-
67	D. D. G.	44	O+	-	-
68	A. J. da S.	45	A+	-	-
69	V. M. dos S.	33	O+	-	-
70	P. R. da S.	37	A+	+	-

71	P. R. de S.	34	A+	-	-
72	P. F. P.	32	O+	+	-
73	J. F. da S.	27	B-	-	-
74	A. O. F.	47	O+	-	-
75	I. J. B.	35	O-	-	-
76	J. A. P.	37	O+	-	-
77	M. G. I.	27	O+	-	-
78	J. S. F.	49	O-	-	-
79	A. C.	19	O+	-	-
80	W. Q.	24	O+	+	-
81	E. A.	28	O+	+	-
82	P. H. A. S.	20	O+	-	-
83	E. F.	26	A+	-	-
84	R. F.	25	O+	-	-
85	R. P. F.	34	B+	+	-
86	E. H. M.	26	O+	-	-
87	A. F. B.	24	A+	-	-
88	M. B.	18	A+	-	-
89	J. C. F.	50	B+	-	-
90	J. L. F. A.	26	O+	+	-
91	L. C. M.	25	A+	+	-
92	E. C. L.	23	O+	-	-
94	E. O. M.	22	A+	-	-
95	A. P.	53	O+	-	-
96	S. L. de C.	18	O+	-	-
97	F. M. de M.	19	O+	-	-
98	R. M. S.	28	O+	-	-
99	A. J. F.	24	A+	-	-
100	D. A. de A.	31	B+	-	-
101	J. A. de A.	24	O+	-	-
102	F. K.	27	O+	-	-
103	A. de S. E.	44	O+	-	-
104	R. R. de F. A.	18	A-	-	-
105	C. C. C.	19	A+	-	-
106	A. G. B.	35	A+	-	-
107	G. dos S. A.	37	A+	+	-
108	C. A. F.	19	O+	-	-
109	O. da C. A.	22	B+	+	-
110	W. J. dos S.	20	O+	+	-
111	M. P. V.	28	A-	-	-
112	G. R. C.	19	AB+	-	-
113	W. L. M.	18	O+	-	-

114	J. de S. D. F.	34	O+	-	-
115	J. B. de A.	52	A+	-	-
116	A. de L. R.	30	B+	-	-
117	G. F. de G.	41	O+	+	-
118	M. R. F.	36	O+	-	-
119	F. P.	30	B+	-	-
120	R. C. de O.	20	A+	-	-
121	E. A. dos S.	25	O+	-	-
122	W. G. V.	38	O+	-	-
123	G. R. B.	24	O+	-	-
124	A. N. da S.	31	O+	+	-
125	A. P. da S.	32	O-	+	-
126	S. J. F.	29	O+	-	-
127	J. C. de M.	37	A+	-	-
128	W. P. da S.	23	B+	-	-
129	F. A. R. F. J.	28	A-	-	-
130	I. R. dos S.	32	O+	-	-
131	Z. de F. R.	24	O+	-	-
132	P. de S. B.	30	A+	-	-
134	V. S. de L.	26	O+	-	-
135	O. P.	29	O+	-	-
136	G. F.	27	B+	-	-
137	N. P. da S.	25	A+	+	-
138	R. F.	19	O+	-	-
139	C. F. P. de B. P.	19	A+	-	-
140	A. C.	43	AB+	-	-
141	A. F. dos S.	35	O+	-	-
142	A. J. da R.	46	A2+	+	-
143	F. M. S. B.	25	A2+	-	-
144	J. de S. A.	27	O+	-	-
145	T. M. C.	21	A+	-	-
146	G. G.	32	A-	-	-
147	W. A. B.	36	O+	-	-
148	D. E. do N.	23	A2+	+	-
149	R. A. F.	33	B+	-	-
150	A. de F. B.	39	A+	-	-
151	M. S. A.	37	A+	-	-
152	N. de S.	24	O+	-	-
153	A. D. R.	27	O+	+	-
154	R. J. P. E.	53	A2+	-	-
155	A. L. R.	37	O+	-	-
156	A. P. de C. G.	19	A2+	-	-

157	V. G. Z.	22	A +	-	-
158	G. G. da S.	27	A +	-	-
159	J. S. dos R.	34	B +	-	-
160	Z. G.	45	O +	-	-
161	E. de A. F.	29	O +	-	-
162	R. A. de S.	33	O +	-	-
163	J. L. dos S.	34		-	-
164	M. L. J.	35	O +	-	-
165	A. C. C.	33	A2 +	+	-
166	J. V. de S.	36	B +	-	-
167	D. R. S.	22	A +	-	-
168	E. R. L.	38	O +	-	-
169	J. A. M.	43	A +	-	-
170	O. G.	47	A +	-	-
171	A. M. S. A.	33	A2 +	-	-
172	M. P.	25	A +	-	-
173	F. C. N.	28	O +	-	-
174	L. R. G.	19	B +	-	-
175	F. V. L.	19	A -	-	-
176	R. L. de S.	30	A +	-	+
177	S. F. S.	36	O +	-	-
178	M. Z.	19	A +	-	-
179	O. M. de C.	44	O +	-	-
180	S. R. N.	29	O +	-	-
181	A. J. da R.	34	O +	-	-
182	J. B. C.	56	B +	-	-
183	J. H. V. B.	35	A +	-	-
184	A. T. M.	19	O +	-	-
185	C. R. M.	19	O +	-	-
186	C. C. F.	25	B +	-	-
187	J. C. dos S.	24	B +	-	-
188	E. A. M.	29	B -	+	-
189	N. A. de S.	39	A +	-	-
191	R. D. P. S.	19	O +	-	-
192	F. B. dos S.	39	A +	-	-
193	C. A. B.	34	A +	-	-
194	D. M. B.	23	A +	-	-
195	L. G. C.	21	B +	-	-
196	M. L.	30	B +	-	-
197	J. B. P.	40	B +	+	+
198	E. L. C.	34	A -	-	-
199	R. V. F.	21	O +	-	-

200	J. P. D.	39	O+	-	-
201	M. D. G.	28	O+	-	-
202	A. F. P. F.	32	O+	-	-
203	J. G. dos S.	26	A+	-	-
204	G. A. S.	34	O+	-	-
205	R. A. B.	28	A+	-	-
206	A. B.	37	AB+	-	-
207	J. B. dos S.	38	O+	-	-
208	W. P. de A.	33	O+	-	-
209	A. P.	46	A+	+	-
210	M. R. de S.	31	A+	-	-
211	J. A. T. T.	42	A+	+	-
212	C. A. P.	25	O+	-	-
213	D. R. N.	23	B+	-	-
215	D. B.	51	A-	-	-
216	L. A. P.	40	A2+	-	-
217	A. A. C.	39	A2+	-	-
218	L. C. dos S.	22	O+	-	-
219	E. S. G.	21	A+	-	-
220	J. P. dos S. A.	58	A+	-	-
221	M. A. R.	26	A+	+	-
222	I. C.	22	A+	-	-
223	C. A. C.	27	B+	-	-
224	F. C. L.	39	O+	-	-
225	J. L. Q.	21	A+	-	-
226	J. C. G. dos S.	34	B+	-	-
227	E. W. C.	35	B+	-	-
228	M. C. R.	21	B+	-	-
229	J. H. C.	24	A+	-	-
230	J. C. Z. dos S.	41	A+	-	-
231	M. A. F. C.	48	A+	-	-
232	A. C. D.	31	O+	-	-
233	S. dos S. M.	31	O+	-	-
234	J. L. dos S.	51	A+	-	-
235	M. R. de M.	20	O+	+	-
236	K. E. D.	20	O+	-	-
237	M. J. E.	25	A+	-	-
238	V. R. de O. L.	26	A-	-	-
239	R. C. M.	28	A+	-	-
240	J. A. P.	46	A+	-	-
241	G. de L. P. S.	27	O+	-	-
242	D. de S.	47	O+	-	-

