

**BRUNA DE MORAES MAZETTO FONSECA**

***“AVALIAÇÃO DA ADAMTS13 E DE MARCADORES  
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM TROMBOEMBOLISMO  
VENOSO”***

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**CAMPINAS**

**2011**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

*Faculdade de Ciências Médicas*

**“AVALIAÇÃO DA ADAMTS13 E DE MARCADORES  
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM TROMBOEMBOLISMO  
VENOSO”**

**BRUNA DE MORAES MAZETTO FONSECA**

*Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento. Sob orientação da Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.*

**CAMPINAS**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

F733a Fonseca, Bruna de Moraes Mazetto, 1987 -  
Avaliação da ADAMTS13 e de marcadores  
inflamatórios em pacientes com tromboembolismo  
venoso / Bruna de Moraes Mazetto Fonseca. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

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

1. Inflamação. 2. Síndrome pós-trombótica. 3.  
Von Willebrand – Fator de. 4. Trombose venosa. I.  
Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of ADAMTS13 and inflammatory markers in patients with venous thromboembolism.

**Palavra-chave em inglês:**

Inflammation

Pos thrombotic syndrome

Von Willebrand factor

Venous thrombosis

**Área de concentração:** Biologia Estrutura, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**Titulação:** Mestre em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]

Sérgio Paulo Bydlowski

Licio Augusto Veloso

**Data da defesa:** 16-12-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

## Banca examinadora de Tese de Mestrado

---

**Bruna de Moraes Mazetto Fonseca**

---

**Orientador(a): Prof. Dr. Joyce Maria Annichino Bizzacchi**

---

---

<b>Membros:</b>	
Professor (a) Mestre (a) Sérgio Paulo Bydlowski	
Professor (a) Mestre (a) Licio Augusto Velloso	
Professor (a) Mestre (a) Joyce Maria Annichino Bizzacchi	

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 16/12/2011**

---

Dedico esta dissertação a minha querida mãe, pelo seu amor e apoio em todos os momentos de minha vida e ao meu marido Marcelo, por estar sempre ao meu lado me incentivando e me fazendo mais feliz a cada dia.

## **AGRADECIMENTOS**

---

À minha orientadora Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, agradeço por toda a confiança depositada em mim, pela oportunidade, aprendizado, e por me ajudar a concretizar um projeto de vida.

À Dra. Fernanda Orsi, por seu apoio desde a escrita do projeto, padronização das técnicas e leitura final deste trabalho. Dedico o sucesso deste trabalho a ela.

As amigas Silmara, Mariane e Kiara por sempre acreditarem em mim e me apoiarem, principalmente nas horas mais difíceis, serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim. Amizades que certamente levarei para o resto da vida.

As funcionárias Deva, Ucha e Cristina pelos ensinamentos e por toda a ajuda ao longo destes anos.

À Dra Sandra, pela realização de todos os exames ultrassonográficos.

Aos amigos do laboratório: Carlinha, Aline Barnabé, Aline Urban, Fernanda, Lucas, Stephany, Luís Fernando, Josie, Carol, Mayara, Ricardinho, Tânia, Susan, Michelle Vagner e Aline Aléssio, pelo carinho.

À Dra. Sara Terezinha Ollala Saad, Dr. Érich Vinícius de Paula e Dra Fabíola Traina, pelos ensinamentos recebidos no exame de qualificação.

Aos pacientes, pois sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq, CAPES e INCTS.

A todos os meus familiares pelo apoio e por sempre torcerem por mim.

À Deus, pela minha vida e por colocar pessoas tão especiais e queridas em minha vida.

**Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP, bolsa de mestrado  
(processo: 2009/06970-6).**

## RESUMO

---

Níveis elevados de marcadores inflamatórios e fatores de coagulação têm sido relacionados com a patogênese do TEV. Particularmente, a relação inversa entre o FVW e a atividade da ADAMTS13 já foi previamente descrita em pacientes com trombose arterial. Níveis de FVW também mostraram-se elevados durante processos inflamatórios e portanto, poderiam desempenhar um papel de ligação entre inflamação e coagulação nos pacientes com TEV. Objetivo: Avaliar a atividade da ADAMTS13 e do FVW e sua associação com marcadores inflamatórios e evolução clínica pós-trombótica em pacientes com TEV. Pacientes e Métodos: Setenta e sete pacientes com TEV, entre sete meses e seis anos após o episódio agudo, atendidos no Hemocentro de Campinas - UNICAMP foram incluídos neste estudo e 77 indivíduos normais foram selecionados como controles, pareados por idade, gênero, etnia e grupo sanguíneo. A atividade da ADAMTS13 e do FVW foram avaliados pela ligação do FVW ao colágeno, o dímero-D por turbidimetria, a PCR por nefelometria, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, antígeno do FVW e da ADAMTS13 foram determinados por ELISA. A presença de trombo residual foi avaliada por ultrassom com Doppler e a SPT através da escala Villalta. Resultados: Trinta pacientes (39%) tiveram TEV causado por fatores de risco transitórios, especialmente pelo uso de anticoncepcional e 47 pacientes tiveram TVE espontâneo. A atividade inflamatória estava aumentada nos pacientes em comparação aos controles, demonstrada pelo aumento significativo dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  and IL-6 nos primeiros (mediana= 2,25 vs 1,59pg/mL,  $P \leq 0,001$ ; 1,16 vs 0,98pg/ml,  $P=0,013$ , respectivamente). Os níveis de IL-8 e PCR foram similares entre os 2 grupos (mediana= 18,3 vs 18,27pg/mL,  $P=0,47$ ; 0,21 vs 0,17mg/dL,  $P=0,29$ , respectivamente). Trinta e dois pacientes (42,8%) foram definidos como tendo um aumento da atividade

coagulante, expressa pelo dímero-D > 0,55mg/dL. Nesse grupo de pacientes todos os marcadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and PCR, estavam significativamente aumentados quando comparados aos pacientes com dímero-D  $\leq$  0,55 mg/L (P=0,0057; 0,001; 0,0093 e 0,0075; respectivamente). A presença de SPT e trombo residual não foram associados ao aumento da atividade coagulante. A atividade da ADAMTS13 e os níveis séricos de IL-8 estavam aumentados em pacientes com SPT quando comparados aos pacientes sem SPT. Todos os marcadores inflamatórios e parâmetros da coagulação estudados foram similares em pacientes independentemente da presença do trombo residual. Conclusão: Este estudo sugere que exista atividade inflamatória e procoagulante nos pacientes mesmo após o episódio agudo do TEV, que, entretanto, não se mostrou estar relacionada com a persistência das seqüelas clínicas e radiológicas da TVP. Além disso, o aumento do FVW nos pacientes corrobora a hipótese de ativação crônica da inflamação. Neste contexto, o aumento observado da ADAMTS 13 poderia ser compensatório frente ao aumento crônico do FVW e poderia inclusive atuar com um mecanismo protetor contra a atividade pró-trombótica observada nestes pacientes.

## ABSTRACT

---

**Introduction:** Increased levels of inflammatory markers and clotting factors have been related to the pathogenesis of VTE. Particularly, the inverse relation between VWF and ADAMTS13 activity has been previously described in patients with arterial thrombosis. VWF levels are also known to be increased during inflammatory processes and therefore could play a role linking the inflammatory and coagulation systems activities in patients with VTE. **Objective:** To evaluate the activity of ADAMTS13 and VWF in patients with VTE and its association with inflammatory markers and clinical outcome of post-thrombotic syndrome. **Patients and methods:** Seventy-seven patients with VTE, 7 months to six years after the acute episode, attended at the Hemocentro of Campinas - UNICAMP, were included in this study and 77 normal subjects were selected as controls, matched by gender, age, ethnicity and ABO blood group. The activity of ADAMTS 13 was performed by VWF collagen binding, D-dímer by turbidimetry, CRP by nephelometry , and TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8, VWF and ADAMTS13 antigen by ELISA. The presence of RVO was investigated by duplex examination and PTS by Villalta scale. **Results:** Thirty patients (39%) had VTE caused by transient risk factors, mainly the use of oral contraceptives, and 47 patients had spontaneous VTE. Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly increased in patients when compared to controls (median= 2.25 vs 1.59pg/mL,  $P \leq 0.001$ ; 1.16 vs 0.98pg/ml,  $P=0.013$ , respectively) whereas levels of IL-8 and CRP were similar among the groups (median= 18.3 vs 18.27pg/mL,  $p=0.47$ ; 0.21 vs 0.17mg/dL,  $P=0.29$ , respectively). Thirty-two patients (42,8%) had D-dimer > 0.55 mg/L and were defined as having increased coagulation activity. Inflammatory markers, such as TNF- $\alpha$ , IL-6,

IL-8 and CRP, were significantly higher in those patients, comparing to patients with D-dimer  $\leq 0.55$  mg/L (P=0.0057, 0.001, 0.0093 and 0.0075, respectively).

The presence of PTS or RVO were not associated with increased inflammatory or coagulation activity. Only ADAMTS13-CBA and plasma levels of IL-8 were higher in patients with PTS comparing to patients without PTS. All inflammatory markers and coagulation parameters studied were similar in patients regardless the presence of RVO.

Conclusion: Our findings suggest that there is an inflammatory and pro-coagulant activity in patients even after the acute episode of VTE, however, these activities were not related to the persistence of clinical and radiological sequels of DVT. Moreover, the increasing levels of VWF, observed in patients, support the hypothesis that the inflammation is chronically activated. In this context, the increasing levels of ADAMTS13, also observed in patients, could be explained as a compensatory mechanism and maybe act as a protection against pro-thrombotic activity seen in these patients.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**%:** Porcentagem

**°C:** Graus Celsius

**μL:** Microlitro

**ADAMTS13:** *A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats*

**APS:** *Antiphospholipid antibody syndrome*

**ATIII:** Antitrombina III

**BaCL2:** Cloreto de bário

**BG:** *Blood group*

**BMI:** *Body mass index*

**BSA:** *Bovine serum albumin*

**CBA:** *Collagen binding assay*

**CRP:** *C Reactive Protein*

**DVT:** *Deep venous thrombosis*

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra acético

**ELISA:** *Enzyme linked immunosorbent assay*

**et al:** E outros (as)

**FII:** Fator II da coagulação ou Protrombina

**FIX:** Fator FIX da coagulação

**FV:** Fator V da coagulação

**FVIII:** Fator FVIII da coagulação

**FVW:** Fator de von Willebrand

**FX:** Fator FX da coagulação

**FXI:** Fator XI da coagulação

**GP:** Glicoproteínas plaquetárias

**GST:** Glutathione S-transferase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Oxygenate water

**IL:** Interleucina

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina-6

**IL-8:** Interleucina-8

**IMC:** Índice de massa corpórea

**IST:** *International Society of Thrombosis and Hemostasis*

**kDa:** Kilodaltons

**LDL:** *Low density lipoprotein*

**LITE:** *Longitudinal Investigation of Thromboembolism*

**M:** Molar

**mg/dL:** Miligrama por decilitro

**mg/L:** Miligrama por litro

**MHz:** Megahertz

**mL:** Mililitros

**mM:** Milimolar

**ng/mL:** Nanograma por mililitro

**nm:** Nanômetro

**OPD:** o-phenylenediamine

**PBS:** Phosphate buffered saline

**PC:** Proteína C

**PCR:** Proteína C reativa

**PE:** *Pulmonary embolism*

**pg/mL:** Picograma por mililitro

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetisulfonila

**PS:** Proteína S

**PTS:** *Post thrombotic syndrome*

**RVO:** *Residual vein obstruction*

**SPT:** Síndrome pós-trombótica

**TCLE:** Termo de consentimento livre e esclarecido

**TEP:** Tromboembolismo pulmonar

**TEV:** Tromboembolismo venoso

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral-alfa

**Tris-HCL:** Tris hidrocloreto

**TVP:** Trombose venosa profunda

**U/dL:** Unidade por decilitro

**UI/dL:** Unidade Internacional por decilitro

**VTE:** *Venous thromboembolism*

**VWF:** *Von willebrand Factor*

## SUMÁRIO

<b>1. ANTECEDENTES NA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
1.1. Tromboembolismo Venoso .....	16
1.2. Tratamento do paciente com TEV .....	17
1.3. Relação entre FVW e Trombose .....	18
1.4. FVW e ADAMTS13.....	20
1.5. Fatores que determinam a atividade da ADAMTS13 .....	21
1.6. Inflamação e tromboembolismo venoso.....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1. Inclusão de pacientes .....	26
4.2. Coleta e processamento de amostras .....	26
4.3. Dosagem do antígeno de FVW.....	27
4.4. Dosagem da atividade do FVW.....	27
4.5. Dosagem da atividade da ADAMTS13-CBA .....	27
4.6. Dosagem de dímero-D.....	28
4.7. Dosagem de citocinas .....	28
4.8. Proteína C Reativa (PCR).....	29
4.9. Análise de níveis circulantes de antígeno da ADAMTS 13 .....	29
4.10. Análise da atividade da ADAMTS13 GST-FVW73 .....	29
4.11. Exame ultrassonográfico .....	30
4.12. Determinação da Síndrome Pós Trombótica.....	31
4.13. Tipagem Sanguínea .....	31
4.14. Análise estatística .....	31
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>6. DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

## **1. ANTECEDENTES NA LITERATURA**

### **1.1. Tromboembolismo Venoso**

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença mundialmente prevalente, cuja alta incidência, em torno de 1 caso para cada 1000 habitantes, a torna um problema real de saúde pública (Hansson, Welin *et al.*, 1997; Silverstein, Heit *et al.*, 1998) . No Brasil a prevalência do TEV é semelhante à mundial, de 0,6 a 1 caso por 1000 habitantes (Maffei, 1995).

