

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Norma Cristina de Sousa

Estudo da relação entre os polimorfismos do gene ABO e as concentrações plasmáticas do fator de von Willebrand e fator VIII

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Norma Cristina de Sousa.

Campinas, 15 de março de 2004.

*Profª. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro
- Orientadora -*

Orientadora: Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Campinas, 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Norma Cristina de Sousa

Estudo da relação entre os polimorfismos do gene ABO e as concentrações plasmáticas do fator de von Willebrand e fator VIII

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP para obtenção de Título de Mestre em Farmacologia,

Orientadora: Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Campinas, 2004

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

So85e Sousa, Norma Cristina de
Estudo da relação entre os polimorfismos do gene ABO e as
concentrações plasmáticas do fator de Von Willebrand e fator VIII /
Norma Cristina de Sousa. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Maria Lourdes Barjas - Castro, Joyce Maria
Annichino-Bizzacchi

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

1. Grupos sanguíneos. 2. *Ristocetina. I. Maria Lourdes Barjas-
Castro. II. Joyce Annichino-Bizzacchi. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	711/Unicamp
	So85e
V	EX
TOMBO BC/	62280
PROC.	16-06-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	28/02/05
Nº CPD	

= 62280

Bbid: 341819



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora:

Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro

Membros:

1. Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro
2. Dr. Elbio Antonio D'amico
3. Prof. Dr. José Orlando Bordin
4. Dr^a. Nelci Fenalti Hoehr
5. Prof^a. Dr^a Sara Teresinha Olalla Saad

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

Data: 15/03/2004

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sebastião Andrade e Maria Aparecida, como reconhecimento por todas as vezes que renunciaram aos seus sonhos para que pudessem realizar os meus e por seus valiosos incentivos na busca de meus ideais. Para vocês o meu amor e o meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, todo poderoso, por ter enriquecido minha mente e meu espírito com sua divina graça e misericórdia, iluminando o meu caminho para que eu pudesse concretizar este meu objetivo.

Ao meu irmão Cláudio Humberto e cunhada Karina Sabatini, que direta ou indiretamente sempre me ajudaram com muitas palavras de incentivo.

Ao Jairo César, pelo carinho, incentivo e compreensão pela minha ausência durante todo esse tempo.

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

Dr^a.Maria de Lourdes Barjas-Castro, orientadora e amiga, pelos ensinamentos, pela oportunidade e confiança em mim depositada em realizar este trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, pela oportunidade oferecida, paciência, atenção e importantes idéias científicas.

Ao Hemocentro Unicamp, que me proporcionou conhecimento e crescimento profissional.

A Fapesp e CNpq que proporcionaram ajuda financeira para realizar este trabalho.

Às amigas do Laboratório de Hemostasia, Cristina, Deva, Ucha, Silmara, Tânia, Beka, Dulcinéia, Eloísa e Lena pelo carinho, amizade, respeito, auxílio técnico e paciência, os quais me proporcionaram grandes conhecimentos.

A Lúcia Helena (Ucha) que além do incentivo e dos grandes conhecimentos a mim transmitidos, foi uma grande amiga em todos os momentos.

Às amigas Dalva, Yajaira, Maria Neri, Valéria, Gisele, Ana Cláudia, Aline, Claudinha, Daniela (Dani), Michele e amigos João Neri, João Madrid e Ricardo pelo carinho, incentivo e amizade.

As secretárias Arlete, Nicete e Maria Helena pela atenção durante a execução deste trabalho.

A todos os funcionários do Serviço de Coleta, Laboratório de Imunologia Eritrocitária do Hemocentro Unicamp, os quais não pouparam esforços para ajudar na realização deste trabalho.

A Maria de Fátima (Fafá) pelos conhecimentos a mim transmitidos e ajuda no recrutamento e avaliação imunohematológica dos doadores.

A Elza R. M. Leite da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP pela colaboração na obtenção de doadores com subgrupos sanguíneos.

A todos os doadores de sangue do Hemocentro Unicamp e aos amigos que também participaram com suas doações de sangue, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao estatístico Roberto Zulli pela colaboração e ensinamentos recebidos na realização das análises estatísticas.

O Senhor meu pai que me dá toda essa inspiração fazendo me sentir não o maior nem o melhor...

Apenas seguir minha missão...

Através das dádivas que do Senhor recebo...

Peço-lhe de coração, daí-me força para que meus atos e as minhas palavras não machuquem meu irmão.

Que o meu coração esteja sempre aberto em paz, e que toda nossa existência seja coroada de esperança e amor.

(Luiz Carlos S. Ribas)

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_x, A^x, B_x e B^x	Subgrupos de A e B: os símbolos subscritos representam os fenótipos e os sobrescritos representam os genótipos
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
cDNA	DNA complementar
Da	Daltons
Del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
DVW	Doença de von Willebrand
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FVIII	Fator VIII
FVIII: C	Fator VIII coagulante
FWV	Fator de von Willebrand
FWV:Ag	Antígeno do Fator de von Willebrand
Glu	Glutamina
GPIb	Glicoproteína plaquetária Ib
GPIIb/IIIa	Complexo glicoprotéico plaquetário IIb/IIIa

gr	Gramas
µg	Micrograma
Gly	Glicina
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
Ile	Isoleucina
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
µl	Microlitro
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
M	Mol
MA	Miliamperes
mM	Milimolar
MW	Miliwatts
NH₄HCO₃	Bicarbonato de amônio
NH₄Cl₂	Cloreto de Amônio
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pb	Pares de bases
pg	Picograma
Phe	Phenilalanina
pmol	Picomol
Pro	Prolina
RCo	Cofator de ristocetina
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tpr	Triptofano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
U/dL	Unidades por decilitros
Val	Valina

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais mutações do alelo A nos exons 6 e 7 do gene ABO.....	41
Tabela 2: Principais mutações do alelo B nos exons 6 e 7 do gene ABO.....	43
Tabela 3: Principais mutações do alelo O nos exons 6 e 7 do gene ABO.....	44
Tabela 4: Iniciadores utilizados para o estudo dos exons 6 e 7 do gene ABO.....	53
Tabela 5: Enzimas de restrição utilizadas no estudo dos polimorfismos do gene ABO.....	54
Tabela 6: Resultado da clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7 do gene ABO dos doadores O ¹ O ²	71
Tabela 7: Resultado da clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7 do gene ABO dos doadores B ^m O e B ³ O.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do gene do FVW e seus domínios.....	28
Figura 2: Organização do gene ABO exons e íntrons.....	36
Figura 3: Genotipagem do grupo sanguíneo O com identificação da Del 261G.....	66
Figura 4: Genotipagem do grupo sanguíneo O ¹ O ^{1V} com identificação da mutação C771T.....	67
Figura 5: Genotipagem do subgrupo A ² O com identificação da mutação C467T.....	68
Figura 6: Genotipagem do subgrupo A ³ O com identificação da mutação G871A.....	69
Figura 7: Genotipagem do subgrupo A ^x O com identificação da mutação T646A.....	70
Figura 8: Resultados do sequenciamento direto do exon 7 do gene ABO dos Indivíduos do subgrupo de B.....	72
Figura 9: "Box and whisker plot" comparando as distribuições dos grupos e subgrupos sanguíneos em relação as dosagens dos FVW:Ag, FVIII e RCo.....	78
Figura 9A: Medianas das dosagens do FVW:Ag nos diferentes grupos e subgrupos sanguíneos.....	78
Figura 9B: Medianas das dosagens do FVIII:C nos diferentes grupos e subgrupos sanguíneos.....	80
Figura 9C: Medianas das dosagens do FVW:RCo nos diferentes grupos e subgrupos sanguíneos.....	82
Figura 10A: Resultados da correlação entre o FVW e VIII.....	84
Figura 10B: Resultados da correlação entre o FVW e RCo.....	85

SUMÁRIO

Resumo.....	20
Abstract.....	23
1- Introdução.....	25
1.1- Fator de von Willebrand.....	26
1.2- Fator VIII e sua ligação com o Fator de von Willebrand.....	27
1.3- Relação entre o grupo sanguíneo ABO e o FVW, FVIII e RiCof	29
1.4- Doença de von Willebrand.....	33
1.5- Grupos sanguíneos	34
1.5.1- Histórico.....	34
1.5.2- Gene ABO.....	35
1.5.3- Subgrupos sanguíneos	36
2- Objetivos.....	45
3- Casuística e Métodos.....	47
3.1- Casuística.....	48
3.2- Coleta de sangue.....	48
3.3- Avaliação imunohematológica.....	49
3.3.1- <i>Determinação sorológica dos grupos sanguíneos.....</i>	<i>49</i>
3.3.2- <i>Determinação sorológica dos subgrupos sanguíneos</i>	<i>49</i>
3.4- Métodos moleculares.....	50
3.4.1- Extração do DNA genômico.....	50
3.4.2- Amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão	

com enzimas de restrição.....	51
3.4.3- Clonagem.....	54
3.4.4- Sequenciamento automatizado.....	56
3.4.4.1- Purificação do produto de PCR.....	56
3.4.4.2- Reação de sequenciamento.....	56
3.5- Determinação do antígeno do FVW.....	57
3.5.1-Quantificação do FVW:Ag.....	58
3.5.1.1- Fatores que podem interferir na reação.....	59
3.6- Análise funcional do FVIII.....	60
3.7- Determinação do cofator de ristocetina.....	60
3.8- Análise estatística.....	61
3.8.1- Correlação entre FVW, FVIII e cofator de ristocetina.....	61
4- Resultados.....	62
4.1- Avaliação imunohematológica sorológica.....	63
4.2- Estudo molecular dos grupos e subgrupos sangüíneos.....	63
4.3- Resultados das dosagens do FVW, FVIII e cofator de ristocetina.....	73
4.3.1- Resultados das dosagens do FVW nos diferentes grupos e subgrupos sangüíneos.....	73
4.3.2- Resultados das dosagens do FVIII nos diferentes grupos e subgrupos sangüíneos.....	74
4.3.3- Resultados das dosagens do FVIII nos diferentes grupos e subgrupos sangüíneos.....	76
4.3.4- Correlação entre FVW, FVIII e cofator de ristocetina.....	68
5- Discussão.....	86

5.1- Polimorfismos do gene ABO.....	92
6- Conclusões.....	93
6.1- Relação entre os polimorfismos do gene ABO e FVW e FVIII:C.....	94
6.2- Polimorfismos do gene ABO.....	94
7- Referências bibliográficas.....	96
Anexo – 1.....	117
Anexo – 2.....	118
Anexo – 3.....	119

RESUMO

O fator de von Willebrand (FVW) é uma glicoproteína multimérica que possui papel fundamental na hemostasia primária formando pontes entre glicoproteínas plaquetárias e estruturas do endotélio vascular. Este fator também atua como carreador do Fator VIII (FVIII) da coagulação. Numerosos fatores influenciam a concentração plasmática do antígeno do fator de von Willebrand (FVW:Ag), e dentre eles o grupo sanguíneo ABO é considerado um dos fatores de maior importância. Vários autores demonstraram que indivíduos do grupo sanguíneo O possuem a concentração do FVW:Ag mais baixa e atividade do fator VIII coagulante (FVIII:C) reduzida quando comparados com os outros grupos (A, B e AB). A literatura não apresenta relatos sobre a atividade funcional do FVW nos subgrupos A²O, A²B, A³O, A^xO, B³O e sobre a concentração plasmática do FVW:Ag e atividade FVIII:C nos subgrupos sanguíneos A³O, A^xO e B³O.

O objetivo do presente trabalho foi correlacionar os polimorfismos do gene ABO com a concentração plasmática do FVW:Ag, Fator VIII:C e atividade do cofator da ristocetina (RCo).

Doadores de sangue (122) de diferentes grupos e subgrupos sanguíneos definidos através de testes sorológicos e moleculares foram submetidos às dosagens de Fator VIII (método coagulométrico), FVW:Ag (enzima imuno ensaio - ELISA) e estudo funcional do FVW (cofator de ristocetina). No estudo molecular dos grupos e subgrupos sanguíneos foram definidos os genótipos: 10 indivíduos (AA), 10(AO¹), 10(AB), 10(BO¹), 10(BB), 10(O₁O₁), 10(O¹O^{1v}), 4(O¹O²), 20(A²O), 20(A²B), 4(A³O), 2(A^xO), 1(B^mO¹) e 1(B³O). As dosagens do FVW:Ag, FVIII:C e RiCof mostraram que os indivíduos do grupo O e portadores deste alelo (AO e BO) possuíam concentrações plasmáticas menores quando comparadas com indivíduos dos grupos AA, AB e BB. Quando analisamos o subgrupo A²O observamos que os referidos fatores possuíam valores mais baixos (Mediana-Md: FVW:Ag=89%; FVIII:C=96%; RCo=99%) quando comparados com AA, AB e BB (Md: FVW:Ag=120% - p<0.001; FVIII:C=117% - p<0.001; RCo=119% - p<0.001) e A²B (Md: FVW:Ag=169% - p<0.001; FVIII:C=112% - p<0.001; RCo=132% - p=0.001) entretanto, encontramos valores mais elevados em relação a OO (Md: FVW:Ag=69% - p=0.018; FVIII:C=75% - p=0.048; RCo= 65% - p<0.001). As dosagens dos referidos fatores nos subgrupos A³O, A^xO e B³O (Md: FVW:Ag=75%; FVIII:C=88%; RCo=76%) apresentaram valores significativamente mais baixos quando comparados com os resultados obtidos nos grupos AA, AB e BB (Md: FVW:Ag=120% - p<0.001; FVIII:C=117% - p=0.041; RCo= 119% - p<0.001) e A²B (Md: FVW:Ag=169% - p<0.001; FVIII:C=112% - p=0.001; RCo=132% - p<0.001).

Entretanto, não foram encontrados diferenças estatisticamente significativas quando comparados com indivíduos dos grupos OO, AO e A²O.

O estudo estatístico mostrou alta correlação entre os níveis plasmáticos do FVW e FVIII ($R=0.77$; $p<0.001$) e entre FVW e RCo ($R=0.75$; $p<0.001$).

Os resultados demonstraram claramente a influência do sistema ABO (antígeno H) nos níveis circulantes do FVW:Ag e conseqüentemente no FVIII plasmático e na atividade funcional do FVW:Ag (cofator de ristocetina).

ABSTRACT

Von Willebrand factor (VWF) plays a key role in primary hemostasis. Various factors influence the FVW plasma level and ABO blood groups are considered the most important factor. Recent studies have demonstrated that individuals carrying one O allele have significantly lower plasma levels of VWF and FVIII than to those carrying no O allele. The objective of this study was to correlate the ABO gene polymorphisms with plasma levels of VWF, FVIII and ristocetin cofactor. Blood donors of different blood groups (122) defined by serological and molecular tests were submitted to VWF:Ag (ELISA) and FVIII (coagulometric method) dosage and tested for ristocetin cofactor (RCo). The blood groups genotyping were: 10(AA), 10(BB), 10(AB), 10(AO¹), 10(BO¹), 10(O¹O¹), 10(O¹O^{1V}), 4(O¹O²), 20(A²O), 20(A²B), 4(A³O), 2(A^XO), 1(B³O) and 1(B^mO). The subgroups A³O, A^XO, B³O and B^mO were analysed as only one group. Group O individuals and those carrying this allele demonstrated significantly lower levels of VWF:Ag, FVIII and RCo than individuals of groups AA, AB and BB. When subgroup A²O was studied these factors presented lower levels (Median(Md):FVW=89%; FVIII=96%; RCo=99%) than AA, AB and BB (Md:FVW=120% - p<0.001; FVIII=117% - p<0.001, RCo=119% - p<0.001) and A²B (Md:FVW=169% - p<0.001; FVIII=112% - p<0.001; RCo=132% - p=0.001) and higher levels than O¹O¹(Md:FVW=69% - p=0.018; FVIII=75% - p=0.048; RCo= 65% - p<0.001). The same factors analysed in A³O¹, A^XO¹ and B³O¹/B^mO¹ donors (Md:FVW=75%; FVIII:C=88%; RCo=76%) were significantly lower compared with those in the groups AA, AB and BB (Md:FVW=120% - p<0.001; FVIII=117% - p=0.041; RCo=119% - p<0.001) and A²B (Md:FVW=169% - p<0.001; FVIII=112% - p=0.001; RCo=132% - p<0.001). However, no statistically significant differences were observed when this subgroup was compared with O¹O¹, AO¹ and A²O¹.

We demonstrated a high correlation between the plasma levels of VWF and FVIII (R=0.77; p<0.001) and between VWF and RCo (R=0.75; p<0.001).

The results of this study clearly demonstrated the influence of ABO subgroups (H antigen) on the VWF:Ag plasma level and consequently on the FVIII plasmatic level and functional activity of FVW:Ag (ristocetin cofactor).

1. Introdução

1.1- Fator de von Willebrand

O FVW é uma glicoproteína multimérica, de alto peso molecular presente no plasma, nas células endoteliais, no subendotélio e nos grânulos alfa das plaquetas. É codificado por um gene com 178 kb e 52 exons, que está localizado no cromossomo 12 (GINSBURG et al., 1985; MANCUSO et al., 1989). O FVW está presente no plasma sob a forma de vários multímeros de tamanhos crescentes, que variam de 1×10^6 a 20×10^6 kDa (TITANI et al., 1986). A biossíntese deste fator envolve um número complexo de etapas incluindo a dimerização, polimerização, glicosilação e clivagem do pró-poli-peptídeo (VISCHER et al., 1995). O FVW é sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos (JAFFE et al., 1973; NACHMAN et al., 1977) e armazenado nos grânulos secretores das células endoteliais chamados de corpúsculos de Weibel-Palade, e nos grânulos α dos megacariócitos (SPORN et al., 1985). Este fator circula no plasma numa concentração de aproximadamente $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (50nM) e atua na hemostasia primária ao mediar a adesão das plaquetas ao subendotélio exposto proporcionando a formação do trombo plaquetário no sítio de injúria vascular. O FVW atua também como carreador do FVIII formando um complexo com o mesmo, inibindo a sua rápida remoção da circulação (KOEDAM et al., 1988). A regulação fisiológica da secreção do FVW está relacionada a presença de injúria vascular, que proporciona a liberação de multímeros de alto peso molecular próximos ao sítio da lesão, permitindo a ligação entre plaquetas e colágeno subendotelial (KELLY et al., 1985). Os vários multímeros são importantes porque proporcionam grande número de sítios de ligação entre o FVW e as plaquetas, e entre as plaquetas e o colágeno do subendotélio vascular. Os maiores multímeros do FVW 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.

Inicialmente ocorre a ligação do FVW ao colágeno subendotelial; esta ligação com o colágeno induz alterações conformacionais na molécula do referido fator, proporcionando posterior ligação a glicoproteína plaquetária Ib (GPIb).

O antibiótico ristocetina tem a capacidade de promover mudanças conformacionais na molécula do FVW, as quais são importantes na indução da ligação do FVW com a GPIb, ocorrendo subsequente a formação do agregado plaquetário em solução. A ristocetina é utilizada em método laboratorial, fornecendo dados sobre a atividade funcional do FVW, e auxiliando no diagnóstico da doença de von Willebrand (READ et al., 1989).

A ligação do FVW à glicoproteína Ib leva à ativação plaquetária, com a posterior exposição da glicoproteína IIb/IIIa. Este processo proporciona a ligação da glicoproteína plaquetária IIb/IIIa com grande quantidade de moléculas do FVW e com outras proteínas de aderência, resultando finalmente no trombo plaquetário (FRESSINAUD et al., 1986; WEISS et al., 1987).

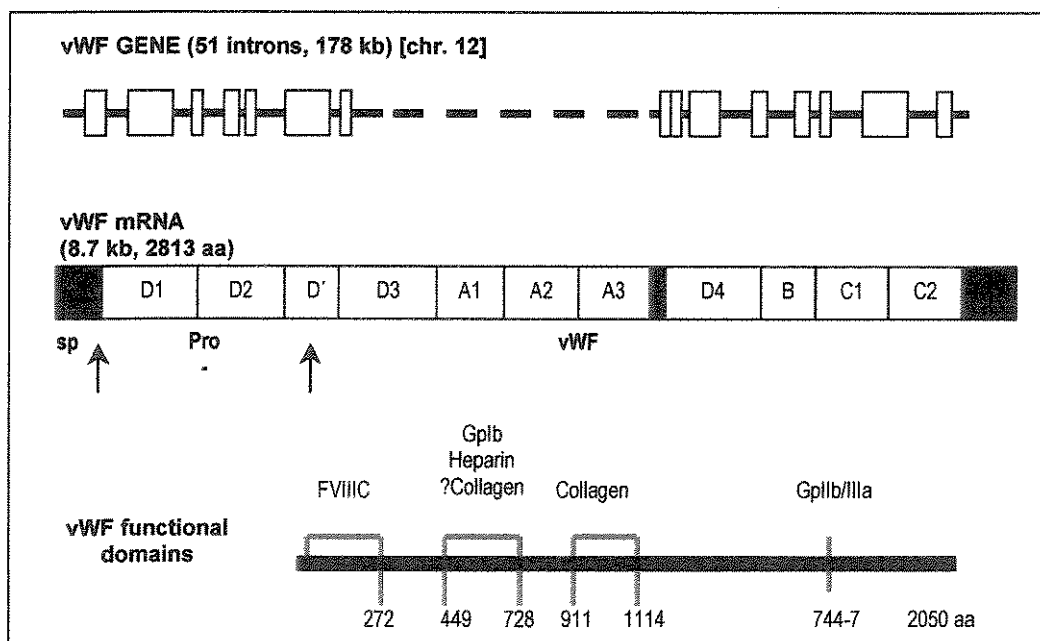
1.2 – Fator VIII e sua ligação com o FVW

O FVIII é uma glicoproteína plasmática, sintetizada pelo fígado, e possui um importante papel para a manutenção da hemostasia normal (GROTH, 1974). O gene do FVIII está localizado no braço longo do cromossomo X, possui 186 kb e 26 exons (TOOLE et al., 1984).

Logo após a sua liberação na circulação, o FVIII liga-se ao FVW para formar um complexo não covalente, constituído por 99% de FVW para 1% de FVIII. Esta ligação é essencial para a sobrevivência plasmática do FVIII, visando sua estabilização e proteção contra a inativação causada pela proteína C e fator X ativados (FORSTER et al., 1978b). A concentração plasmática do FVIII no plasma normal é de aproximadamente 1nM. Alterações no sítio de ligação da molécula do FVW acarretam a diminuição na concentração plasmática do FVIII (FOSTER et al., 1987b; LEYTE et al., 1991b).

Existem vários fatores que influenciam a concentração do FVW e FVIII, dentre estes destacam-se: estresse, idade, sexo, níveis de estrógeno, gestação, grupo sanguíneo (GILL et al., 1987; SHIMA et al., 1995), estímulo adrenérgico e processo inflamatório (BLOOM et al., 1991). Segundo DALTON et al. (1987), o FVW pode estar diminuído em pacientes portadores de hipotireoidismo.

Figura 1 - Estrutura do gene do FVW e seus domínios



Estruturas do gene, RNA mensageiro e a proteína do FVW. Na primeira linha é apresentado o gene do FVW, as barras na posição vertical representam os exons e as linhas sólidas representam os introns. O RNA mensageiro do FVW está representado no meio, onde as letras representam segmentos homólogos repetidos. A linha subsequente mostra os domínios funcionais, dentro as seqüências maduras do FVW, com os números dos aminoácidos (NICHOLS; GINSBURG, 1997).

1.3 – Relação entre grupo sanguíneo ABO, fator de von Willebrand, Fator VIII e cofator de ristocetina

A influência do grupo sanguíneo ABO sobre a concentração plasmática do FVIII e FVW foi descrito primeiramente por PRESTON em 1964, e confirmado por outros autores: (MOHANTY et al., 1984; ORSTAVIK et al., 1985; GILL et al., 1987; SHIMA et al., 1995).

GILL et al. (1987), determinaram a concentração do antígeno do FVW (FVW:Ag) em 1.117 doadores de sangue voluntários, e verificaram uma relação com o grupo sanguíneo ABO. Indivíduos pertencentes ao grupo O tiveram a menor média da concentração dos níveis do FVW:Ag (74,8 U/dl), seguidos pelo grupo A (105,9 U/dl), grupo B (119,9U/dl) e finalmente pelo grupo AB (123,3 U/dl).

MILLER et al. (2003), também estudaram as concentrações do FVW e cofator de ristocetina em indivíduos do grupo O e não O (A e B), e verificaram que os indivíduos do grupo O possuíam concentrações significativamente mais baixas do FVW, e menor obviamente do cofator de ristocetina em relação aos indivíduos não O.

SHIMA et al. (1995), demonstraram que indivíduos normais portadores do alelo O (genótipos AO e BO) possuíam concentrações mais baixas do FVW:Ag em relação àqueles que não eram portadores do alelo O (genótipos AA, BB e AB).

Os mecanismos para explicar a relação entre o grupo sanguíneo ABO e a concentração plasmática do FVW:Ag ainda não são muito claros.

Autores demonstraram que indivíduos do grupo sanguíneo O que apresentavam concentrações do FVW diminuídas possuíam também redução da atividade do FVIII, e que esta era consequência da influência do grupo sanguíneo ABO sobre o FVW:Ag circulante (ORSTAVIK et al., 1989; O'DONNELL et al., 2000).

MATSUI et al. (1992), demonstraram que estruturas ABH são carregadas pelo FVW de acordo com o grupo sanguíneo de cada indivíduo. Contudo ainda não está claro se o efeito do grupo sanguíneo ABO na concentração plasmática do FVW é diretamente ligado as estruturas ABH.