243	A. P. F.	50	O +	+	-
244	J. S. de S.	23	A +	-	-
245	A. S.	23	O +	-	-
246	E. T. S.	32	O +	-	-
247	F. C.	35	O +	+	+
248	M. A. B.	32	O -	+	-
249	D. P.	43	B -	-	-
250	F. de A.	34	A -	-	-
251	R. B.	29	O +	+	-
252	J. A. N.	23	O +	-	-
253	L. S. da C.	26	O +	-	-
254	A. da S.	18	A2+	-	-
255	J. R. G. da S.	38	O +	-	-
256	N. B. da S.	30	O +	-	-
257	A. R. da S.	19	A +	-	-
258	S. B.	44	O +	-	+
259	D. S. de L.	26	O +	-	-
260	M. R. Z.	21	O -	-	-
261	S. de S.	40	O +	-	-
262	A. M. P.	22	O +	-	-
263	S. C. G.	30	A +	-	-
264	M. C. do A.	28	B +	-	-
265	J. dos S. R.	25	O +	-	-
266	J. V. dos A.	37	O +	+	-
267	A. de A. C.	41	A2+	+	-
268	N. S. J.	41	A+	-	-
269	E. S. da S.	43	O+	-	-
270	J. S.	42	O+	-	-
271	A. C. G.	41	A+	-	-
272	V. S. da S.	23	O+	-	-
273	M. F. A.	33	B+	-	-
274	C. C. dos S.	55	B+	-	-
275	R. C. A. B.	23	B-	-	-
276	R. S.	36	O+	-	-
277	R. L. da S.	35	A2+	-	-
278	C. A. R. R.	30	O+	-	-
279	H. L. da S.	37	O-	-	-
280	J. F. de S.	29	A+	-	-
281	C. R. A. da H.	31	A+	-	-
282	L. C. A.	27	O+	-	-
283	E. M. R.	21	B+	-	-
284	I. dos S. C.	27	A+	-	-

285	R. M.	25	O+	-	-
286	V. F.	42	O+	+	-
287	J. R. do N.	44	O-	-	-
288	S. Q. de A.	26	A+	-	-
289	S.S. A.	24	O+	+	-
290	J. S. da S.	37	O+	-	-
291	L. G.	44	B+	-	-
292	L. O.	22	O+	-	-
293	I. F.	45	B+	-	-
294	J. L. de S.	41	O+	-	+
295	R. de L. F.	43	O+	-	-
296	C. V. H.	45	B+	-	-
297	C. L. A.	48	O+	-	-
298	H. A. R.	23	A+	-	-
299	J. G. J.	27	A+	+	-
301	A. I. da M.	35	O+	-	-
302	J. S.	21	A+	-	-
303	P. R. F.	35	O+	-	-
304	A. B. de A.	44	A-	-	-
305	J. de O.	35	AB-	-	-
306	P. I. L. S.	23	O+	-	-
307	J. P. da S. R.	33	O+	-	-
308	M. M.	47	O+	-	-
309	D. G. V.	37	A+	+	-
310	A. F.	24		+	-
311	L. M. da S.	41	A+	+	-
312	J. C.	52	A2+	+	-
313	J. P. dos S.	44	O+	-	-
314	E. M.	28	O+	-	-
315	D. A. Q.	38	A+	-	-
316	S. C. M. J.	39	O+	-	-
317	J. C. M.	33	O+	-	-
318	V. F.	47	O+	-	-
319	V. R.	29	A+	-	-
320	S. A. B.	27	O+	-	-
321	M. R. M.	27	A2B+	-	-
322	M. C. M.	25	A2B+	-	-
323	W. L. T.	28	O+	-	-
324	N. R. de C.	30	O+	-	-
326	A. F. A.	58	A-	-	-
327	O. de M.	49	A+	-	-

328	J. N. F.	43	B+	-	-
329	E. L.	45	A+	-	-
330	N. H. P.	31	A+	-	-
331	A. J. M. G.	37	O+	-	-
332	A. J. do A.	46	A-	-	-
333	E. M. de M.	37	A2+	-	-
334	R. R. F. de P.	26	O-	-	-
335	J. B. B.	37	AB+	-	-
336	M. Z.	24	O+	-	-
337	M. M.	26	A-	-	-
338	A. D. G.	40	O+	-	-
339	J. R. dos S.	29	A+	+	+
341	C. dos S.	28	A2+	-	-
342	L. R. V.	43	O+	-	-
343	N. B. de M.	20	A2+	-	-
344	R. A. G.	45	O+	-	-
345	C. C. da S.	34	O+	+	-
346	G. de O.	34	O+	-	-
347	R. C. C.	45	O-	-	-
348	F. N. da S.	21	O+	-	-
349	E. P. M.	25	A+	-	-
350	F. A.	21	A+	-	-
351	D. B.	23	O+	-	-
352	J. A. B.	33	O+	-	-
354	A. O. C. da S.	52	O+	-	-
355	G. L.	28	O+	-	-
356	F. P. S. M.	25	O+	-	-
357	U. S. M.	39	O+	-	-
358	M. A. F.	24	O+	-	-
359	J. F. dos R.	47	A-	-	-
360	F. J. O.	22	O+	-	+
361	R. T. G.	20	A2+	-	-
362	D. R.	50	A2B+	-	-
363	J. F. da S.	37	O+	-	-
364	C. B. da S.	25	A+	-	-
365	B. G. da S.	40	O+	-	-
366	E. C. de M.	23	O+	-	-
367	E. da C.	26	O+	-	+
368	M. L.	44	B+	+	-
369	J. L. de S. Q.	35	O+	-	-
370	J. F.	34	O+	-	-

371	E. de S.	48	A+	-	-
372	C. R. B. J.	28	A2+	-	-
373	R. A. R.	28	A2+	-	-
374	E. A. dos R.	29	O+	-	-
375	P. G. F. de O.	40	O+	-	-
376	H. M. T.	37	A+	-	-
377	M. dos S.	29	O+	-	-
378	P. S. P.	26	O+	-	-
380	F. D. M.	27	A2+	-	-
381	M. A. L.	31	A+	-	-
382	R. M.	25	O-	-	-
383	S. M. M.	30	O+	-	-
384	J. R. de S.	28	A+	-	-
385	R. L. de S.	30	A+	-	-
386	E. R. dos S.	27	A-	-	-
387	D. J. R.	28	O+	-	-
388	M. R.	25	O+	-	-
389	S. L. da S.	30	O+	-	-
390	B. L. de M.	35	A+	-	-
391	E. C. L.	38	AB-	-	-
392	R. J. da S.	48	O+	-	-
393	C. F. B.	20	B+	-	-
394	J. M. da C.	28	O+	+	-
395	C. A. S.	24	A+	-	-
396	J. M.	47	O+	-	-
397	R. R. P.	41	A+	-	-
398	A. J. S.	40	A+	-	-
399	V. J. F.	44	O+	-	-
400	A. C. N.	36	O+	-	-
401	E. A. M.	30	O+	-	-
402	M. S. S.	38	O+	-	-
403	M. B.	25	O+	-	-
404	J. M. B.	22	B+	-	+
405	A. de S. C.	24	O-	-	-
406	P. S. M.	33	A2+	-	-
407	C. P. dos S.	41	B+	-	-
408	E. F. T.	29	O+	-	-
409	W. C. T.	21	O+	-	-
410	A. N.	31	A+	-	-
411	O. M.	30	O-	-	-
413	O. do A.	21	O+	-	-