O TEV é uma patologia resultante da exacerbação da resposta hemostática normal no sistema vascular venoso (Loscalzo, 1995). Etiologicamente, o TEV é uma doença multifatorial em que fatores genéticos e adquiridos interagem dinamicamente provocando inicialmente a ativação e propagação inapropriadas dos mecanismos de coagulação do organismo e posteriormente a formação de trombos patológicos na circulação (Rosendaal, 1999b; White, Zhou *et al.*, 2003).

Dentre os fatores de risco adquiridos conhecidos, os mais importantes são: imobilização, gravidez, puerpério, câncer, anticoncepção ou reposição hormonal, trauma, cirurgia e presença de anticorpos antifosfolípidios (Rosendaal, 1999a; Robetorye e Rodgers, 2001).

Os fatores de risco genéticos, que caracterizam a trombofilia hereditária, compreendem a deficiência de anticoagulantes naturais, como a proteína C, S e a antitrombina ou as mutações que levam a ganhos de função, como a mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden) e mutação G20210A no gene da protrombina (Arruda, Annichino-Bizzacchi *et al.*, 1997; Rosendaal, 1999a; Robetorye e Rodgers, 2001).

## 1.2. Tratamento do paciente com TEV

Após o diagnóstico de TEV, o paciente é tratado com anticoagulação plena por no mínimo 3 meses com o intuito de se evitar a progressão ou a embolização do trombo formado. Seguido ao período agudo do TEV, e ao tratamento inicial com anticoagulação, o acompanhamento clínico do paciente é feito no sentido de se detectar e tratar as possíveis seqüelas do evento trombótico e avaliar o risco do paciente em apresentar recidiva da doença, risco que, se presente, justificaria o tratamento prolongado com anticoagulação com o objetivo de se prevenir novos episódios de TEV.

Nos casos de trombose venosa profunda (TVP) dos membros inferiores, que é a manifestação mais comum do TEV, a seqüela frequentemente observada em até 50% dos pacientes é a síndrome pós- trombótica (SPT) (Kahn, Shrier *et al.*, 2008). Numa fase tardia após a TVP, seja pela obstrução venosa persistente ou pela lesão valvular, pode ocorrer aumento da pressão vascular venosa, levando ao prejuízo do retorno venoso, à diminuição da perfusão do músculo da panturrilha e ao aumento da permeabilidade microvascular (Prandoni e Kahn, 2009; Vedantham, 2009). Essas alterações fisiopatológicas, em conjunto, causam as manifestações clínicas da SPT e podem limitar a atividade do paciente, tendo efeitos adversos sobre a sua qualidade de vida e produtividade (Kahn, Shbaklo *et al.*, 2008; Prandoni e Kahn, 2009). Recentemente, o ISTH (*International Society of thrombosis and hemostasis*) recomendou que a escala de Villalta fosse adotada para diagnosticar e graduar a severidade da SPT (Kahn, Partsch *et al.*, 2009).

A incidência de recidiva do TEV é alta no nosso meio, chegando a 30% num período de até 10 anos após a trombose (Mello, Orsi *et al.*). Os fatores de risco para a ocorrência do primeiro episódio de TEV são, na sua maioria, distintos dos fatores de

risco para a recidiva; um exemplo disso é que as trombofilias hereditárias não influenciam na recidiva da doença (Rosencher, Mirault *et al.*)

As trombofilias adquiridas como neoplasia, síndrome do anticorpo antifosfolípido e síndrome nefrótica, bem como trombozes de repetição são fatores de risco reconhecidos para recidiva da TEV e indicam o uso de anticoagulação definitiva nos pacientes após o primeiro evento trombótico (Rosencher, Mirault *et al.*). Para os demais pacientes, a quantificação do dímero-D após o término da anticoagulação e o estudo ultrassonográfico do membro, para a avaliação da presença de trombo residual, podem ser usados como indicadores de risco de recidiva e influenciar na decisão de ser manter a anticoagulação prolongada após o evento agudo (Cosmi, Legnani *et al.*, ; Siragusa, Malato *et al.*, 2008).

### **1.3. Relação entre FVW e Trombose**

Apesar dos fatores de risco bem estabelecidos, 30% dos casos de TEV permanecem idiopáticos (Heijboer, Brandjes *et al.*, 1990; Poort, Rosendaal *et al.*, 1996; Silverstein, Heit *et al.*, 1998). Além disso, indivíduos com trombofilias hereditárias ou adquiridas, podem apresentar quadros clínicos diversos, o que sugere a presença de outros fatores, não definidos, que podem interferir na expressão fenotípica da doença. Por isso, na última década, têm-se tentado identificar outros fatores que pudessem fazer parte da patogênese do TEV.

Recentemente, reconheceu-se como potencialmente trombogênicos o aumento dos níveis plasmáticos dos fatores (F) VIII, IX, X, XI, von Willebrand (FVW) e fibrinogênio (Kamphuisen, Lensen *et al.*, 2000; Meijers, Tekelenburg *et al.*, 2000; Van Hylckama Vlieg, Van Der Linden *et al.*, 2000; De Visser, Poort *et al.*, 2001; Annichino-Bizzacchi, 2003; Mello, 2006).

O FVW encontra-se aumentado em algumas condições patológicas tais como o

infarto agudo do miocárdio, a coagulação intravascular disseminada e a síndrome HELLP (Hulstein, Van Runnard Heimel *et al.*, 2006; Vischer, 2006; Groot, De Groot *et al.*, 2007). Estudos em humanos evidenciaram haver quantidades muito elevadas de FVW agregado às plaquetas na constituição de trombos coronarianos (Hoshiba, Hatakeyama *et al.*, 2006; Yamashita, Sumi *et al.*, 2006). Apesar da relação com a trombose arterial, a associação entre FVW e o TEV não está bem estabelecida.

Um amplo estudo conduzido na Holanda, o “Leiden Thrombophilia Study”, mostrou que o risco de TEV era 3 vezes maior nos pacientes com níveis de FVW > 150 IU/dl, porém o aumento do FVW não foi um fator de risco independente para trombose, e sim associado ao aumento do FVIII (Koster, Blann *et al.*, 1995).

Posteriormente, entretanto, outro importante estudo, o “Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE)”, envolvendo 19.237 indivíduos normais acima de 45 anos, mostrou que o aumento do FVIII e do FVW seriam fatores de risco independentes para TEV (Tsai, Cushman *et al.*, 2002).

Em estudos populacionais, indivíduos do grupo sanguíneo não-O (A, B e AB) vêm consistentemente sendo apontados como tendo maior risco de desenvolver TEV e trombose arterial que indivíduos do grupo O. Esse risco é atribuído ao fato do grupo sanguíneo ABO influenciar os níveis plasmáticos do FVW, que podem estar 25% aumentados nos indivíduos não-O (Mannucci, Capoferri *et al.*, 2004; Tirado, Mateo *et al.*, 2005; Jenkins e O'donnell, 2006; Gallinaro, Cattini *et al.*, 2008; Minano, Ordonez *et al.*, 2008).

Recentemente, publicamos um estudo clínico em pacientes com TEV que mostrou que o FVIII e o FVW estavam aumentados em 30% dos casos. Os níveis elevados de FVIII e FVW no plasma aumentaram em 3 vezes o risco de TEV e permaneceram como fatores de risco independentes na análise multivariada. Outro dado interessante, é que

em nossa população os níveis de FVIII e FVW são muito mais elevados que os descritos em outros grupos étnicos (Mello, 2006).

A causa do aumento do FVW nos casos de TEV ainda é incerta. Baseado no fato de o FVW carrear o FVIII, um estudo pesquisou diferentes polimorfismos dos genes do FVIII e FVW, porém nenhum dos polimorfismos estudados foi associado aos níveis de FVIII, FVW ou ao risco de TEV (Kamphuisen, Eikenboom *et al.*, 2001).

Polimorfismos presentes no gene do receptor de LDL, outra proteína envolvida no metabolismo do FVIII e do FVW, foram investigados na mesma população brasileira, e apesar de mostrarem correlação com esses fatores de coagulação, não foram considerados fatores de risco para TEV (Mello, Siqueira *et al.*, 2008).

#### **1.4. FVW e ADAMTS13**

O FVW tem como função primordial a manutenção da hemostasia primária, promovendo a adesão e a agregação das plaquetas através da ligação às glicoproteínas plaquetárias (GP) 1b-IX e GP IIb/IIIa (Sadler, Moake *et al.*, 2004; Ruggeri, 2007). Além disso, o FVW estabelece uma forte ligação com o FVIII livre no plasma, protegendo-o contra a proteólise. O FVW é armazenado nos corpos de Weibel Palade das células endoteliais e nas plaquetas e é secretado para o plasma na forma de grandes multímeros. A ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats) degrada esses multímeros de alta densidade do FVW clivando a ligação peptídica 842Tyr-843Met do domínio A2, gerando multímeros que variam em tamanho entre 500 a 20.000 kDa (Chung e Fujikawa, 2002; Moake, 2004; Dong, 2005; Levy, Motto *et al.*, 2005). A ação da ADAMTS13 é aumentada em locais ou situações em que há maior *stress* do fluxo sanguíneo, isto é, em que a razão entre a pressão do fluxo sanguíneo e o diâmetro do vaso seja elevada (Dong, Moake *et al.*, 2002; Dong, 2005).

A deficiência grave da ADAMTS13 causa a disponibilidade anormal dos multímeros de alta densidade do FVW no plasma, multímeros estes que se ligam mais eficazmente às plaquetas e formam então trombos plaquetários patogênicos na microcirculação. Esses trombos causam obstrução da microcirculação e sangramentos por plaquetopenia, levando aos sinais e sintomas clínicos que caracterizam a púrpura trombocitopênica trombótica (Moake, 2002; 2004; Sadler, Moake *et al.*, 2004; Donadelli, Orje *et al.*, 2006).

A deficiência leve ou moderada da ADAMTS13, por sua vez, vem sendo associada ao aumento dos níveis plasmáticos do FVW e a situações em que se observa ativação da coagulação. A relação entre a atividade da ADAMTS13 e os níveis do FVW já foi demonstrada em neonatos e gestantes saudáveis (Mannucci, Canciani *et al.*, 2001) (Schmugge, Dunn *et al.*, 2004), e em diversas situações patológicas, como síndrome HELLP (Lattuada, Rossi *et al.*, 2003; Hulstein, Van Runnard Heimel *et al.*, 2006), pós-operatório de cirurgia cardíaca (Mannucci, Parolari *et al.*, 2005), acidente vascular cerebral isquêmico, sepse grave (Bongers, De Maat *et al.*, 2006), coagulação intravascular disseminada (Bongers, De Maat *et al.*, 2006), cirrose, insuficiência renal crônica e doenças inflamatórias agudas (Mannucci, Canciani *et al.*, 2001). Recentemente foi demonstrado em modelo animal e *in vitro* que a inibição da ADAMTS13 promove a progressão na formação dos trombos arteriais (Moriguchi-Goto, Yamashita *et al.*, 2008).