O'DONNELL et al. (2002). demonstraram uma relação direta entre o genótipo ABO, a expressão da enzima A transferase e a quantidade de antígenos A e H expressa no FVW circulante. Entre os indivíduos do grupo A a expressão do antígeno H no FVW foi do ponto de vista quantitativo esquematizado da seguinte forma: $A^2O^1 > A^1O^1 > A^1A^1$. Os mesmos autores demonstraram que em doadores dos grupos O e A^2O^1 o antígeno H presente no FVW foi inversamente proporcional com os níveis plasmáticos do referido fator.

Um estudo com gêmeos dizigóticos e monozigóticos, realizado por ORSTAVIK et al. (1985), demonstraram que 66% da variação total do FVW:Ag no plasma era determinado geneticamente, e que 30% deste componente genético era explicado pelo grupo sanguíneo ABO. Com relação ao FVIII:Ag, verificou-se que 57% da variação da concentração plasmática do referido fator também foi geneticamente determinada, do qual 12% foi devido ao grupo sanguíneo ABO. Quando a concentração do FVW foi corrigida para os valores do FVIII, verificou-se uma influência significativa do grupo sanguíneo ABO sobre a concentração do FVW:Ag ($p= 0.001$). Inversamente, quando a concentração do FVIII foi corrigida para os valores do FVW, não se observou nenhum efeito sobre a concentração do FVIII:Ag ($p= 0.62$). Este estudo sugere que a influência do grupo ABO sobre o FVIII-FVW é mediada primeiramente pelos efeitos causados sobre o FVW:Ag (O'DONNELL et al., 2001).

SOUTO et al. (2000), estudaram a concentração plasmática dos FVIII e FVW em indivíduos de diferentes grupos sanguíneos, e verificaram que somente o FVW:Ag apresentou concentração significativamente mais baixa nos heterozigotos (AO e BO) em relação aos indivíduos não carreadores do alelo O (AA, AB e BB; $p = 0,03$).

ORSTAVICK et al. (1989), descreveram a influência do gene secretor nos níveis circulantes do FVW e FVIII, demonstrando que a homozigose para o alelo Se (secretor) está relacionada a elevadas concentrações do FVW:Ag quando comparados com indivíduos heterozigotos e com ausência do referido gene.

Os efeitos do grupo sanguíneos ABO na via regulatória secretora do FVW, foram investigados usando desmopressina (DDAVP) (SCOTT et al., 1993). Esta droga é muito utilizada no tratamento da doença de von Willebrand tipo 1, e causa uma rápida liberação do FVW armazenado dentro dos corpúsculos de Weibel-palade das células endoteliais. O aumento do FVW observado uma hora após a infusão do DDAVP não foi significativamente diferente nos indivíduos do grupo sanguíneo O comparados aos não O (FVW:Ag - $320 \pm 104\%$ para o tipo O, e $291 \pm 84\%$ para não O), sugerindo que o grupo ABO não afeta a liberação do FVW (SCOTT et al., 1993).

O'DONNEL & LAFFAN, (2001) e O'DONNEL et al, (2002) sugeriram que a alteração da concentração plasmática do FVW é consequência da influência do grupo sanguíneo ABO na secreção do referido fator pelas células endoteliais, e também no seu catabolismo hepático e no "clearance" plasmático.

A ação de carboidratos influenciando o "clearance" do FVW foi demonstrada em ratos da linhagem RIIS/J. O gene Galgt2 (localizado no cromossomo 11), que é responsável pela síntese da 1,4- N acetil-galactosaminiltransferase, pode apresentar um ganho de

função e agir como um modificador plasmático do FVW (MFVWf), causando a redução de até 20 vezes na concentração plasmática do referido fator (MOHLKE et al., 1998, 1999). Em humanos o antígeno eritrocitário Sda apresenta certa homologia com o produto do gene Galgt2 de ratos da linhagem RIIS/J (SMITH & LOWE, 1994) embora, não exista nenhuma evidência comprovada de alguma relação entre a função de ambos. (MOHLK et al., 1998; 1999).

BOWEN, (2003) descreveu que a enzima metaloprotease ADAMTS 13 é uma das prováveis responsáveis pelo catabolismo do FVW circulante. Segundo o autor os açúcares do grupo ABO presentes no FVW poderiam interferir com a sua proteólise, obedecendo de forma esquemática a seguinte ordem de classificação $O \geq B > A \geq AB$. Permanece ainda sem explicação o motivo pelo qual o FVW dos indivíduos do grupo sanguíneo A é mais protegido contra a proteólise que os do grupo B, enquanto que os do grupo AB são protegidos na mesma intensidade que os do grupo A. O FVW dos indivíduos do grupo O se apresenta como o mais susceptível a proteólise pela enzima ADAMST 13.

A proteólise do FVW pela metaloprotease pode ser aumentada pelo antibiótico ristocetina, favorecendo a hipótese de que uma mudança conformacional entre os domínios A1 e A2 poderia ocasionar alterações no seu sítio de clivagem para a ADAMTS13 (BOWEN, 2003).

O'DONNELL et al. (2003), demonstraram que o FVW proveniente das plaquetas não apresenta expressão dos antígenos ABH e por este motivo a concentração plasmática deste específico fator não estaria relacionada com o genótipo ABO do indivíduo.

1.4 – Doença de Von Willebrand (DVW)

Em 1926, Eric Adof von Willebrand descreveu uma doença hemorrágica que havia observado em vários membros de uma família do Floglo, no arquipélago das ilhas Aland, entre a Finlândia e a Suécia. Nesta família, vários indivíduos morreram de sangramentos incontroláveis (SPRINGER-VERLAG et al., 1996). Os sintomas predominantes desta patologia eram epistaxe, sangramento gengival importante após extração dentária e sangramento do trato genital feminino (VON WILLEBRAND 1931; NILSON et al., 1957). Von Willebrand descreveu a referida doença como uma "pseudohemofilia" hereditária, caracterizada por um defeito combinado vascular e plaquetário, transmitido por herança autossômica.

Atualmente está caracterizado que a origem dos sangramentos na DVW é decorrente de anormalidades na adesão e agregação plaquetária consequência do mal funcionamento ou da redução da concentração plasmática do FVW (ERICK et al., 2003). HOWARD e FIRKIN, em 1971, observaram que o antibiótico ristocetina causava agregação plaquetária no sangue normal, exceto em pacientes com DVW. Essa anormalidade era corrigida *in vivo* ou *in vitro* pelo plasma normal, demonstrando que o FVW é o responsável pela atividade de cofator da ristocetina.

Atualmente a DVW é considerada como a anormalidade hemostática hemorrágica hereditária mais freqüente.

Em um "Estudo Cooperativo Europeu" GOODEVE et al. (2003), estudaram a contribuição do grupo sanguíneo ABO na doença de von Willebrand e constataram uma alta prevalência do grupo O em pacientes com o fenótipo tipo I da referida patologia.

1.5 – Grupos sangüíneos

1.5.1 - Histórico

Os antígenos eritrocitários são estruturas polimórficas que correspondem a proteínas, glicoproteínas ou glicolípides localizados na membrana eritrocitária (WATKINS, 1980, CLAUSEN HAKOMORI, 1989; ORIOL, 1987), podendo ser encontrados também na superfície epitelial e nas células endoteliais (YAMAMOTO et al., 2000).

Estes antígenos são identificados por anticorpos obtidos através de aloimunização por transfusões, gestações, e como consequência da imunização natural de antígenos provenientes do meio ambiente (MARCUS, 1969).

Os antígenos eritrocitários foram agrupados em 26 sistemas, cinco coleções e duas séries, de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sangüínea - ISBT (DANIELS et al., 2001).

O sistema ABO, considerado o maior e mais importante grupo de aloantígenos eritrocitários humanos foi descoberto por LANDSTEINER em 1901 durante testes de aglutinação de hemácias com soros de diferentes indivíduos.

Os sistemas ABO e Hh que englobam os antígenos A, B e H foram os primeiros definidos bioquimicamente, e são caracterizados como estruturas glicídicas ligadas a glicoproteínas ou glicolípides da membrana eritrocitária. A estrutura final destes antígenos depende da ação de enzimas conhecidas como glicosil-transferases, que são codificadas pelo gene H no cromossomo 19, e pelo gene ABO no cromossomo 9 (WESTERVELD et al., 1976; ALLDERDICE et al., 1986). A fucosiltransferase, produto do gene H, é capaz de transferir um resíduo de fucose para N-acetil-glicosamina-galactose formando o antígeno H - L Fuc α 1-2Gal (WATKINS, 1980). A glicosil transferase catalisa a transferência específica de um açúcar sob a forma ativada para o antígeno H, que funciona como um substrato receptor (WATKINS, 1980; HATA et al 2001). Este resíduo adicional transferido pela enzima pode ser a N-acetil

galactosamina ou galactose, originando os grupos sanguíneos A e B, respectivamente. Nos indivíduos do grupo sanguíneo O, o antígeno H não é modificado, sendo identificado na membrana eritrocitária e em células epiteliais (MORGAN, 1960; YAMAMOTO et al., 2000.).

1.5.2 - Gene ABO

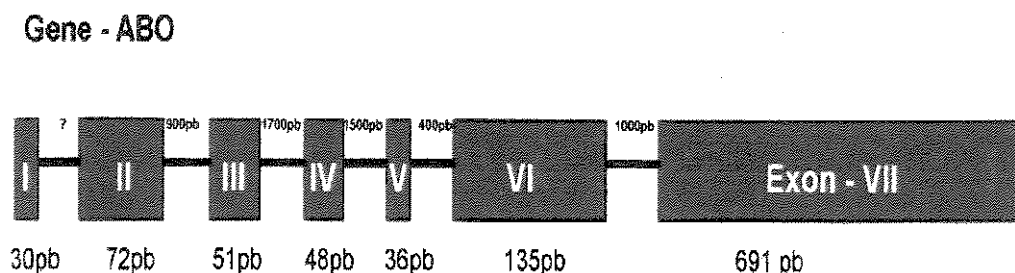
O gene ABO, responsável pela síntese da glicosil transferase, está localizado no braço longo do cromossomo 9-q34.1-q34.2 (ALLDERDICE et al., 1986) e possui uma estrutura molecular bem conhecida composta por sete exons, totalizando 41 kb (BENNETT et al., 1995) (figura 2). As enzimas galactosaminil e galactosil transferase, produtos dos alelos A e B, possuem aproximadamente 352 aminoácidos (YAMAMOTO et al., 1990; BENETT et al., 1995). O domínio catalítico da proteína está localizado na porção N-terminal, sendo que na região inicial existem 21 aminoácidos, que representam o domínio catalítico transmembrana, pelo qual ocorre a fixação na membrana da hemácia (PAULSON et al., 1989; CLAUSEN et al., 1992)

CLAUSEN et al. (1992), no final da década de 1980, purificaram e seqüenciaram a A transferase solúvel, procedente do pulmão de indivíduos do grupo sanguíneo A. Baseado nas informações obtidas do seqüenciamento, YAMAMOTO et al. (1990a), realizaram a clonagem molecular e a caracterização do DNA complementar. Foi então construída uma biblioteca de cDNA em lambda gt 10 com poli A e RNA procedentes de linhagem celular de câncer gástrico humano (MKN 45). Esta linhagem foi escolhida por apresentar alta expressão do antígeno A e elevada atividade da A transferase.

Os alelos A e B possuem 99% de homologia na seqüência de nucleotídeos e diferem apenas por sete bases nos exons seis e sete (A297G, C526G, C657T, G703A, C796A, G803C e G930A) que acarretam somente quatro substituições de aminoácidos nas posições Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met e Gly268Ala (YAMAMOTO e HAKOMORI, 1990). Estas duas enzimas diferem em suas especificidades, pois a NAc

galactosaminiltransferase (gene A) adiciona um resíduo de N-acetil-galactosamina ao antígeno H, enquanto a galactosiltransferase (gene B) adiciona um resíduo de galactose .

Figura 2 – Organização do gene ABO exons e íntrons (BENNETT et al., 1995; OGASAWARA et al., 1996)



Estrutura do gene ABO mostrando os 7 exons representados pelas barras verticais com seus respectivos pares de bases e as linhas sólidas representam os íntrons

1.5.3 - Sub-grupos sanguíneos

Diferentes níveis de expressão de antígenos A ou B nos eritrócitos podem ser encontrados, e são chamados de subgrupos de A ou B, conforme a intensidade de aglutinação das hemácias com os reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti-A₁ e anti-H.

Os grupos sanguíneos com fraca expressão do antígeno A apresentam padrões de reações sorológicas distintos, que traduzem um menor número de sítios antigênicos e reciprocamente um aumento do antígeno H na membrana eritrocitária.

O subgrupo sanguíneo A₂ é o mais freqüente entre indivíduos do grupo A; sua freqüência em caucasóides é de 1,7 a 6,8%, e em orientais é menor que 1%, (YIP, 2002).

Hemácias A₂ reagem com anticorpos anti-A e não são aglutinadas com anti-A1. Os anticorpos anti-A1, obtidos geralmente a partir de lecitinas como a *Dolichos biflorus*, não reconhecem o referido antígeno (BIRDE, 1952; LOPEZ et al., 1980), que apresenta além de diferenças bioquímicas, um menor número de sítios antigênicos distribuídos na membrana eritrocitária (CLAUSEN et al., 1984; 1985; 1986; HEIER et al., 1988, HEIER et al., 1994; YIP, 2002). O gene A₂ resulta da associação da mutação C467T (Pro 156 Leu) com a deleção de um nucleotídeo na região 3' (1060 del C), o que gera desvio de leitura de transcrição, e como consequência, a uma inserção de 21 aminoácidos na proteína e diminuição da atividade enzimática (YAMAMOTO et al., 1992).

O subgrupo A₃ é pouco freqüente e pode ser identificado em 0,001% a 0,01% dos indivíduos do grupo sanguíneo A (REED, 1964; GARRETA et al., 1974). O padrão de aglutinação de hemácias A₃ com soros policlonais anti-A e anti-AB caracteriza-se por pequenos aglutinados circundados por hemácias livres (campo misto). A ocorrência de anticorpo anti-A1 é variável neste fenótipo, e a saliva de secretores contém substâncias A e H. O estudo molecular de indivíduos A₃B demonstrou em dois casos a mutação G871A, resultando na substituição do aminoácido asparagina pelo ácido aspártico na posição 291. Este fato levou YAMAMOTO et al (1993a) a considerarem esta mutação como a responsável pelo referido subgrupo, apesar de não ter sido identificada por outros autores em vários indivíduos A₃. BARJAS-CASTRO et al. (2000), relataram a associação da mutação G829A/Val/277Met com a deleção 1060C em 2 indivíduos A₃, provenientes de famílias distintas.

A freqüência do grupo sanguíneo A_x é estimada em 0,003% dos indivíduos do grupo A (SALMON et al., 1965; GARRETA et al., 1974). Hemácias A_x não aglutinam com soro policlonal anti-A ou podem apresentar uma reação de fraca intensidade com soro anti-AB de doadores O (DANIEL, 1995). A enzima transferase A não é usualmente

detectada no soro ou na membrana eritrocitária do subgrupo A_x (CARTRON, 1976). A mutação T646A leva a substituição do aminoácido Phe216Ile, e reduz a atividade da enzima A transferase, consequentemente produzindo o fenótipo A_x (YAMAMOTO et al., 1993b; OLSSON & CHESTER, 1998; OGASAWARA et al; 2001, YIP, 2002).

SELTMAN et al. (2003), identificaram duas novas mutações no exon 7 de indivíduos com fraca expressão do antígeno A. As mutações C592T e C488T geram as trocas dos aminoácidos Arg198Trp e Thr163Met, respectivamente. (Tabela 1).

Os subgrupos de B são muito raros, provavelmente reflexo da baixa frequência do grupo B na população. GARRETA et al. (1978), descreveram três indivíduos B₃ em 350.000 doadores estudados, o que representa 1 em 10.000 do grupo B. Em chineses a frequência de B₃ é um pouco maior, aproximadamente um a cada 900 indivíduos do grupo B. Este subgrupo se caracteriza por apresentar reação de hemaglutinação com presença de campo misto com soros anti-B e anti-AB (SALMON, 1974).

A literatura mostra raros subgrupos de B como, B_x e B_m que se caracterizam por apresentarem ausência de reação de hemaglutinação com soros anti-AB e anti B porém, a diferenciação entre eles somente pode ser realizada através de testes que identificam os antígenos B e H na saliva (YOSHIDA et al., 1982; OGASAWARA et al, 1996a. BEATTIE et al., 1972). O estudo molecular de indivíduos do subgrupo B³ mostrou a presença das mutações G247T(Asp87Tyr) e C1054T(Arg352Trp) (OGASAWARA et al., 1996a; YU et al., 2002). OGASAWARA et al, (1996a) descreveram as mutações G871A / Asp291Asn em um indivíduo do subgrupo B^x e as substituições T641G / Met214Arg e G669T / Glu223Asp em indivíduos do raro subgrupo B^{el}. Sete mutações foram recentemente relatadas em indivíduos com fraca expressão do antígeno B conforme descritas na tabela 2 (OLSSON et al., 2001; YIP, 2002).

SELTMAN et al. (2003), investigaram toda sequência genômica (exceto o íntron 1) e 2 regiões regulatórias de 110 haplótipos, variantes comuns do gene ABO, com o intuito de identificar variações na região não codificante e polimorfismos na região codificante. Neste estudo foi encontrado em um indivíduo do subgrupo B a mutação A1037T / Lys346Met, que estava localizada na região 3' do gene ABO.

O grupo sanguíneo O se caracteriza pela ausência de atividade das enzimas glicosil transferases e como consequência o antígeno H persiste na membrana eritrocitária e demais células que o expressam. Várias alterações moleculares do gene ABO podem levar ao fenótipo O. A deleção 261G no exon 6, que caracteriza os indivíduos O¹, leva a um desvio de leitura da transcrição e à produção de uma proteína de 117 aminoácidos, desprovida de atividade catalítica, que é rapidamente degradada (YAMAMOTO et al., 1990, OLSSON & CHESTER 2001). Esta mutação ocorre em aproximadamente 95% dos indivíduos O brancos e negros (FRANCO et al., 1994; 1995; OLSSON & CHESTER; 1996b, MIFSUD et al., 1996). Nove mutações foram descritas associadas à deleção 261G caracterizando o grupo O_{1v}: G106T, G188A, C189T, C220T, A297G, T646A, G681A, C771T, G829A (YAMAMOTO et al., 1990a; OLSSON & CHESTER 1996b, OLSSON & CHESTER 2001). Nestes indivíduos, a molécula completa da proteína também não é produzida, pois a deleção causa um “frameshift” com a criação de um códon de terminação prematuro. O alelo O_{1v} foi identificado em 31% dos negros brasileiros do grupo O, e em torno de 40% dos brancos do Brasil e da Suécia (OGASAWARA et al., 1996b,c; OLSSON & CHESTER, 1996b; OLSSON et al., 1998). O alelo O₂ com a ausência da Del 261G representa 3,7% dos indivíduos caucasóides (YIP et al., 2002). Este alelo é resultante de uma mutação pontual do nucleotídeo 802, que leva a uma substituição da glicina pela arginina na posição 268, que é o sítio catalítico da enzima (YAMAMOTO et al., 1993c; GRUNNET et al., 1994;

OLSSON & CHESTER, 1996b., YIP, 2000). As mutações A297G e C526G /Arg176Gly também podem estar presentes em indivíduos O₂ (YAMAMOTO et al., 1993b).

OGASAWARA et al. (2001), descreveram, em indivíduos do grupo O com ausência da deleção 261G, as mutações C893T e C927A que geram respectivamente, a substituição Ala298Val e um códon de finalização prematura na posição 309. OLSSON & CHESTER. (1996), descreveram em um doador do grupo sanguíneo O a associação das alterações moleculares relatadas previamente no A₂ (C467T e deleção 1060C) com a inserção de múltiplas guaninas na porção 798-804, descrita em A_{el}. As mutações descritas no grupo sanguíneo O estão demonstradas na tabela 3.

A literatura demonstra claramente a interferência do grupo sanguíneo ABO na concentração plasmática do FVW, e alguns autores sugerem que o referido fator influencie a atividade coagulante do FVIII. Entretanto, a análise funcional do FVW:Ag não foi analisada até o momento e tão pouco correlacionada com os diversos subgrupos do gene ABO. Importante enfatizar a relevância de estudos nesta área que permitirão a melhor compreensão dos fatores que interferem na concentração plasmática do FVW:Ag e FVIII:C e conseqüentemente na definição de critérios para o diagnóstico da DVW .

Tabela 1- Principais mutações nos exons 6 e 7 do alelo A no gene ABO

FENÓTIPO	MUTAÇÕES	SUBSTITUIÇÕES	REF.
A ₂₋₁	C467T, C654T*	Pro156Leu	YAMAMOTO et al., 1993c
A ₂₋₂	A297G*, C526G, C657T*, G703A*, C771T*, G829A	Arg176Gly, Val277Met	YAMAMOTO et al., 1993
A ₂₋₃	C1054T, C1054G	Arg352Trp, Arg352Gly	YAMAMOTO et al., 1992
A ₃₋₁	G871A	Asp291Asn	YAMAMOTO et al., 1993
A ₃₋₂	G829A, Del1060C*	Val277Met	BARJAS-CASTRO et al., 2000
A _{X-1}	T646A	Phe216Ile	YAMAMOTO et al., 1993
A _{X-2}	T646A, G681A*, C771T*, G829A	Phe216Ile, Val277Met	OLSSON&CHESTER 1998
A _{X-3}	A297G*, T646A, G681A*, C771T*, G829A	Phe216Ile, Val277Met	BENNETT et al., 1995
A _{X-6}	G996A	Trp332Stop	OLSSON et al., 2001
A _{el-1}	ins798-804G	Phe269frameshift	OGASAWARA et al., 1996
A _{el-2}	C467T, T646A, G681A*	Pro156Leu, Phe216Ile	OGASAWARA et al., 1996
A _{w-1}	C407T, C467T, Del1060C*	Thr136Met, Pro156Leu	OLSSON et al., 2001
A _{w-2}	C350G, C467T, Del1060C*	Gly177Ala, Pro156Leu	OLSSON et al., 2001
A _{w-3}	G203C, C467T, Del1060C*	Arg68Thr, Pro156Leu	OLSSON et al., 2001

<i>A_{w-4}</i>	C712T	Arg241Trp	OLSSON et al., 2001
<i>A_{w-5}</i>	A965G	Glu322Gly	OLSSON et al., 2001
<i>A_{w-07}</i>	C592T	Arg198Trp	SELTMAN et al., 2003
<i>A_{w-08}</i>	C488T	Thr163Met	SELTMAN et al., 2003

Obs.: *: polimorfismo gênico que não acarreta substituição de aminoácidos

Del: deleção

Tabela 2 – Principais mutações nos exons seis e sete do alelo B no gene ABO em relação ao alelo A

FENÓTIPO	MUTACÃO	SUBSTITUIÇÕES	REF.
B₁	A297G*, C526G, C657T*, G703A, C796A, G803C, G930A*	Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala	YAMAMOTO et al., 1990
B₃₋₁	A297G*, C526G, C657T*, G703A, C796A, G803C, G930A*, C1054T	Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala, Arg352Trp	OGASAWARA et al., 1996
B₃₋₂	A297G*, C526G, T646A, G703A, C769A, G803C, G930A*	Arg176Gly, Phe216Ile, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala	OGASAWARA et al., 2001
B₃₋₃	G247T	Asp87Tyr	YU et al., 2002
B_{x-1}	A297G*, C526G, C657T*, G703A, C796A, G803C, G871A, G930A*	Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala, Asp291Asn	OGASAWARA et al., 1996
B_{el-1}	A297G*, C562G, T641G, C657T*, G703A, C796A, G803C, G930A*	Arg176Gly, Met214Arg, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala	OGASAWARA et al., 1996
B_{el-2}	A297G*, C526G, C657T, G669T, G703A, C796A, G803C, G930A*	Arg176Gly, Glu223Asp, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala	OGASAWARA et al., 1996
B_{el-3}	C502T	Arg168Trp	LIN et al., 2003
B_{w-2}	C873G	Asp291Glu	OLSSON et al., 2001
B_{w-3}	C721T	Arg241Trp	OLSSON et al., 2001
B_{w-4}	A548G	Asp183Gly	OLSSON et al., 2001
B_{w-5}	G539A	Arg180His	OLSSON et al., 2001
B_{w-6}	A1039G	Lys246Glu	OLSSON et al., 2001
B_{w-7}	G1055A	Arg352Gln	OLSSON et al., 2001
B_{w-8}	T863G	Met288Arg	OLSSON et al., 2001

Obs.: *: Ausência de polimorfismo gênico que não acarreta substituição de aminoácidos

Tabela 3 – Principais mutações nos exons 6 e 7 do alelo O no gene ABO em relação ao alelo A

FENÓTIPO	MUTAÇÕES	SUBSTITUIÇÕES	REF.
O ₁	Del 261G*		YAMAMOTO et al., 1990a
O ₂	G53T, C220T, A297G*, C526G, G802A	Agr18Leu, Pro74Ser, Arg176Gly, Gly268Arg	YAMAMOTO et al., 1993b
O ₃	C467T, Ins800G*, Del1060C*	Pro156Leu	OLSSON&CHESTER et al., 1996c
O _{1v}	G106T, G188A, C189T, C220T, Del261G*, A297G*, T646A, G681A*, C771T, G829A	Val36Phe, Arg63His, Pro74Ser, Phe216Ile, Val277Met	YAMAMOTO et al., 1990a
O _{v2}	Del261G*, C318T*, C467T	Pro156Leu	OGASAWARA et al., 1996,1998
O _{v3}	Del261G*, C657T*		YIP 2000
O _{v4}	Del261G*, T579C*		OGASAWARA et al., 1996, 1998
O _{var}	Del261G*, C318T*, C467T, C729T*	Pro156Leu	YIP 2000

Obs.: *: polimorfismo gênico que não acarreta substituição de aminoácidos

Del: deleção

2. OBJETIVOS

Gerais

Tendo em consideração que:

- poucos estudos relacionam os diferentes grupos sanguíneos com as concentrações plasmáticas do FVW e FVIII;
- subgrupos sanguíneos de A e B e polimorfismos do grupo O não foram até o presente correlacionados com as dosagens dos referidos fatores;
- a literatura não apresenta resultados da avaliação do cofator da ristocetina nos diferentes polimorfismos do gene ABO, incluindo grupos e subgrupos

Específicos

Correlacionar os diferentes polimorfismos do gene ABO com a concentração plasmática do FVW, FVIII e cofator da ristocetina

3.CASUÍSTICA MÉTODOS

3.1 – Casuística

Foram estudados 220 indivíduos, doadores de sangue ou funcionários do Hemocentro/UNICAMP, no período de julho de 2001 a setembro de 2002.