414	J. C. R.	24	B+	-	-
415	S. D. M.	38	A+	-	-
416	C. A. R.	34	O-	-	-
417	J. C. G.	18	O+	-	-
418	J. C. C. M.	23	O+	-	-
419	D. A. de O.	30	B+	-	-
420	M. P.	41	O+	-	-
421	A. A. G.	39	A+	-	-
422	J. B. T. da S.	25	O+	+	-
423	D. de A. B.	28	O+	-	-
424	A. J.	38	B+	-	-
425	A. F. F.	37	O+	-	-
426	S. M. dos S.	30	O+	-	+
427	L. de L.	28	A+	-	+
428	S. M. M.	20	O+	-	-
429	L. C. S.	29	A+	-	-
430	C. F. dos S.	26	A+	-	+
431	D. M.	24	O+	-	-
432	J. S. de A.	40	O+	-	-
434	E. J. S. S.	31	A+	-	-
435	O. C. F.	18	O+	-	-
436	F. D. da S. J.	19	AB+	-	-
437	M. N. de O.	19	B+	-	-
438	M. A. G.	20	O+	-	-
439	J. T. R.	45	A+	-	-
440	L. A. da L. J.	19	A+	-	-
441	P. S. da C. B.	30	O-	-	-
442	O. F. de S.	37	O+	-	-
443	M. R. F.	32	O+	-	-
444	A. A. B.	39	B+	-	-
445	L. C. A.	25	O+	-	+
446	E. H.	40	O+	-	-
447	V. R.	40	O+	-	-
448	M. S. B.	28	B+	+	-
449	F. R. C. B. N.	20	A2-	-	-
450	D. A. de A. J.	21	AB+	+	-
451	S. G. S.	36	AB+	-	-
452	A. G. R.	40	O+	-	-
453	O. da S.	22	A+	-	+
454	D. B. M.	35	A+	-	+
455	I. L. F.	51	O+	-	-

456	J. D.	43	A+	-	-
457	V. V.	34	O+	+	-
458	J. M. S.	35	O+	-	+
459	M. A. S.	19	O+	-	-
460	F. J. B. R.	37	O+	+	+
461	O. C.	39	A+	-	-
462	R. R. B.	44	A+	-	-
463	J. A. F. F.	45	O+	-	+
464	O. B. M.	23	O+	-	-
465	O. A. M.	31	A+	-	-
466	J. T. T.	38	O+	-	-
467	H. B. G.	26	O+	-	-
468	R. S. O.	26	O+	-	-
469	R. C. M.	32	O+	-	-
470	S. W.	52	A+	-	-
471	A. F. M.	37	A+	-	-
472	C. A. M.	25	A2+	-	+
473	M. J. S. F.	47	O+	-	-
474	M. A. B.	20	A+	-	-
475	M. C. S.	55	A2-	-	-
476	R. J. A.	50	A+	-	-
477	J. A. S.	43	O-	-	-
478	J. A. P.	18	O+	-	-
479	A. M. N.	28	A+	-	-
480	E. T. M.	31	A+	-	-
481	A. V.	34	A-	-	-
482	N. R. de L.	35	B+	+	-
483	A. A. R.	52	A2+	-	-
484	R. de S.	28	A+	-	+
485	P. R. da S.	37	A+	-	+
486	J. B. B.	27	A+	-	-
487	N. E.	28	A2+	-	-
488	J. C. de S.	40	O+	-	-
489	D. R.	27	A+	-	-
490	L. F. F.	33	A+	-	-
491	W. V. S.	29	AB+	-	-
492	A. H. S. N.	23	O-	-	-
493	M. A. A.	32	A2B+	-	-
494	E. J. S.	31	AB+	-	-
495	P. H. S.	27	B+	-	-
496	M. A. C.	27	A2B+	-	-

497	A. B. F.	34	O+	-	-
498	E. G. M. R.	20	O-	-	-
499	A. L. M.	47	A+	-	-
500	M. A. P. A.	31	A+	-	-
501	M. S. B.	25	O+	-	-
502	J. O. P.	30	O+	-	-
503	N. S. M.	23	A-	+	-
504	W. C. F.	47	O+	-	-
505	A. de S.	27	O-	-	-
506	L. P.	58	A2+	-	-
507	J. A. da S. J.	29	A2+	-	-
508	J. C.	40	A+	-	-
509	R. C.	26	O+	-	-
510	M. P. M. da C.	23	O+	-	+
511	W. R. da S.	44	O+	-	-
512	P. R. B.	45	O+	+	-
513	W. D. F. R.	29	O+	-	-
514	M. R. de O.	20	O+	-	-
515	L. da S.	37	A2+	-	+
516	J. D. da S.	40	A+	-	-
517	J. D. M.	35	B+	-	-
518	E. M. S.	24	O+	-	-
519	A. B.	24	A+	-	-
520	J. R. B.	45	O+	-	-
521	J. C. V.	38	O-	-	-
522	C. A. C.	27	A-	+	-
523	V. M. P.	24	B+	-	-
524	L. C. R.	27	B+	-	-
525	L. G.	33	A+	-	-
526	A. B. V. A. S.	49	O+	-	-
527	M. G. de A.	29	A2+	-	-
528	F. L. C.	20	B+	-	-
529	J. de O. M.	37	A+	-	+
530	M. T. F. R.	47	A+	-	-
531	M. M. F.	22	O+	-	-
532	J. C. de F.	38	B+	-	-
533	A. A. S. R.	32	A+	-	-
534	P. A. do N.	37	A+	-	-
535	A. G. T.	22	O+	-	-
536	C. A. N.	27	B+	-	-
537	R. C. S.	20	A2+	-	-

538	J. G. S.	29	A+	-	-
539	A. R. L. M.	24	A+	-	-
540	L. F. S.	35	B+	-	-
541	W. M.	30	O-	-	-
542	D. P. dos S.	34	B+	-	-
543	A. da S. B.	46	A2+	-	-
544	A. M.	22	O+	-	-
545	L. B. N.	35	A+	-	-
546	W. C. G. H.	30	A+	-	-
547	H. S.	32	B+	-	-
548	J. F.	33	O+	-	-
549	O. da C. J.	36	O-	-	-
550	E. da C.	30	O-	-	-
551	J. P. de O. N.	34	O+	-	-
552	J. A. R.	25	O-	-	-
553	E. C. R.	26	A+	-	-
554	L. V. G.	29	A+	+	-
555	E. R. E.	29	A2-	-	-
556	C. A. D. B.	25	O+	-	-
557	N. F. da S.	27	A+	-	-
558	A. do C. da S.	37	O+	-	-
559	J. R. da S.	36	A+	-	-
560	R. C.	21	O+	-	-
561	O. J. C.	20	O+	-	-
562	W. de S. L.	22	O+	-	-
563	M. A. de C.	31	O+	-	-
564	J. S. S.	23	A2+	-	-
565	J. F. L.	43	O+	-	-
566	U. D. F.	41	A2+	-	+
567	J. dos S. A.	30	O+	-	-
568	R. D. S. de M.	33	O-	-	-
569	W. A. V.	43	A+	-	-
570	V. A.	33	A+	-	-
571	L. R. da S.	19	A+	-	-
572	J. de A.	42	A2-	-	-
573	R. A. G.	30	O+	-	-
574	E. C. C.	34	O-	-	-
575	L. C. da S.	44	A+	-	-
576	A. H. M.	22	B+	-	-
577	A. A. da S.	58	A+	-	-
578	A. T. D.	38	O+	-	-