### **1.5. Fatores que determinam a atividade da ADAMTS13**

O gene da ADAMTS13 está localizado no cromossomo 9q34 e mais de 50 mutações já foram descritas, dentre mutações *missense*, *non-sense*, *frameshift*, e *splice*, além de vários polimorfismos genéticos (Kokame e Miyata, 2004; Donadelli, Banterla *et al.*, 2006; Plaimauer, Fuhrmann *et al.*, 2006). As alterações genéticas levam à

deficiência hereditária grave da ADAMTS13 (Donadelli, Banterla *et al.*, 2006; Tao, Anthony *et al.*, 2006).

Alterações leves a moderadas da atividade da ADAMTS13 podem ser causadas por fatores adquiridos que influenciam na liberação, ativação e *clearance* da enzima, tanto em situações normais quanto nas patológicas. Estudos *in vitro* sugeriram que a trombina, o FX ativado e a plasmina causariam a proteólise da ADAMTS13 e por consequência a diminuição da sua atividade plasmática (Crawley, Lam *et al.*, 2005; Lam, Chion *et al.*, 2007).

Outra condição que pode modular a atividade da ADAMTS13 é a atividade inflamatória sistêmica, uma condição freqüente em pacientes que apresentaram TEV, mesmo após o término do tratamento com anticoagulantes orais. Foi sugerido que a interleucina 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) podem ser responsáveis pelo aumento da secreção endotelial de moléculas de alta densidade do FVW e pela liberação da interleucina 6 (IL-6), o que levaria à inibição da ação da ADAMTS13 (Bernardo, Ball *et al.*, 2004). Um estudo recente em pacientes com síndrome coronariana aguda sugeriu a relação entre diminuição da atividade da ADAMTS13 e aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 e FVW (Marcucci, Cesari *et al.*, 2008).

### **1.6. Inflamação e tromboembolismo venoso**

Durante a década passada, o papel da inflamação na fisiopatologia das trombooses arteriais foi extensivamente estudado. Contudo, pouco se sabe sobre a relação entre inflamação e TEV (Poredos e Jezovnik, 2007).

A inflamação é capaz de atuar em diversas etapas da hemostasia, seja através da ativação da coagulação, do aumento da atividade plaquetária ou da inibição dos anticoagulantes naturais e da fibrinólise, resultando em desequilíbrio da hemostasia a favor da geração de trombina, fibrina e trombose (Esmon, 2004).

Embora a associação entre TEV e resposta inflamatória seja controversa (Tsai, Cushman *et al.*, 2002), os níveis de alguns marcadores inflamatórios foram relacionados com a concentração de marcadores de ativação endotelial, como o FVW e P-Selectina, favorecendo a hipótese de que a inflamação poderia estar envolvida na fisiopatogenia da TVP (Jezovnik e Poredos).

Estudos clínicos mais recentes já mostraram haver estreita relação entre o TEV agudo e níveis plasmáticos elevados de marcadores inflamatórios, como proteína C reativa (PCR), IL-6 e IL-8 e TNF- $\alpha$  (Fox e Kahn, 2005; Poredos e Jezovnik, 2007). O aumento das citocinas pode ser observado não apenas no evento agudo, mas de forma sustentada durante o seguimento dos pacientes após o TEV, sugerindo que a resposta inflamatória pudesse preceder o evento e não apenas ser uma consequência do mesmo (Van Aken, Reitsma *et al.*, 2002).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Conforme destacado acima, há evidências robustas que o aumento dos níveis do FVW seja um fator de risco para a ocorrência de TEV. Porém, as causas desse aumento não estão elucidadas e aparentemente decorrem da interação de alterações genéticas e adquiridas.

Em diversas patologias, níveis elevados de FVW estão relacionados à diminuição da atividade da ADAMTS13. Como os níveis de FVW no plasma são regulados pela ação proteolítica da ADAMTS13, é possível que em alguns casos de TEV a diminuição da atividade da ADAMTS13 contribua para a patogênese da doença. Diminuições leves ou moderadas da atividade da ADAMTS13 seriam suficientes para aumentar os níveis plasmáticos do FVW e colaborar com estados de hipercoagulabilidade que causariam o TEV.

Pacientes com TEV frequentemente apresentam evidências laboratoriais de inflamação sistêmica, que pode modular a atividade da ADAMTS13 independente de fatores hereditários que determinem sua atividade basal. Assim, o estudo de marcadores inflamatórios torna-se fundamental para que se compreenda melhor a associação entre atividade da ADAMTS13 como fator de risco adicional ou como mera consequência do TEV.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo principal deste estudo foi avaliar através de um estudo caso-controle as variações da atividade da ADAMTS13 em pacientes com TEV, e sua associação com o FVW, inflamação e evolução clínica pós-trombótica. Para isto, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

3.1. Determinação dos níveis plasmáticos do antígeno e da atividade da ADAMTS13 em pacientes (casos) com TEV e indivíduos saudáveis (controles) pareados por sexo, idade, etnia e grupo ABO, provenientes da mesma área geográfica que os pacientes;

3.2. Determinação dos níveis plasmáticos do antígeno e da atividade do FVW nesses mesmos grupos e avaliar o balanço ADAMTS13/FVW;

3.3. Avaliação de marcadores sistêmicos da resposta inflamatória: IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , e PCR; e de marcadores locais de inflamação (ultrassom com Doppler para avaliação de trombose residual no sistema venoso profundo) e sua correlação com ADAMTS13/FVW neste mesmo grupo de estudo;

3.4. Determinação do dímero-D como marcador de hipercoagulabilidade e sua correlação com os marcadores inflamatórios e com ADAMTS13/FVW.

## **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1. Inclusão de pacientes**

Durante o período a que se refere este estudo, 385 pacientes com TEV foram acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas/UNICAMP. Destes 385, 77(20%) foram recrutados para o estudo. Os demais 308 foram excluídos por idade inferior a 18 ou superior a 70 anos na época da trombose, por trombose em sítio incomum, pela presença de neoplasia, trombofilia hereditária (deficiência das proteínas S, C e ATIII), doenças inflamatórias, renais ou hepáticas e síndrome do anticorpo antifosfolípido.

Inicialmente, a meta era a inclusão de aproximadamente 150 pacientes com TEV idiopática. Porém, houve uma grande dificuldade em recrutar esses pacientes, tendo em vista a raridade dos casos, e por isso optamos por incluir também pacientes com trombofilia hereditária (FV Leiden e mutação G20210A no gene do fator II). Assim, dos 77 pacientes incluídos neste estudo, 47 (61%) apresentaram TEV espontâneo e em 30 houve a associação a fatores de risco adquiridos.

Setenta e sete indivíduos controle, saudáveis, pareados em gênero, idade, etnia e grupo sanguíneo ABO com os pacientes, foram selecionados entre amigos e parentes não biológicos.

### **4.2. Coleta e processamento de amostras**

Após a assinatura do TCLE, foram coletados aproximadamente 10mL de sangue. O sangue para determinação do grupo sanguíneo ABO foi colhido em tubos Vacutainer, contendo EDTA. Para a obtenção do plasma foram coletados 2 tubos com citrato (0,11mol/L), na proporção 9:1. O sangue foi imediatamente centrifugado por 20 minutos a 2500xg e o plasma estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### **4.3. Dosagem do antígeno de FVW**

Os níveis de antígeno de FVW (FVWAg) no plasma foram mensurados usando-se a técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Favaloro, Smith *et al.*, 1999). Basicamente, placas de ELISA de alta aderência (MaxiSorb<sup>R</sup>, Nunc, Rochester, NY, USA) são cobertas com anti-FVW humano (A0082; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) e as amostras de plasma diluído são transferidas para a placa. Após incubação o substrato cromogênico, o anticorpo anti-FVW peroxidase conjugado (P0226; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) é adicionado. A absorbância é lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620nm e expressa em U/dl. Esta técnica foi padronizada e atualmente é realizada de forma rotineira em nosso laboratório. O valor de normalidade para o grupo O é de 43,4 a 173 U/dL e para o grupo não O é de 70 a 186 U/dL.

### **4.4. Dosagem da atividade do FVW**

A atividade do FVW foi determinada pela técnica de ligação ao colágeno (VWF-CBA) (Favaloro, Smith *et al.*, 1999; Shelat, Smith *et al.*, 2006). Basicamente, placas de ELISA de alta aderência (MaxiSorb<sup>®</sup>, Nunc, Rochester, NY, USA) são cobertas com colágeno humano tipo III (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) e incubadas com plasma diluído. Após a adição do substrato cromogênico, anticorpo anti-FVW peroxidase conjugado (P0226; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), a absorbância é lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620nm, e os resultados expressos em %. O valor de referência do laboratório é de 37,20% a 117,20%.

### **4.5. Dosagem da atividade da ADAMTS13-CBA**

A atividade da ADAMTS13 foi determinada pela técnica de ligação do FVW residual ao colágeno (ADAMTS13 – CBA) (Gerritsen, Turecek *et al.*, 1999). Esta técnica baseia-se na proteólise de uma quantidade constante de FVW purificado por

diluições seriadas da amostra de plasma testado, usada como fonte de ADAMTS13. Basicamente, a mistura de plasma diluído e FVW purificado é incubada por 24 horas e a atividade do FVW residual presente na amostra é determinada pela técnica de VWF-CBA já descrita anteriormente. Esta técnica foi padronizada em nosso laboratório pela aluna e pela colaboradora Dra. Fernanda Orsi, após estágio da última no Laboratório do Prof. Dr. Zhang, no Children's Hospital of Philadelphia University, Pennsylvania, USA. Os resultados são expressos em %, com valor de normalidade entre 55,8 e 195,6%

#### **4.6. Dosagem de dímero-D**

Esta determinação foi realizada utilizando-se o reagente Innovance DDimer (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha). A técnica é feita em coagulômetro automatizado BCS-XP (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha) através de análise imunoturbidimétrica potenciada por partículas de poliestireno revestidas covalentemente com anticorpo monoclonal específico para detecção de dímeros-D, considerando-se como valor normal até 0,55 mg/L.

#### **4.7. Dosagem de citocinas**

Para a dosagem das citocinas coletou-se um volume de 8ml de sangue através de punção venosa em tubos secos. Dentro de um período máximo de 30 minutos após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2000xg por 15 minutos, e o plasma separado em alíquotas e congelado a -80 °C para ensaio posterior. Utilizou-se o método de ELISA para determinação dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8.

A IL-8 foi dosada utilizando-se kit comercial da BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, Califórnia, USA). As dosagens de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram realizadas empregando-se o método de ELISA de alta sensibilidade (Quantikine<sup>®</sup> HS, R&D Systems, Minneapolis, USA). A dosagem mínima detectável para IL-8, IL-6 e TNF- $\alpha$  foi de 0,8, 0,447 e 0,550 pg/ml, respectivamente.

#### **4.8. Proteína C Reativa (PCR)**

Para a determinação dos níveis de PCR, coletou-se um volume de 8ml de sangue através de punção venosa em tubo seco. Cerca de 1 hora após a coleta, as amostras foram centrifugadas, aliquotadas e conservadas a -80 °C até o momento da realização do ensaio. Utilizou-se um kit ultra-sensível (C-Reactive Protein Test System, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemanha), em equipamento automatizado, que utiliza o princípio nefelométrico. Resultados até 0,5 mg/dL são considerados normais.

#### **4.9. Análise de níveis circulantes de antígeno da ADAMTS 13**

O antígeno da ADAMTS13 no plasma foi avaliado pelo kit comercial Imubind® ADAMTS13 ELISA (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, EUA). A utilização do kit foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620nm na leitora SpectraMax 190 ELISA Reader (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Os resultados foram expressos em ng/mL, com valor de normalidade entre 630 e 850 ng/mL.

#### **4.10. Análise da atividade da ADAMTS13 GST-FVW73**

A atividade da ADAMTS13 no plasma foi avaliada pelo kit comercial Technozym® ADAMTS13 Activity (ADAMTS13 GST-VWF73 activity) (Technoclone GmbH, Viena, Austria). O método utiliza o peptídeo sintético FVW73 marcado com glutationa S-transferase (GST). A utilização do kit foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450nm na leitora SpectraMax 190 ELISA Reader (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Os resultados foram expressos em %, com valor de referência de 40 a 130%.