Critérios de inclusão e exclusão dos participantes:

- * Inclusão: indivíduos saudáveis, do sexo masculino, doadores de sangue e voluntários não doadores.

- * Exclusão: sexo feminino, portadores de qualquer tipo de patologia, uso regular de medicamento e exposição a situações de estresse. O sexo feminino foi excluído devido a influência hormonal, responsável pelas variações nas dosagens do FVIII e FVW.

Os colaboradores foram convidados a participar do projeto de pesquisa e responderam a um questionário (anexo 1) com os critérios de inclusão e exclusão.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP e todos os participantes assinaram voluntariamente o termo de consentimento pós informação (anexo 2).

3.2 - Coleta de sangue

Para a realização das dosagens de FVIII, FVW e cofator de ristocetina foram coletados 8 mL de sangue de veia periférica com anticoagulante citrato de sódio 3,8% (0,5 mL). Logo após a coleta o sangue foi centrifugado a 4000 rpm e o plasma foi aliqotado e congelado a -80°C até a realização dos exames. Para a obtenção do DNA genômico e avaliação imunohematológica foram coletados 8 mL de sangue com anticoagulante EDTA 10% (sal dissódico de ácido etilenodinitrotetracético).

3.3- Avaliação Imunohematológica

3.3.1 - Determinação sorológica dos grupos sanguíneos

Os 220 indivíduos estudados foram submetidos a determinação do grupo sanguíneo ABO e RH pelas técnicas de gel centrifugação (LAPIERRE et al., 1990) (*Cartão ABD - DiaMed, Lagoa Santa, MG, Brasil*), tubo (Manual AABB, 2003), e placa opalina (ROUGER e SALMON, 1981). Foram realizadas provas eritrocitárias com soros anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D (*Biotest S/A, São Paulo, Brasil*), e provas séricas com hemácias A₁ e B (*Biotest S/A, São Paulo, Brasil*). As amostras foram analisadas também com lecitinas anti-A₁ - *Dolichos biflorus*, e anti-H - *Ulex europeus* (*Asem Diagnostics, Itapicirica da serra, São Paulo, Brasil*).

3.3.2 – Determinação sorológica dos subgrupos sanguíneos

Foram realizadas provas eritrocitárias com hemácias A₁ e B (*Biotest S/A, São Paulo, Brasil*), e séricas pelas técnicas de hemaglutinação em tubo (Manual AABB, 2003) placa opalina (ROUGER e SALMON, 1981) e gel centrifugação (LAPIERRE et al., 1990). Os antisoros anti-A, anti-B e anti-AB, policlonais e monoclonais de três diferentes procedências foram utilizados de acordo com os critérios dos fabricantes (*Asem Diagnostics, Itapicirica da Serra, São Paulo, Brasil; Biotest S/A, São Paulo, Brasil*). As amostras foram analisadas também com lecitinas anti-A₁ - *Dolichos biflorus*, e anti-H - *Ulex europeus* (*Asem Diagnostics, Itapicirica da Serra, São Paulo, Brasil*). Estes subgrupos foram submetidos a determinação de grupo sanguíneo com os diferentes soros e métodos (tubo, gel e placa opalina), e por dois técnicos diferentes que não conheciam o doador (estudo cego). A presença de antígenos A, B e H na saliva foram investigados nos subgrupos A₃, A_x e B_{fracos}, em todos doadores em que foi possível a obtenção do material (MANUAL AABB, 1999).

3.4 - Métodos Moleculares

3.4.1- Extração do DNA genômico

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 4 mL de sangue venoso coletado em EDTA 10%. O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos. Para lise de hemácias foi adicionado cloreto de amônia (NH_4HCO_3) na proporção de 5 vezes o volume de células, e bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3 0,01M) na proporção de 0,5 vezes o volume. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e seguida de centrifugação por 15 minutos / 2.500 rpm / 4°C. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado de leucócitos livre de hemácias. Os leucócitos foram dissolvidos em 10 mL de tampão contendo NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, tris/HCL pH 7,5 10 mM, uréia 7 M, dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) e incubados a 37°C por aproximadamente 16h. Após a incubação foram realizadas três extrações com iguais volumes de mistura contendo fenol (redesilado e saturado em Tris/HCL pH 8,0 - 0,2 mM com 0,1% de hidroxiquinolína) clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 2.500 rpm durante 20 minutos. No final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um novo tubo e realizada nova extração apenas com clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. A precipitação do DNA foi feita com etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e acetato de sódio 3 M pH 5,3 (10%). O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70% para eliminar resíduo de fenol, e posteriormente diluído em água estéril ou em TE (Tris pH 8,0 10 mM; EDTA 0,1 mM pH 7,4) (SAMBROOCK et al., 1989).

A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria pela leitura das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, em luz ultravioleta.

3.4.2 - Amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão com enzimas de restrição

Os exons 6 e 7 do gene ABO de todos os indivíduos participantes, de diferentes grupos sanguíneos e subgrupos foram amplificados para posterior análise, pela técnica de PCR (SAIKI et al., 1985). Este método baseia-se na utilização de iniciadores que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido a complementaridade da sequência. Os repetitivos ciclos de desnaturação térmica anelamento e extensão dos iniciadores, promovida pela enzima taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase levam a um acúmulo exponencial do fragmento. As reações foram realizadas num volume final de 50 µl contendo DNA genômico 500 ng; Tris-HCL pH 8,5/10 mM; KCL 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM, deoxinucleotideo trifostato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 10 mM de cada; iniciadores 0,25µM e taq DNA polimerase 1U . Foram utilizados 3 pares de iniciadores visando a amplificação de fragmentos de 220, 279 e 744 pb, sendo os dois últimos para garantir a amplificação do exon 7 (tabela 4). As amostras foram desnaturadas inicialmente por 7 minutos à 94°C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação à 94°C / 1minuto , anelamento 58 a 64°C / 1 minuto e 40 segundos e extensão 72°C / 7 minutos. A reação foi realizada em ciclador automático de temperatura (Perkin Elmer- cetus corp, Boston, MA; PTC100-MJ Research Inc, Watertown Mass, USA).

O material amplificado foi separado em gel de agarose a 2 e 3% e então visualizado sob luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio.

O exon 6 do gene ABO dos indivíduos estudados foi amplificado com os iniciadores P1 (s/as) e submetido a digestão pelas enzimas de restrição *Kpn I* e *BstE II* (YAMAMOTO et al., 1990b; 1995), com o objetivo de definir a presença da deleção 261G (YAMAMOTO et al., 1990).

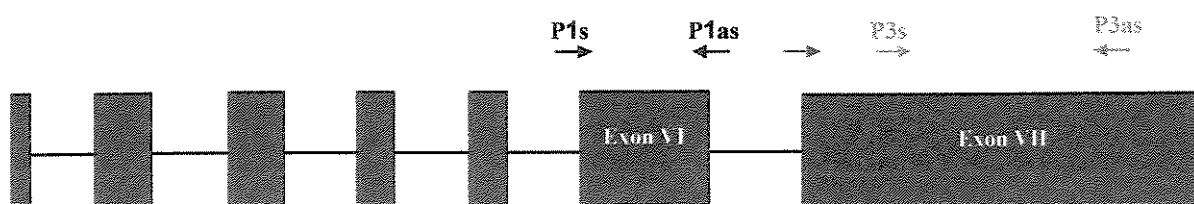
A análise dos polimorfismos descritos no exon 7 foi realizada através da amplificação das regiões comprometidas e, posterior digestão com enzimas de restrição,

específicas (tabela 5). Nos doadores dos subgrupos de A foram realizadas as seguintes investigações.

- Indivíduos do subgrupo sanguíneo A₂: investigada a mutação C467T (YAMAMOTO et al., 1992) com os iniciadores P2sP3as e posteriormente realizada digestão com as enzimas de restrição *Alu I* e *Msp I* (YAMAMOTO et al., 1992; Olsson et al., 1995).
- Indivíduos do subgrupo sanguíneo A₃: investigada a mutação G871A. O fragmento foi amplificado com os iniciadores P3 (s/as) e submetido a digestão com a enzima *Sal I* (YAMAMOTO et al., 1993a).
- Indivíduos do subgrupo sanguíneo A_x: investigada a mutação T646A após amplificação com os iniciadores P2sP3as e posterior digestão do fragmento com a enzima *Mbo I* (YAMAMOTO et al., 1993).
- Indivíduos do grupo sanguíneo O e heterozigotos para o alelo O: investigada a Del 261G e a mutação C771T (Yamamoto et al. 1990 a. b) após a amplificação com os iniciadores P1 (s/as) e P2sP3as e posterior digestão do fragmento com as enzimas *Kpn I*, *BstE II* e *Dde I* (OLSSON & CHESTER, 1996b).
- Os DNAs dos indivíduos pertencentes aos subgrupos de B e do grupo O com ausência da Del 261G foram submetidos a clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7 para investigação de mutações ainda não descritas na literatura.

As reações de digestão dos produtos de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: PCR 10 µL; tampão (específico de cada enzima) 1,5 µL, e enzima 0,8 µL, para um volume final de 15 µL (incubação por 12h a 37°C). Os sítios de digestão de cada enzima estão representados na tabela 5.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados para estudo dos exons 6 e 7 do gene ABO



Exon	Iniciadores	Produtos do PCR
Exon-6	P1s - 5' TGCCAGCTCCATGTGACCGCAC 3'	220pb
	P1as - 5' TCGCCACTGCCTGGGTCTCTAC 3'	
Exon-7	P2s - 5' CCGTCCGCCTGCCTTGCAG 3'	744pb
	P3as - 5' TGCCGGCAGCCCTCCCAGAG 3'	
Exon-7	P3s - 5' TGCAAGAGGTGCAGCGGCTC 3'	279pb
	P3as - 5' TGCCGGCAGCCCTCCCAGAG 3'	

Tabela 5 - Enzimas de restrição utilizadas no estudo dos polimorfismos dos exons 6 e 7 do gene ABO

Enzimas	Sítios de restrição 5' ^ 3'	Exons	Substituições / Deleções
<i>Kpn I</i>	5' GGTAC↓C 3'	6	Del G261
<i>BstE II</i>	5' G↓GTNACC 3'	6	Del G261
<i>Msp I</i>	5' C↓CGG 3'	7	C467T
<i>Alu I</i>	5' AG↓CT 3'	7	C467T
<i>MboI</i>	5' ↓GATC 3'	7	T646A
<i>Msp I</i>	5' C↓CGG 3'	7	G703A
<i>Dde I</i>	5' C↓TNAG 3'	7	C771T
<i>Sal I</i>	5' G↓TCGAC 3'	7	G871A

Os DNAs dos doadores que apresentaram resultados na triagem molecular (PCR e digestão) discrepantes do resultado sorológico foram submetidos a clonagem e sequenciamento.

3.4.3– Clonagem

Realizado clonagem dos exons 6 e 7 dos indivíduos pertencentes aos subgrupos de B e ao grupo O com ausência da deleção 261G. A ligação do plasmídeo pGEM – Teasy vetor (*Promega, Madison, WI, USA*) com o DNA foi realizada utilizando-se a enzima T4 ligase. O produto desta reação foi utilizado na transformação de bactérias competentes *E.coli*, através do choque térmico.

Reação de ligação e transformação: Tubos de eppendorfs com PCR (2 µl), “buffer” (5 µl) enzima T4 ligase (1 µl), plasmídeo (vetor) (1 µl) e água destilada (1 µl) foram homogeneizados e mantidos a temperatura ambiente por 1 h. Células competentes DH5α (Kit *Promega*) foram descongeladas à temperatura ambiente, porém mantidas

em um recipiente com gelo e adicionado 5 µl do produto de ligação. A reação foi mantida no gelo por 20 minutos, incubada a 42°C / 1 minuto e 30 segundos e posteriormente transferida para o gelo por 2 minutos. À amostra foi adicionado 800 µl de SOC (meio de cultura) e em seguida incubada a 37°C / 220 rpm por 1h. Centrifugado por 1 minuto a 800 rpm (12°C), descartado 600 µl do sobrenadante e o pellet foi ressuspensão no volume final. Aplicado 200 µl da amostra em placa com o meio de cultura Luria-Betani (LB) contendo ampicilina, 5-bromo cloro-3-indol-B-D-galactopirionidase (XGAL) e isopropil-B-D- tiogalactopiranoside (IPTG). Estas duas substâncias foram utilizadas para propiciar a identificação através de α complementação entre as colônias de bactérias contendo o plasmídio recombinante (colônias brancas) e as colônias contendo apenas o plasmídio recircularizado sem o DNA (colônias azuis) (SAMBROOK et al., 1989). Após a aplicação da amostra, a placa foi levada para a estufa por 16 h a 37°C, e verificado se houve crescimento de colônias. Somente as colônias brancas foram pescadas e colocadas na placa de cultura contendo LB circle grow (meio líquido contendo ampicilina) 120 µl. Cada colônia pescada foi colocada em um poço diferente da placa de cultura, esta foi submetida a 1300 rpm por 16 h a 37°C. Realizado posteriormente PCR da clonagem utilizando plasmídio (2 µl), "buffer" (1,5µl), dntp (1,5 µl), MgCl₂ (0,5 µl), iniciadores do plasmídio sense e antisense (0,35 µl), taq (0,2 µl) e água destilada (8,6µl). As amostras foram desnaturadas por 2 minutos a 95°C, e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação de 20 segundos a 95°C, anelamento de 15 segundos a 58°C, e extensão a 72°C por 40 segundos. As reações foram realizadas em cicladores automáticos de temperatura (*PTC-MJ Research, inc., Watertown MASS, USA*). O produto do PCR foi observado em gel de agarose a 1,5%, e posteriormente foi realizado sequenciamento do fragmento.

3.4.4 - Sequenciamento Automatizado

3.4.4.1 - Purificação do produto de PCR

Reação de purificação do PCR: acetato de amônio a 7,5 M (2 μ L) e etanol absoluto (50 μ L) foram adicionados ao produto do PCR (10 μ L), com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, e protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir foi adicionado etanol 70% (100 μ L) e o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão, tomando-se o cuidado de não remover o "pellet". Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida a centrifugação invertida a 200 rpm por 7 segundos e aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem dos poços. Nas situações em que o sequenciamento não foi realizado imediatamente, o produto foi então armazenado em freezer a -20°C antes da ressuspensão.

3.4.4.2 – Reação para o sequenciamento

A reação de amplificação para o sequenciamento automático foi realizada com o BigDyeTerminator Cycle Sequencing Ready Reacton Kit® (*Percin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA*). Para esta reação foi utilizado produto de PCR purificado 10 ng, iniciadores sense e anti-sense 1,6 pmol, solução Terminator Ready Reaction Mix do BigDye® 1,5 μ L e água destilada estéril (volume final 10 μ L). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial (96°C por 1 minuto) e 25 ciclos com desnaturação a 96°C/10 segundos; anelamento a 57°C/5 segundos, e finalmente a extensão a 60°C/4 minutos. A reação de PCR foi realizada em termociclador automático (*GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems*). Para a realização da eletroforese foi adicionado em cada poço "loading buffer" 2 μ L, (*Invitrogen Corporation, Grand Island, USA*) e EDTA 25 mM/pH 8,0 com blue dextran (50 mg/ml) na proporção de 5:1. As amostras

foram homogeneizadas e posteriormente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e em seguida colocadas no gelo para serem aplicadas em gel de poliacrilamida 2mm de espessura, e separados por eletroforese no sequenciador automático (*ABI Prism 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA*). O gel foi composto por uréia 36gr, resina Dowex e tampão TBE 10 mL (108 gr de Tris, 55 gr de ácido bórico e 8,3 gr de EDTA dissódico, volume total 1000 mL). Na placa de sequenciamento foi colocado 20mL da solução de gel com persulfato de amonio 130 µL e TEMED 13 µL . Após 2 horas de polimerização do gel, a placa foi limpa e colocada no aparelho para a realização da eletroforese sob as seguintes condições: Voltagem – 1680 KW; corrente – 50.0 mA; potência – 150 watts; temperatura do gel – 50°C; potência do laser – 40.0mW; tempo de corrida – cerca de 3 horas .

3.5 - Análise quantitativa do FVW - Determinação do antígeno do fator de von willebrand (FVW:Ag)

A determinação antigênica do FVW :Ag foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA / Enzyme-linked immunoadsorbant assay) (ZALESKI et al., 1986), que tem como princípio à reação de um anticorpo específico capturante com o antígeno do FVW, e de um segundo anticorpo anti-FVW ligado à enzima peroxidase. Quando ocorre a formação do complexo imunoenzimático ligado à peroxidase na presença de um substrato específico, há o aparecimento de cor diretamente proporcional á concentração do antígeno.

3.5.1 - Procedimento da determinação do FVW:Ag

Uma microplaca de poliestireno, com 96 orifícios (NUNC Maxisorb F96 CERT) com fundo em "U" foi sensibilizada com anticorpo capturante de coelho anti-von Willebrand humano (Dako 0082 – Dinamarca). O anticorpo previamente diluído em tampão de revestimento (pH 7,4 - tris, NaCl e albumina bovina), 125 µl, foi incubado na microplaca por 24 horas a 4°C. Após sensibilização, a placa foi lavada quatro vezes com 250 µl de tampão de lavagem (pH 7,4 - tris, NaCl, tween 20), e saturada com 170 µl de tampão (pH 7,4 - Tris-NaCl albumina 5%) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. A seguir, a placa foi novamente lavada quatro vezes com 250 µl de tampão de lavagem, para a retirada do excesso de albumina. Para a realização da curva de calibração foi utilizado um "pool" de plasmas de indivíduos normais diluídos (tampão de diluição pH 7,4: tris, NaCl, albumina bovina, tween 20) 1:50 (100%), 1:100 (50%), 1:200 (26%), 1:400 (12,5%), 1:800 (6,25%), 1:1600 (3,125%). As amostras testes foram previamente diluídas com tampão, de acordo com os resultados da atividade do fator VIII:C. Nos doadores com atividade do fator VIII:C menor que 60% as diluições foram 1:50 e 1:100; nos doadores com atividade entre 60 e 150%, as diluições foram 1:100 e 1:200 e nos que possuíam atividade do fator VIII:C maior que 150% foram realizadas diluições 1:200 e 1:400. Os critérios de diluição foram adotados com o objetivo de obter maior sensibilidade da curva de calibração, entre os pontos 50 e 6,25 (MANNUCCI et al., 1999). Tanto a curva de calibração, quanto às amostras teste diluídas, foram aplicadas em duplicata num volume de 100 µl sob agitação por 3 horas, à temperatura ambiente.

A seguir a placa foi novamente lavada por 4 vezes com tampão de lavagem e então adicionado 100 µl de anticorpo de coelho anti-von Willebrando humano conjugado com peroxidase (Dako p226 – Dinamarca), diluído em tampão Tris – NaCl - albumina - Tween 20, pH 7,4, na concentração final de 5 µg/mL. Após agitação por 60 minutos, à

temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada com o tampão de lavagem e adicionado em cada orifício 100 µl de substrato específico orto-fenileno diamino (Sigma – USA) previamente dissolvido em tampão com citrato de sódio e fosfato de sódio (pH 5) 12,5 mL e peróxido de hidrogênio 30% (5 µl) . Para a detecção de cor, a incubação transcorreu por 10 minutos, sendo posteriormente bloqueada a reação com a adição de ácido sulfúrico 3 M. A densidade ótica foi detectada com filtro de 492 nanômetros e os resultados foram obtidos a partir da curva de calibração, que foi traçada em papel di-log (atividade versus densidade óptica).

Os resultados da concentração plasmática do antígeno do FVW foram expressos em porcentagens obtidas de uma curva de calibração realizada com amostras de 101 indivíduos normais, sendo o valor de normalidade estabelecido pelo Laboratório de Hemostasia do Hemocentro Unicamp de 60% a 160%.

3.5.1.1 - Fatores que podem interferir na reação

- Os reagentes e amostras devem estar estabilizados a temperatura ambiente antes do início dos testes. Devem ser agitados suavemente sem fazer espuma e deverão retornar á refrigeração imediatamente após o uso.
- As diluições do plasma de referência e demais reagentes devem ser feitas imediatamente antes do uso
- As lavagens das placas devem ser executadas automaticamente. A realização manual requer cuidados para evitar a contaminação dos micropoços adjacentes.
- A temperatura de incubação da placa deve estar entre 15 e 30°C.

3.6 – Análise funcional do FVIII (atividade pró-coagulante FVIII:C)

A análise funcional do FVIII foi realizada empregando o método coagulométrico de um estágio, utilizando-se plasma deficiente em fator VIII (*Diagnostica Stago, Asnieres-sur-seine, France*), (ZACHARSKI et al., 1978) reagentes para realização do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e coagulômetro de leitura foto-óptica (*Koagulab 32-S; Diagnostica Stago, Asnieres-sur-seisse, France*). Foram realizadas diluições seriadas a partir de 1:10 (100%) até 1:80 (1.56%) de um calibrador comercial de referência conhecida em tampão veronal. As dosagens das amostras controles comerciais e das amostras dos doadores foram realizadas somente após a curva padrão com o calibrador ser reprodutível. Antes da avaliação das amostras 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. As diluições das amostras foram realizadas em tampão veronal 1:10 (100%) e os valores expressos em porcentagensc (*Diagnostica Stago, Asnieres-sur-seine, France*).

3.7 – Análise funcional (atividade biológica) do FVW - Determinação do cofator de ristocetina (FVW:RCo)

A ristocetina é um antibiótico que promove a interação entre o FVW e o complexo GPIb/IX/V. O teste da atividade do cofator da ristocetina reflete a atividade funcional do FVW, na presença de plaquetas humanas normais liofilizadas (ZIMMERMAN, 1982). Plaquetas em número padronizado de 350.000/mm³ foram adicionadas a várias diluições de plasma teste e ao plasma de referência e, posteriormente a ristocetina foi acrescentada com o objetivo de promover a aglutinação plaquetária. A aglutinação foi detectada utilizando-se agregômetro óptico (PACK – S4 – *Helena Laboratories*) e a determinação do cofator de ristocetina foi realizada de acordo com as especificações do fabricante (*Helena Ristocetin Cofactor Assay Kit, Helena Laboratories, Beaumont,*

Texas) . A referência de normalidade foi de 58 a 160% definida de acordo com os critérios do fabricante.

3.8 – Metodologia estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o método não paramétrico de Wilcoxon (ARMITAGE et al., 1994). Este método consiste na análise da mediana com os valores máximos e mínimos, sendo que os resultados são demonstrados na forma de "box and-whisker-plot". A forma básica destes "box plots" mostra uma caixa definida pelos valores altos e baixos representados pelos quartis superior e inferior, sendo que o valor da mediana corresponde ao traço que subdivide a caixa. Os "whiskers" se estendem para os dois lados verticais da caixa mostrando os valores máximo e mínimo. O "box-and whisker-plots" facilita a visualização e comparação dos resultados obtidos entre os grupos e subgrupos sanguíneos.

3.8.1 - Correlação entre FVW, FVIII e cofator de ristocetina

Para a análise dos referidos fatores foi utilizado o método de correlação de Spearman. Este teste está indicado no estudo de variantes não lineares, onde se obtém uma reta, através da qual é analisado a correlação entre os fatores estudados (CANN, 2003).

4. RESULTADOS

A idade média dos 220 participantes do projeto foi 32 anos, com idade mínima de 18 e máxima de 60 anos.

4.1 – Avaliação imunohematológica sorológica

A determinação dos grupos e subgrupos sangüíneos dos 220 participantes foi: 48 indivíduos do grupo sangüíneo A, 46 B, 11 AB, 63 O, 20 A₂, 20 A₂B, 1 A₃, 3 A₃B, 4A_x, 2A_xB e 2 subgrupos de B (1B_m e 1B₃). Somente um indivíduo do subgrupo de B foi possível realizar testes com saliva e confirmar o subgrupo B_m. O outro subgrupo de B foi classificado como B₃, entretanto os testes da saliva não foram feitos por falta de material.

4.2 – Estudo molecular dos grupos e subgrupos sangüíneos

A avaliação molecular dos indivíduos definidos sorologicamente como grupo sangüíneo A mostrou que 38 eram heterozigotos (AO¹) portadores do alelo O com a deleção 261G e 10 homozigotos (AA). Os indivíduos classificados como do grupo B, 36 eram heterozigotos (BO¹) também portadores do alelo O com a deleção 261G e 10 homozigotos (BB).