579	N. A. de L.	37	A+	+	-
580	A. F. F.	35	O+	-	-
581	L. C. S. A.	32	A+	-	-
582	L. F.	32	A2+	-	-
583	V. M.	43	B+	-	-
584	A. N. dos S.	34	A+	-	-
585	S. S. F.	30	O-	+	-
586	M. R. C.	34	A2+	-	-
587	E. L. da S.	35	A+	-	-
588	W. R. T. M.	19	O+	-	-
589	V. S.	36	B+	-	-
590	L. E. M. S.	27	O-	-	-
591	M. A. B.	22	O+	-	-
592	H. do. C. G.	18	O+	-	-
593	P. da P.	27	A2+	+	-
594	L. O. L.	48	A+	+	-
595	W. A. B.	21	AB+	-	-
596	R. F.	23	A2+	-	-
597	R. C.	21	A+	-	-
598	W. C. B.	25	O+	-	-
599	E. M. D.	29	A+	-	-
600	J. N. B.	22	A-	-	-
601	W. C. B.	29	A+	-	-
602	V. A. S.	50	O+	+	-
603	M. A. A. de S.	27	O-	-	-
604	W. L. R. S.	20	O+	-	-
605	L. G. de S.	41	O+	-	-
606	J. O. de S.	44	O+	+	-
607	V. V. B.	19	A+	-	-
608	L. R. G.	27	O+	-	-
609	G. C. de L.	26	O+	-	-
610	D. A. do A.	26	O+	-	-
611	C. B. M.	48	B+	-	-
612	R. M. da S.	33	O+	-	-
613	D. de S.	40	O+	-	-
614	C. A. M.	34	B+	-	-
615	N. de S.	25	O+	-	-
616	J. C. da C.	52	B+	-	-
617	S. P. dos S.	46	O+	-	-
618	L. C. F.	37	O+	-	-
619	F. de L.	28	O+	-	-

620	J. J. dos S.	44	A3B+	-	-
621	R. M. P.	31	O+	-	-
622	L. de A.	38	O+	-	-
623	C. C. de A.	28	O+	-	-
624	L. de M.	22	O+	-	-
625	V. D. G.	28	O+	-	-
626	S. G.	53	A+	-	-
627	E. B. da S.	34	A2+	+	-
628	C. M. R.	40	O+	-	-
629	O. de O. B.	54	A2-	-	-
630	M. F. P.	30	A+	-	-
631	J. C. F.	40	O-	-	-
632	M. A. de L.	31	A2+	-	-
633	M. L. B.	23	A+	-	-
634	P. D. S. A.	26	A+	-	-
635	C. R. A. do A.	32	A+	-	-
636	L. J. da C.	29	O+	-	-
637	O. S. de F.	48	A+	-	-
638	G. E. T. T.	25	O+	-	-
639	E. B. R.	23	O+	-	-
640	M. B.	40	O-	-	-
641	J. C. F.	27	O+	+	-
642	V. C. da S.	32	A2+	-	-
643	J. M. de T.	42	O+	-	-
644	C. E. do R.	20	A+	-	-
645	R. F. do N. A.	37	O+	-	+
646	L. M. da S.	22	O+	-	-
647	J. C. M.	33	O-	-	-
648	S. R. P.	36	O+	-	-
649	A. R. de S.	42	A+	-	-
650	E. L. F.	30	O+	-	-
651	P. R. F.	38	B+	-	-
652	A. J. D.	23	A+	-	-
653	O. O. A.	26	O+	-	-
654	P. M. L. de C.	43	A+	-	-
655	R. C. de O.	49	O+	-	-
656	G. Z. A.	38	A2+	-	-
657	M. J. S.	42	B+	+	-
658	E. M. S.	52	A+	-	-
659	D. D.	28	O+	-	-
660	J. M. A. de S.	30	A2+	-	-

661	G. A. da F.	31	O+	-	-
662	E. de L.	31	O+	-	-
663	A. N. P.	31	B+	-	-
664	L. A. dos S.	31	O+	-	-
665	F. M. B.	23	A-	+	-
666	J. A. S.	46	A+	-	-
667	S. D.	34	O+	-	-
668	A. da S. dos S.	27	A2+	-	-
669	M. D. B. de O.	53	O+	-	-
670	H. T. T.	47	B+	-	-
671	A. A. P.	31	O+	+	-
672	L. C. S.	27	A2+	-	-
673	O. N. da S.	33	O+	-	-
674	L. R. dos S.	23	O+	-	-
675	M. G. R.	24	AB+	-	-
676	J. D. M.	28	O+	-	-
677	P. J. D. de S.	40	A+	-	-
678	C. L. S. V. P.	36	A+	-	-
679	M. S.	23	O+	-	-
680	E. S.	44	O+	-	-
681	C. B.	51	O+	-	-
682	J. C. dos S.	35	A2+	-	-
683	L. R. V.	38	O+	-	-
684	J. S. D.	28	O+	-	-
685	A. B. da S.	23	A+	-	-
686	V. B.	36	A+	-	-
687	P. C. B.	44	A+	-	-
688	F. A. V.	21	B+	-	-
689	M. dos S.	21	O+	-	-
690	J. J. da S.	34	O+	-	-
691	M. A. S.	25	A+	-	-
692	L. P. da S.	19	A+	-	-
693	J. P. dos S.	19	O+	-	-
694	C. G.	20	B+	-	-
695	B. de L. G.	44	O+	-	-
696	J. B.	56	O+	-	-
697	O. S. S.	24	O+	-	-
698	L. V. B. R.	34	O+	-	-
699	F. J. P.	23	O+	-	-
700	G. B. da S. F.	20	A+	-	-
701	L. R. N.	41	A+	-	-

702	R. R. F.	24	O+	-	-
703	L. A. C. M.	33	A+	-	-
704	A. G.	54	A+	-	-
705	W. F.	31	O+	-	-
706	A. dos S.	25	O+	-	-
707	J. C. R. Q.	29	A+	-	-
708	L. A. R. G.	21	A+	-	-
709	G. A. da C.	29	O+	-	+
710	J. L. da S.	39	O+	-	-
711	A. L. de O.	42	A+	-	-
712	F. P.	58	B+	-	-
713	O. H. de L.	32	O+	-	-
714	R. N. A. de O.	36	O+	-	-
715	V. de J. F. P.	41	A+	-	-
716	L. B. D.	29	A-	-	-
717	M. V.	52	O+	-	-
718	O. P. C.	43	O+	-	-
719	J. B. da C.	38	O+	-	-
720	A. M. de S.	43	O+	+	+
721	M. V. da S.	42	O+	-	-
722	J. R. R.	26	A2+	-	-
723	J. C. S.	20	B-	-	-
724	V. M.	23	O+	-	-
725	M. F.	33	O+	-	-
726	D. T.	33	A+	-	-
727	V. C. R.	37	A+	-	-
728	V. de F. M.	35	A+	-	-
729	J. B. de S.	28	O+	-	-
730	J. C. N.	41	O-	-	-
731	M. A. R.	23	O+	-	-
732	V. A. do N.	34	O+	-	-
733	A. C. da S.	46	O+	-	-
734	A. A. J.	23	O+	-	-
735	V. F. de J.	20	B+	-	-
736	R. V. G.	35	B+	-	-
737	S. F. C.	26	O+	-	-
738	B. dos S.	46	A+	-	-
739	E. F. V. C.	21	A2B+	-	-
740	D. M.	19	A+	-	-
741	E. A. da S.	21	O+	-	-
742	R. dos S.	21	O+	-	-