#### **4.11. Exame ultrassonográfico**

O estudo ultrassonográfico foi realizado por um único médico, com ampla experiência e com Certificado na área de atuação em ecografia vascular pela Sociedade de Angiologia e Cirurgia Vascular e pelo Colégio Brasileiro de Radiologia. O tempo entre a coleta do sangue e a realização do exame ultrassonográfico foi de no máximo 2 meses. O aparelho utilizado foi um SIEMENS SONOLINE G40 (Siemens Healthcare, Mountain View, Calif) e transdutores convexo de 3-5 MHz e linear de 5-10 MHz . Foram estudadas as veias cavas inferior, ilíacas comuns e externas, femorais comuns e superficiais, poplíteas, gastrocnêmias e tibiais posteriores. O paciente foi orientado para realizar jejum de 10 horas e uso de anti-flatulento.

Primeiramente, o exame foi realizado com o paciente em decúbito dorsal para a avaliação da imagem bidimensional, Doppler pulsado e fluxo colorido. Os segmentos venosos normais são compressíveis, apresentam fluxo fásico com a respiração e aumentam com a compressão distal. A manobra de compressibilidade é realizada com a veia em sessão transversal, comprimindo-se a mesma com o transdutor. Em sessão longitudinal da veia, obtém-se o espectro do fluxo venoso com o Doppler pulsado e o fluxo em cores espontâneo e com compressão distal. O segmento venoso incompressível e sem fluxo no estudo em cores foi considerado ocluído. Os segmentos semi-compressíveis e com fluxo parcial foram considerados semi-ocluídos ou parcialmente recanalizados. Foram realizadas medidas dos diâmetros transversos das veias em compressão máxima e a extensão longitudinal das alterações encontradas.

O teste para a avaliação do refluxo venoso foi realizado com o paciente em posição ortostática, com o Doppler pulsado, das veias femoral superficial, poplíteia e tibiais posteriores com manobra de Valsalva e compressão distal. Foi considerado

refluxo a presença de fluxo retrógrado com duração maior que 1 segundo nas veias femoral superficial e poplítea, e 0,5 segundo nas veias tibiais posteriores.

#### **4.12. Determinação da Síndrome Pós-Trombótica**

No momento da coleta do sangue, a pesquisadora, após treinamento, avaliou os membros inferiores dos indivíduos utilizando a escala Villalta. A escala gradua a gravidade de 0 a 3 pontos de cinco sintomas avaliados pelo paciente (dor, cãibra, sensação de peso, prurido e parestesia) e seis sinais físicos avaliados pelo clínico (edema, endurecimento da pele, dor durante a compressão da panturrilha, hiperpigmentação, vermelhidão e ectasia venosa) (Kahn, 2009). A pontuação somada que totaliza  $\geq 5$  indica SPT, e  $>14$  ou presença de úlcera indica SPT grave.

#### **4.13. Tipagem Sanguínea**

A tipagem sanguínea ABO foi realizada por método *standard*, pelo sistema automático de microplaca PK-7200, da marca OLYMPOS. Os resultados foram expressos em tipo A, B, AB ou O.

#### **4.14. Análise estatística**

Apresentamos os dados de forma descritiva, representados pelas medianas, mínimo e máximo. Além disso, foi feita uma análise estatística exploratória visando comparar o grupo de pacientes e controles em relação aos dados obtidos até o presente. Para a análise de variáveis contínuas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para a análise de variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher. A correlação entre variáveis contínuas foi investigada por meio do cálculo do coeficiente de correlação de postos de Spearman. Parâmetros que foram significativamente associados com TEV na análise univariada entraram num modelo multivariado de regressão logística. Valores de  $P \leq 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Um software estatístico comercial (R Development Core Team version 2.0, 2011, Vienna, Austria) foi utilizado.

## **5. RESULTADOS**

### **Increased ADAMTS13 activity in patients with venous thromboembolism**

Artigo em elaboração

Mazetto, BM; Orsi, FLA; Barnabé, A; De Paula, EV; Flores-Nascimento, MC;  
Annichino-Bizzacchi, JM.

## **Increased ADAMTS13 activity in patients with venous thromboembolism**

Bruna de Moraes Mazetto, Fernanda Loureiro de Andrade Orsi, Aline Barnabé, Érich Vinícius de Paula, Mariane Cristina Flores Nascimento, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Hematology and Hemotherapy Center – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCTS), UNICAMP, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil

**Running Head:** ADAMTS13 and venous thromboembolism

**Corresponding author:** joyce@unicamp.br

## **Abstract**

Increased levels of inflammatory markers and clotting factors have been related to the pathogenesis and prognosis of venous thromboembolism (VTE). Particularly, the imbalance between VWF and ADAMTS13 has been described in patients with arterial thrombosis. In this study, 77 patients with previous VTE and 77 matched controls were selected for the evaluation of inflammatory markers, FVW, ADAMTS 13 and D-dimer. The presences of post-thrombotic syndrome (PTS) and residual vein obstruction (RVO) were also assessed in patients. Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly increased in patients compared to controls (median= 2.25 vs 1.59pg/mL,  $P\leq 0.001$ ; 1.16 vs 0.98pg/ml,  $P=0.013$ , respectively). Plasma levels and activity of VWF (median= 150.25 vs 95.39 U/dL,  $P\leq 0.001$ ; 145.26% vs 92.39%,  $P\leq 0.001$ ) and ADAMTS 13 (median= 1088.84 vs 950.80 ng/mL,  $P\leq 0.001$ ; 96.03 vs 83.64%,  $p\leq 0.001$ ) were also higher in patients. We further analysed the subgroups of patients with higher risk for VTE recurrence, defined as the presence of high D-dimer levels, PTS or RVO. All inflammatory markers were significantly higher in patients with increased D-dimer. The presence of PTS or RVO was not associated with higher inflammatory or coagulation parameters. The increased levels of inflammatory markers and VWF may suggest that there is a persistence of the inflammatory activity in patients even long time after the VTE episode. In this context, it is possible to postulate that the increased levels of ADAMTS13 could represent a compensatory mechanism against persistent increased levels of VWF. Moreover, increased inflammatory activity was associated to increased D-dimer levels, thus it is possible that inflammatory activity may be related to the risk of VTE recurrence as well.

## **Introduction**

Venous thromboembolism (VTE) results from the interaction of genetic and acquired factors [1]. However, at least 30% of VTE episodes are idiopathic. High levels of inflammatory markers and coagulation factors, such as factor VIII (FVIII) and von Willebrand factor (VWF), have been associated with acute and recurrent VTE[2-6]. The reason for this phenomenon is unclear and, apparently, is not related to genetic mutations [7, 8].

VWF activity is partially controlled by the metalloprotease ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats) [9-12]. The imbalance between VWF and ADAMTS13 activity has been demonstrated in many clinical situations such as pregnancy [13], systemic inflammatory diseases, ischemic brain sepsis [14] and heart disease [15]. Apparently, ADAMTS13 activity may be impaired by inflammatory cytokines [16].

Thus, we postulated that the increased levels of VWF observed in some cases could possibly be explained by an inflammation-mediated imbalance between VWF and ADAMTS13 levels, as seen in arterial thrombosis. To address this question, we performed a case-control study to evaluate the association of VTE with VWF, ADAMTS13 and other inflammatory markers. We also evaluated these parameters in subgroups of patients with higher risk of VTE recurrence, such as patients with increased D- dimer levels, post-thrombotic syndrome (PTS) or residual vein obstruction (RVO).

## **Material and Methods**

### **Patients and controls**

This is a case-control study, including 77 patients with at least one episode of VTE who were treated at the Hemostasis and Thrombosis Clinic of the State University of Campinas-Brazil between March 2009 and June 2011. In this period, 385 patients with VTE were attended in the clinic, but 308 could not participate in the study due to exclusion criteria. All acute episodes of deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) were confirmed by duplex ultrasonography and ventilation-perfusion scanning, respectively. All patients included in the study had been treated with oral anticoagulants for at least 6 months and were enrolled one month after warfarin withdrawal.

We excluded patients with VTE at unusual sites, younger than 18 years old or older than 70 years old, those with a known malignant disorder, liver, renal failure or inflammatory disease, with antiphospholipid antibody syndrome (APS) or deficiency of natural anticoagulants. Pregnant women were also excluded.

Controls had no biological relation with the patients, no medical history of VTE and were matched with patients for gender, age, ethnicity and ABO blood group. Exclusion criteria for controls were the same as for patients. Patients and controls were from the same geographic region.

It is important to point out that Brazilian population is constituted by different ethnic backgrounds, an admixture of Caucasians, Africans and Native Americans [17] and that patients and controls reflect Brazilian racial distribution.

The study was approved by the local Ethics Committee on human research and written informed consent was obtained from all study participants.

## **Clinical evaluation of the VTE episode and assessment of VTE sequels by clinical and ultrasonographic examination.**

### Retrospective clinical characterization of the VTE episode

At the day of the enrollment in the study, participants were invited to answer a questionnaire about the presence of provoking risk factors for VTE and their family history of thrombosis. Provoked VTE was defined as an initial thrombotic event that occurred in the presence of surgery, trauma, immobilization or use of a plaster cast in the previous 3 months, pregnancy, puerperium or estrogen therapy during the previous 30 days. All other episodes were classified as spontaneous. Subsequently to the clinical evaluation, blood samples were obtained by venous puncture.

### Evaluation of PTS

Participants who had had DVT were also submitted to a physical examination to evaluate the presence of PTS. PTS was diagnosed using the Villalta scale, as previously described [18]. After the physical examination, patients were referred for ultrasound duplex examination.

### Ultrasonographic assessment of RVO

Participants who had had DVT were addressed to doppler assessment of RVO. Vascular Doppler imaging was assessed by the same physician using a Siemens Sonoline G40 (Siemens Healthcare, Mountain View, Calif.), with a convex transducer of 3-5 MHz and linear 5-10 MHz. Incompressible venous segment without color flow was considered as presenting RVO.

### **Evaluation of inflammatory biomarkers, D-dimer, VWF and ADAMTS 13**

Two tubes of blood samples were obtained from participants at the time of their enrollment in the study. A citrate and an EDTA-containing tube were collected and

samples were immediately centrifuged. Serum and platelet-poor plasma obtained were aliquoted and stored at -80°C.

#### Serum levels of inflammatory biomarkers

A Commercial ELISA was used to measure serum levels of IL-8 (BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), IL-6 and TNF- $\alpha$  (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Serum high sensitive CRP (hs-CRP) levels were measured with a nephelometric method, with a Siemens BN ProSpec analyzer.

#### D-dimer

Plasma quantification of D-dimer was performed by immunoturbidimetric analysis, as recommended by the manufacturer, with an automated BCS-XP coagulometer (Siemens Healthcare, Marburg, Germany).

#### VWF Antigen

VWF antigen (VWF-Ag) levels in plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described [19].

#### VWF activity

VWF activity was determined by collagen – binding assay (VWF-CBA), as previously described [19, 20].

#### ADAMTS13 antigen

Plasma levels of the ADAMTS13 antigen (ADAMTS13-Ag) were determined with the Imubind® ADAMTS13 ELISA commercial kit (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA) as recommended by the manufacturer.

#### ADAMTS13 collagen – binding activity

ADAMTS13 activity was determined by collagen – binding assay (ADAMTS13–CBA) as previously described [21].

### ADAMTS13 activity

ADAMTS13 activity in plasma was also determined with the Technozym<sup>®</sup> ADAMTS13 Activity commercial kit (ADAMTS13 GST-VWF73 activity, Technoclone GmbH, Viena, Austria), as recommended by the manufacturer.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as median and range. Differences between groups for continuous data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. Categorical data were analyzed using Fisher's exact test or Chi-square test. Correlation studies were carried out using Spearman's rank correlation coefficient(*r*). Parameters associated with VTE were evaluated in a logistic regression multivariate model. Values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant. Commercial statistical software (*R Development Core Team* version 2.0, 2011, Vienna, Austria) was used.

## **Results**

### **Demographic and clinical data**

Seventy-seven patients with VTE, treated at the Hematology Center of the State University of Campinas, were included in the study. Additionally, we included 77 healthy subjects as controls. Demographic parameters such as age, gender, ethnicity and ABO blood group were similar between patients and controls, as indicated in Table 1a.

VTE was provoked in 30 patients (39%) and the risk factors were hormonal contraceptives (n=23), surgery (n=4) and immobilization (n=3). Ten patients (13%) presented hereditary thrombophilia, 5 had Factor V Leiden heterozygous and 5 had Factor II 20210A heterozygous mutation. Patients' clinical data are summarized in Table 1b.