Dos 63 indivíduos do grupo sangüíneo O estudados 59 apresentaram homozigose para a deleção 261G (O¹O¹). Vinte indivíduos deste grupo aleatoriamente escolhidos, os quais possuíam a Del 261G, foram investigados também a presença da mutação C771T descrita no O_{1V}, (YAMAMOTO et al., 1990a; Olsson e Chester 1996b) e foram encontrados 10 O¹O¹, 10 O¹O^{1V}. Quatro doadores do grupo O apresentaram heterozigose para a Del 261G e foram submetidos a clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7. Os quatro doadores O¹O² apresentaram as mesmas mutações no exon 6, no alelo O₁ a deleção 261G e a mutação G297A e no outro alelo foi identificado a substituição 220T(Pro74Ser). Dois doadores possuíam no exon 7 as mutações C467T(Phe216Ile) e C771T em homozigose e a mutação T646A (Phe216Iso) em

heterozigose. O terceiro doador apresentou as mesmas mutações descritas nos dois doadores, sendo T646A e C771T em homozigose associada com a G829A também em homozigose. O quarto doador apresentou no exon 7 as mutações C467T, T646A e C729T em homozigose (tabela 6). O PCR seguido da clonagem e sequenciamento foram repetidos por 3 vezes para a confirmação de todas as mutações.

Vinte indivíduos do grupo A₂O e 20 A₂B apresentaram a mutação C467T/Pro156Leu e a Del 261G em heterozigose (YAMAMOTO et al., 1992).

Um indivíduo tipado sorologicamente como A₃ e três como A₃B, apresentaram apenas a mutação C467T em heterozigose, tendo portanto um resultado molecular compatível com A² diferente do sorológico esperado.

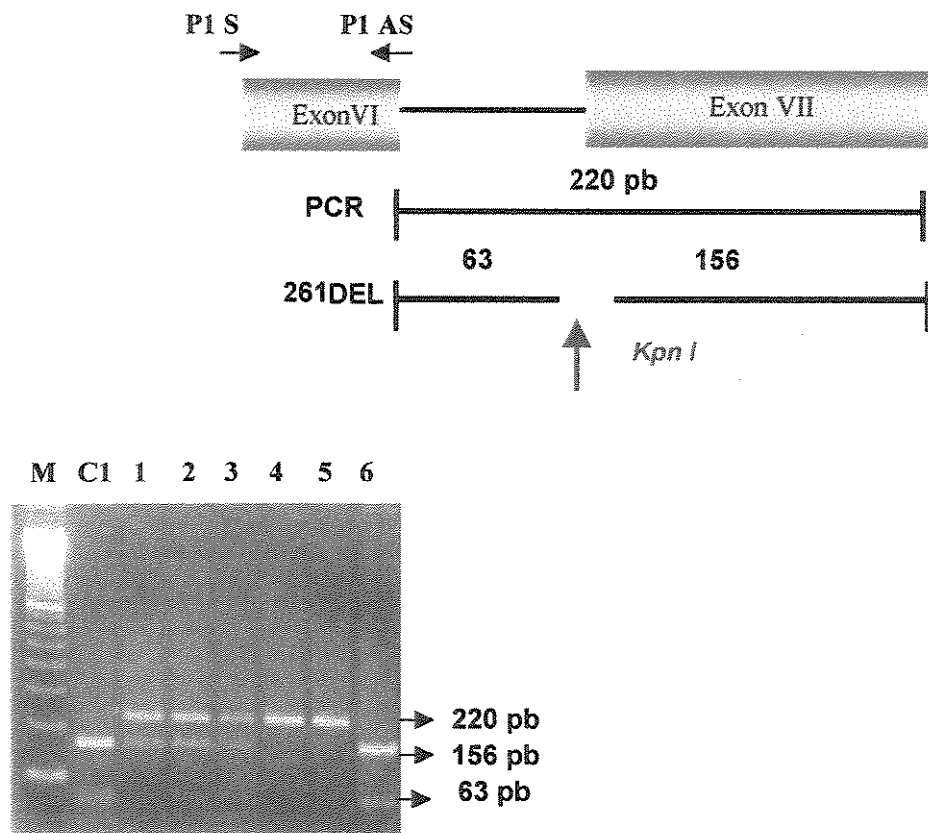
Quatro indivíduos A₃ foram sequenciados previamente no Hemocentro Unicamp e verificou-se que todos possuíam a Del 261G no alelo O e a mutação C467T associada a Del 1060C no alelo A. Dois indivíduos A³ apresentaram a mutação G829A sendo um deles em homozigose (BARJAS-CASTRO et al., 2000). Estes indivíduos A₃ foram incluídos no projeto para dosagem de FVW, FVIII e cofator de ristocetina.

Dos quatro indivíduos tipados sorologicamente como A_x, somente dois casos foram confirmados molecularmente como portadores da mutação T646A que resulta na substituição do aminoácido Phe216-Ile (YAMAMOTO et al., 1999b; OLSSON e CHESTER, 1998), sendo os dois heterozigotos para a referida mutação e para a Del 261G. Os outros dois indivíduos apresentaram heterozigose para as mutações C467T e a Del 261G sendo portanto classificados molecularmente como A².

Os 2 indivíduos sorologicamente descritos como A_xB apresentaram a mutação C467T em heterozigose, tendo portanto também um resultado molecular diferente do sorológico.

Dois doadores do subgrupo de B, foram submetidos a clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7. No exon 6 foram identificadas a deleção 261G e a substituição A297G no alelo O de ambos doadores. No exon 7 os mesmos apresentaram as mutações T646A e G829A em homozigose. O doador classificado como B^mO apresentou também as seguintes mutações: C467T, C771T e G861A em homozigose; C657T e G803C presentes no alelo B. As substituições encontradas no B³O foram: C467T e C771T em homozigose; C526G, C657T, G861A e G803C apenas no alelo B (tabela 7).

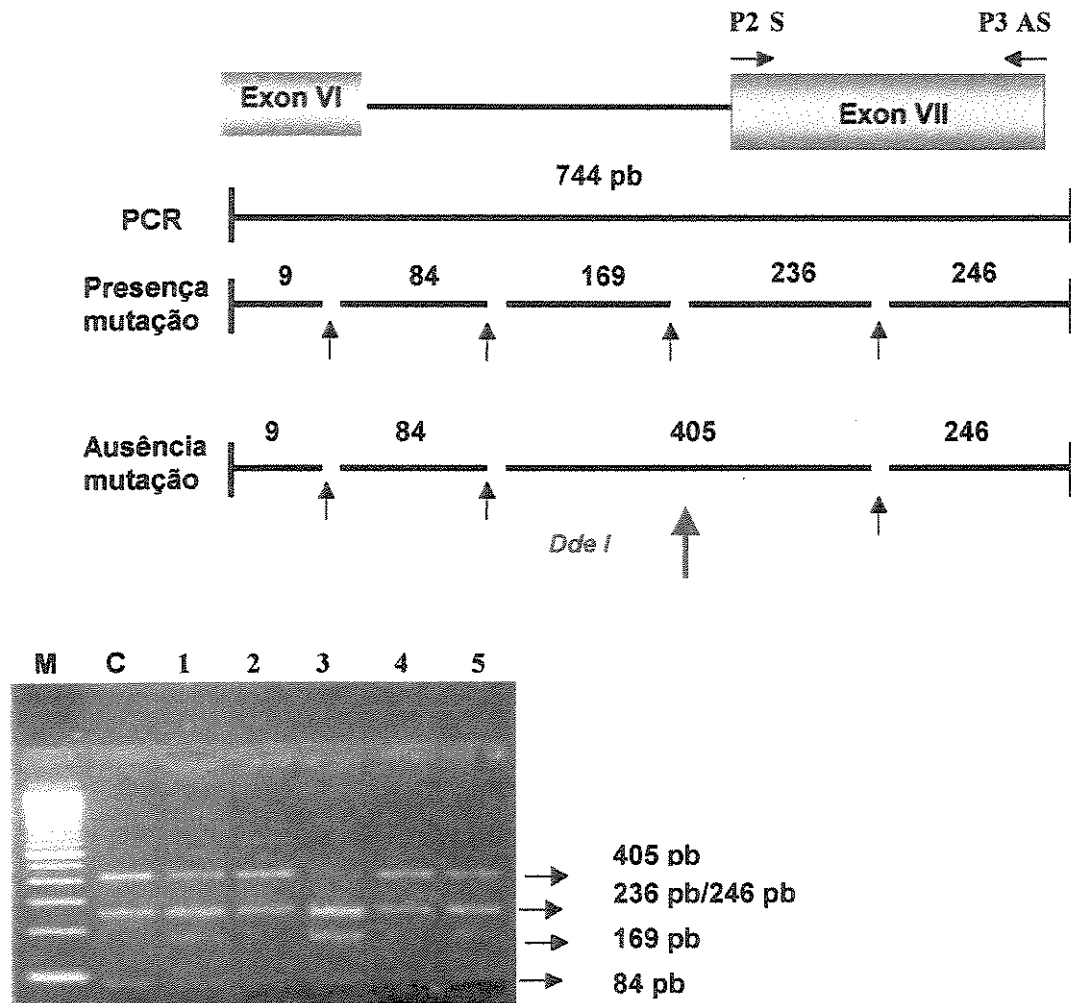
Figura 3- Genotipagem do grupo sanguíneo O com identificação da Del 261G



Produtos de PCR do exon 6 amplificados por iniciadores P1s/as e digeridos pela enzima *Kpn I*

- M - Marcador Ladder - 100 pb (*Gibco BRL Products*)
- C1 - controle: homozigose para a Del 261G
- 1, 2 e 3 - heterozigose para a Del 261G (fragmentos: 220, 156 e 63 pb)
- 4 e 5 - negativa para Del 261G (fragmento: 220 pb)
- 6 - homozigose para Del 261G

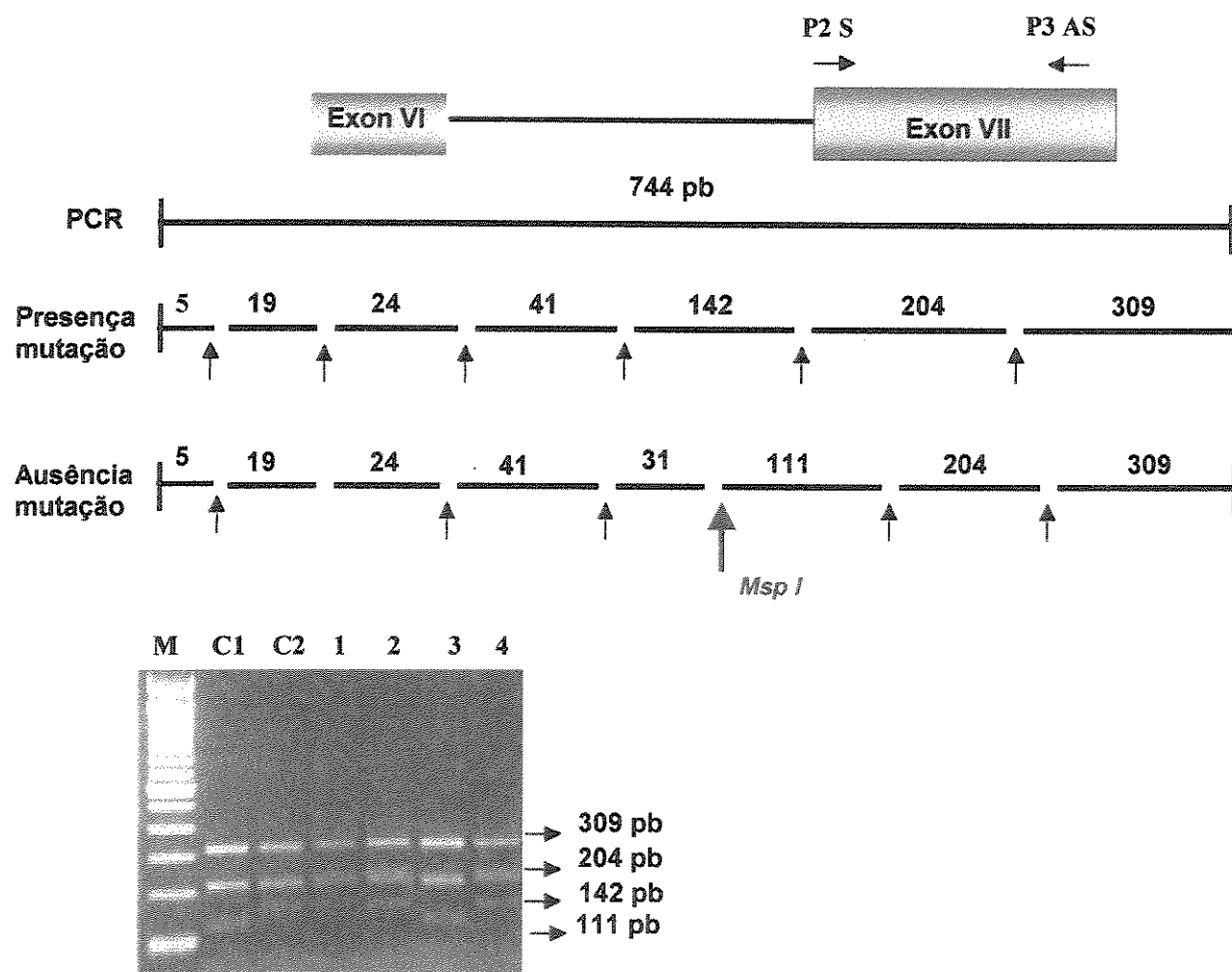
Figura 4-Genotipagem do grupo sanguíneo O¹O^{1v} com identificação da mutação C771T



Produtos de PCR do exon 7 amplificados por iniciadores P2s/P3as e digeridos pela enzima *Dde I*

- M - Marcador Ladder - 100 pb (*Gibco BRL Products*)
- C1 - controle: ausencia da mutação C771T
- 1 e 5 - heterozigose para a mutação C771T (fragmentos: 84, 169, 236/246 e 405 pb)
- 2 e 4 - ausencia da mutação C771T (fragmentos: 84, 246/ 236, 405 pb)
- 3 - homozigose para a C771T (fragmentos: 84, 169, 236/246 pb)

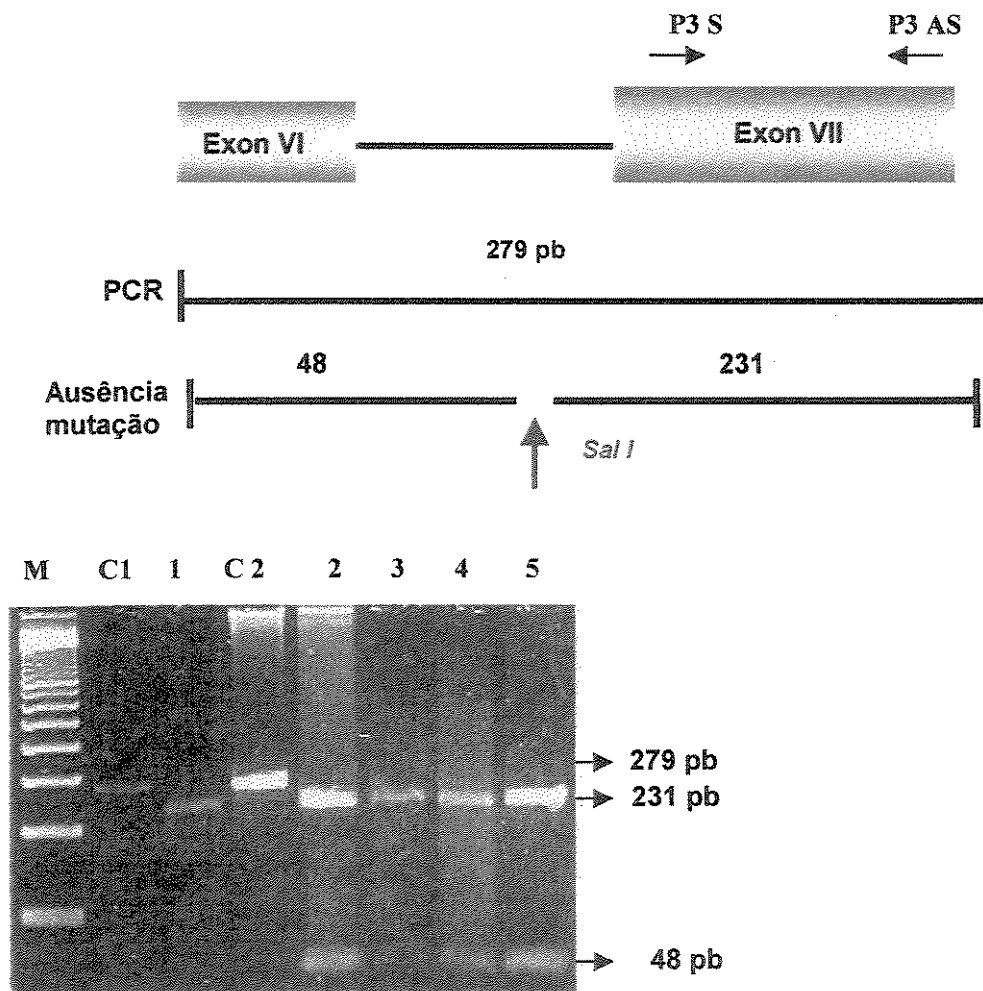
Figura 5- Genotipagem do subgrupo A²O com identificação da mutação C467T



Produtos de PCR do exon 7 amplificados por iniciadores P2s/P3as e digeridos pela enzima *Msp I*

- M - Marcador Ladder - 100 pb (*Gibco BRL Products*)
- C1 - controle: ausencia da mutação C467T (111, 204 e 309 pb)
- C2, 1, 2, e 4 - homozigose para a C467T (fragmentos: 142, 204 e 309 pb)
- 3 - ausencia da mutação C467T

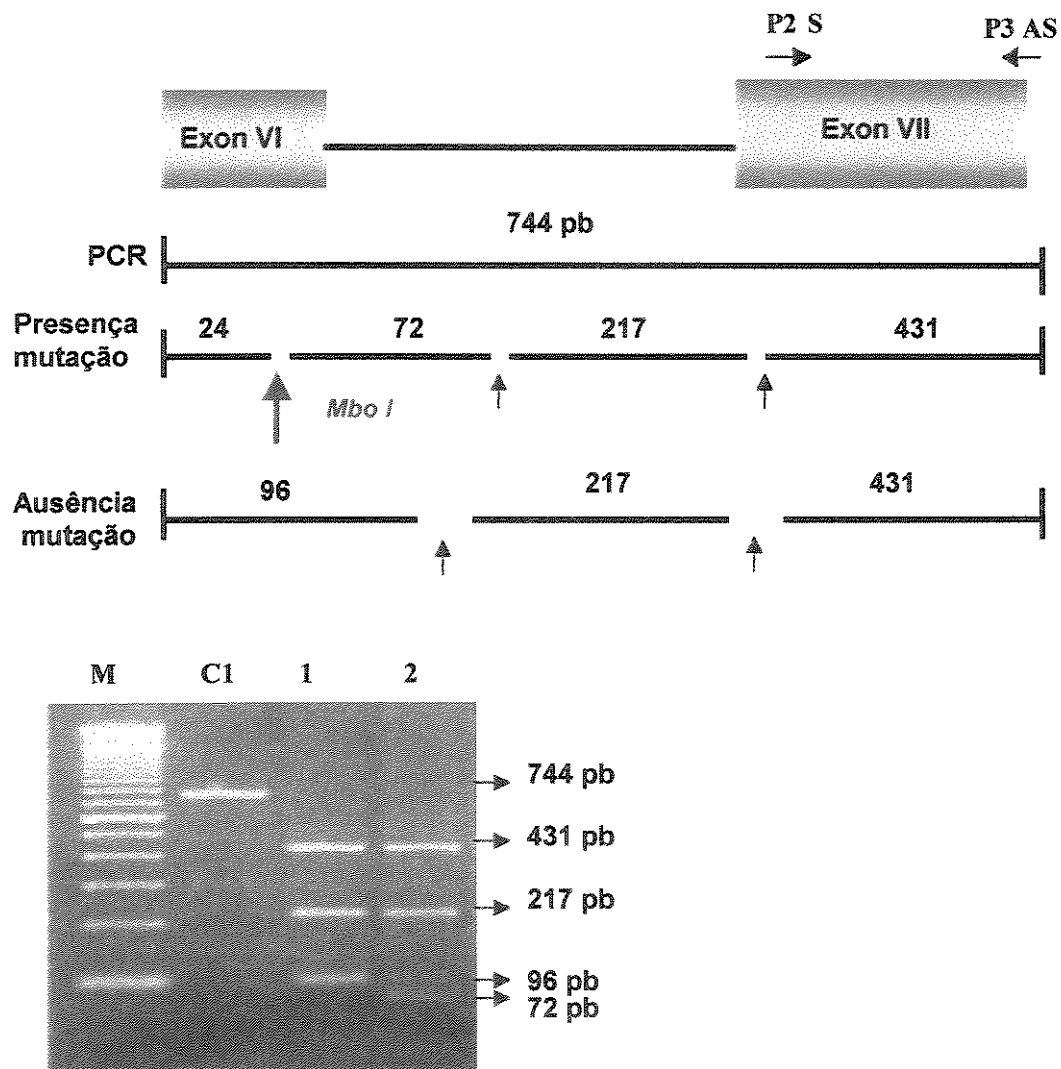
Figura 6-Genotipagem do subgrupo A³O com identificação da mutação G871A



Produtos de PCR do exon 7 amplificados por iniciadores P3s/as e digeridos pela enzima *Sal I*

- M - Marcador Ladder - 100 pb (*Gibco BRL Products*)
- C1 e C2 - controles: produtos de PCR não digeridos (fragmento: 279 pb)
- 1 a 5 - ausência da mutação G871A (fragmentos: 231 e 48 pb)

Figura 7- Genotipagem do subgrupo A^XO com identificação da mutação T646A



Produtos de PCR do exon 7 amplificados por iniciadores P2s/P3as e digeridos pela enzima *Mbo* I

- M - Marcador Ladder - 100 pb (*Gibco BRL Products*)
- C1 - controle: produtos de PCR não digeridos (fragmento: 744 pb)
- 1 - ausência da mutação T646A (fragmentos: 96, 217 e 431 pb)
- 2 - heterozigose para T646A (fragmentos: 72, 96, 217 e 431 pb)

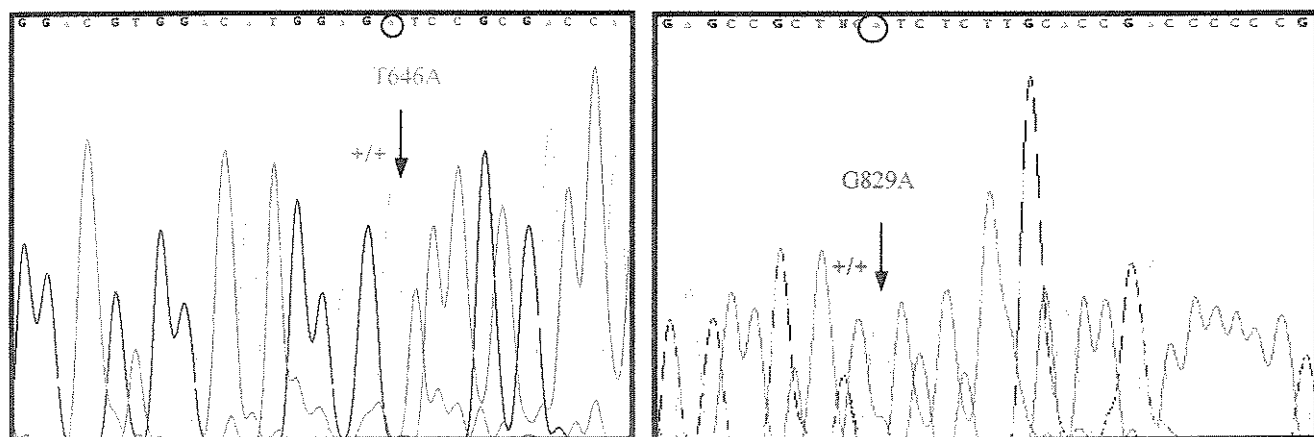
Tabela 6 – Resultados da clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7 dos quatro doadores O¹O²

Doadores O²	1		2		3		4	
Alelos	O¹	O²	O¹	O²	O¹	O²	O¹	O²
Exon 6								
Del261G	+	-	+	-	+	-	+	-
C220T	-	+	-	+	-	+	-	+
A297G	+	+	+	+	+	+	+	+
Exon 7								
C467T	+	+	+	+	+	+	+	+
T646A	+	-	+	-	+	+	+	+
C729T	-	-	-	-	-	-	+	+
C771T	+	+	+	+	+	+	-	-
G829A	-	-	-	-	+	+	-	-

Tabela 7 – Resultados da clonagem e sequenciamento dos exons 6 e 7 de dois doadores B^mO e B³O

Doadores B³O	B^mO		B³O	
Alelos	B	O	B	O
Exon 6				
Del261G	-	+	-	+
A297G	-	+	-	+
Exon 7				
C467T	+	+	+	+
C526G	-	-	+	-
T646A	+	+	+	+
C657T	+	-	+	-
G861A	+	+	+	-
C771T	+	+	+	+
G829A	+	+	+	+
G803C	+	-	+	-

Figura 8 - Resultados do sequenciamento direto do exon 7 do gene ABO dos indivíduos portadores de subgrupo de B (B^mO e B^3O)



4.3 - Resultados das dosagens do FVW, FVIII e cofator de ristocetina

Baseado nos resultados do estudo molecular foram selecionados 122 doadores do total de 220, para dosagem do FVW:Ag, FVIII:C e cofator de ristocetina. O critério utilizado foi obter 10 doadores AO¹, 10 AA, 10 BO¹, 10 BB, 10 AB, 10 O¹O¹, 10 O¹O^{1V}, 4 O¹O², 20 A²O, 20 A²B e todos os subgrupos disponíveis (2 A^xO, 4 A³O, 1 B³O e 1 B^mO).