743	C. A. G. e S.	21	O-	-	-
744	R. P. de L.	35	A+	-	-
745	A. F. R.	43	O+	-	-
746	D. R. V.	19	AB+	-	-
747	M. S. V.	23	O+	-	-
748	M. L.	31	A-	-	-
749	L. M.	59	O+	-	-
750	A. T.	56	A+	-	-
751	J. R. G.	31	O+	-	-
752	A. J. dos S.	50	O+	-	-
754	A. N. P.	33	O+	-	-
755	R. F. da S.	24	O+	-	-
756	R. C. P.	18	O+	-	-
757	J. P. N.	33	A2+	-	-
758	J. C. O.	25	B+	-	-
759	A. F. G.	19	O+	-	-
760	J. B. G.	39	A+	-	-
761	J. M. de S.	38	B+	-	-
762	K. D. V.	24	O+	-	-
763	R. A. T. C.	38	O+	-	-
764	D. A. da S.	34	A+	-	+
765	A. L. M.	43	O-	-	-
766	J. F. S.	31	O+	-	-
767	A. A. dos S.	28	O+	-	-
768	V. de J.	35	A2B+	-	-
769	J. I. C.	18	O+	-	-
770	C. D.	61	B-	-	-
771	C. Z.	46	B+	-	-
772	J. C. da S.	25	O+	-	-
773	C. J. F.	27	O+	-	-
774	M. A. B.	30	O+	-	-
775	W. L. do R.	25	A+	-	-
776	C. C. C.	20	A+	-	+
777	S. G. da S.	31	O+	-	-
778	T. G. de S. C.	22	O+	-	-
779	E. C. O.	35	A+	-	-
780	G. D. M.	20	B+	-	-
781	J. D. da S.	41	O+	-	-
782	E. L. de S.	22	O+	-	-
783	E. N.	33	B+	+	-
784	M. A. O.	28	B+	-	-

785	J. D. da C.	39	A+	-	-
786	J. E. B.	30	O+	-	-
787	E. A. de F.	34	A2B+	-	-
788	R. R.	30	O+	-	-
789	R. A. F.	23	A+	-	-
790	C. A. G. V.	27	A+	-	-
791	J. A. F.	38	O+	-	-
792	L. R. F.	29	O+	-	-
793	C. R. R.	34	A+	-	-
794	R. A. S.	20	O+	-	-
795	E. A. B.	25	O-	-	-
796	L. D.	30	O+	-	-
797	M. A. da S.	42	A+	-	-
798	E. R.	30	O+	-	-
799	C. A. T.	43	O-	-	-
800	G. L. V.	34	A+	-	-
801	M. D.	32	O+	-	-
802	G. A. B.	21	B+	-	-
803	S. Q. S.	32	A+	-	-
804	A. D. P.	33	A+	-	-
805	E. S.	23	O-	-	-
806	D. de O.	27	A+	-	-
807	M. B. de A. C.	44	O+	-	-
808	G. M. G.	23	O+	-	-
809	M. de A. C.	20	A-	-	-
810	F. C. S.	23	O-	-	-
811	J. A. R.	25	B+	-	-
812	R. H.	22	A+	-	-
813	J. P.	47	B+	-	-

Resultado da dosagem do cofator de ristocetina, fator VIII e antígeno do vWF, nos doadores de sangue com diagnóstico confirmado de vWD.

Nesta tabela, a análise das respostas ao questionário quanto a história pessoal de sangramento e análise do antecedente familiar foi considerada como positiva quando o doador apresentou uma ou mais queixas positivas.

Doador	Nome	1º Amostra Cofator	2º Amostra Cofator	3º Amostra Cofator	1º Amostra Fator VIII	2º Amostra Fator VIII	3º Amostra Fator VIII	vWFAg	Idade	Tipo sanguíneo	História pessoal sangram.	Antecedente Familiar de sangram.	Grupo Étnico	Diagnóstico
28	N. S. de C.	42%	45%		55%	96%		48%	50	O+	+	+	Caucasóide	vW tipo I
34	N. R.	105%			35%	53%		53%	48	O-	-	-	Caucasóide	vW tipo I
164	M. L. J.	129%	48%		35%	38%		52%	35	O+	-	-	Caucasóide	vW tipo I
202	A. F. P. F.	46%	55%	54%	61%	56%		66%	32	O+	-	+	Mulato	vW tipo II
306	P. I. L. S.	45%	45%		48%	48%	38%	63%	23	O+	-	-	Caucasóide	vW tipo II
352	J. A. B.	60%			55%	22%		55%	33	O+	+	-	Caucasóide	vW tipo I
426	S. M. S.	35%	45%		50%	65%		43%	30	O+	-	+	Caucasóide	vW tipo I
486	J. B. B.	39%			57%	45%		65%	27	A+	+	-	Caucasóide	vW tipo II
531	M. M. F.	32%	65%		46%	47%	56%	47%	22	O+	+	-	Caucasóide	vW tipo I
563	M. A. C.	35%	60%		56%	55%		148%	31	O+	-	-	Caucasóide	vW tipo II
586	M. R. C.	39%	46%		75%			52%	34	A2+	-	-	Caucasóide	vW tipo I
673	O. N. da S.	32%	44%		59%	45%			33	O+	+	-	Caucasóide	vWD
713	O. H. de L.	13%	25%		52%	57%	56%	89%	32	O+	+	-	Caucasóide	vW tipo II

NR ⇒ Não realizado

NC ⇒ Não compareceu após a convocação

☐ ⇒ resultado não utilizado para o cálculo da Média e Desvio Padrão

Resultado da dosagem do cofator de ristocetina, fator VIII e antígeno do vWF, nos doadores de sangue com provável diagnóstico de vWD.

Nesta tabela, a análise das respostas ao questionário quanto a história pessoal de sangramento e análise do antecedente familiar foi considerada como positiva quando o doador apresentou uma ou mais queixas positivas.

Doador	Nome	1º Amostra Cofator	2º Amostra Cofator	3º Amostra Cofator	1º Amostra Fator VIII	2º Amostra Fator VIII	3º Amostra Fator VIII	vWFAg	Idade	Tipo sanguíneo	História pessoal sangram.	Antecedente Familiar de sangram.	Grupo Étnico	Diagnóstico
05	L. C. de C.	21%	NC		47%	NC			29	O-	+	-	Caboclo	Provável
62	J. A. de T.	28%	43%	57%	113%	92%	91%	67%	25	A2+	-	-	Caboclo	Provável
171	A. M. S. A.	43% 151%	70%	108%	63%	49%	38%	82%	33	A2+	-	+	Caucasóide	Provável
254	A. da S.	30% 50%	50%		84%			46%	18	A2+	+	-	Caucasóide	Provável
345	C. C. da S.	50%	64%		43%	47%	67%	92%	34	O+	+	+	Caucasóide	Provável
348	F. N. da S.	85%			32%	59%			21	O+	-	-	Caucasóide	Provável
425	A. F. F.	45%	50%		93%	97%			37	O+	+	-	Caucasóide	Provável
481	A. V.	50%			54%	86%		86%	34	A-	-	-	Caucasóide	Provável
546	W. C. G. H.	28%	57%		80%				30	A+	-	-	Caucasóide	Provável