### **Inflammatory markers, D-dimer, VWF and ADAMTS3**

TNF- $\alpha$  and IL-6 serum levels were significantly increased in patients (median= 2.25 vs 1.59pg/mL,  $P \leq 0.001$ ; 1.16 vs 0.98pg/ml,  $P = 0.013$ , respectively) whereas levels of IL-8 and CRP were similar among groups (median= 18.3 vs 18.27pg/mL,  $P = 0.47$ ; 0.21 vs 0.17mg/dL,  $P = 0.29$ , respectively).

Patients had higher plasma levels of VWF-Ag (median= 150.25 vs. 95.39 U/dL,  $P \leq 0.001$ ) and higher VWF-CBA (median= 145.26% vs. 92.39%,  $P \leq 0.001$ ) than controls. Unexpectedly, patients also presented higher ADAMTS13-Ag (median= 1088.84 vs. 950.80 ng/mL,  $P \leq 0.001$ ), higher ADAMTS13-CBA (median= 102.52 vs. 94.71%,  $P = 0.046$ ) and higher ADAMTS13 GST-VWF73 activity (median= 96.03 vs. 83.64%,  $p \leq 0.001$ ) than controls. Plasma levels of D-dimer were increased among patients when compared to controls (median= 0.44 vs. 0.28mg/L,  $P \leq 0.001$ ), as shown in Figure 1.

### **Correlation and multivariate analysis**

There was a positive correlation between VWF-Ag and CRP ( $r= 0.37$ ;  $P\leq 0.001$ ), and also between VWF-Ag and IL-6 ( $r= 0.25$ ;  $P=0.01$ ) among patients. No correlation was found between the time passed since the acute event of VTE and any of the parameters studied.

We also evaluated parameters related to VTE in a multivariate logistic regression model. The following parameters were independent factors associated with VTE: TNF- $\alpha$ , D-dímer, ADAMTS13 activity, VWF-Ag and VWF-CBA ( $P=0.0027$ ,  $P=0.0326$ ,  $P=0.01$ ,  $P=0.0052$  and  $P=0.0002$ , respectively).

### **Evaluation of patients according to D-dimer, PTS and RVO.**

We analyzed 3 subgroups of patients according to the presence increased D-dimer, PTS or RVO. These factors are related to disease morbidity, poorer prognosis and increased risk of VTE recurrence.

Thirty-two patients (42.8%) presented increased D-dimer ( $> 0.55$  mg/L). PTS was evaluated in 51 patients and was present in 53% of the cases. Doppler examination was performed in 64 patients and RVO was observed in 53% of these patients. Both PTS and RVO were present in 17 cases.

The inflammatory markers, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and PCR, were significantly higher in patients with D-dimer  $>0.55$  mg/L, as shown in Figure 2. The levels of inflammatory markers, VWF and ADAMTS 13 were similar among patients, regardless the presence of PTS or RVO. The only exception was IL-8 levels that were significantly increased in patients with PTS (22.9 vs 16.8 pg/ml;  $p=0.01$ ), as shown in Table 2.

Table 1). Demographical and clinical data

<b>Table 1a. Demographic data from patients and controls</b>		<b>N = 77</b>
<b>Demographic data</b>		
Female, number (%)		52 (67.5)
Male, number (%)		25 (32.5)
Caucasian/ Non Caucasian		41/36
BG "O"/ Non "O"		13/64
Age (range)		42(20-72)
Time after VTE, median months (range)		32.0 (7-77)
<b>Table 1b. Clinical and laboratory features of patients</b>		
<b>Clinical features</b>		
Leg DVT*, number (%)		71 (88.6)
proximal DVT, number (%)		35 (45.4)
DVT plus symptomatic PE**, number (%)		2(2.6)
Isolated PE, number (%)		4 (5.2)
Spontaneous VTE*** episode, number (%)		47 (61)
Provoked VTE episode, number (%)		30 (39)
Recurrent VTE, number (%)		15 (19.5)
SPT <sup>+</sup> (%)		27 (53)
RVO <sup>++</sup> (%)		34 (53.1)
BMI <sup>+++</sup>		58
Obese (%)		23 (39.6)
<b>Comorbidities</b>		
Hypertension, number		18 (23.4)
Dyslipidemia, number		9 (11.7)
Hypothyroidism, number		7 (9.1)
Diabetes, number		4 (5.2)
Other, number		18 (23.4)
<b>Laboratory features</b>		
Familial Thrombophilia, number (%)		10 (13)
Factor V Leiden, number (%)		5 (6.5)
FII G20210A, number (%)		5 (6.5)

\*DVT, deep vein thrombosis; \*\*PE, pulmonary embolism; \*\*\*VTE, venous thromboembolism; <sup>+</sup>SPT was not available in 26 patients; <sup>++</sup> Duplex examination was not available in 13 patients; <sup>+++</sup> BMI, body mass index was not available in 19 patients.

Figure 1: Comparative data of VWF-Ag, VWF-CBA, AD13-Ag, AD13-CBA, AD13 GST-VWF activity and D-dimer levels.

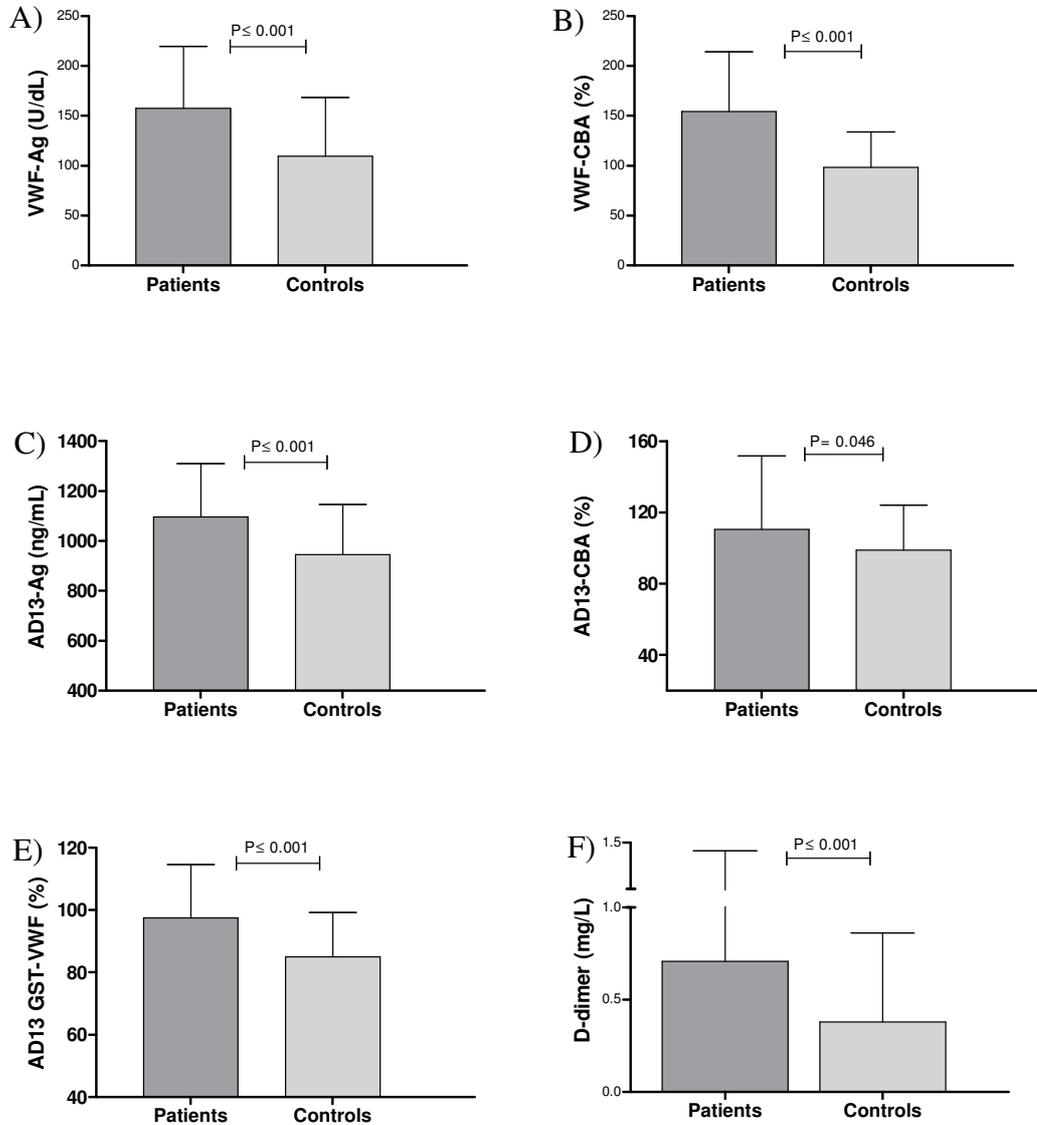
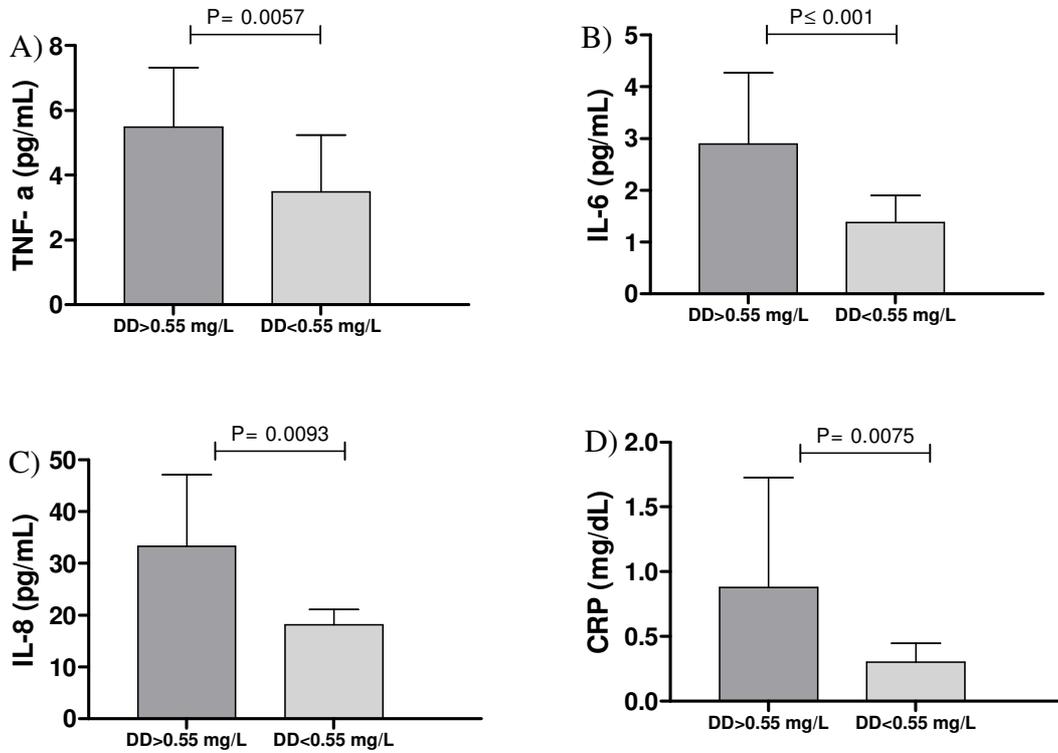


Figure 1: Bar graph represent the mean and standard deviation of (A) VWF-Ag, (B) VWF-CBA, (C) ADAMTS13-Ag, (D) ADAMTS13-CBA, (E) ADAMTS13 GST-VWF73 activity and (F) D-dimer. All parameters were higher in patients than controls. Values were calculated by Mann-Whitney U-test for statistical purposes.

Figure 2: Comparative data of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and CRP among patients with D-dimer >0.55mg/L and  $\leq$ 0.55mg/L.



Bar graph represent the serum levels of (A)TNF- $\alpha$  (3.63 vs 1.94pg/mL; P=0.0057) (B) IL-6 (1.87 vs 0.98 pg/mL; P $\leq$ 0.001), (C) IL-8 (23.12 vs 16.72 pg/mL; P= 0.0093) and (D) CRP 0.35 vs 0.11 mg/dL; P= 0.0075) in patients with D-dimer >0.55mg/l and  $\leq$ 0.55mg/L, respectively. All parameters were higher in patients who had D-dimer >0.55mg/L. The values were calculated by Mann-Whitney U-test for statistical purposes.

Table 2: VWF-Ag, VWF-CBA, D-dimer, AD13-Ag, AD13-CBA, AD13-activity, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and CRP in patients according to the presence of PTS and RVO.