4.3.1- Resultados das dosagens do FVW em doadores de diferentes grupos e subgrupos sanguíneos

Os indivíduos dos grupos AA, AB e BB foram estudados em um mesmo grupo por não apresentarem o alelo O. Os subgrupos A₃O, B₃O e A_xO foram também analisados em um único grupo, por apresentarem maior quantidade de antígeno H quando comparados com AO, BO e A²O. Os quatro doadores O¹O² foram analisados juntamente com o grupo O¹O¹.

A mediana das dosagens do FVW:Ag dos grupos sanguíneos AA, AB, BB (Md= 120% min= 74%, max= 208%) estava significativamente mais elevada quando comparada com as medianas dos grupos AO e BO (Md= 80%, min= 60%, max= 150%; p<0.001), O¹O¹ (Md= 69%, min= 40%, max= 99%; p<0.001) e A²O (Md= 89%, min= 56%, max= 133%; p<0.001), porém a mediana estava estatisticamente menor em relação ao subgrupo A²B (Md= 169%, min= 92%, max= 250% ; p=0.013) e A²O (Md= 89%, min= 56%, max= 133%; p<0.001).

A mediana das dosagens do FVW:Ag dos grupos AO e BO (Md= 80% min= 60%, max= 150%) estava significativamente menor (p<0.001) quando comparada com o subgrupo A²B (Md= 169%). Porém quando comparado com os grupos O¹O¹ (Md= 69%) e A²O (Md= 89%) os resultados não foram estatisticamente significativos (p=0.056 e p=0.677, respectivamente).

A mediana das dosagens do FVW:Ag no grupo O^1O^1 (Md= 69%, min= 40%, max= 60%) estava significativamente menor ($p<0.001$) quando comparada com A^2B (Md= 169%) e A^2O (Md= 89%; $p=0.018$) porém quando comparado com O^1O^{1V} a diferença não foi estatisticamente significativa (Md= 86%, min= 55%, max= 99%; $p= 0.133$).

A mediana das dosagens do FVW:Ag no grupo A^2O (Md= 89%, min= 56% e max= 133%) quando comparada com o subgrupo A^2B (Md=169%) também apresentou-se significativamente diminuída ($p<0.001$).

A mediana das dosagens do FVW:Ag nos subgrupos A^3O , A^xO , B^3O (Md= 75%, min= 50% e max= 110%) quando comparada com as medianas dos grupos AA, AB, BB (Md= 120%) e A_2B (Md= 169%) estava significativamente menor ($p<0.001$ para ambos). Porém a mediana nos subgrupos A^3O , A^xO , B^3O não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com AO e BO (Md= 80%; $p=0.898$), O^1O^1 (Md= 69%; $p=0.491$) e A^2O (Md= 89%; $P=0.665$).

O "Box-and-wiskers box plot" dos resultados das dosagens do FVW:Ag se encontram na figura 9a.

4.3.2 - Resultados das dosagens do FVIII em doadores de diferentes grupos e subgrupos sanguíneos

A mediana das dosagens do FVIII:C nos grupos sanguíneos AA, AB, BB (Md= 117%, min= 64%, max= 180%) quando comparada com a mediana dos grupos AO e BO (Md= 89%, min= 50% e max= 147%;), O^1O^1 (Md= 75%, min= 45% e max= 143%;) e A^2O (Md= 96%, min= 50% e max= 130%;) estava significativamente mais elevada ($p<0.001$ para

ambos). Porém a diferença não foi significativa quando comparada com A²B (Md= 112%, min= 98%, max= 210%; P=0.312).

A mediana das dosagens do FVIII:C nos grupos sanguíneos AO e BO (Md= 89%, min= 50%, max= 147%) estava significativamente menor quando comparada ao subgrupo A²B (Md= 112%; p<0.001). Porém as diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparadas com os grupos O¹O¹ (Md= 75%; p=0.065) e A²O (Md= 96%; p=0.625).

A mediana das dosagem do FVIII:C no Grupo O¹O¹ (Md= 75%, min= 45% e max= 143%) estava significativamente menor quando comparada com A²B (Md= 112%; p<0.001) e A²O (Md= 96%; p=0.048) porém quando comparada com O¹O^{1V} as diferenças não foram estatisticamente significativas (Md= 88%, min= 72% e max= 100%; p= 0.132%).

A mediana das dosagem do FVIII:C no subgrupo A²O (Md= 96%, min= 50%, máx= 130%) estava estatisticamente menor quando comparada com o subgrupo A²B (Md=112%; p<0.001).

A mediana dos resultados das dosagens do FVIII:C nos subgrupos A³O, A^xO , B³O (Md= 88%, min= 65%, max= 123%) estava significativamente menor quando comparada aos grupos AA, AB, BB (Md= 117%; p=0.041) e A₂B (Méd= 112%; p=0.001). A mediana das dosagens do FVW:Ag nos subgrupos A³O, A^xO , B³O não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparada com AO e BO (Md=89%; p=0.959), O¹O¹ (Md=75%; p=0.575) e A²O (Md=96%; P=0.575).

O "Box-and-wiskers box plot" dos resultados das dosagens do FVIII:C se encontram na figura 9b.

4.3.3 - Resultados das dosagens do cofator de ristocetina em doadores de diferentes grupos e subgrupos sanguíneos

A mediana das dosagens do cofator de ristocetina nos grupos sanguíneos AA, AB, BB (Md= 119%, min= 71% e máx= 160%) estava significativamente mais elevada quando comparada aos grupos AO e BO (Md= 86%, min= 57%, max= 176%; $p<0.001$), O¹O¹ (Md= 65%, min= 25% e max= 98%; $p<0.001$) e A²O (Md= 99%, min= 62% max= 152%; $p<0.001$), porém quando comparada com A²B (Md=132%, mín= 77% e máx= 253%) a diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0.180$).

A mediana das dosagens do cofator de ristocetina nos grupos AO e BO (Md=86%, mín= 57% e máx= 176%) estava significativamente mais elevada quando comparada as medianas dos grupos O¹O¹ (Md=65%; $p=0.001$) e menor em A²B (Md=132%; $p<0.001$), porém a diferença não foi estatisticamente significativa quando comparada com A²O (Md=99%; $p=0.233$).

A mediana das dosagens do cofator de ristocetina para o Grupo O¹O¹ (Md=65%, mín= 25% e máx= 98%) estava significativamente menor quando comparada com a mediana dos subgrupos A²B (Md=132%) e A²O (Md= 99%), ($p<0.001$ para ambos), porém não foi estatisticamente significativa quando comparado com O¹O^{1V} (Md= 76%, min= 62% e max= 120%; $p= 0.177$).

A mediana das dosagens do cofator de ristocetina nos subgrupos A³O, A^xO , B³O (Md=76%, mín= 60% e máx= 120%) estava significativamente menor quando comparada com a mediana dos grupos AA, AB, BB (Md=119%) e A²B (Md=132%), ($p<0.001$ para ambos). A mediana do cofator de ristocetina nos subgrupos A³O, A^xO , B³O não

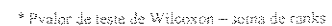
apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com as medianas dos grupos AO e BO (Md= 86%; $p=0.959$), OO (Md=65%; $p=0.232$) e A²O (Md=99%; $P=0.575$).

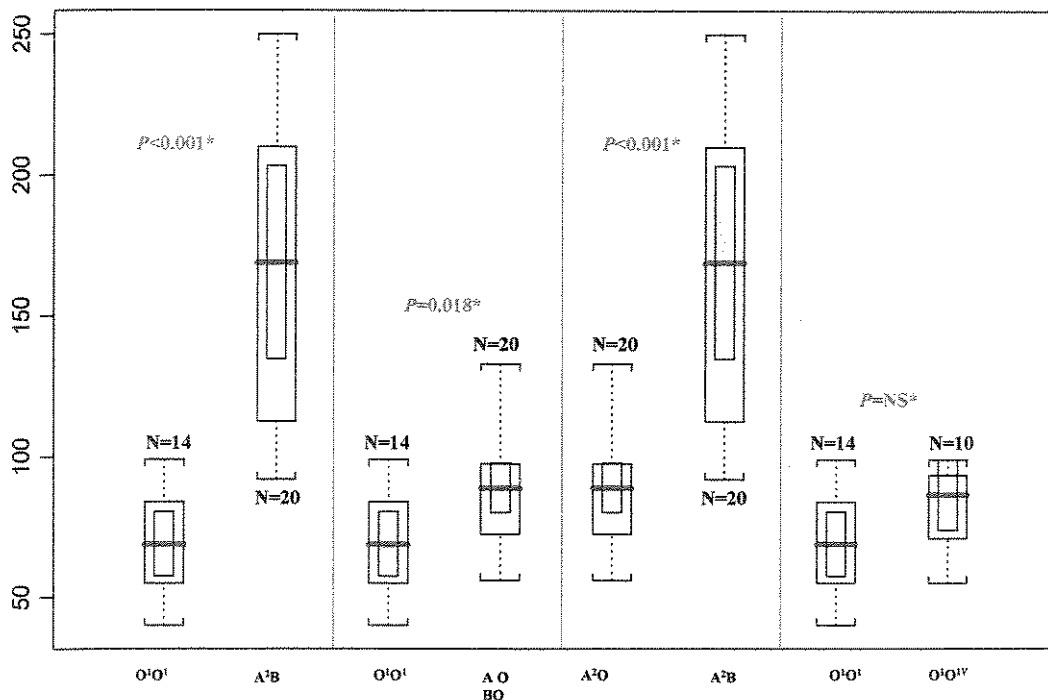
O "Box-and-wiskers box plot" dos resultados das dosagens do cofator de ristocetina se encontram na figura 9c.

4.3.4 - Correlação entre o FVW, FVIII e RCo

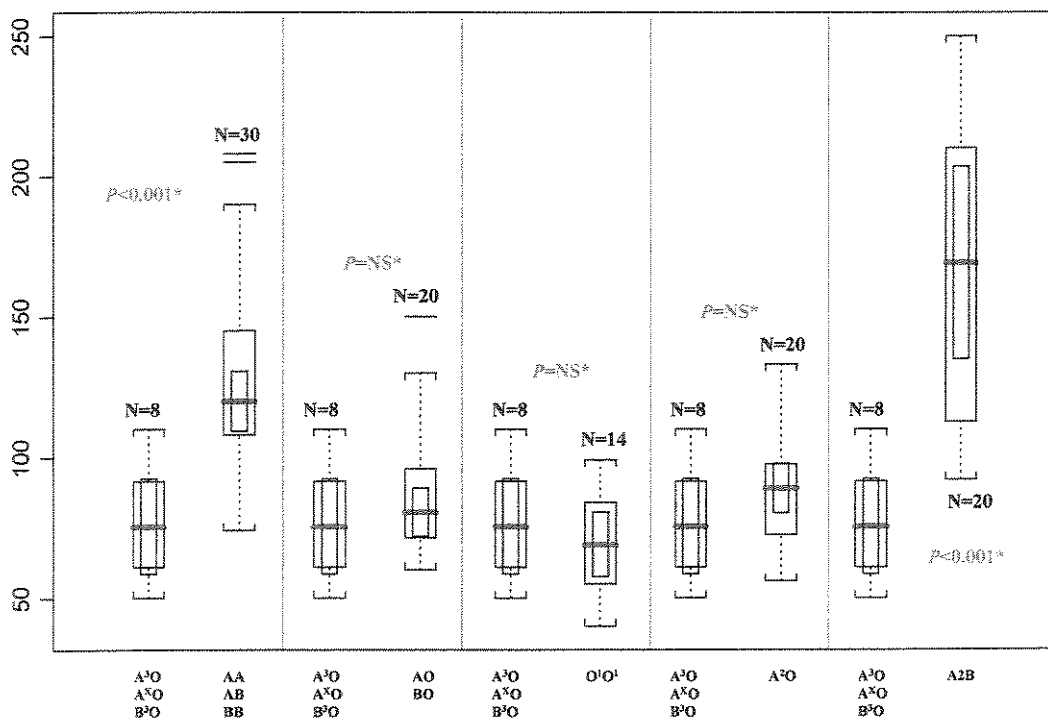
A análise realizada através do teste de Spearman verificou uma alta correlação entre o FVW e FVIII ($r=0.77$; $p<0.001$) e também entre o FVW e RCo ($r=0.75$; $p<0.001$) (figura 10a e 10b).

Figura 9 A - Medianas dos resultados das dosagens do FVW:Ag em diferentes grupos e subgrupos sanguíneos



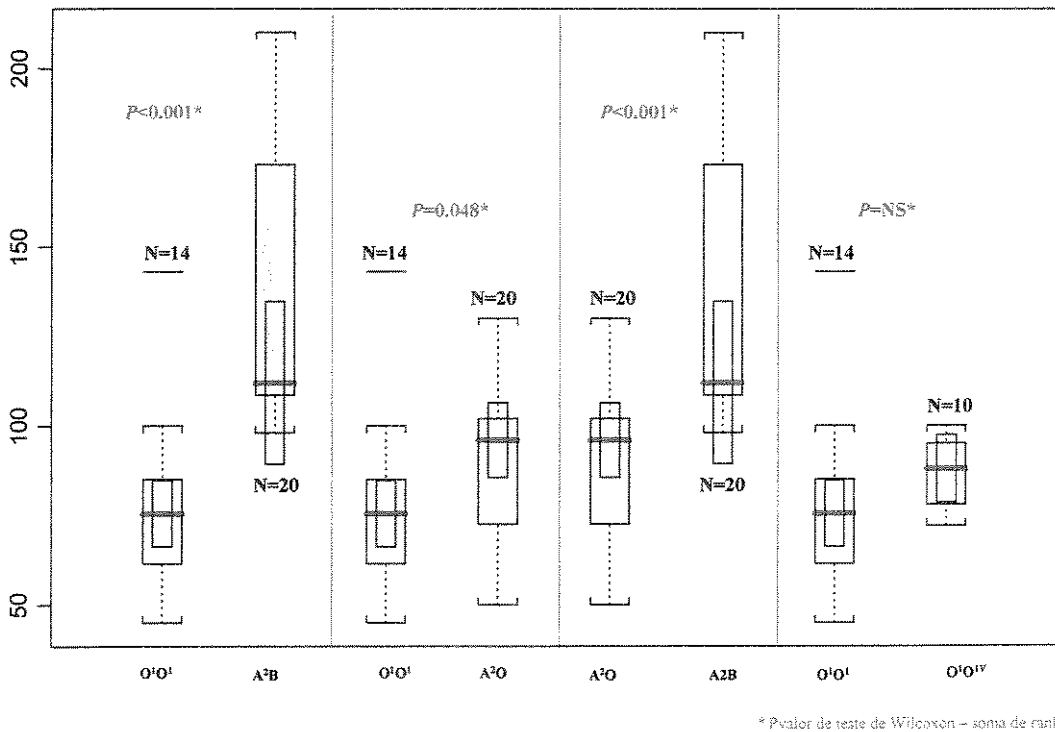
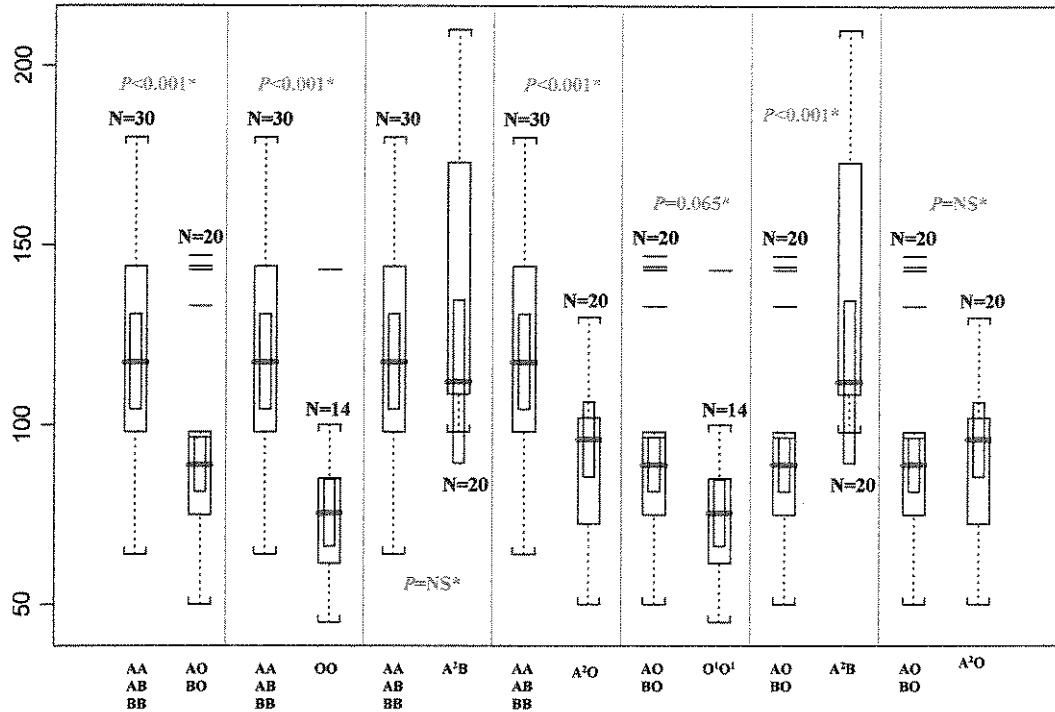


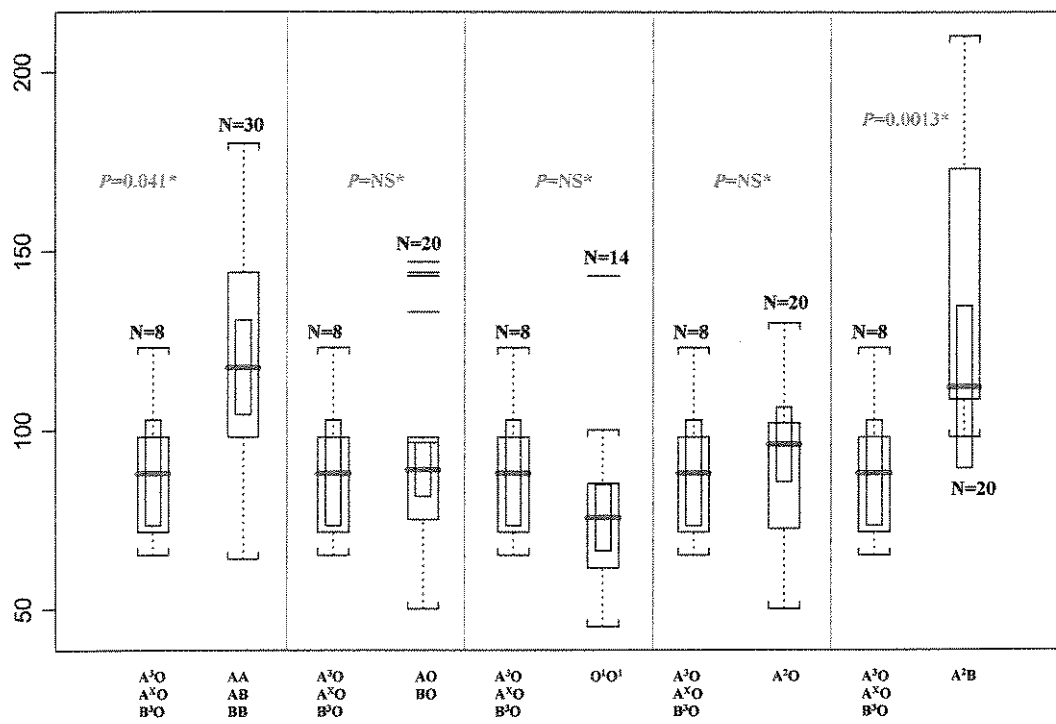
* P-valor de teste de Wilcoxon – soma de ranks



* P-valor de teste de Wilcoxon – soma de ranks

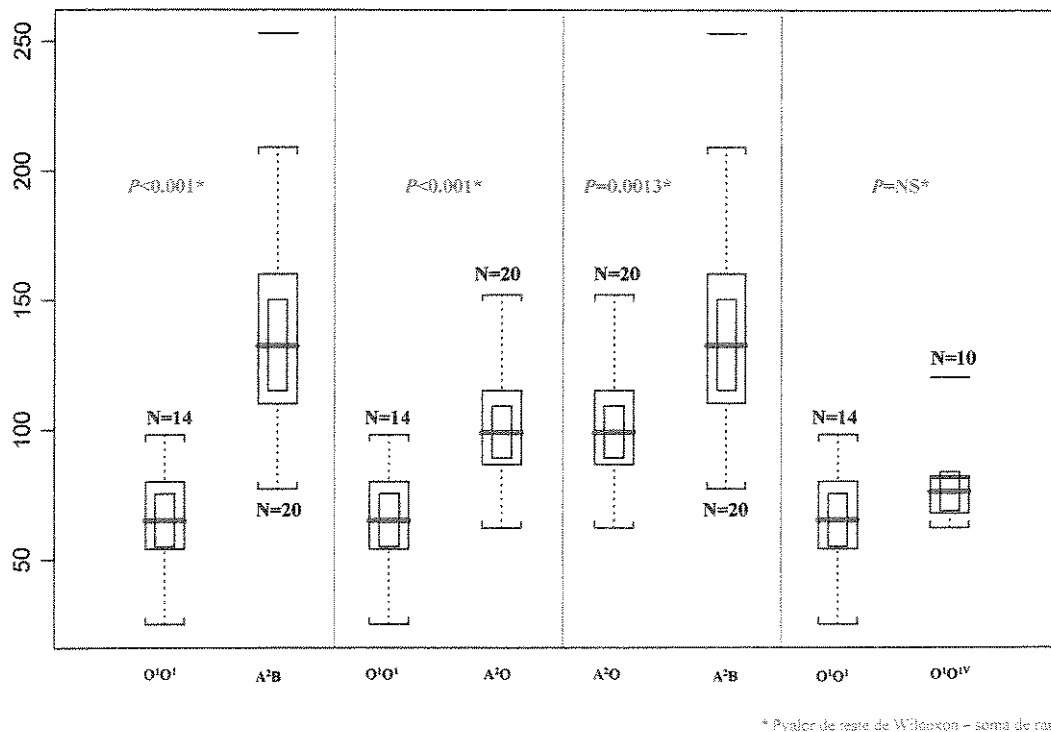
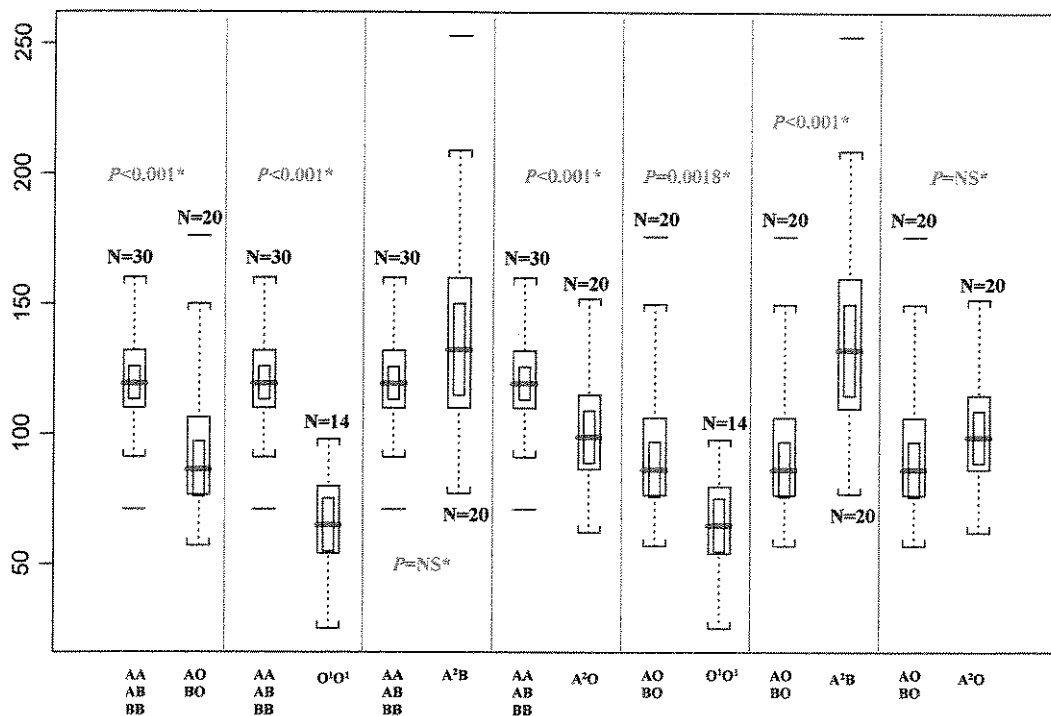
Figura 9B - Medianas dos resultados das dosagens do FVIII:C em diferentes grupos e subgrupos sanguíneos

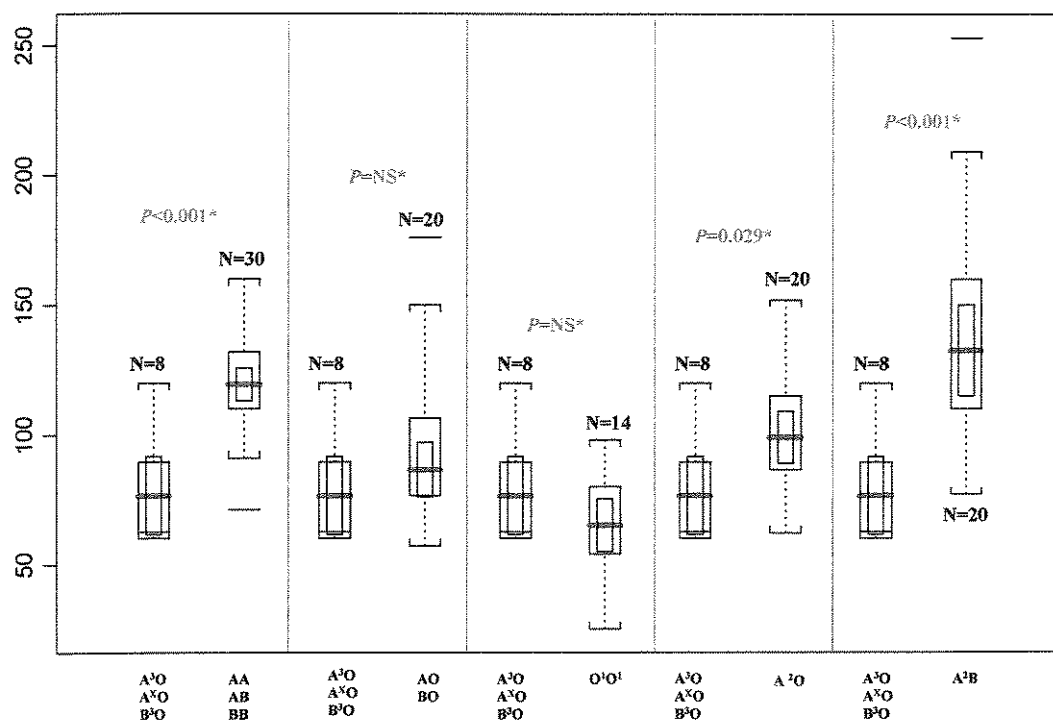




* P-valor de teste de Wilcoxon – soma de ranks

Figura 9 C - Medianas dos resultado das dosagens do cofator de ristocetina em diferentes grupos e subgrupos sanguíneos





* Pvalor de teste de Wilcoxon – soma de ranks

Figuras 10 - Os gráficos 10A e 10B representam os resultados dos estudos das correlações do FVW com FVIII e do FVW com RCo.