NR

⇒ Não realizado

NC

⇒ Não compareceu após a convocação



⇒ resultado não utilizado para o cálculo da Média e Desvio Padrão

Tamanho e padrão alélico encontrado nos controles caucásóides VNTR-3

Amostra	Padrão	Tamanho dos Alelos
cc-01	Heterozigoto	142 / 146 pb
cc-02	Heterozigoto	138 / 150 pb
cc-03	Heterozigoto	150 / 154 pb
cc-04	Homozigoto	146 / 146 pb
cc-05	Heterozigoto	138 / 146 pb
cc-06	Heterozigoto	138 / 146 pb
cc-07	Heterozigoto	150 / 158 pb
cc-08	Homozigoto	142 / 142 pb
cc-09	Heterozigoto	150 / 154 pb
cc-10	Heterozigoto	150 / 154 pb
cc-11	Heterozigoto	142 / 150 pb
cc-12	Heterozigoto	146 / 154 pb
cc-13	Heterozigoto	146 / 158 pb
cc-14	Heterozigoto	146 / 150 pb
cc-15	Heterozigoto	154 / 158 pb
cc-16	Heterozigoto	142 / 146 pb
cc-17	Heterozigoto	138 / 146 pb
cc-18	Heterozigoto	146 / 158 pb
cc-19	Homozigoto	150 / 150 pb
cc-20	Heterozigoto	146 / 158 pb
cc-21	Heterozigoto	138 / 154 pb
cc-22	Heterozigoto	142 / 162 pb
cc-23	Heterozigoto	150 / 154 pb
cc-24	Heterozigoto	138 / 150 pb
cc-25	Heterozigoto	146 / 150 pb
cc-26	Homozigoto	146 / 146 pb
cc-27	Heterozigoto	138 / 158 pb
cc-28	Heterozigoto	146 / 158 pb
cc-29	Heterozigoto	154 / 162 pb
cc-30	Heterozigoto	146 / 150 pb
cc-31	Heterozigoto	150 / 154 pb
cc-32	Heterozigoto	142 / 150 pb
cc-33	Heterozigoto	146 / 154 pb
cc-34	Heterozigoto	138 / 150 pb
cc-35	Heterozigoto	142 / 146 pb
cc-36	Heterozigoto	146 / 150 pb
cc-37	Heterozigoto	138 / 154 pb
cc-38	Heterozigoto	146 / 154 pb
cc-39	Homozigoto	146 / 146 pb
cc-41	Homozigoto	150 / 150 pb
cc-42	Homozigoto	150 / 150 pb
cc-43	Heterozigoto	142 / 150 pb
cc-44	Heterozigoto	142 / 146 pb
cc-45	Heterozigoto	138 / 150 pb
cc-47	Heterozigoto	150 / 154 pb
cc-48	Heterozigoto	142 / 146 pb
cc-49	Heterozigoto	134 / 150 pb
cc-50	Heterozigoto	142 / 150 pb
cc-51	Heterozigoto	142 / 150 pb
cc-52	Heterozigoto	146 / 150 pb
cc-53	Heterozigoto	142 / 146 pb

Tamanho e padrão alélico encontrado nos controles caucásóides VNTR-2

Amostra	Padrão	Tamanho dos Alelos
cc-1	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-2	Heterozigoto	170 / 190 pb
cc-3	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-4	Heterozigoto	178 / 186 pb
cc-5	Heterozigoto	182 / 190 pb
cc-6	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-7	Heterozigoto	170 / 182 pb
cc-8	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-9	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-10	Heterozigoto	170 / 182 pb
cc-11	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-12	Heterozigoto	170 / 178 pb
cc-13	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-14	Heterozigoto	178 / 186 pb
cc-15	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-16	Heterozigoto	182 / 186 pb
cc-17	Heterozigoto	182 / 194 pb
cc-18	Heterozigoto	178 / 194 pb
cc-19	Heterozigoto	174 / 178 pb
cc-20	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-21	Heterozigoto	178 / 190 pb
cc-22	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-23	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-24	Heterozigoto	170 / 194 pb
cc-25	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-26	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-27	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-28	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-29	Heterozigoto	170 / 178 pb
cc-30	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-31	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-32	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-33	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-34	Heterozigoto	178 / 190 pb
cc-35	Heterozigoto	182 / 194 pb
cc-36	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-37	Heterozigoto	170 / 190 pb
cc-38	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-39	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-41	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-42	Heterozigoto	182 / 186 pb
cc-43	Heterozigoto	182 / 186 pb
cc-44	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-45	Heterozigoto	182 / 190 pb
cc-47	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-48	Heterozigoto	170 / 182 pb
cc-49	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-50	Heterozigoto	178 / 182 pb
cc-51	Homozigoto	182 / 182 pb
cc-52	Homozigoto	178 / 178 pb
cc-53	Homozigoto	182 / 182 pb

Tamanho e padrão alélico encontrado nos controles caucásóides VNTR-1

Amostra	Padrão	Tamanho dos Alelos
01	Homozigoto	102 / 102 pb
02	Heterozigoto	98 / 122 pb
03	Heterozigoto	102 / 114 pb
04	Homozigoto	102 / 102 pb
05	Heterozigoto	102 / 118 pb
06	Homozigoto	102 / 102 pb
07	Heterozigoto	98 / 102 pb
08	Heterozigoto	98 / 102 pb
09	Homozigoto	102 / 102 pb
10	Homozigoto	102 / 102 pb
11	Homozigoto	102 / 102 pb
12	Heterozigoto	98 / 102 pb
13	Heterozigoto	102 / 118 pb
14	Heterozigoto	102 / 114 pb
15	Homozigoto	102 / 102 pb
16	Heterozigoto	102 / 122 pb
17	Heterozigoto	114 / 118 pb
18	Heterozigoto	102 / 126 pb
19	Heterozigoto	102 / 118 pb
20	Homozigoto	102 / 102 pb
21	Heterozigoto	114 / 122 pb
22	Homozigoto	102 / 102 pb
23	Heterozigoto	110 / 114 pb
24	Heterozigoto	98 / 118 pb
25	Heterozigoto	102 / 114 pb
26	Heterozigoto	114 / 118 pb
27	Homozigoto	102 / 102 pb
28	Heterozigoto	102 / 118 pb
29	Heterozigoto	98 / 114 pb
30	Homozigoto	102 / 102 pb
31	Heterozigoto	102 / 122 pb
32	Heterozigoto	98 / 102 pb
33	Heterozigoto	118 / 122 pb
34	Heterozigoto	102 / 118 pb
35	Heterozigoto	102 / 122 pb
36	Heterozigoto	114 / 118 pb
37	Heterozigoto	98 / 118 pb
38	Heterozigoto	102 / 122 pb
39	Homozigoto	102 / 102 pb
41	Homozigoto	102 / 102 pb
42	Heterozigoto	102 / 106 pb
43	Heterozigoto	102 / 114 pb
44	Heterozigoto	102 / 114 pb
45	Heterozigoto	102 / 118 pb
47	Heterozigoto	98 / 102 pb
48	Heterozigoto	98 / 102 pb
49	Homozigoto	102 / 102 pb
50	Homozigoto	102 / 102 pb
51	Homozigoto	102 / 102 pb
52	Heterozigoto	102 / 114 pb
53	Homozigoto	102 / 102 pb