	PTS N=51**		P*	RVO N=64***		P*
	Absence	Presence		Absence	Presence	
VWF-Ag (U/dL)	<b>148.04</b> (79.40 – 433.89)	<b>151.43</b> (52.34 – 285.52)	0.25	<b>148.59</b> (71.99 – 433.89)	<b>154.76</b> (48.72 – 285.52)	0.2
VWF-CBA(%)	<b>136.49</b> (61.30 – 352.00)	<b>156.91</b> (75.23 – 296.92)	0.2	<b>155.26</b> (155.26 – 352)	<b>152.72</b> (50.57 – 296.92)	0.17
D-dimer (mg/L)	<b>0.56</b> (0.17 – 4.23)	<b>0.44</b> (0.17 – 2.36)	0.66	<b>0.44</b> (0.17 – 4.23)	<b>0.44</b> (0.17 – 2.36)	0.19
AD13-Ag (ng/mL)	<b>1042.18</b> (448.57 – 1406.59)	<b>1049.78</b> (706.73 – 1598.09)	0.32	<b>1058.46</b> (448.57 – 1959.10)	<b>1059.97</b> (847.12 – 1598.09)	0.78
AD13-CBA (%)	<b>96.82</b> (46.28 – 150.07)	<b>129.38</b> (32.58 – 199.25)	<b>0.022</b>	<b>109.03</b> (32.58 – 204.22)	<b>109.23</b> (42.65 – 199.25)	0.2
AD13-activity (%)	<b>95.93</b> (67.48 – 118.32)	<b>94.83</b> (64.16 – 137.49)	0.71	<b>96.03</b> (64.16 – 139.71)	<b>93.60</b> (66.90 – 137.49)	0.2
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	<b>2.33</b> (0.75 – 13.76)	<b>2.19</b> (1.00 – 12.37)	0.19	<b>2.19</b> (1.00 – 12.37)	<b>2.33</b> (0.75 – 13.76)	0.19
IL-6 (pg/mL)	<b>1.18</b> (0.18 – 11.69)	<b>1.30</b> (0.35 – 6.37)	0.41	<b>0.99</b> (0.18 – 4.631)	<b>1.26</b> (0.35 – 19.49)	0.1
IL-8 (pg/mL)	<b>16.83</b> ( 5.88 – 191.13)	<b>22.93</b> (7.38 – 130.43)	<b>0.01</b>	<b>17.19</b> (5.88 – 130.43)	<b>20.18</b> ( 6.68 – 191.13)	0.1
CRP (mg/L)	<b>0.20</b> (0.002 – 1.05)	<b>0.21</b> (0.00 – 2.07)	0.3	<b>0.21</b> (0.04 – 2.07)	<b>0.18</b> (0.00 – 13.50)	0.37

Data expressed as median (range); \*P refers to Mann Whitney U test \*\* PTS was not available in 26 patients; \*\*\*Duplex examination was not available in 13 patients. The values were calculated by Mann-Whitney U-test.

## Discussion

The relation between inflammation and arterial disease is well established [22]. However, the relation between inflammation and VTE has been studied in recent years. We evaluated the inflammatory profiles of patients with previous VTE, by dosing the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and CRP. In agreement with previous studies, our results showed that TNF- $\alpha$  and IL-6 are increased in these patients[6, 23]. These findings suggest that VTE patients may present with increased levels of inflammatory markers even long time after the acute VTE episode.

We also observed that VWF antigen and activity were increased in VTE patients. Increased levels of VWF, mainly associated with decreased levels of ADAMTS 13, may act as a biomarker of prothrombotic and proinflammatory states [13, 24]. In contrast to previous reports, we observed increased levels of VWF associated with also increased levels of ADAMTS13. These findings were unexpected and it is possible that, since patients were in the late phase after the acute episode of VTE, ADAMTS13 levels could be increased to compensate the increased levels of VWF. Further, clinical data have shown that patients with chronic coronary syndrome may present with increased VWF and normal ADAMTS13 [25]. Regarding these data, it is possible to hypothesize that, in acute events, decreased levels of ADAMTS13 may occur through consumption by unexpectedly increasing levels of VWF and that ADAMTS 13 levels may normalize during the chronic course of the disease. These are interesting and intriguing findings that raise new questions about the relationship between ADAMTS13 and VWF in chronic inflammatory diseases and their role in VTE.

Patients with high levels of D-dimer have been considered having higher risk of VTE recurrence. In our results, all inflammatory markers were significantly increased in patients with elevated levels of D-dimer when compared to patients with normal D-

dimer. This finding raises the possibility of an association between inflammatory and coagulation activities in these patients [26].

It has been shown by prospective studies that the increased inflammatory activity during the acute episode of VTE is related to the onset of clinical sequels of the disease, mainly PTS [27, 28]. Our findings, however, failed to show any correlation between inflammatory markers and PTS or RVO. D-dimer levels were also not associated with PTS or RVO. Thus, it seems that the presence of these clinical sequels of VTE is not associated to the persistence of inflammatory or coagulation activities in these patients.

In conclusion, our study showed that patients with previous VTE may have increased levels of inflammatory markers and D-dimer even long time after the acute episode. The imbalance between VWF and ADAMTS 13 was not observed in these patients. Although the VWF levels were increased the ADAMTS 13 activity was also increased in these patients, in contrast to the results of previous studies. The inflammatory markers were significantly increased in patients with higher D-dimer levels, however none of the parameters studied could be associated with the presence of PTS or RVO. Considering the important relationship between inflammation, coagulation and thrombosis, further epidemiological studies, particularly prospective studies, are needed to elucidate the role of inflammation in the pathogenesis of VTE and in the prognosis of the disease.

## References

1. Rosendaal, F.R., *Venous thrombosis: a multicausal disease*. Lancet, 1999. **353**(9159): p. 1167-73.
2. Roumen-Klappe, E.M., et al., *Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis*. J Vasc Surg, 2002. **35**(4): p. 701-6.
3. van Hylckama Vlieg, A., et al., *High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3678-82.
4. Tsai, A.W., et al., *Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE)*. Am J Med, 2002. **113**(8): p. 636-42.
5. Mello, T., *Fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX e FXI como fatores de risco para tromboembolismo venoso em pacientes de uma população brasileira*, in *Fisiopatologia Médica - Faculdade de Ciências Médicas*. 2006, Universidade Estadual de Campinas: Campinas.
6. van Aken, B.E., et al., *Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation*. Thromb Haemost, 2000. **83**(4): p. 536-9.
7. Mello, T.B., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms are not risk factors for venous thromboembolism*. Thromb Res, 2008. **121**(5): p. 625-9.
8. Kamphuisen, P.W., et al., *High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene*. Br J Haematol, 2001. **115**(1): p. 156-8.
9. Chung, D.W. and K. Fujikawa, *Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13*. Biochemistry, 2002. **41**(37): p. 11065-70.
10. Dong, J.F., *Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1710-6.
11. Levy, G.G., D.G. Motto, and D. Ginsburg, *ADAMTS13 turns 3*. Blood, 2005. **106**(1): p. 11-7.
12. Moake, J.L., *von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Semin Hematol, 2004. **41**(1): p. 4-14.
13. Mannucci, P.M., et al., *Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2730-5.
14. Bongers, T.N., et al., *High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability*. Stroke, 2006. **37**(11): p. 2672-7.
15. Bongers, T.N., et al., *Lower levels of ADAMTS13 are associated with cardiovascular disease in young patients*. Atherosclerosis, 2009. **207**(1): p. 250-4.
16. Bernardo, A., et al., *Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow*. Blood, 2004. **104**(1): p. 100-6.
17. Zago, M.A. and F.F. Costa, *Hereditary haemoglobin disorders in Brazil*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1985. **79**(3): p. 385-8.
18. Kahn, S.R., *Measurement properties of the Villalta scale to define and classify the severity of the post-thrombotic syndrome*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(5): p. 884-8.
19. Favalaro, E.J., et al., *Laboratory testing for von Willebrand's disease: an assessment of current diagnostic practice and efficacy by means of a multi-laboratory survey. RCPA Quality Assurance Program (QAP) in Haematology*

- Haemostasis Scientific Advisory Panel*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(4): p. 1276-82.
20. Shelat, S.G., et al., *Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(8): p. 1707-17.
  21. Gerritsen, H.E., et al., *Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(5): p. 1386-9.
  22. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(14): p. 973-9.
  23. van Aken, B.E., P.H. Reitsma, and F.R. Rosendaal, *Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis*. *Br J Haematol*, 2002. **116**(1): p. 173-7.
  24. Zhao, B.Q., et al., *von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke*. *Blood*, 2009. **114**(15): p. 3329-34.
  25. He, S., et al., *Are increased levels of von Willebrand factor in chronic coronary heart disease caused by decrease in von Willebrand factor cleaving protease activity? A study by an immunoassay with antibody against intact bond 842Tyr-843Met of the von Willebrand factor protein*. *Thromb Res*, 2001. **103**(3): p. 241-8.
  26. Pottier, P., et al., *D-dimers, thrombin-antithrombin complexes, and risk factors for thromboembolism in hospitalized patient*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2009. **15**(6): p. 666-75.
  27. Roumen-Klappe, E.M., et al., *Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(4): p. 582-7.
  28. Shbaklo, H., C.A. Holcroft, and S.R. Kahn, *Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**(3): p. 505-12.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

### Perfil pró-inflamatório em pacientes com TEV

A relação entre inflamação e doença arterial está bem estabelecida, tanto que a PCR é amplamente utilizada como marcador de risco de complicações da doença aterosclerótica, principalmente de infarto agudo do miocárdio (Ridker, Cushman *et al.*, 1997).

Por outro lado, a relação entre a inflamação e TEV ainda tem sido objeto de investigação nos últimos anos, sendo que os estudos demonstraram haver aumento de citocinas inflamatórias tanto na fase aguda como na evolução da doença (Van Aken, Den Heijer *et al.*, 2000; Roumen-Klappe, Den Heijer *et al.*, 2002; Van Aken, Reitsma *et al.*, 2002; Reitsma e Rosendaal, 2004). Entretanto, ainda não há evidências clínicas que sustentem a hipótese de que os marcadores inflamatórios pudessem prever o desenvolvimento (Fox e Kahn, 2005) ou a recorrência da trombose venosa (Van Aken, Den Heijer *et al.*, 2000).

O presente estudo avaliou o perfil inflamatório em pacientes com antecedente de TEV, através da dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e PCR. Os resultados mostraram um aumento significativo dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos pacientes com antecedente de TEV em relação aos controles. Além disso, o TNF- $\alpha$  foi um fator de risco independente associado ao TEV.

O aumento desses marcadores inflamatórios, mesmo após o período agudo do TEV, demonstra a presença de uma resposta inflamatória persistente ao longo do tempo após a trombose, visto que a mediana do tempo decorrido entre o evento trombótico e a dosagem desses marcadores foi de 32 meses (7,1-76,6). Contudo, é importante ressaltar que o modelo de estudo atual não é o ideal para estabelecer uma relação causal entre atividade inflamatória e TEV, sendo então que não se pode excluir a possibilidade de

que alguns indivíduos apresentem um perfil pró-inflamatório prévio à trombose, que possa ter contribuído para a gênese do fenômeno trombótico.

Considerando a hipótese de que a elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 fosse apenas consequência do evento trombótico, a expectativa seria que os níveis destas citocinas fossem atenuados à medida que os pacientes se distanciassem do evento trombótico. Entretanto, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 não se correlacionaram com o tempo que decorreu após o evento trombótico.

É interessante que os resultados atuais são concordantes com estudos caso-controles prévios, que não observaram associação significativa entre o intervalo de tempo após o episódio de TEV e níveis de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6 (Van Aken, Den Heijer *et al.*, 2000; Van Aken, Reitsma *et al.*, 2002). Além disso, este estudo foi o que avaliou esses marcadores inflamatórios após um período muito mais prolongado em relação ao evento fonte.

Um dado muito interessante deste estudo foi a observação de que todos os marcadores inflamatórios mostraram-se significativamente elevados no grupo de pacientes que apresentavam níveis elevados de dímero-D, um marcador de hipercoagulabilidade, quando comparados ao grupo com dímero-D normal. Esse achado corrobora a hipótese de haver associação entre a atividade inflamatória e o aumento da coagulação (Pottier, Fouassier *et al.*, 2009).