Figura 10A - Resultado da correlação entre o FVW e FVIII

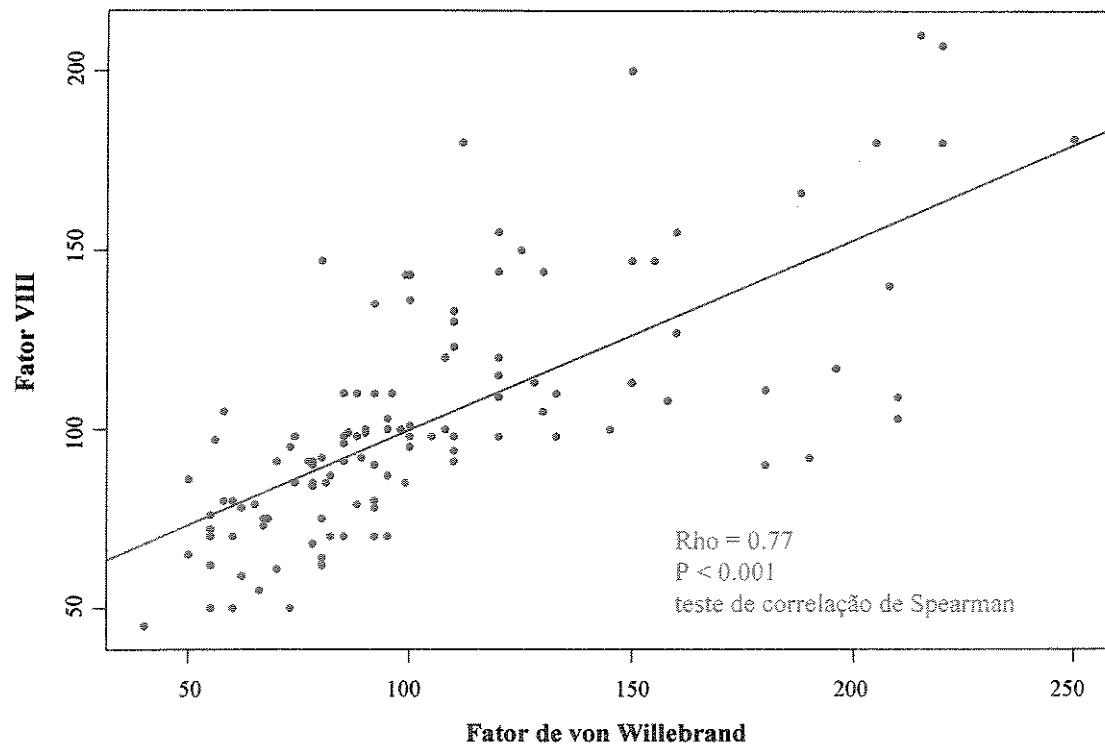
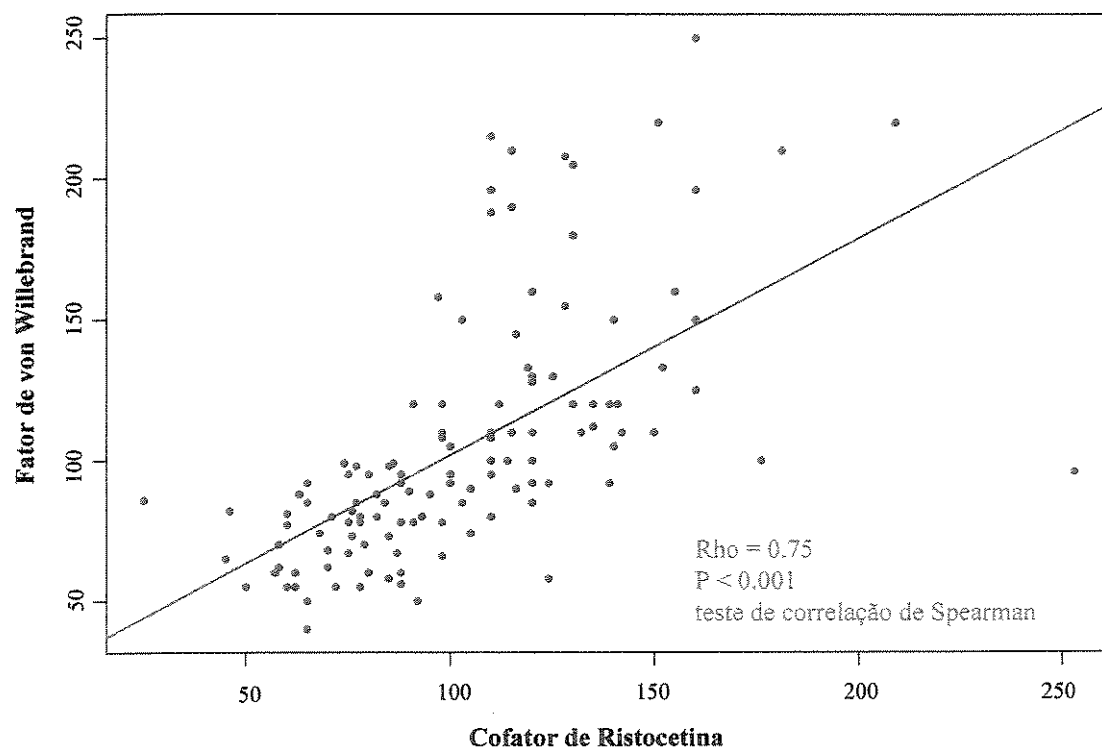


Figura 10B - Resultado da correlação entre o cofator de ristocetina e Fator de von Willebrand



5. DISCUSSÃO

Diversos autores discutiram a influência dos grupos sanguíneos A, B, AB e O nos níveis circulantes do FVW e FVIII (GIL et al., 1987; SHIMA et al., 1995; SOUTO et al., 2000), entretanto apenas O'DONNELL et al. (2002), estudaram o subgrupo A₂O e relacionaram este polimorfismo do gene ABO com os níveis circulantes do FVW e FVIII.

Estudamos grupos e subgrupos sanguíneos como A₂O, A₃O, A_xO e B₃O, caracterizando cada um detalhadamente através de técnicas sorológicas e moleculares. A princípio foi realizada amplificação dos exons 6 e 7 do gene ABO e digestão com enzimas de restrição específicas. Quando necessário, foi também realizado clonagem e sequenciamento dos referidos exons, que são os principais responsáveis pela atividade da enzima glicosil transferase.

Os diversos subgrupos do sistema ABO se caracterizam por uma redução da atividade da enzima glicosil transferase que acarreta uma redução na expressão dos antígenos A e B na membrana eritrocitária, com permanência do antígeno H em quantidades inversamente proporcionais à presença dos antígenos A e B.

MATSUI et al. (1992), demonstraram a presença dos antígenos ABH no FVW e O'DONNELL et al. (2002), relacionaram a presença do antígeno H com a concentração plasmática do referido fator, concluindo que existe uma relação inversa entre a quantidade de antígenos H e o FVW circulante.

Recentemente BOWEN (2003), descreveu que a enzima ADAMTS 13 é uma das responsáveis pelo catabolismo do FVW circulante e que o grupo sanguíneo ABO pode influenciar a proteólise do referido fator, sendo o grupo O o mais susceptível à ação enzimática.

MILLER et al. (2003) estudaram o cofator de ristocetina (RiCof) em indivíduos do grupo sanguíneo O e não O definidos apenas por testes sorológicos. SHIMA et al. (1995), realizaram além do estudo sorológico a investigação das principais mutações descritas nos grupos sanguíneos A, B e O. Ambos autores constataram que as

concentrações plasmáticas do FVW:Ag e RiCof estavam diminuídas nos indivíduos do grupo O quando comparados com não O (A, B e AB), e também nos indivíduos OO, AO e BO quando comparados com AA, AB e BB.

Interessante ressaltar que neste estudo realizamos as dosagens do FVW:Ag, FVIII:C e cofator de ristocetina (RiCof) após definição sorológica e molecular dos grupos e subgrupos sangüíneos, com o objetivo de verificar se as concentrações plasmáticas destes fatores estavam relacionadas com alguma mutação específica na enzima glicosil transferase e conseqüentemente com a presença do antígeno H na membrana eritrocitária. Verificamos que indivíduos do grupo AA, AB, BB apresentaram a concentração do FVW:Ag e a atividade de FVIII:C e RCo mais elevada no plasma quando comparados com indivíduos do grupo O, ou portadores desse alelo (AO, BO), sendo estes resultados semelhantes aos previamente descritos (SHIMA et al., 1995; SOUTO et al., 2000; O'DONNELL et al., 2002).

As concentrações plasmáticas FVW:Ag e a atividade do FVIII:C e RiCof encontrados em doadores do grupo A²O (n=20) foram estatisticamente menores que os valores encontrados em indivíduos AA, AB e BB (p<0.001 em ambos) e maiores que os valores encontrados em indivíduos do grupo O¹O¹ (p=0,018; p=0,048 e p<0.001). Entretanto, quando comparamos esses parâmetros em indivíduos do grupo A²O com os grupos AO e BO, não obtivemos diferenças estatisticamente significativas. O'DONNELL et al. (2002), estudaram 13 indivíduos A²O e correlacionaram as concentrações plasmáticas do FVW:Ag com as dosagens obtidas em doadores AO e BO, e encontraram diferenças estatisticamente significativas (p=0.030), ao passo que quando comparamos A²O com O¹O¹ analisando todos os parâmetros, obtivemos diferenças estatisticamente significativas (FVW- P=0.018; FVIII- P=0.045 e RCo- p<0.001). Provavelmente a discrepância de resultado com relação ao FVW:Ag e FVIII seja conseqüência da reduzida casuística analisada por O'DONNELL e colaboradores.

Em nosso trabalho foram avaliados pela primeira vez as concentrações plasmáticas do FVW:Ag, FVIII:C e RCo em indivíduos do subgrupo A²B (n=20). Na comparação dos resultados obtidos de doadores A²B e A²O, obtivemos uma diferença estatisticamente significativa para os dois fatores (FVW:Ag - p=0.013 e FVIII:C - p<0.001). Na comparação de doadores dos grupos A²B e AA, AB e BB verificamos que somente o nível plasmático do FVW:Ag foi estatisticamente mais baixo nos doadores A²B (p=0.013), entretanto os resultados das dosagens do FVIII:C e RCo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p=0.312 e p=0.180, respectivamente).

Esta foi a primeira vez em que as dosagens do FVW:Ag e atividade do FVIII e RCo foram realizadas no grupo O¹O^{1V} comparando-o ao grupo O¹O¹, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (FVW:Ag - P=0.132; FVIII:C - p=0.125; RCo - p=0.177). O grupo O¹O² também foi analisado e os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados com os grupos O¹O¹ e O¹O^{1V}, provavelmente como consequência do restrito número de casos estudados (n=4). Cabe enfatizar que indivíduos do grupo O com ausência da deleção 261G representam apenas 3,7% dos indivíduos do grupo O caucasóides.

As concentrações plasmáticas do FVW e da atividade do FVIII e RCo foram avaliadas também pela primeira vez em doadores dos subgrupos A³O/ A^xO/ B³O. Estes subgrupos caracterizam-se por apresentarem uma baixa atividade da enzima glicosiltransferase e consequentemente, maior quantidade do antígeno H na membrana da hemácia quando comparados com o subgrupo A²O e o grupo AO.

As dosagens do FVW e atividade do FVIII e RiCof não foram estatisticamente diferentes quando comparados valores encontrados em indivíduos A³O/ A^xO/ B³O com doadores AO/BO e O¹O¹. Porém estes níveis foram estatisticamente menores quando comparados com os resultados encontrados em doadores AA, BB, AB. O'DONNELL et al. (2002), demonstram que a concentração do antígeno H é inversamente proporcional ao FVW circulante e consequentemente os indivíduos pertencentes aos

subgrupos A³O/ A^xO/ B³O, deveriam apresentar uma redução significativa na concentração plasmática do FVW quando comparados aos grupos AO e BO que possuem menor quantidade de antígeno H. Provavelmente o reduzido número de indivíduos estudados tenha influenciado nos resultados. Estes subgrupos são pouco frequentes na população dificultando o aumento na casuística

Pela primeira vez foi estudado o RCo em doadores dos subgrupos sanguíneos A²O e A²B. Verificamos que indivíduos com genótipos AA, AB e BB apresentaram concentrações plasmáticas do RCo mais elevada em relação ao grupo O e portadores desse alelo (AO, BO) ($p < 0.001$), resultado semelhante ao descrito por SHIMA et al, (1995).

Os resultados do RiCof em doadores dos subgrupos A³O, A^xO e B³O apresentaram o mesmo comportamento que o FVW:Ag e FVIII:C quando comparados com AO e O¹O¹, ou seja, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, quando foram comparados com as dosagens obtidas de indivíduos dos grupos AA, AB, BB e A²B encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$). As dosagens do cofator de ristocetina nos subgrupos A³O, A^xO e B³O também foram estatisticamente menores que as obtidas em indivíduos do grupo A²O ($P = 0.029$), e este resultado é diferente do encontrado para o FVW:Ag e FVIII:C nos mesmos subgrupos sanguíneos.

O estudo estatístico demonstrou uma alta correlação entre as dosagens do FVW e FVIII e entre o FVW e RCo ($R = 0.77$; $p < 0.0001$ e $R = 0.45$ e $p < 0.001$, respectivamente). Este resultado é compatível com a teoria de que a redução na concentração plasmática do FVW acarreta proporcional redução do FVIII. Esta hipótese está baseada no fato de que o FVIII é transportado pelo FVW (KOEDAM et al., 1988). Provavelmente as alterações nas concentrações plasmáticas do FVW e FVIII tenham interferido na atividade funcional avaliada pelo RCo.

O estudo dos subgrupos sangüíneos nos mostrou que os mesmos também possuem concentrações plasmáticas do FVW e FVIII mais baixas quando comparados com indivíduos dos grupos A, B e AB provavelmente consequência da presença do antígeno H.

Em nosso estudo encontramos três pontos divergentes da literatura :

- A mediana das dosagens do FVW, FVIII e RCo não foram estatisticamente diferentes quando comparados indivíduos do grupo A²O com AO e BO e estatisticamente significativa quando comparados indivíduos do grupo A²O com O¹O¹. Estes resultados são diferentes dos descritos previamente por O'DONNELL et al. (2002).
- A mediana das dosagens do FVW no subgrupo A²B (Md=112%) comparada com indivíduos dos grupos AA, AB e BB (Md=117%) foi estatisticamente significativa, porém as concentrações plasmáticas do FVIII e RCo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para estes mesmos grupos.
- Quando comparamos A³O, A^xO e B³O com A²O verificamos que as dosagens do RiCof foram estatisticamente maiores no grupo A²O. Entretanto, as concentrações plasmáticas do FVW e FVIII, nos mesmos subgrupos citados não apresentaram diferenças significativas. Neste caso nossos resultados não foram compatíveis com a hipótese proposta por O'DONNELL que relaciona a concentração plasmática do FVW com a presença de antígeno H.

Apesar da alta correlação existente entre o FVW e a atividade do FVIII e RCo observamos nestes dois últimos casos, que a atividade do FVIII e RCo não apresentaram o mesmo comportamento da concentração plasmática do FVW. Provavelmente outros fatores ainda não estudados poderiam estar influenciando na relação do complexo FVW-FVIII, além da presença do antígeno H.

5.1 – Polimorfismos do gene ABO

A literatura mostra alguns estudos dos polimorfismos da enzima glicosiltransferase analisando pequeno número de casos, principalmente com relação a subgrupos pouco freqüentes como A₃, A_x e B₃ entre outros. Há vários polimorfismos no gene ABO que são classificados como subgrupos de A ou B fracos por possuírem uma maior quantidade de antígeno H, baixa expressão dos respectivos antígenos e não apresentam um padrão sorológico característico (VENGELEN-TYLER, 1999).

Dez amostras estudadas apresentaram resultados sorológicos específicos dos subgrupos A₃(1), A_x(4), A₃B(3) e A_xB(2) porém o estudo molecular demonstrou em todos os casos a presença da mutação C467T característica do subgrupo A². Provavelmente estes doadores possuam alterações moleculares em algum outro exon do gene ABO. Neste estudo foram analisados apenas os exons 6 e 7 que são considerados os principais responsáveis pelo princípio ativo da enzima.

O estudo molecular dos dois doadores com subgrupos de B demonstrou em ambos os casos a associação das mutações G829A(Val277Met) e T646A(Phe216Ile). A substituição G829A foi previamente descrita em indivíduos O_{1V} (YAMAMOTO et al., 1990a) e no subgrupo A₃ (BARJAS-CASTRO et al., 2000) e a substituição T646A é considerada a mutação clássica do subgrupo A_x e também foi demonstrada em doadores O^{1V} e B₃ (OGASAWARA et al., 2001). Ambas as mutações estão localizadas após a Del 261G, portanto não acarretam nenhuma alteração enzimática em doadores do grupo O¹. A associação das mutações G829A e T646A provavelmente foram as responsáveis pela fraca expressão do antígeno B nos doadores caracterizados sorologicamente como B_m e B₃. O significado desta associação até então não descrita no alelo B, permanece ainda desconhecido.

6.CONCLUSÕES

6.1 – Relação entre os polimorfismos do gene ABO e FVW e FVIII:C

- A concentração plasmática do FVW e FVIII:C apresentou relação com os grupos e subgrupos do sistema ABO
- A presença do alelo O (AO, BO e OO) demonstrou estar relacionada com baixa concentração plasmática FVW e FVIII:C quando comparados com indivíduos com ausência do referido alelo (AA, AB e BB).
- As concentrações FVW e FVIII:C no plasma foram inversamente proporcionais à expressão do antígeno H na membrana eritrocitária, nos diferentes grupos e subgrupos sanguíneos.
 - A concentração plasmática do FVW nos doadores dos subgrupos A³O/ A^xO / B³O foi menor que os valores encontrados em indivíduos com grupos sanguíneos que não apresentam o antígeno H como AA , BB e AB, embora a concentração não tenha sido também significativamente menor que a encontrada em indivíduos AO e BO.
- Identificado uma alta correlação entre as concentrações plasmáticas do FVW e FVIII:C e também entre o FVIII:C e o RCo.

6.2 – Polimorfismos do gene ABO

- Os subgrupos de B classificados sorologicamente como B₃ e B_m apresentaram ambos a associação das mutações G829A(Val277Met) e T646A(Phe216Ile).

- A associação das mutações G829A e T646A provavelmente foram as responsáveis pela fraca expressão do antígeno B na membrana eritrocitária.

O significado desta associação até então não descrita no alelo B, permanece ainda desconhecido.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEDORT, L.M. von Willebrand Disease: From the Bedside to Therapy. **Tromb and Haemost**.1: 562-565, 1997.
- ALLDERDICE, P.; KATIA, H.; LEWIS, M.; MCA-ALPINE, P.; WONG, P.; ANDERSON, J.; GILBERT, E. Segregation of marker loci in families with an inherited paracentric insertion of chromosome 9. **Am J Hum Genet**, 39: 612-617, 1986.
- ALPERIN, J.B. Estrogens and surgery in women with von Willebrand's disease. **Am J Med**, 73: 367, 1982.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. The scope of statistics: Ed. Blackwell Science, 1994. p. 32-35.
- ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carboydrate-specific receptors of the liver. **Annual Reviews in Biochem**, 51: 531-554, 1982.
- ASSOULINE, Z.; KERBIRIOU-NABIAS, D.M.; PIEUTO, G.; THOMAS, N.; BAHNAK, B.R.; MEYER, D. The human gene for von Willebrand factor. Identification of repetitive Alu sequences 5' to the transcription initiation site. **Biochemi Biophys Res Commun**. 153: 1159-1166, 1988.
- BARJAS-CASTRO, M.L.; SAAD, S.T.O. Absence of the G871A mutation in A3 blood donors from Brazil. **Transf**, 37: 564, 1997.
- BARJAS-CASTRO, M.L.; CARVALHO, M.H.; LOCATELLI, M.F.; BORDINI, S.; SAAD, S.T.O. Molecular Heterogeneity of the A₃ subgroup. **Clin Lab Haemost**, 22: 1-7, 2000.
- BEATTIE, K.M.; **Discrepancies in ABO grouping**. In: a Seminar on problems encountered in pretransfusion tests. Washington, DC: American Association of Blood Banks, 1972: 129-165.
- BELL, W.N.; ALTHON, H.G. A brain extract is a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation. **Nature** (Lond), 174: 880-881, 1954.
- BENENETT, E.P.; STEFFERSEN, R.; CLAUSEN, H.; WEGHIUS, D.; van KESSEL, A.G. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. **Biochem Biophys Res Commun**, 206: 318-325, 1995.
- BIESSON, E.A.; BAKKEREN, H.F.; BEUTING, D.M.; KEIPER, J.; VAN BERKEL, T.J. Ligand size is a mayor determinant of hight affinity binding of fucose - and galactose exposing lipoproteins by the hepatic fucose receptor. **Biochem J**, 299: 291-296, 1994.

- BIRD, G.W. Relationship of the blood sub-groups A_1 , A_2 and A_1B , A_2B to haemagglutinins present in the seeds of *Dolichos biflorus*. **Nature**, 170: 674-676, 1952.
- BLOOM, A.L. The biosynthesis of Factor VIII. **Clin Haematol**. 8: 53-77, 1979.
- BLOOM, A.L. Von Willebrand factor; clinical features of inherited and acquired disorders. **Mayo Clin Proc**, 66: 743-51, 1991.
- BONTHRON, D.T.; HANDIN, R.I.; KOUMAN, R.J.; WASLEY, L.C.; ORR, D.C.; MITSOCK, A.M. et al. Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. **Nature**, 26270-26273, 1986.
- BOUMA, B.N.; WIEGERINCK, Y.; SIXMA, J.J.; VON MOURIK, J.A.; MOCHTAR, I.A. Immunological characterization of purified antihemophilic factor A (factor VIII) which corrects abnormal platelets retention in von Willebrand's disease. **Nature New Biol**, 236: 104-106, 1972.
- BOWEN, D.J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS 13. **J of Thromb and Haemost**, 1: 33-40, 2003.
- BRECHER, E.M.; CAMBS, R.M.; DREW, J.M.; GROSSMAN, J.B. American Association of Blood Banks. **AABB Technical Manual**. United States, 2003. 14th edition, p. 215-217.
- BUDDE, U.; SCHARF, R.E.; FRANKE, P.; HARTMANN-BUDDE, K.; DENT, J.; RUGGERI, Z.M. Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma. **Blood**, 82: 1749-1757, 1993.
- BURGET, R.; RUTTEN, L.; GERG, S.; KLUTER, H. Characterization of a novel O1 variant allele at the ABO blood group locus. **Tiss Antig**, 58: 422-424, 2001.
- CAEKEBEKE-PEERLINCK, K.M.J.; KOSTER, T.; BRIET, F. Bleeding time, blood groups and von Willebrand factor. **Br J Haematol**, 73: 217-220, 1989.
- CANN, J. A. **Maths from scratch for biologists**. Ed. Wiley, New York. 2003. p. 135-143.
- CARTRON, J.P. Étude des propriétés N-acetylgalactosaminyltransférases des sérums de subjects A et A faible. **Rev Franc Transfus Immuno-hémat**, 19: 67-88, 1976.
- CASTAMAN, G.; DINI, E.; RODEGHIERO, F. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand disease. **Blood**, 69: 454-459, 1987.
- CATTANEO, E.J.; ABSHIRE, T.C.; GIROUX, D.S.; TUCKER, E.L.; BROXON, E.H. Relative value of diagnostic studies for von Willebrand's disease. **Inter J of Pediatric Hematol/Oncology**, 1: 499-508, 1994.