Genótipo de famílias com vWD – VNTR-3

vW	Nome	Parentesco	Tipo da Doença	Padrão	Tamanho dos Alelos
vW-14	R. M. R.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	146 / 150 pb
vW-14-1	M. C. G. R.	Esposa	Normal	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-14-2	M. M. G. R.	Filha	Normal	Heterozigoto	146 / 154 pb
vW-14-3	R. H. G. R.	Filho	Normal	Heterozigoto	146 / 150 pb
vW-14-4	A. F. G. R.	Filho	Tipo I	Heterozigoto	146 / 154 pb
vW-36	V. M. M.	Paciente	Tipo II N	Heterozigoto	142 / 154 pb
vW-36-1	T. R. M.	Mãe	Normal	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-36-2	M. M.	Irmã	Normal	Heterozigoto	146 / 150 pb
HB-27	O. M.	Pai	Hemofílico B	Heterozigoto	142 / 146 pb
vW-41	R. L.	Paciente	Tipo II B	Heterozigoto	138 / 146 pb
vW-41-1	N. S. L.	Mãe	Tipo IIB	Heterozigoto	138 / 146 pb
vW-41-2	E. L.	Pai	Normal	Heterozigoto	146 / 154 pb
vW-41-3	M. C. L.	Irmã	Tipo II B	Heterozigoto	138 / 154 pb
vW-41-4	J. H. L.	Irmão	Normal	Homozigoto	146 / 146 pb
vW-54	F. de S. F.	Paciente	Tipo II	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-54-1	E. M. F.	Pai	Tipo II	Heterozigoto	142 / 150 pb
vW-54-2	H. B. de S.	Mãe	Normal	Heterozigoto	146 / 154 pb
vW-54-3	E. de S. F.	Irmão	Normal	Heterozigoto	142 / 146 pb
vW-54-4	F. S. F.	Irmão	Normal	Heterozigoto	142 / 154 pb
vW-54-5	L. de S. F.	Irmão	Tipo II	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-65	K. L. P.	Paciente	Tipo II	Heterozigoto	138 / 150 pb
vW-65-1	V. N. P.	Pai	Tipo II	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-65-2	N. A. S. P.	Mãe	Normal	Heterozigoto	138 / 146 pb
vW-65-3	J. M. P.	P. (irmã)	Tipo II	Heterozigoto	138 / 150 pb
vW-68	S. B. M.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	142 / 154 pb
vW-68-1	S. B. M. P.	Irmã	Tipo I	Heterozigoto	142 / 150 pb
vW-68-2	S. B. M.	Irmã	Normal	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-68-3	J. R. M.	Pai	Normal	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-68-4	M. B. L. M.	Mãe	Tipo I	Heterozigoto	142 / 150 pb
vW-79	K. D. B.	Paciente	Tipo I	Homozigoto	154 / 154 pb
vW-79-1	A. D. B.	Mãe	Tipo I	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-79-2	J. M. I. B.	Pai	Normal	Homozigoto	154 / 154 pb
vW-79-3	C. D. B.	Irmã	Normal	Heterozigoto	150 / 154 pb
vW-79-4	K. J. B.	Irmão	Tipo I	Homozigoto	154 / 154 pb
vW-109	T. F. G. S. M.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	142 / 158 pb
vW-109-1	L. S. C. M.	Filho	Normal	Heterozigoto	142 / 150 pb
vW-109-2	K. S. C. M.	Filha	Normal	Heterozigoto	142 / 150 pb
TR-855	M. A. C. M.	Marido	Normal	Heterozigoto	150 / 150 pb

Genótipo de famílias com vWD – VNTR-2

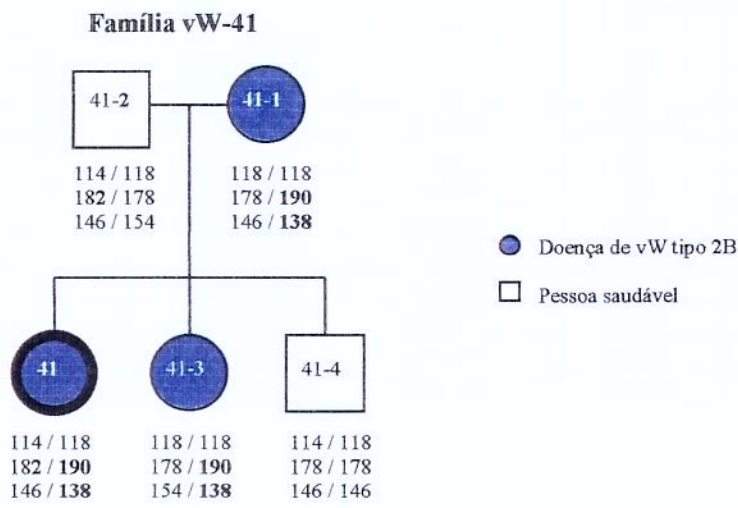
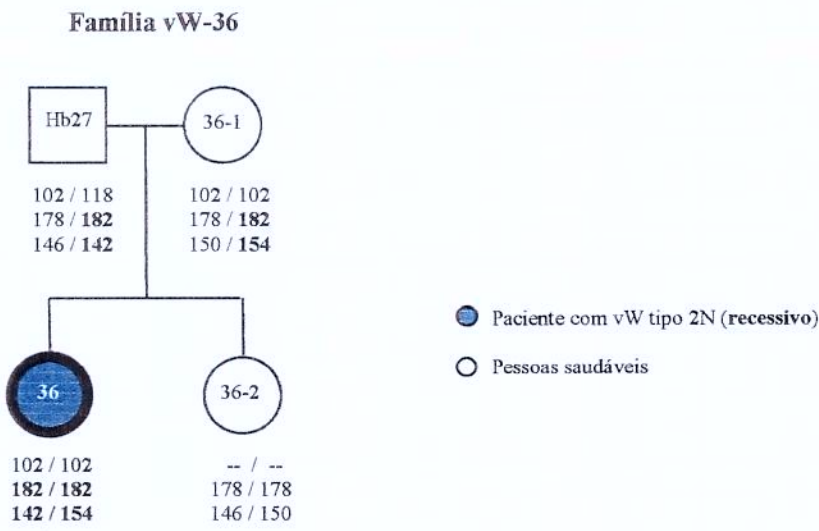
vW	Nome	Parentesco	Tipo da Doença	Padrão	Tamanho dos Alelos
vW-14	R. M. R.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-14-1	M. C. G. R.	Esposa	Normal	Homozigoto	178 / 178 pb
vW-14-2	M. M. G. R.	Filha	Normal	Homozigoto	178 / 178 pb
vW-14-3	R. H. G. R.	Filho	Normal	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-14-4	A. F. G. R.	Filho	Tipo I	Homozigoto	178 / 178 pb
vW-36	V. M. M.	Paciente	Tipo II N	Homozigoto	182 / 182 pb
vW-36-1	T. R. M.	Mãe	Normal	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-36-2	M. M.	Irmã	Normal	Homozigoto	178 / 178 pb
HB-27	O. M.	Pai	Hemofílico B	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-41	R. L.	Paciente	Tipo II B	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-41-1	N. S. L.	Mãe	Tipo IIB	Heterozigoto	178 / 190 pb
vW-41-2	E. L.	Pai	Normal	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-41-3	M. C. L.	Irmã	Tipo II B	Heterozigoto	178 / 190 pb
vW-41-4	J. H. L.	Irmão	Normal	Homozigoto	178 / 178 pb
vW-54	F. de S. F.	Paciente	Tipo II	Heterozigoto	170 / 174 pb
vW-54-1	E. M. F.	Pai	Tipo II	Heterozigoto	170 / 174 pb
vW-54-2	H. B. de S.	Mãe	Normal	Heterozigoto	170 / 186 pb
vW-54-3	E. de S. F.	Irmão	Normal	Heterozigoto	170 / 186 pb
vW-54-4	F. S. F.	Irmão	Normal	Homozigoto	170 / 170 pb
vW-54-5	L. de S. F.	Irmão	Tipo II	Heterozigoto	170 / 174 pb
vW-65	K. L. P.	Paciente	Tipo II	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-65-1	V. N. P.	Pai	Tipo II	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-65-2	N. A. S. P.	Mãe	Normal	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-65-3	J. M. P.	P. (irmã)	Tipo II	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-68	S. B. M.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-68-1	S. B. M. P.	Irmã	Tipo I	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-68-2	S. B. M.	Irmã	Normal	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-68-3	J. R. M.	Pai	Normal	Homozigoto	182 / 182 pb
vW-68-4	M. B. L. M.	Mãe	Tipo I	Heterozigoto	178 / 190 pb
vW-79	K. D. B.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-79-1	A. D. B.	Mãe	Tipo I	Homozigoto	178 / 178 pb
vW-79-2	J. M. I. B.	Pai	Normal	Heterozigoto	182 / 190 pb
vW-79-3	C. D. B.	Irmã	Normal	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-79-4	K. J. B.	Irmão	Tipo I		178 / 182 pb
vW-109	T. F. G. S. M.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	178 / 182 pb
vW-109-1	L. S. C. M.	Filho	Normal	Heterozigoto	182 / 186 pb
vW-109-2	K. S. C. M.	Filha	Normal	Heterozigoto	182 / 186 pb
TR-855	M. A. C. M.	Marido	Normal	Heterozigoto	178 / 186 pb