A relação entre inflamação e coagulação é bidirecional, visto que proteases da coagulação, ao se ligarem a receptores ativáveis por proteases presentes em células endoteliais e mononucleares, são capazes de estimular a produção de várias citocinas, originando uma resposta inflamatória (Levi, Van Der Poll *et al.*, 2004). Isso poderia explicar o fato de haver um aumento de todos os marcadores inflamatórios apenas nos pacientes com dímero-D elevado, sugerindo então que a alteração inflamatória esteja

sendo estimulada pelo processo de hipercoagulabilidade, ou ainda que possa haver uma relação de causa-efeito entre a ativação da coagulação e a inflamação nesses pacientes.

Tendo em vista a importância da relação entre inflamação, hemostasia e trombose, mais estudos epidemiológicos, sobretudo de natureza prospectiva, são necessários para um melhor entendimento do papel da inflamação no risco de TEV e na evolução de suas complicações.

### **Associação entre marcadores inflamatórios e a presença de sequelas clínicas (síndrome pós-trombótica - SPT) e radiológicas (trombo residual) do TEV**

A literatura mostra através de estudos prospectivos que o aumento da atividade pró-inflamatória no episódio agudo do TEV está relacionada ao aparecimento de sequelas clínicas da doença.

Em 2009, um estudo que incluiu 110 pacientes com TVP na fase aguda, e acompanhados durante um ano, mostrou que o aumento dos níveis séricos de IL-6 ao diagnóstico estava significativamente associado ao aparecimento de SPT (Roumen-Klappe, Janssen *et al.*, 2009)Klappe 2009. O aumento de ICAM-1 e IL-6, 4 meses após o evento de TEV também foi associado com o desenvolvimento de SPT (Shbaklo, Holcroft *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou 4 marcadores inflamatórios e dímero-D em pacientes com TEV, na fase tardia da doença, investigando sua associação com a presença de trombo residual e SPT. Como os estudos anteriores incluíram pacientes até 6 meses do episódio agudo, nosso objetivo foi investigar se esses marcadores também teriam um papel ou associação com essas complicações após a fase aguda.

Uma das hipóteses é se a presença de um trombo residual ou de SPT, poderia ser um fator que estimularia a resposta inflamatória local, com consequências sistêmicas, e

ao mesmo tempo, se o processo inflamatório crônico poderia favorecer a manutenção ou piora dessas complicações.

A pesquisa de trombo residual foi realizada sempre pelo mesmo investigador, pelo método de Prandoni (Prandoni, Lensing *et al.*, 2002) e foi detectado em 53% dos pacientes avaliados. Não há uma padronização na literatura do tamanho a ser considerado como trombo residual, o que limita a comparação entre os diversos estudos.

A SPT estava presente em 53% dos pacientes, uma ocorrência semelhante ao descrito na literatura.

Nossos resultados mostraram que apenas a IL-8 estava significativamente aumentada nos pacientes com SPT. Todos os outros marcadores inflamatórios não mostraram diferença entre os pacientes com e sem SPT ou trombo residual. Também não houve alteração do dímero-D entre os grupos analisados.

Desta forma, nossos resultados levantam a hipótese de que a manutenção das sequelas clínicas e radiológicas do TEV estariam relacionadas às alterações anatômicas decorrentes da trombose aguda e não estariam associadas à persistência da atividade inflamatória e de hipercoagulabilidade nesses pacientes.

A presença de trombo residual não significa alteração de fluxo sanguíneo, e talvez por isso não induz maior resposta inflamatória local e sistêmica. Além disso, uma das restrições do método de ultrassom com Doppler para avaliação das seqüelas vasculares, é a não diferenciação entre a presença de um trombo residual ou apenas de tecido cicatricial dentro do vaso, que também podem explicar os achados deste estudo.

Essa hipótese vai ao encontro de evidências clínicas recentes que indicam que a presença de trombo residual não seria um fator de risco para a recidiva da trombose (Carrier, Rodger *et al.*), visto que não está associado a maior resposta inflamatória ou hipercoagulabilidade.

### **Níveis de ADAMTS13 e o balanço FVW/ADAMTS13 em pacientes com TEV**

O aumento dos níveis plasmáticos de FVW têm sido relatado em diversas doenças com um importante componente inflamatório, como a artrite reumatóide (McIntegart, Capell *et al.*, 2001), infecções virais e bacterianas (Tzavara, Vlachoyiannopoulos *et al.*, 1997; Kayal, Jais *et al.*, 1998), doença arterial coronariana (Jager, Van Hinsbergh *et al.*, 1999) e acidente vascular cerebral isquêmico (Bongers, De Maat *et al.*, 2006). Além disso, vários estudos demonstraram um aumento do FVW em pacientes com TEV, inclusive após a fase aguda da doença. Estudos realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o aumento do FVW também é um fator de risco para TEV na população brasileira (Mello, 2006).

A ADAMTS13 é a principal reguladora da proteólise fisiológica do FVW e a inflamação é acompanhada por uma diminuição da sua atividade (Mannucci, Canciani *et al.*, 2001). Há uma relação inversa entre FVW/ADAMTS13, que pode ser utilizada como possível biomarcador de estados pró-trombóticos e inflamatórios, conforme demonstrado em diversas patologias inflamatórias e arteriais.

A ADAMTS13 ainda não foi avaliada em pacientes com TEV, e essa foi a primeira das nossas propostas neste estudo caso-controle. Além disso, como o TEV está associado a alterações inflamatórias, e há relação entre a ADAMTS13 e o FVW, incluímos a análise qualitativa e quantitativa do FVW e da ADAMTS13.

Existem vários métodos disponíveis para avaliar a atividade da ADAMTS13, e todos se baseiam nas propriedades de clivagem do FVW. Os métodos podem utilizar FVW purificado (derivado do plasma ou recombinante) como substrato para a determinação da atividade da ADAMTS13 plasmática, ou substratos que mimetizam a porção do FVW que contem o sítio fisiológico de clivagem da ADAMTS13.

Os métodos que utilizam peptídeos sintéticos como substratos parecem ser os mais adequados para mensurar ADAMTS13 em caso de baixa atividade da enzima (0-5% de atividade da ADAMTS13), porém o método baseado na ligação ao colágeno residual possui boa sensibilidade e reprodutibilidade principalmente para detecção de valores mais altos da atividade da enzima. Como o método de ligação ao colágeno é um método *in-house*, e foi padronizado no laboratório para a realização deste estudo, incluímos o método Technozym ADAMTS13 activity para validação dos resultados.

Neste estudo, tanto o antígeno quanto a atividade do FVW mostraram-se elevados nos pacientes com TEV, possivelmente associado ao aumento da atividade inflamatória, representada pelo aumento de IL-6 e TNF- $\alpha$ , que podem estimular as células endoteliais. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre o antígeno do FVW e a IL-6 e PCR.

Os pacientes com aumento do dímero-D mostraram aumento de todos os marcadores inflamatórios, o que pode também contribuir para o aumento de FVW. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6, liberadas durante a inflamação tem demonstrado efeitos distintos sobre a liberação endotelial de FVW de alto peso molecular e seu processamento (Bernardo, Ball *et al.*, 2004).

Os estudos prévios que analisaram FVW e ADAMTS13 em outras patologias, mostraram um resultado contrário ao observado em nosso estudo, uma vez que não demonstramos uma relação inversa entre os mesmos, e sim um aumento de ambos. Contudo, esses estudos incluíram pacientes com patologias agudas, o que pode explicar esse achado diverso. Nos eventos agudos, possivelmente a queda da ADAMTS13 ocorra pelo consumo frente ao aumento inesperado do FVW.

Um estudo relatou que o nível do antígeno e da atividade do FVW estavam aumentados em um grupo de grávidas, mas os multímeros de alto peso molecular não

estavam presentes no plasma. Os autores formularam a hipótese de que o alto nível do antígeno do FVW poderia ser responsável pela diminuição da atividade da ADAMTS13 no plasma, como resultado do consumo da enzima quando ocorre um aumento do FVW (Lattuada, Rossi *et al.*, 2003).

Em nosso estudo os pacientes encontravam-se em período distante ao episódio agudo do TEV, e o aumento da ADAMTS13 poderia ser justificado como um mecanismo compensatório ao aumento crônico do FVW. Sendo assim, é possível que a ADAMTS13 funcione mais como um mecanismo de proteção a estes pacientes, clivando o FVW em excesso e diminuindo a quantidade de multímeros de altíssimo peso molecular, que poderiam ter um efeito pró-trombótico. Nesse sentido, a análise dos fragmentos do FVW seria uma ferramenta importante para corroborar essa hipótese.

Um estudo realizado em pacientes com síndrome coronariana crônica demonstrou um aumento de FVW e valores normais de ADAMTS13, o que corrobora nossa hipótese de um efeito compensatório entre esses fatores na fase tardia (He, Cao *et al.*, 2001).

Os nossos achados são muito interessantes, abrindo novos raciocínios em relação a ADAMTS13, o balanço entre a atividade da enzima e do FVW em processos inflamatórios crônicos e seu papel na TEV.

## 7. CONCLUSÃO

1. Após o evento agudo de TEV, há atividade pró-inflamatória e de hipercoagulabilidade nos pacientes, independentemente de apresentarem sequelas da trombose.
2. Há correlação direta entre os marcadores pró-inflamatórios e pró-coagulantes, evidenciando possível relação de causa e efeito entre eles.
3. O aumento da ADAMTS13 nesses pacientes foi um achado inesperado. É possível que este aumento ocorra por um mecanismo compensatório ao aumento do FVW.



## Anexo 2

### AVALIAÇÃO DO PACIENTE COM HISTÓRICO DE TROMBOSE

Nome do Paciente: _____	Data: _____
HC: _____	Data de nascimento: _____
Idade: _____	Sexo: <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino
-----	
Endereço: _____ número: _____ complemento: _____	
Cidade: _____ Estado: _____	
Telefone: _____	
-----	
Origem étnica: <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Afrodescendente <input type="checkbox"/> Oriental <input type="checkbox"/> Outros: _____	
-----	
História Pessoal: <input type="checkbox"/> TEV <input type="checkbox"/> OAA <input type="checkbox"/> AVCi <input type="checkbox"/> IAM	
Local: _____	Número de episódios: _____
<input type="checkbox"/> Espontâneo <input type="checkbox"/> Provocado: _____	
-----	
História Gestacional: G P A NV	Complicações: _____
-----	
Comorbidades: <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> IRC <input type="checkbox"/> Dislipidemia <input type="checkbox"/> Insuf. Hepática <input type="checkbox"/> Neoplasia	
-----	
História Familiar: <input type="checkbox"/> TEV <input type="checkbox"/> OAA <input type="checkbox"/> AVCi <input type="checkbox"/> IAM	
Grau de parentesco: _____	
-----	
Hábitos: <input type="checkbox"/> Fumo <input type="checkbox"/> Álcool <input type="checkbox"/> Drogas _____	
-----	
Medicamentos: _____	
-----	
Medidas Antropométricas: Peso: _____ Kg	Circunferência abdominal: _____ cm
Altura: _____ m	
IMC: _____	Obeso <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

### Anexo 3

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os indivíduos adultos.

#### Projeto: “Avaliação da Atividade da ADAMTS13 no Tromboembolismo Venoso”

*Responsáveis pelo projeto: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Fernanda Loureiro de Andrade Orsi, Bruna de Moraes Mazetto Fonseca.*

Eu, \_\_\_\_\_,

Idade: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, HC/AIH/RH: \_\_\_\_\_,

Residente à Rua/Av. \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_, Telefones \_\_\_\_\_, concordo em

participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: \_\_\_\_\_,

Idade : \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_, Residente à

Rua/Av. \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

---

Este estudo pretende quantificar a presença e a atividade de alguns fatores da coagulação em indivíduos que tenham tido trombose venosa. Para tanto, coletaremos 10mL de sangue do senhor (a) para realizarmos a quantificação do antígeno e da atividade desses fatores. Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes. A participação nesse estudo contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em conseqüência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa.
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso.
4. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
5. O material sanguíneo plasma colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado. Sim Não
6. Caso seja realizado outro estudo com este plasma, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de outro estudo. Este novo

estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.

7. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
8. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.
9. Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Assinatura do Voluntário*

\_\_\_\_\_  
**Joyce M. Annichino-Bizzacchi**

Orientadora

Fone: (19) 3521-8601

\_\_\_\_\_  
**Fernanda L. Andrade Orsi**

Colaboradora

Fone: (19) 3521-8756

\_\_\_\_\_  
**Bruna de M. Mazetto Fonseca**

Aluna de pós-graduação

Fone: (19) 3521-8755

---

### CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, assine seu nome diante da opção “SIM, aceito que minha amostra seja armazenada”. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção “Não, não aceito que minha amostra seja armazenada”.