- CHESTER, M.A; OLSSON, M.L. The ABO blood group gene – A locus of considerable genetic diversity. **Transf Med Rev**, in press.
- CLAUSEN, H.; WATANABE, K.; KANNAGARI, R.; LEVERUY, S.B.; NUDELMAN, E.; ARAO-TOMONO, Y.; HAKAMORI, S. Blood group A glycolipid (Ax) with globo-series structure which is specific for blood group A₁ erythrocytes: one of the chemical bases for A₁ and A₂ distinction. **Biochem Biophys Res Commun**, 124: 523-529, 1984.
- CLAUSEN, H.; LEVERUY, S.B.; NUDELMAN, E.; TSUCHIYAIA, A.S.; HAKAMORI, S. Repetitive A epitome (type 3 chain A) defined by blood group A₁ – specific monoclonal antibody TH – 1: chemical basis of quantitative A₁ e A₂ distinction. **Proc Natl Acad Sci USA**, 82:1199-1203, 1985.
- CLAUSEN, H.; LEVERUY, S.B.; NUDELMAN, E.; BALDWIN, M.; HAKAMORI, S. Further characterization for type 2 and 3 chain blood group glycosphingolipids from human erythrocyte membrane. **Biochem**, 25: 7075-7085, 1986.
- CLAUSEN, H.; HAKAMORI, S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotopes and their distribution. **Vox Sang**, 56: 1-20, 1989.
- CLAUSEN, H.; BENETTI, E.P.; DABELTEEN, E. Carbohydrates of the cell surface: Molecular aspects of. glycosyltransferases and their genes. **APMIS** 100, (suppl27):9, 1992.
- CCWAN, D.H. Platelet adherence to collagen: Role of prostaglandin-thromboxane synthesis. **Br J Haematol**, 49: 425, 1981.
- COONEY, K.; GINSBURG, D.; RUGGERI, Z.M. von Willebrand disease. In: LOSCALZP, J.; SCHAFER, A.I.(eds). **Thromb and hemorrh**, 657-682, 1993.
- COONEY, K.A.; GISNSBURG, D. Comparative analysis of type 2b von Willebrand disease mutations: Implications for the mechanism of von Willebrand factor binding to platelets. **Blood**, 87: 2322-2328, 1996.
- COON, M.R.; BAYER, W.L. A technique for von Willebrand multimer analysis applicable to the clinical laboratory. **J Clin Appl Thromb Haemost**, 1: 31-33, 1995.
- CREMER, E.M.; MEYER, D. le MENN, R.; BRETON-GORIUS, J. Eccentric localization of von Willebrand factor in a internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-palade bodies. **Blood**, 66: 710,1985.
- COWAN, D.H. Platelet adherence to collagen: Role of prostaglandin-thromboxane synthesis. **Br J Haematol**, 49: 42,1981.

- DALTON, R.G.; DEWAR, M.S.; SAVIDGE, G.F.; KERNOFF, P.B.; MATTEWUS, K.B.; GREAVES, M.; PRESTON, F.E. Hypothyroidism as a cause of acquired von Willebrand 's disease. **Lancet**, 1: 1007-1009, 1987.
- DANIELS, G.I. **Human blood groups**, Blackwell Scientific Ltd. Oxford, 1995. p. 210-212.
- DANIELS, G.I. Blood group terminology. **Transf Today**, 37: 10-12, 1998.
- DANEILS, G.L.; ANSTEE, D.J.; CARTRON, J.P.; DAHR, W.; GARRATTY, G.; HENRY, S., et al. Terminology for red cell surface antigens – ISBT working party Oslo report. International Society of Blood Transfusion. **Vox Sang**. 77: 52-57, 1999.
- DANIELS and members of the ISBT working party on terminology for red cell surface antigens. Reports and guidelines. **Vox Sang**, 8: 195-196, 2001.
- DOEDAN, J.A.; MEIJER, J.C.; SIXMA, J.J.; BOLMA, B.N. Inactivation of human factor VIII by activated protein. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. **J Clin Invest**, 82: 1236-1243, 1988.
- EKERT, H.; DOWLING, S.V.; MUNTZ, R.H.; SOUZA, S.D. Ristocetin in the diagnosis of von Willebrand's disease: A comparison of rate and percent of aggregation with levels of the plasma factor(s) necessary for ristocetin aggregation. **Thromb Diathes Haemorrh**, 34: 465-474, 1975.
- ERICK, M.E. **American Society Hematology** - Education program book. United States. 2003, p. 567-574.
- EWENSTEIN, B.M. von Willebrand's disease. **Annu Rev Med**, 48: 525-542, 1997.
- FEDERICI, A.B.; MANNUCCI, P.M.; BADER, R.; LOMBARDI, R.; LATTUADA, A.; COLIBRETTI, M.L.; DENT, J.A.; ZIMMERMAN, T.S. Type II Factor von Willebrand disease: New structural abnormality of plasma and platelet von Willebrand factor in patient with prolonged bleeding time and borderline levels of ristocetin cofactor activity. **Am J of Haematol**, 32: 287-293, 1989.
- FEDERICI, A.B.; DE GROOT, P.G.; MOIA, M.; IJSSELDIJK, M.W.; SIXMA, J.J.; MANNUCCI, P.M. Type a von Willebrand disease, subtype "platelet low": decreased platelet adhesion be explained by low synthesis of von Willebrand factor in endothelial cells. **Br J of Haematol**, 83: 88-93, 1993.
- FEDERICI, A.B. Diagnosis of von Willebrand's disease. **Haemoph**, 4: 654-660, 1998.

- FOSTER, P.; FULCHER, C.A.; MARTI, T.; TITANI, K.; ZIMMERMAN, T.S. A major factor VIII binding domain resides within amino-terminal 272 residues of von Willebrand factor. **J of Biol Chem**, 262: 8443-8446, 1987b.
- FRANCO, R.F.; SIMÕES, B.P.; GERREIRO, J.F.; SANTOS, E.B.S.; ZAGO, M.A. Molecular bases of the ABO blood group of indians from the Brazilian Amazon Region. **Vox Sang**, 67: 299-301, 1994.
- FRANCO, R.F.; SIMÕES, B.P.; ZAGO, M.A. Relative frequencies of the two O alleles of the histo-blood group ABH system in different racial groups. **Vox Sang**, 69: 50-52, 1995.
- FRESSINAUD, E.; SAKARIASSEN, R.S.; GIRMA, J.P.; MEYER, D.; BAUMGARTNER, H.R. Role of GPII/IIIa as well as GPIb in von Willebrand factor-mediated platelet adhesion to collagen. **Tromb Res Suppl**, 6: 138 (Abstr), 1986.
- FRESSINAUD, E.; FEDERICI, A.B.; CASTAMAN, G.; ROTHSCHILD, C.; RODEGHIERO, F.; BAUMGARTNER, H.R.; MANNUCCI, P.M.; MEYER, D. The role of platelet von Willebrand factor in platelet adhesion and thrombus formation: a study of 34 patients with various subtypes of type von Willebrand disease. **Br J of Haematol**, 86: 327-332, 1994.
- FURLAN, M.; ROBLES, R.; LAMMLE, B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. **Blood**, 87: 4223-4234, 1996.
- FURLONG, R.A.; CHESMON, J.; PEAKE, I.R. The combined use of monoclonal antibody – based enzyme – linked immunosorbent assays (ELISA) for factor VIII antigen (VIII – Ag) and von Willebrand factor antigen (Vwf:Ag) for the detection of carriers of hemophilia A. **Clin Lab Hematol**, 10: 295-305, 1988.
- GARRETA, M.; MULLER, A.; GENER, J.; MTTE, C.; MOULLEC, J. Reliability in automatic determination of the ABO blood by the groupomatic system. **Vox Sang**, 2: 141-155, 1974.
- GARRETA, M.; MULLER, A.; SALMON C. Fréquence réelle des phenotypes B faible. **Rev Franc Transf Immuno Hématol**. 21: 193-200, 1978.
- GIL, C.J.; BROOK, E.J.; BAUER, J.P.; MARKS, J.W.; MONTGOMERY, R.R. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. **Blood**, 69: 1691-1695, 1987.
- GINSBURG, D.; HANDIN, R.L.; BONTHRON, D.T.; DONON, T.A.; BRUNS, G.A.P.; LATT, A.S.; ORKIN, S.H. Human von Willebrand factor (vWF) : Isolation of

- complementary DNA clones and chromosomal localization . **Science**, 228: 1401, 1985.
- GINSBURG, D. Molecular genetics of von Willebrand disease. **Thromb and Haemost**, 82: 585-591, 1999.
 - GOODEVE, A.; WALKER, M.; PEAKE, I.; RODEGHIERO, F.; CASTAMN, G.; FEDERICI, A., et al. Contribution of ABO blood group to type I von Willebrand disease in patients with the multicentre MCMDM - I VWD study. **Blood**, 102: 91, 2003.
 - GOTO, S.; IKEDA, Y.; SALVADIVAR, E.; RUGGERI, Z.M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. **The American Society for Clinical Investigation, Inc**, 101: 479-486, 1997.
 - GRALNICK, H.R. von Willebrand factor interactions with platelets. **J Clin Invest**, 75: 19, 1984.
 - GRALNICK, H.R.; WILLIAMS, S.B.; MACKEOWN, L.P.; MAGRUDER, L.; HANSMANN, K.; VAIL, M.; PARKER, R.I. Platelet of von Willebrand factor. **Mayo Clin Proc**, 66: 634-640, 1991.
 - GRALNICK, H.R.; SADLER, J. A new classification for von Willebrand disease. **Blood**, 84: 676-679, 1994.
 - GRALNICK, H.R.; ROSENFELD, S.J. Adhesive interactions in hemostasis. **Acta Haematol**, 97: 118-125, 1997.
 - GREAVES, M.; MALIA, R.G.; WARD, A.M.; MOULT, J.; HOLT, C.M.; LINDSEY, N.; HUGHES, P.; GOODFIELD, M.; ROWELL, N.R. Elevated von Willebrand factor antigen in systemic sclerosis: relationship to visceral disease. **B J of Rheumat**, 27: 281-295, 1988.
 - GREENWELL, P.; WATKINS, W. Unpublished observation cited by Watkind. **Rev Franc Transf Immuno-Hémat**, 21: 201-228, 1978.
 - GROTH, C.G. Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. **Surgery**, 75: 725-733, 1974.
 - GRUNNET, N.; STEFFERSEN, R.; BENNET, E.P.; CLAUSEN, H. Evaluation of. histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: Frequency of a novel O allele defined as O². **Vox Sang**, 67: 210-215, 1994.
 - HANDA, M. The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. **J Biol Chem**, 261: 12579, 1986.
 - HARRISO, N.R.L.; MCKEE, P.A. Estrogen stimulates of von Willebrand factor production by cultured endothelial cells. **Blood**, 63: 657-665, 1984.

- HATA, Y.; KOMINATO, F.; YAMAMOTO, H.; TAKIZAWA, H. Characterization of the human ABO gene promoter in erythroid cell lineage. **Vox Sang**, 82: 39-46, 2001.
- HEIER, H.E.; NAMORK, E.; FALLETH, E. Study of immunogold labeled blood group A erythrocytes in the scanning electron microscope. **Eur J Haematol**, 41:17-24, 1988.
- HEIER, H.E.; NAMORK, E.; CALKOYSKA, Z.; SANDIN, R.; KORNSTAT, L. Expression of a antigens of erythrocytes of weak blood group A subgroups. **Vox Sang**, 66: 231-236, 1994.
- HIRONAKA, T.; KATOM, S.S.; MINAGA, T. The carbohydrate structures of blood coagulation factor VIII. **Tanpak Usgistsu Kakusan Koso**, 37(suppl 11) 1732-9, Review Japanese, 1992.
- HIRONAKA, T.; FURUKAWA, K.; ESMON, P.C.; FOURNEL, M.A.; SAWADA, S.; KATO, M.; MINAGA, T.; KOBATA, A. Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant baby hamster kidney cells. **J Biol Chem**. 267:8012, 1992.
- HOLBERG, L.; NILSSON, I.M. Von Willebrand disease. **Clin Haematol**, 14: 461-488, 1985.
- HOLMBERG, L.; NILSSON, I.M. von Willebrand's disease. **Eur J Haematol**, 48: 127-141, 1992.
- HOYER, I.W.; RIZZA, C.R.; TUDDENHAM, E.G.D.; CARTA, C.A.; ARMITAGE, H.; ROTBLAT, F. von Willebrand factor multimer patterns in von Willebrand's disease. **B J Haematol**, 55:, 493-507, 1983.
- HOWARD, M.; FIRKIN, B.G. Ristocetin A new tool in the investigataion of platelet aggregation. **Thromb Haemost**, 26:362-369, 1971.
- IMINNO, G. et al. The role of ADP secretion a tromboxane síntesis in factor VIII binding to platelets. **Blood**, 62: 186, 1983.
- INGERSLEV, J.A. Sensitive Elisa for von Willebrand factor (VWF:Ag). **Scand J Clin Lab Invest**, 47: 143-149, 1987.
- INGERSLEV, J. von Willebrand factor, factor VIII and factor VIII/von Willebrand factor. **Danish Medical Bulletin**, 37: 385-406, 1990.
- INGERSLEV, J.; GURSEL, T. Diagnosis of von Willebrand disease. **Haemoph**, 5(2): 50-60, 1999.
- JAFFE, E.A.; HOYER, L.W.; NACHAMAN, R.L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultures human endothelial cells. **J Clin Invest**, 60: 914-921, 1973.

- JURGENS, R., FORSUIS, H. Untersuchungen über die 'Konstitutionelle thrombopathie (v. Willebrand-Jurgens)' auf den **Alandsinseln Schweiz Med. Wschr**, 81: 1248-1253, 1951.
- KAMPHUISEN, W.P.; DUISTERMART, H.J.J.; HOWELINGEN, V.C.H.; EIKEBOON, J.C.J. Familial clustering of factor VIII von Willebrand factor levels. **Hemost and tromb**, 79:323-327,1998.
- KELLY, D.; TUDDENHAM, E.G.D.; SUMMERFIELD, J.A. The effect of an acute phase reaction on BCG inoculation on factor VIII in the guinea-pig. **Tromb Res**, 40: 445-451, 1985.
- KOA, K.J. Demonstration and characterization of specific binding sites of factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. **J Biol Chem**, 63: 656, 1979.
- KOEDAM, J.A.; MEIJERS, J.C.; SIXMA, J.J.; BOUMA, B.N. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. **J Clin Invest**. 82: 1236-1243, 1988.
- LANDSTAINER, K. Über agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Bluts. **Wien Klin Wochenschr**, 14:1132-1134, 1901.
- LAPIERRE, Y.; RIGAL, D.; ADAM, J.; JOSEF, D.; MEYER, F.; GREBER, S.; DROT, C. The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody reaction. **Transf**, 30:109-113, 1990.
- LENTING, P.J.; VON MOURIK, J.A.; MERTENS, K. The life cycle of factor VIII in view of its struture and function. **Blood**, 92: 3983-3996, 1998.
- LEYTE, A.; VOORBERG, J.; VON SCHIJNDEL, H.B.; DUIM, B.; PANNEKIEK, H.; VAN MOURIK, J.A. The pro-plypeptide of von Willebrand factor is required for the formation of a functional factor VIII-binding site on mature von Willebrand factor. **Biochem J**, 274: 257-261, 1991b.
- LEWIS, M.; KAITA, H.; GIBLETT, E.R.; ANDERSON, J.E. Genetic linkage analyses of chromosome 9 loci ABO and AKI. Cytogenet. **Cell Genet**, 22: 452, 1978.
- LIN-CHU, M.; BROADBERRY, R.; CHOU, P.N. The B₃ phenotype in Chinese. **Transf**. 126: 428-430, 1986.
- LIN-CHU, M.; BROADBERRY, R.; TSAI, S. Incidence of ABO subgroup in Chinese in Twain. **Transf**, 27: 114-115, 1987.
- LIN, PH.; LIN, TSAIS, J.; CHEM, J.M.; CHU, D.C. A unique 502 C>T mutation in exon 7 of ABO gene associated with the B_e phenotype in Taiwan. **Transf**. 43: 1254-1259, 2003.

- LOLLAR, P. The association of factor VIII with von Willebrand factor. **Mayo Clin Proc**, 66:524-534, 1191.
- LOPES, M.; BENALI, J.; CARTRON, J.P.; SALMON, C. Some notes on the specificity of. anti-A₁ reagents. **Vox Sang**, 39: 271-276, 1980.
- LOWE, J.B. Biochemistry and biosynthesis of ABH and lewis antigen in: **Blood Cell Biochem**, (CARTON, J.P & ROUGE, P. eds), 73-115, Plenum Press, New York, 1996.
- LUTZ, P.; DZIK, W.H. Molecular biology of red cell blood group genes. **Transf**, 32: 467-483, 1992.
- MACFARLANE, D.E. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). **Thromb Diathes Haemorrh**, 34: 306-308, 1975.
- MACFARLANE, D.E.; STIBBE, J.; KIRBY, E.P.; TUCKER, M.;B, GRANT, R.A .; MCPHERSON, J. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofator). **Thromb Diath Haemorrh**, 34: 306, 1976.
- MANCUSO, D.J.; TULEY, E.A.; WESTFIELD, L.A.; WORRALL, N.K .; SHELTON-INLOES, B.B.; SORAGE, J.M.; ALEYY, Y.G.; SADLER, J.E. Structure of. the gene for human von Willebrand factor . **J of Biol Chem**, 264: 19514-19527, 1989.
- MANCUSO, D.J.; TULEY, E. A.; WESTFIELD, L.A.; LESTER-MANCUSO, T.L.; LE BEAU, M.M.; SORACE, J.M, SADLER, J.E. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. **Biochem**, 30: 253-269, 1991.
- MANNUCCI, P.M.; FEDERICI, A.B. Diagnosis and managemente of von Willebrand disease. **Haemoph**, 5: 28-37, 1989.
- MANNUCCI, P.M.; FEDERICI, A.B. Diagnosis and managemente of von Willebrand disease. **Haemoph**, 5: 28-39, 1999.
- MARCUS, D.M. The ABO and Lewis blood group system. Immunochemistry, geneticts and relation to human disease. **N Engl J Med**, 280: 994-999, 1969.
- MATSUI, T.; TITANI, k.; MIZUOCHI T. Structures of the asparagin-linked oligosaccharide chans of human von Willebrand factor. **J Biol Chem**. 267: 8723-8731, 1992.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; NISHIDA, S.; TITANI, K. Human plasma alfa2 macroglobulin and von Willebrand factor possess covalently kinked ABO (H) bolld group antigens in subjects with corresponding ABO phenotype. **Blood**. 82: 663-68, 1993.

- MATSUI, T.; SHIMOYAMA, T.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y.; TAKEMOTO Y.; SAKON.; HAMAKO, J. T. ABO blood group antigens on human plasma von Willebrand factor after ABO – mismatched bone marrow transplantation. **Blood**, 94: 2895-2900, 1999.
- MAZZINI, J. **Determinação da prevalência numa população brasileira. Estudo molecular-determinação da frequência alélica de 3 VNTRs no íntron 40 do gene do Fator de von Willebrand.** Campinas 1999 (tese-mestrado- Universidade Estadual de Campinas).
- MAZURIER, C.; DIÉVAL, J.; JORIEUX, S.; DELOBEL, J.; GOUDEMAND, M. 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, 1990.
- MEYER, D.; FRESSINAUD, E.; GAUCHER, C.; LAVERGNE, J.M.; HILBERT, L.; RIBBA, A.S.; JORIEUX, C.M.; MAZURIER, C. Gene defects in 150 unrelated french cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. **Thromb and Haemost**, 78(1): 451-456, 1997.
- MIFSUD, N.A.; HADDAD, A.P.; CONDON, J.A.; SPARROW, R.L. ABO genotyping – identification of. O¹, O^{1v}, and O² alleles using the polymerase chain reaction – sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO). **Technique Immunoh**, 12(4): 149-153, 1996.
- MILLER, C.H.; HAFF, E.; PLATT, S.J.; RAWLINS, C.D.; DILLEY, ^aB.; EVATT, B. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. **J Thromb and Haemost**. 10: 2191-2197, 2003.
- MOHANTY, D.; GHOSH, K.; MARWAHA, N.; KAUR, S.; QUAUAN, AP.; DAS, K.C. Mayor blood group antigens- A determinant of factor VIII levels in blood? **Thromb and Haemost**, 51: 414, 1984.
- MOHRI, H.; YOSHIOKA, A.; ZIMMERMAN, T.S.I.; RUGGERI, Z.M. Isolation of the von Willebrand factor domain interactin with platelet glycoprotein Ib, heparin and collagen and characterization of its three distinct functional sites. **J of Biol Chem**, 264: 17361-17367, 1989.
- MOHLKE, K.L.; NICHOL, C.W.; WESTRICK, J.R.; NOVAK, K.E.; COONEY, A.K.; SWANK, T.R. et al. A novel modifier gene for plasma von Willebrand factor level maps to distal mouse chromosome 11. **Medic Scienc**, 93: 15352-15357, 1996.
- MOHLKE, K.L.; PURKAYASTHA, A.A.; WESTRIK, R.J.; GINSBURG, D. Comparative mapping of distal murine chromossome 11 and human 17q21.3 in a

region containing a modifying locus for murine plasma von Willebrand factor level. **Genomics**, 54: 19-30, 1998.

- MOHLKE, L.K.; PURKAYASTHA, A.A.; WESTRIK, R.J.; SMITH, P.L.; PETYNIK, B.; LOWE, J.B.; GINSBURG, D. Mwf, a dominant modifier of murine von Willebrand factor, results from altered lineage-specific expression of a glycosyltransferase. **Cell**, 96: 111-120, 1999.
- MONTGOMERY, R.; KRONER, A.P.; FOSTER, P.A.; FAHS, S.A. The defective interaction between von Willebrand factor and FVIII in a patients with type 1 von Willebrand is caused by substitution of Arg 19, and his 54 in mature von Willebrand factor. **Thromb And Haemost**, 87: 1013-1021, 1996.
- MORGAN, W.T.J. A contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of. blood group specificity. **Proc Roy Soc B**, 151: 308-347, 1960.
- NACHMAN, R.; LEVINE, R.; JAFFE, E.A.. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea-pig megacaryocytes. **J of Clin Invest**, 60: 914-921, 1977.
- NAKAMUTA, I.; TAKIZAWA, H.; NISHINO, K. A₃ phenotype with A₁ gene-specified enzyme character in serum. **Exp Clin Immunogenet**, 6:143-149, 1989.
- NICHOLS, W.C.; GINSBURG, D. Reviews in molecular medicine von Willebrand disease. Medicine. Eds. **Williams & Wilkins U.S.A.**, 76(1): 1-20, 1997.
- NILSON, I. M.; BLOMBACK, M.; VON FRANCKEN, I. On a inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. **Acta Med Scand**, 159: 35-37, 1957.
- NILSSON, J.M.; KIRKWOOD, T.B.L.; BARROWOLIFFE, T.W. In vivo recovery of factor VIII: a comparison of one-stage and two-stage assay methods. **Thromb and Haemost**, 42: 1230-1239, 1979.
- O'DONNELL, J.; LAFFAN, M.A. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. **Transf Med**, 11: 343-351, 2001.
- O'DONNELL, J.; BOUTON, E.F.; MAMNING, A.R.; LAFFAN, A.M. Amount of H antigen expressed on circulation of von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. **Arterios Thromb Vasc Biol**, 22: 335-341, 2002.
- O'DONNELL, J.; LAFFAN, A.M. Dissociation of ABO antigen expression from von Willebrand factor synthesis in endothelial cell lines. **Br J of Haematol**, 121: 928-931, 2003.
- OGASSAWARA, K.; YABE, R.; UCHIKAWA, M.; SAITOU, N.; BANNAI, M.; NAKATAK.; TAKENAKA, M.; FUJISAWA, K.; ISHIKAWA, Y.; JUJI, T.; TOKUNAGA,

- K. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. **Blood**, 88: 2732-2737, 1996.
- OGASAWARA, K.; YABE, R.; UCHIKAWA, M.; SAOTPI, N.; BANNAI, M.; NAKATA, K. et al. Molecular genetics analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. **Blood**, 88: 2732-2737, 1996a
 - OGASSAWARA, K.; YABE, R.; UCHIKAWA, M.; SAITOU, N.; BANNAI, M.; NAKATA, K.; TAKENAKA, M.; FUJISAWA, K.; UCHIKAWA, M.; ISHIKAWA, Y., JUJI, T.; TOKUNAGA, K. Extensive polymorphism of. ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. **Hum Genet**, 97: 777-783, 1996.
 - OGASAWARA, K.; YABE, R.; UCHIKAWA, M.; BANNAI, M.; NAKATA, K.; TAKENAKA, M. et al. Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group. **Vox Sang**, 74:242-247, 1998.
 - OGASAWARA, K.; YABE, R.; UCHIKAWA, M.; NAKATA, K.; WATANABLE, J.; TAKAHASHI, Y. et al. Recombination and gene conversion – like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes. **Immunog**, 53: 190-199, 2001.
 - OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A.. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O1 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. **Vox Sang**, 69: 242-247, 1995.
 - OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. Polymorphism at the ABO locus in subgroup A individuals. **Transf**, 36: 309-313, 1996.
 - OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. Frequent occurrence of a variant O₁ allele at the blood group ABO locus. **Vox Sang**, 70:26-30, 1996a.
 - OLSSON, M.; CHESTER, M. Frequent occurrence of a variant O¹ gene at the blood group ABO locus. **Vox Sang**, 70: 26-30, 1996b.
 - OLSSON, M.L.; CHESTER, M. A.. Evidence for new types of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A₂ nucleotide deletion and the A₆₁ NUCLEOTIDE INSERTION. **Vox Sang**, 71:113-117, 1996c.
 - OLSSON, M.L.; GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.; CHESTER, M.A. . Molecular analysis of the O alleles at the blood group ABO locus in populations of different ethnic origin reveals novel crossing-over events and point mutations. **Biochem at Biophys Res Communic**, 234: 779-782, 1997.