Genótipo de famílias com vWD – VNTR-1

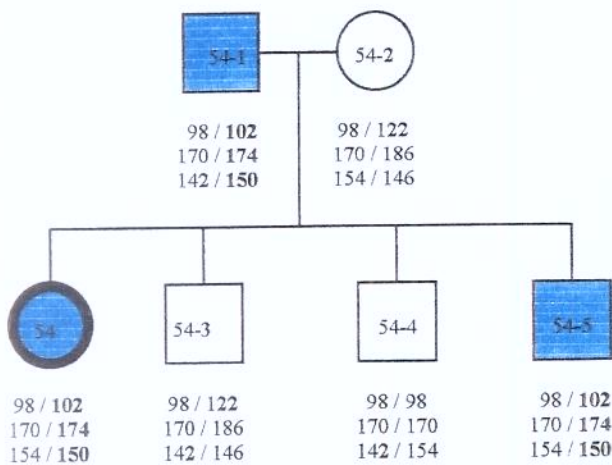
vW	Nome	Parentesco	Tipo da Doença	Padrão	Tamanho dos Alelos
vW-14	R. M. R.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	102 / 118 pb
vW-14-1	M. C. G. R.	Esposa	Normal	Heterozigoto	102 / 114 pb
vW-14-2	M. M. G. R.	Filha	Normal	Heterozigoto	114 / 118 pb
vW-14-3	R. H. G. R.	Filho	Normal	Heterozigoto	102 / 118 pb
vW-14-4	A. F. G. R.	Filho	Tipo I	Heterozigoto	114 / 118 pb
vW-36	V. M. M.	Paciente	Tipo II N	Homozigoto	102 / 102 pb
vW-36-1	T. R. M.	Mãe	Normal	Homozigoto	102 / 102 pb
vW-36-2	M. M.	Irmã	Normal	Não	Reagente!
HB-27	O. M.	Pai	Hemofílico B	Heterozigoto	102 / 118 pb
vW-41	R. L.	Paciente	Tipo II B	Heterozigoto	114 / 118 pb
vW-41-1	N. S. L.	Mãe	Tipo IIB	Homozigoto	118 / 118 pb
vW-41-2	E. L.	Pai	Normal	Heterozigoto	114 / 118 pb
vW-41-3	M. C. L.	Irmã	Tipo II B	Homozigoto	118 / 118 pb
vW-41-4	J. H. L.	Irmão	Normal	Heterozigoto	114 / 118 pb
vW-54	F. de S. F.	Paciente	Tipo II	Heterozigoto	98 / 102 pb
vW-54-1	E. M. F.	Pai	Tipo II	Heterozigoto	98 / 102 pb
vW-54-2	H. B. de S.	Mãe	Normal	Heterozigoto	98 / 122 pb
vW-54-3	E. de S. F.	Irmão	Normal	Heterozigoto	98 / 122 pb
vW-54-4	F. S. F.	Irmão	Normal	Homozigoto	98 / 98 pb
vW-54-5	L. de S. F.	Irmão	Tipo II	Heterozigoto	98 / 102 pb
vW-65	K. L. P.	Paciente	Tipo II	Homozigoto	118 / 118 pb
vW-65-1	V. N. P.	Pai	Tipo II	Heterozigoto	98 / 118 pb
vW-65-2	N. A. S. P.	Mãe	Normal	Heterozigoto	118 / 122 pb
vW-65-3	J. M. P.	P. (irmã)	Tipo II	Homozigoto	118 / 118 pb
vW-68	S. B. M.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	102 / 122 pb
vW-68-1	S. B. M. P.	Irmã	Tipo I	Homozigoto	122 / 122 pb
vW-68-2	S. B. M.	Irmã	Normal	Homozigoto	102 / 102 pb
vW-68-3	J. R. M.	Pai	Normal	Heterozigoto	102 / 122 pb
vW-68-4	M. B. L. M.	Mãe	Tipo I	Heterozigoto	102 / 122 pb
vW-79	K. D. B.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	102 / 122 pb
vW-79-1	A. D. B.	Mãe	Tipo I	Heterozigoto	118 / 122 pb
vW-79-2	J. M. I. B.	Pai	Normal	Heterozigoto	98 / 102 pb
vW-79-3	C. D. B.	Irmã	Normal	Heterozigoto	102 / 118 pb
vW-79-4	K. J. B.	Irmão	Tipo I	Heterozigoto	102 / 122 pb
vW-109	T. F. G. S. M.	Paciente	Tipo I	Heterozigoto	102 / 122 pb
vW-109-1	L. S. C. M.	Filho	Normal	Heterozigoto	102 / 114 pb
vW-109-2	K. S. C. M.	Filha	Normal	Heterozigoto	102 / 114 pb
TR-855	M. A. C. M.	Marido	Normal	Heterozigoto	114 / 118 pb

Heredogramas e Genótipos das 8 famílias com vWD.

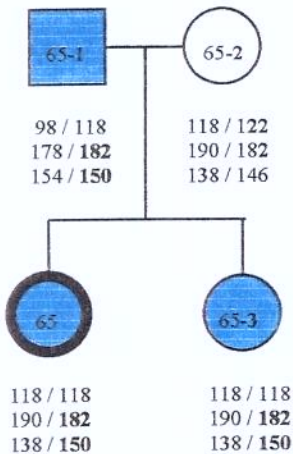
WTR-1, 2 e 3



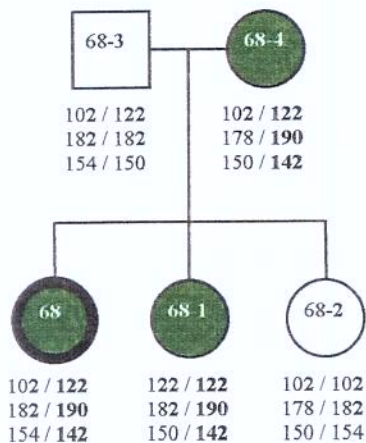
Família vW-54



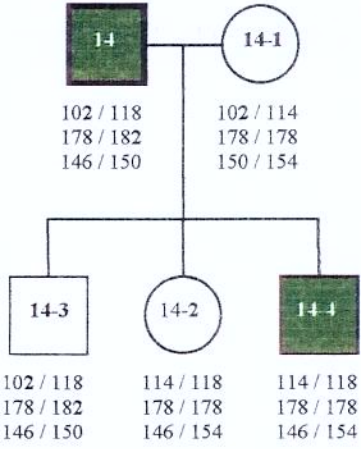
Família vW-65



Família vW-68



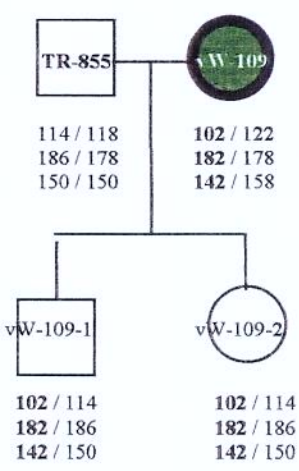
Família vW-14



Doença de von Willebrand tipo I

Pessoas saudáveis

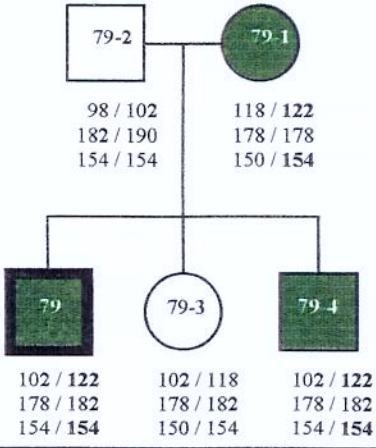
Família vW-109



Paciente com vW tipo I

Pessoas saudáveis

Família vW-79



Doença de von Willebrand tipo I

Pessoas saudáveis