- OLSSON, M.L.; CHESTER, M. Heterogeneity of the blood group Ax allele: Genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. **Transf Med**, 8: 231-238, 1998.
- OLSSON, M.L.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.; CHESTER, M.A. Heterogeneity of the O alleles at the blood group ABO locus in amerindians. **Vox Sang**, 74: 46-50, 1998.
- OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. **Transf Med**, 11: 295-313, 2001.
- OLSSON, M.L.; IRSHAD, M.N.; HOSSEINI-MAAF, B.; HELLBERG, A.; MOULDS, K.M.; SARENEVA, H.; CHESTER, A.M. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Transf Med**, 98: 1585, 2001.
- ORIOL, R. ABH and related tissue antigens. **Biochem Soc Trans**, 15: 596-599, 1987.
- ORSTAVIK, K.H.; MAGNUS, P.; REISNER, H.; BERG, K.; GRAHAM, J.B.; 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 Genet**, 37: 89-101, 1985.
- ORSTAVIK, K.H.; KORNSTAD, L.; REISNER, H.; BERG, K. Possible effect of secretor locus on plasma concentration of factor VIII and von Willebrand factor. **Blood**, 73: 990-993, 1989.
- PARKER, R.I.; GRALNICK, H.R. Identification of platelet glycoprotein IIb/IIIa as major binding site for released platelet von Willebrand factor. **Blood**, 68: 732, 1986.
- PAULSON, J.C.; WEISTEIN, J.; SCHAUER, A. Tissue-specific expression of sialyltransferase. **J Biol Chem**, 264: 10931-10934, 1989.
- PIETU, G. et al. Binding of human von Willebrand factor to collagen and to collagen-stimulated platelets. **J Clin Med**, 109: 637, 1987.
- PRESTON, A.E.; BARR, A. The plasma concentration of factor VIII in the normal population. **Br J of Haematol**, 10: 238-245, 1964.
- READ, M.S.; SMITH, S.V.; LAMB, M.A.; BRINKHOUS, K.M. Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. **Blood**, 74: 1031-1035, 1989.
- REED, T. The frequency and nature of blood group A₃. **Transf**, 4: 457-460, 1964.
- REYES, F.; LEJONC, J.L.; GORDIN, M.F.; LEJONC, J.L.; CARTRON, J.P.; DREYFUS, B. The heterogeneity of erythrocyte antigens distribution on human

normal phenotypes: An immunoelectron microscopy study. **Br J Haematol**, 34: 613-662, 1976.

- ROBERT, W.; COLMAN.; HIRSH, H.; VICTOR, J.; MARDER.; SALZMAN, E.W. Basic principles and clinical practice, Third edition. **Hemost and Thomb**, 1994.
- RODEGHIERO, F.; CASTAMAN, G. The von Willebrand factor. **Res Clin Lab**, 20: 143-153, 1990.
- ROSENBERG, J.B.; GREENGARD, J.S.; MONTGOMERY, R.R. Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells. **Arteriosc Thromb and Vasc Biol**, 20: 2689-2695, 2000.
- ROUBINET, F.; KERMARREC, N.; DESPIAU, S.; APOIL, P.A.; DUGOUJON, M.J.; BLANCHER. A Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins. **Immunog**, 53: 95-104, 2001.
- ROUGER, P.; SALMON, C. Le group sanguin ABO et le groupage ABO. In: **La pratique des groups et groupes érythrocytaires**. Masson. Paris, 1981. P. 37-57, 1981.
- RUGGERI, Z.M.; ZIMMERMAN, T.S.; Platelets and von Willebrand disease. **Semin Hematol**, 22: 203, 1985.
- RUGGERI, Z.M.; ZIMMERMAN, T.S. von Willebrand factor and von Willebrand disease. **Blood**, 70: 895-904, 1987.
- RUGGERI, Z.M and ZIMMERMAN, T.S. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. **Blood**, 57: 1140-1143, 1992.
- RUGGERI, Z.M. Cell adhesion in vascular biology von Willebrand factor. **J Clin Invest**, 99: 559, 1997.
- SADLER, P.J.; BARONDES, S.H. Platelet-collagen adhesion: Evidence for participation of antigenically distinct entities. **J Cell Biol**, 99: 2084, 1984.
- SADLER, J.E.; GRALNICK, J.R. Commentary: A New classification of von Willebrand disease. **Blood**, 84: 676-679, 1994.
- SADLER, J.E.; MANNUCCI, P.M.; BERNTORP, E.; BOCHKOV, N.; BOULYJENKOV, V.; GINSBRUG, D.; MEYER, D.; PEAKE, I.; RODEHIERO, F.; SRIVASTAVA, A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. **Tromb Haemost**, 84: 160-174, 2000.
- SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALLONA, F.; MULLIS, K. HORNG, T.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickel cell anemia. **Science**, 230:1350-1354, 1985.

- SALMON, S.; SALMON, D.; REVIRON, J. Étude immunologique et génétique de la variabilité du phénotype Ax, Nov. Ver. **Fran Hémat**, 5: 275-290, 1965.
- SALMON, S. Les phénotypes B faibles B₃, B_x, B_{el} classification pratique proposée. **Rev Franc Transf Immuno Hématol**. 19: 89-104, 1976.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Isolation of DNA from mammalian cells In: **Molecular cloning** - A Laboratory Manual – 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANGER, F.; COUSON, A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed syntheses with DNA polymerase. **J Mol Biol**, 94: 441, 1975.
- SANTORO, S.A. Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen. **Biophys Acta**, 756: 123, 1983.
- SARODE, R.; GOLDSTEIN, J.; SUSSMAN, I.I.; NAGEL, L.R.; TSAI, H. Role of A and B blood group antigens in the expression of adhesive activity of von Willebrand factor. **Br J Haematol**, 109: 857-858, 2000.
- SCHULMAN, S.; BERNTORP, E.; INGERSLEV, J. VON Willebrand disease an update in the Aland Islands. **Hemoph**, 5(2): 1-6, 1999.
- SCHWARZ, H.P.; TURECEK, P.L.; PICHELER, L.; MITTERER, A.; MUNDT, W.; DORNER, F.; ROUSSI, J. and DROUET, L. Recombinant von Willebrand factor. **Thromb and Haemost**, 78(1): 571-576, 1997.
- SCOTT, J.P.; GILL, J.C.; ROCK, A.; LEVINE, S.; VOKAC, E.A; MONTGOMERY, R.R. The effect of ABO type on synthesis, release and platelet binding of von Willebrand factor. **Thromb and Haemost**, 69: 946, 1993.
- SELTSAM, A.; HALLENSLEBEN, M.; KOLLMANN, A.; BLASCZYK, R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. **Blood**. 102: 3035-3042, 2003.
- SHIMA, M.; FUJIMURA, Y.; NISHIYAMA, T.; TSUJIIUCHI, T.; NARITA, N.; MATSUI, T.; TITANI, K.; KATAYAMA, M.; YAMAMOTO, F.; YOSHIOKA, A. ABO blood genotype and plasma von Willebrand factor in normal individual. **Vox Sang**, 68: 236-240, 1995.
- SIXMA, J.; GIRMA, J.P.; MAYER, D.; WERWEIG, C.L.; DANNERKOCK, H. Structure-function relationship of human von Willebrand factor. **Blood**, 70:605-611, 1987.
- SIXMA, J.J.; DECKMYN, H.; HUIZINGA, E.G.; VAUTERIN, S.; VANHOORELBEKE, K.; PLAS, R.M.; VAMDECASTEEL, G. Sequence alignment between VWF and peptides inhibiting the VWF – collagen interaction of collagen binding site in VWF. **Thromb and Haemost**. 84: 621-625, 2000.

- SMITH, P.L.; LOWE, J.B. Molecular cloning of a murine N-acetylgalactosamine transferase cDNA that determines expression of the T lymphocyte-specific CT oligosaccharide differentiation antigen. **J Biol Chem**, 269: 15162-15171, 1994.
- SODETZ, J.; PIZZO, S.V.; MCKEE, P.A. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of factor VIII/von Willebrand factor. **J of Biol Chem**, 252: 5538-5546, 1977.
- SOUTO, J.C.; ALMASY, L.; MUNIZ-DIAZ, E.; SORIA, J.M.; BORRELL, M.; BAYERN, L.; MATEO, J.; MADOZ, P.; STONE, W.; BLANGERO, J.; FONTCUBERTA, J. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. **Arterioscler Thromb and Vasc Biol**, 20: 2024-2028, 2000.
- SPORN, L.A.; CHAVINS, S.I.; MARDER, V.Z.; WAGNER, D.D. Biosynthesis of von Willebrand and protein by human megakaryocytes. **J Clin Invest**, 76: 1102-1106, 1985.
- SPRINGER-VERLAG. Von Willebrand disease. **Eur J Pediatr**. 155: 751-752
- SUZUKI, K.; IWATA, M.; TSUJI, H.; TAKAGI, T.; TAMURA, A.; ISHIMOTO, G.; SHIGENORI, I.; MATSUI, K.; MIYAZAKI, T. A of new recombination in the ABO blood group gene and evidence for the occurrence of recombination products. **Hum Genet**, 99: 544-461, 1997.
- SWEENEY, J. D.; HOERNIG, L.A. Intraplatelet von Willebrand factor and ABO blood group. **Thromb Researc**, 68: 393-398, 1992.
- THOMAS, B.W.; GEOFFERI, F.S.; BLOMBACK, M.; WERCHELL, B. Influence of age and blood groups on 15 blood coagulation laboratory variables in reference material composed of 80 blood donors. **Vox Sang**, 39: 301-308, 1980.
- TOOLE, J.J.; KNOPF, J.L.; WOZNEY, J.M.; SULTZMAN, L.A.O.; BUECKER, J.L.; PITTMAN, D.D.; KAUFMAN, R.J.; BROWN, E.; SHOEMAKER, C.; ORR, E.C. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. **Nature**, 312: 342-347, 1984.
- TRIPLETT, D.A.; HARMS, C.S. Prothrombin time, in: Triplett, D.A. and Harms, C.S.: Procedures for the coagulation laboratory. Chicago, **Educational Products Division American Society of Clinical Pathologists**, P. 6-9; 12-14; 20-21, 1981.
- TSAI, H.M.; NAGEL, R.L.; HATCHER, V.B.; SUSSMAN II. Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. **Blood**, 73: 2074, 1989.

- TITANI, K.; KUMAR, S.; ERICSON, L.H.; WADE, R.D.; ASHIDA, K.; WALSH, K.A.; CHOPEK, M.W.; SADLER, L.E.; FUJIKAWA, K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. **Biochem**, 25: 3171-3184, 1986.
- VAN CONG, N.; WEIL, D.; FINAZ, C.; COCHET, C.; REBOURCET, R. De GROUCHY, J.; FREZAL, J. Assignment of the ABO – Np – AKI linkage group to chromosome 9 in man-hamster hybrids. **Cytog Cell Genet**, 16:241, 1976.
- VAN MOURIK, J.A. MOCHTAR, I.A. Purification of human antihemophilic factor (factor VIII) by gel chromatography. **Biochim Biophys Acta**, 221: 677-679, 1970.
- VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiol**, 3: 97-130, 1993.
- VEহার, G.A.; KEYT, B.; EATON, D.; RODRIGUEZ, H.; O'BRIEN, D.P.; ROTBLAT, R.; OPPERMAN, H.; KECK, R.; NOOD, W.I.; HARKINS, R.N. Structure of human factor VIII. **Nature**, 312: 337-342, 1984.
- VENGELEN-TYLER, V. American association of blood banks. Technical manual 12th edition, 1996.
- VENGELEN-TYLER, V. American association of blood banks. Technical manual 13th edition, 1999.
- VLOT, A.J.; KOPPELMAN, S.J.; MEIJERS, J.C.; DAMA, C.; van den BERG, H.M.; BOUMA, B.N.; SIXMA, J.J.; WILLEMS, G.M. Kinetics of factor VIII von Willebrand factor association. **Blood**, 87: 1809-1816, 1996.
- VLOT, A.J.; KOPPELMAN, S.J.; BOUMA, B.N.; SIXMA, J.J. Factor VIII and von Willebrand factor. **Thromb and Haemost**, 79: 456-465, 1998.
- VON WILLEBRAND, E.A. Über Hereditär Pseudohaemophilie. **Acta Med. Scand**, 67:521-550, 1931.
- XIE, L.; CHESTERMAN, C.N.; HOGG, P.J. Reduction of von Willebrand factor by endothelial cells. **Thromb Haemost**, 84: 506-513, 2000.
- WATKINS, W.M.; MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in serum by simple sugars. **Nature**, 169: 825-826, 1952.
- WATKINS, W.M. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. **Adv. Human Genet**, 10: 1-136, 1980.
- WEINER, E.; BROXSON, E.H.; TUCKER, E.L.; GIROUS, D.S.; SHULTS, J. ABSHIRE, T.C. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multimeric study. **J Ped**, 123: 893-898, 1993.
- WEISS, H.J.; HAIWIGER, J.; RUGGERI, Z.M.; TURRITTO, V.T.; HOFFMAN, T. 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), 1987.
- WERNER, E.J.; ABSHIRE, T.C.; GIROUX, D.S.; TUCKER, E.L.; BROXON, E.H. Relative value of diagnostic studies for von Willebrand disease. **J Ped**, 121: 34-38, 1992.
 - WESTERVELD, A.; JONGSMA, A.P.; MEERA.; KHAN, P.; VAN SOMEREM, H. Assignment of the AK1: NP: ABO linkage group to human chromosome 9. **Proc Ntl Acad Sci USA**. 73(3): 895-899, 1976.
 - WILLEBRAND, E.A.von. Uber Hereditar Pseudohaemophilie. **Acta Med Scand**, 67:521-550, 1931.
 - YAMAMOTO, F. Cloning the ABH genes. **Transf**, 30: 671-672, 1990.
 - YAMAMOTO, F.; MARKEN, J.; TSUJI, T.; WHITE, T.; CLAUSEN, H.; HAKOMORI, S. Cloning and characterization of. DNA complementary to human UDP- GalNAc: Fucalpa 1-2 Galalpha 1-3 GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA.. **J Biol Chem**, 265: 1146-1151, 1990a.
 - YAMAMOTO, F.; CLAUSEN, H.; WHITE, T.; MARKEN, J.; HAKOMORI, S. Molecular genetics basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**, 345: 229-233, 1990b.
 - YAMAMOTO, F.; MCNEILL, P.D.; HAKOMORI, S. Human histo-blood group A₂ allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. **Biochem Biophys Res Commun**, 187:366-374, 1992.
 - YAMAMOTO, F.; MCNEILL, P.D.; YAMAMOTO, M. et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3 A_x and B_a alleles. **Vox Sang**, 64: 171-174, 1993.
 - YAMAMOTO, F.; MCNEIL, P.D.; YAMAMOTO, M.; HAKOMORI, S.; HARRIS, T.; JUDD, W.J. DAVENPORT, R.D. Molecular genetic analyses of the ABO blood group system: 1.Weak subgroups: A₃ and B₃ alleles. **Vox Sang**, 64: 116-119, 1993a.
 - YAMAMOTO, F.; MCNEIL, P.D.; YAMAMOTO, M.; HAKOMORI, S.; HARRIS, T. Molecular genetic analysis of them ABO blood group system: 3. A_x and B_(A) alleles. **Vox Sang**, 64: 71-174, 1993b.
 - YAMAMOTO, F.; MCNEILL, P.D.; YAMAMOTO, M.; HAKOMORI, S.; BROMILOW, I.M.; DUGUID, J.K.M. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of. O allele. **Vox Sang**, 64: 175-178, 1993c.

- YAMAMOTO, F.; MCNEILL, P.D.; YAMAMOTO, M.; HAKOMORI, S.; BROMILOW, I.M.; DUGUID, J.K.M. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: Another type of. O allele. **Vox Sang**, 64: 175-178, 1993d.
- YAMAMOTO, F. Molecular genetics of the ABO histo-blood system. **Vox Sang**, 69: 1-7, 1994.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S (1995) Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. **Glicobiol**, 5: 51-58, 1995.
- YAMAMOTO, K.; WAARD, V.; FEARNES, C. LOSKUTOFF, J.D. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expressive in vivo. **Blood**, 9: 2791-2801. 1998.
- YAMAMOTO, Y.; HATA, H.; TAKIZAWA, H.; TSUCHIYA, T.; TSUKADA, J.; YAMAMOTO, F. Expression of human histo-blood group ABO gene is dependent upon DNA methylation of the promoter region. **J Biol Chem**, 274: 37240-37250, 1999.
- YAMAMOTO, F. Molecular genetcs of. ABO. **Vox Sang**, 78 (supl 2):91, 2000.
- YIP, P.S. Single – tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. **Blood**, 95: 1487-1492, 2000.
- YIP, P.S. Sequence variation at the human ABO locus. **Ann Hum Genet**, 4: 1490-1492, 2002.
- YOSHIDA, A.; YAMAMOTO, K.; DAVE, V.; YAMAGUCHI, H.; OKUBO, Y. A case of weak blood group B expression (B_m) associated with abnormal blood group galactosyltransferase. **Blood**. 2: 3, 1982.
- YU, L.C.; TWU, C.Y.; CHOU, L.M.; CHANG, Y.C.; WU, Y.C.; LIN, MARIE. Molecular genetic analysis for the B_3 allele. **Blood**, 100: 1490-1492, 2002.
- ZACHARSKI, L.R; ROSENSTEIN, R. Standardization of. the one-stage assay for factor VIII (antihemophilic factor). **Am J Clin Pathol**. 70: 280-286, 1978.
- ZAGO, M.A.; TAVELLA, M.H.; SIMÕES, B.P.; FRANCO, R.F.; SANTOS, B. Racial heterogeneity of. DNA polymorphisms linked to the A and the O alleles of the ABO blood group gene. **Ann Hum Genet**, 60: 67-72, 1996.
- ZALESKI, A.; HENRIKSEN, R.A. Visualization of multimeric structureof von Willebrand factor using a peroxidase - conjugated second antibody. **J Lab Clin Med**, 107: 172-175, 1986.
- ZHANG, Z.P.; BLOMBACK, M.; NYMAN, D.; ANVRET, M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Aland Islands. **Proc Nati Acad Sci, usa (GENETICS)**, 90: 7937-7940, 1993.

- ZIMMERMAN, T.S.; RATNOFF, O.D.; POWELL, A.E. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. **J Clin Invest**, 50: 244-254, 1971.
- ZIMMERMAN, T.S.; RUGGERI, Z.M. Von Willebrand's disease in the Aland Islands. **Proc Natl Acad Sci**, 6: 203-236, 1982.
- ZIMMERMAN, T.S.; RUGGERI, Z.M. von Willebrand factor and von Willebrand disease. **Blood**, 70: 895-904, 1987.

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO

Data ____/____/____

Cadastro Nº do doador

Nome _____ fone _____

Idade _____ data de nascimento ____/____/____ tipo sanguíneo: _____

Cor: Caucasóide

 Negróide

 Amarelo

 Índio

Descendência:

Avós paternos _____ Avós maternos _____

Hemostasia:

Equimoses:

Fica com marcas mesmo sem batidas: _____

Extração de dentária _____

Epistaxe: _____

Frequência: _____

Gengivorragia: _____

Cirurgia: _____

Necessitou transfusão: _____

História de sangramento na família:

Filhos _____

Irmãos _____

Pais _____

Tios _____

Está fazendo uso de algum medicamento: _____

Sofre de algumas destas doenças:

Diabetes

Hipertensão

Infarto

Derrame

Outras _____

ANEXO 2

Eu, _____ concordo em participar do Projeto de Pesquisa para o estudo dos polimorfismos do gene ABO com os níveis circulantes do antígeno do Fator de von Willebrand, Cofator da Ristocetina e Fator VIII.

Campinas, _____ de _____ 200 ____.

ANEXO 3

Resultado sorológico e molecular do FVW:Ag, FVIII:C e RCo nos grupos e subgrupos sanguíneos em 122 doadores selecionados.

Nr do Doador	Resultado Sorológico	Resultado Molecular	Dosagens		
			VWF:Ag	FVIII:C	RCo
1	A	AA	180%	90%	130%
2	A	AA	74%	98%	105%
3	A	AA	120%	115%	91%
4	A	AA	108%	100%	98%
5	A	AA	120%	144%	130%
6	A	AA	208%	140%	128%
7	A	AA	190%	92%	115%
8	A	AA	120%	98%	141%
9	A	AA	110%	130%	142%
10	A	AA	80%	64%	71%
11	A	AO	70%	91%	79%
12	A	AO	92%	80%	124%
13	A	AO	60%	80%	57%
14	A	AO	110%	91%	110%
15	A	AO	130%	144%	120%
16	A	AO	73%	95%	85%
17	A	AO	82%	87%	76%
18	A	AO	73%	50%	76%
19	A	AO	81%	85%	60%
20	A	AO	85%	98%	77%
21	B	BB	155%	147%	128%
22	B	BB	120%	120%	98%
23	B	BB	110%	98%	115%
24	B	BB	130%	105%	125%
25	B	BB	145%	100%	116%
26	B	BB	160%	155%	155%
27	B	BB	108%	120%	110%
28	B	BB	120%	98%	112%
29	B	BB	110%	94%	132%
30	B	BB	133%	110%	119%
31	B	BO	60%	70%	80%
32	B	BO	110%	133%	150%
33	B	BO	78%	91%	78%
34	B	BO	66%	55%	98%
35	B	BO	80%	62%	93%
36	B	BO	100%	143%	176%

37	B	BO	78%	85%	75%
38	B	BO	89%	92%	90%
39	B	BO	150%	147%	103%
40	B	BO	60%	70%	88%
41	AB	AB	125%	150%	160%
42	AB	AB	80%	147%	110%
43	AB	AB	100%	136%	110%
44	AB	AB	90%	100%	105%
45	AB	AB	92%	90%	100%
46	AB	AB	112%	180%	135%
47	AB	AB	205%	180%	130%
48	AB	AB	160%	127%	120%
49	AB	AB	92%	135%	139%
50	AB	AB	120%	155%	139%
51	O	O^1O^1	55%	50%	50%
52	O	O^1O^1	50%	86%	65%
53	O	O^1O^1	86%	99%	25%
54	O	O^1O^1	65%	79%	45%
55	O	O^1O^1	70%	61%	58%
56	O	O^1O^1	82%	70%	46%
57	O	O^1O^1	40%	45%	65%
58	O	O^1O^1	78%	84%	98%
59	O	O^1O^1	55%	62%	78%
60	O	O^1O^1	80%	75%	82%
61	O	O^1O^{1V}	80%	92%	78%
62	O	O^1O^{1V}	99%	85%	74%
63	O	O^1O^{1V}	88%	98%	82%
64	O	O^1O^{1V}	62%	78%	70%
65	O	O^1O^{1V}	95%	100%	80%
66	O	O^1O^{1V}	55%	72%	62%
67	O	O^1O^{1V}	85%	91%	120%
68	O	O^1O^{1V}	92%	78%	65%
69	O	O^1O^{1V}	68%	75%	70%
70	O	O^1O^{1V}	88%	79%	63%
71	O	O^1O^2	99%	143%	86%
72	O	O^1O^2	95%	100%	88%
73	O	O^1O^2	62%	59%	58%
74	O	O^1O^2	55%	76%	72%
75	A_2	A^2O	58%	105%	85%
76	A_2	A^2O	88%	110%	95%
77	A_2	A^2O	85%	70%	103%
78	A_2	A^2O	95%	70%	75%
79	A_2	A^2O	58%	80%	124%
80	A_2	A^2O	56%	97%	88%
81	A_2	A^2O	92%	70%	120%
82	A_2	A^2O	67%	75%	75%

83	A ₂	A ² O	60%	50%	62%
84	A ₂	A ² O	100%	101%	114%
85	A ₂	A ² O	95%	103%	100%
86	A ₂	A ² O	105%	98%	100%
87	A ₂	A ² O	110%	130%	98%
88	A ₂	A ² O	133%	98%	152%
89	A ₂	A ² O	90%	99%	116%
90	A ₂	A ² O	78%	90%	88%
91	A ₂	A ² O	85%	110%	84%
82	A ₂	A ² O	100%	95%	120%
93	A _X	A ² O	95%	87%	110%
94	A _X	A ² O	78%	68%	91%
95	A ₂ B	A ² B	92%	110%	88%
96	A ₂ B	A ² B	150%	200%	160%
97	A ₂ B	A ² B	215%	210%	110%
98	A ₂ B	A ² B	96%	110%	253%
99	A ₂ B	A ² B	210%	103%	181%
100	A ₂ B	A ² B	220%	207%	151%
101	A ₂ B	A ² B	210%	109%	115%
102	A ₂ B	A ² B	188%	166%	110%
103	A ₂ B	A ² B	220%	180%	209%
104	A ₂ B	A ² B	196%	117%	110%
105	A ₂ B	A ² B	105%	98%	140%
106	A ₂ B	A ² B	158%	108%	97%
107	A ₂ B	A ² B	98%	100%	77%
108	A ₂ B	A ² B	100%	98%	110%
109	A ₂ B	A ² B	150%	113%	140%
110	A ₃ B	A ² B	196%	117%	160%
111	A ₃ B	A ² B	250%	181%	160%
112	A ₃ B	A ² B	180%	111%	130%
113	A _X B	A ² B	128%	113%	120%
114	A _X B	A ² B	120%	109%	135%
115	A ₃	A ³ O	85%	96%	65%
116	A ₃	A ³ O	110%	123%	120%
117	A ₃	A ³ O	77%	91%	60%
118	A ₃	A ³ O	74%	85%	68%
119	A _X	A ^X O	98%	100%	85%
120	A _X	A ^X O	67%	73%	87%
121	B _m	B ^m O	50%	65%	92%
122	B ₃	B ³ O	55%	70%	60%

Normal para FVW 60% a 160%

Normal para FVIII - 60%160%

Normal para Cofator de Ristocetina - 58% a 168%