SIM, eu aceito que minha amostra seja armazenada

\_\_\_\_\_  
 NÃO, eu não aceito que minha amostra seja armazenada

Campinas \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Anexo 4

##### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os indivíduos controles.

##### Projeto: “Avaliação da Atividade da ADAMTS13 no Tromboembolismo Venoso”

*Responsáveis pelo projeto: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Fernanda Loureiro de Andrade Orsi, Bruna de Moraes Mazetto Fonseca.*

Eu, \_\_\_\_\_,

Idade: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, HC/AIH/RH: \_\_\_\_\_,

Residente à Rua/Av. \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_, Telefones: \_\_\_\_\_,

concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: \_\_\_\_\_,

Idade : \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_, Residente à

Rua/Av \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

---

Este estudo pretende quantificar a presença e a atividade de alguns fatores da coagulação sanguínea em indivíduos que tenham tido trombose venosa. Entretanto, para termos confiança de que as alterações que por ventura encontraremos no sangue das pessoas acometidas por trombose estão diretamente relacionadas à doença que apresentam, precisamos estudar os mesmos fatores no sangue de pessoas saudáveis, como o(a) senhor(a). Para tanto, coletaremos 10mL de sangue do senhor (a) para realizarmos a quantificação do antígeno e da atividade desses fatores. Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes. A participação nesse estudo contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em conseqüência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa.
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso.
4. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.

5. O plasma, material sanguíneo, colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado. Sim Não
6. Caso seja realizado outro estudo com este plasma, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
7. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
8. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.  
Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887  
Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Assinatura do Voluntário*

\_\_\_\_\_  
**Joyce M. Annichino-Bizzacchi**  
Orientadora  
Fone: (19) 3521-8601

\_\_\_\_\_  
**Fernanda L. Andrade Orsi**  
Colaboradora  
Fone: (19) 3521-8756

\_\_\_\_\_  
**Bruna de M. Mazetto Fonseca**  
Aluna de pós-graduação  
Fone: (19) 3521-8755

### CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, assine seu nome diante da opção “SIM, aceito que minha amostra seja armazenada”. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção “Não, não aceito que minha amostra seja armazenada”.

SIM, eu aceito que minha amostra seja armazenada

NÃO, eu não aceito que minha amostra seja armazenada

Campinas

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

## Anexo 5

Tabela com dados demográficos e clínicos

TVP N °	Idade	Sexo	Etnia	Grupo ABO	Meses após TVP	Diabetes	Hipertensão	Dislipidemia	Outras doenças	Fator de risco	Local da trombose	SPT	IMC	TVP recorrente
TVP 01	46	M	N	O+	7	Não	Não	Não	Nefrolitíase	Espontânea	P/D	NA	NA	X
TVP 03	34	F	N	B+	7	Não	Não	Não	Não	ACO+ Cirurgia de varizes	D	NA	NA	
TVP 05	52	M	C	A-	35	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	D	NA	NA	
TVP 06	36	F	C	A+	13	Não	Não	Não	Não	ACO	P	NA	NA	
TVP 08	55	M	N	A+	28	Sim	Não	Não	Não	Espontânea	D	NA	NA	
TVP 10	34	F	N	O+	14	Não	Não	Não	Não	ACO	D	NA	NA	
TVP 11	30	M	C	B+	38	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Sim	25,6	
TVP 12	31	M	C	A+	39	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Não	33,8	
TVP 15	53	F	C	B+	44	Não	Não	Não	Não	ACO	D	Sim	28,3	
TVP 16	46	F	C	O+	42	Não	Não	Não	Convulsões	Espontânea	D	Sim	32,8	X
TVP 17	32	F	N	O-	75	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	NA	NA	
TVP 20	28	M	C	A+	25	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	Sim	37,8	
TVP 22	55	F	C	O+	45	Não	Não	Não	Disfunção diastólica de VE	Espontânea	P	Sim	47,5	
TVP 23	47	F	C	A+	41	Não	Sim	Não	Não	ACO	D	Sim	37,7	
TVP 27	46	F	N	O+	18	Não	Não	Não	Esquizofrênica	Espontânea	P/D	NA	NA	X
TVP 29	28	F	C	A+	16	Não	Não	Não	Não	ACO	D	NA	NA	
TVP 30	50	M	C	A+	40	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	D	NA	NA	
TVP 32	36	M	C	O+	40	Não	Não	Não	Asma	Espontânea	P/D	NA	NA	X
TVP 33	52	F	C	A-	9	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	D	NA	NA	
TVP 34	47	M	N	A+	35	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Não	29,9	
TVP 35	28	F	N	A+	35	Não	Não	Não	Não	Gravidez	D	Não	28,6	
TVP 37	42	F	N	O+	34	Não	Não	Não	Não	Cirurgia Hérnia Inguinal	P	Sim	28,5	
TVP 38	41	F	N	A-	40	Não	Não	Sim	Não	Espontânea	D	Não	26,9	
TVP 39	27	F	C	B+	7	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P	NA	NA	X
TVP 40	33	F	C	O+	32	Não	Não	Não	Migrânea	Puerpério	D	Não	22,7	
TVP 41	21	F	C	AB +	31	Não	Não	Não	Não	Puerpério	D	NA	NA	

<b>TVP N °</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Etnia</b>	<b>Grupo ABO</b>	<b>Meses após TVP</b>	<b>Diabetes</b>	<b>Hipertensão</b>	<b>Dislipidemia</b>	<b>Outras doenças</b>	<b>Fator de risco</b>	<b>Local da trombose</b>	<b>SPT</b>	<b>IMC</b>	<b>TVP recorrente</b>
<b>TVP 42</b>	42	M	C	A+	10	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Sim	28,5	
<b>TVP 43</b>	34	F	C	A+	49	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	NA	42,3	x
<b>TVP 45</b>	40	F	C	A+	50	Não	Não	Não	Asma	ACO	P/D + TEP	Sim	35,5	x
<b>TVP 46</b>	30	F	N	A+	33	Não	Sim	Não	Não	Gravidez	D	NA	NA	
<b>TVP 47</b>	27	F	N	A+	30	Não	Não	Não	Asma	Gravidez	P	Sim	29	
<b>TVP 48</b>	40	M	C	A+	36	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Não	30	
<b>TVP 49</b>	37	F	N	A+	22	Não	Não	Não	Não	Gestação	P	Não	24,7	
<b>TVP 50</b>	56	M	C	A+	19	Não	Sim	Sim	Não	Espontânea	D	Não	35,5	
<b>TVP 51</b>	28	M	N	O+	59	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P	NA	NA	
<b>TVP 53</b>	45	F	C	A+	28	Não	Não	Não	Não	Espontânea	TEP	Não	32,9	
<b>TVP 54</b>	51	F	C	A+	77	Não	Não	Não	Fibromialgia e arritmia	Espontânea	TEP	NA	27,1	
<b>TVP 56</b>	40	F	C	B+	20	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	Sim	32,5	x
<b>TVP 57</b>	53	F	N	A+	22	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	D	Sim	41	
<b>TVP 58</b>	53	M	C	A+	70	Não	Não	Não	Sarcoidose	Espontânea	D	Não	33	
<b>TVP 59</b>	32	F	N	B+	33	Não	Não	Não	Não	ACO	D	Não	25,5	
<b>TVP 60</b>	20	F	C	A+	32	Não	Não	Não	Não	ACO	P/D + TEP	Sim	20,5	
<b>TVP 61</b>	30	F	C	B+	33	Não	Não	Não	Não	ACO	P	Não	44,7	
<b>TVP 62</b>	60	M	N	A+	37	Não	Sim	Sim	Não	Viagem prolongada	D	Não	37,3	
<b>TVP 63</b>	49	F	N	A+	17	Sim	Sim	Não	Insuficiência Cardíaca	Espontânea	D	NA	35	
<b>TVP 66</b>	72	F	C	A+	56	Não	Sim	Sim	Não	Viagem prolongada	P/D	Não	23,4	
<b>TVP 67</b>	31	M	N	A+	44	Não	Não	Não	Não	Cirurgia hérnia inguinal	P	Não	21,9	
<b>TVP 68</b>	44	M	N	A+	35	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P	Não	26,1	x
<b>TVP 69</b>	72	F	C	A+	64	Não	Sim	Sim	Não	Espontânea	D	Não	NA	
<b>TVP 70</b>	65	F	C	A+	32	Não	Sim	Não	Arritmia cardíaca	Viagem prolongada	P/D	Sim	28,9	x
<b>TVP 71</b>	28	F	C	A+	25	Não	Não	Sim	Depressão	ACO	D	Sim	29,1	x
<b>TVP 72</b>	29	F	N	O+	8	Não	Não	Não	Não	ACO	D	NA	21	
<b>TVP 73</b>	67	F	N	B+	19	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	P/D	Sim	25	x
<b>TVP 74</b>	59	M	N	B+	15	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	P/D	Não	26,2	
<b>TVP 75</b>	39	M	C	A+	67	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P	Não	27,5	
<b>TVP 76</b>	72	F	C	B+	28	Não	Não	Não	Arritmia, Asma e uveíte	Espontânea	D	NA	24	

<b>TVP N °</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Etnia</b>	<b>Grupo ABO</b>	<b>Meses após TVP</b>	<b>Diabetes</b>	<b>Hipertensão</b>	<b>Dislipidemia</b>	<b>Outras doenças</b>	<b>Fator de risco</b>	<b>Local da trombose</b>	<b>SPT</b>	<b>IMC</b>	<b>TVP recorrente</b>
<b>TVP 77</b>	72	F	C	A+	45	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	Sim	29,5	
<b>TVP 78</b>	46	M	N	A+	44	Não	Não	Sim	Não	Espontânea	D	Sim	NA	x
<b>TVP 81</b>	20	F	N	B+	30	Não	Não	Não	Não	Gestação	D	Não	30,1	
<b>TVP 82</b>	51	F	N	A+	14	Sim	Sim	Sim	DPOC	Espontânea	P/D	NA	59,8	
<b>TVP 84</b>	47	F	C	A+	13	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	NA	25,3	
<b>TVP 85</b>	46	F	N	A+	10	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Sim	31,4	
<b>TVP 86</b>	38	F	C	B-	41	Não	Não	Não	Não	Gestação	P/D	Não	33,2	
<b>TVP 87</b>	27	F	N	O+	18	Não	Não	Não	Não	ACO	P/D	Não	28,5	x
<b>TVP 88</b>	43	M	N	A+	9	Não	Não	Não	Gastrite	Espontânea	P/D	Sim	26,6	
<b>TVP 89</b>	35	F	C	AB+	37	Sim	Sim	Não	Arritmia	Espontâneo	TEP	NA	34,4	
<b>TVP 90</b>	54	F	C	A+	26	Não	Sim	Não	Não	Espontânea	TEP	NA	32,2	
<b>TVP 91</b>	26	M	N	A+	23	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Sim	36,2	
<b>TVP 92</b>	50	M	N	B+	15	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Sim	22,2	x
<b>TVP 93</b>	30	F	C	O+	34	Não	Não	Não	Não	Espontânea	D	Sim	23,9	
<b>TVP 94</b>	55	M	N	B+	35	Não	Não	Não	Não	Espontânea	P/D	Não	23	
<b>TVP 95</b>	59	F	C	A+	23	Não	Não	Não	Não	TRH	P/D	Sim	27,5	
<b>TVP 96</b>	52	M	N	A+	22	Não	Sim	Sim	Gastrite crônica	Espontânea	P	Sim	27,5	
<b>TVP 97</b>	57	F	C	A+	19	Não	Não	Não	Esteatose Hepática	Espontânea	D	Sim	29,9	
<b>TVP 98</b>	27	F	N	B+	16	Não	Não	Não	Traço falciforme	Pós-operatório varizes	D	NA	NA	
<b>TVP 99</b>	28	F	N	A+	36	Não	Não	Não	Não	ACO	D	Sim	22,1	
<b>TVP 100</b>	58	F	N	A+	52	Não	Sim	Não	Não	TRH	D	Não	27,6	

**TVP N°:** identificação numérica dos pacientes; **C:** caucasóide; **N:** não-caucasóide **TVP:** trombose venosa profunda; **DPOC:** doença pulmonar obstrutiva crônica; **ACO:** anticoncepcional; **THR:** terapia de reposição hormonal; **TEP:** tromboembolismo pulmonar; **D:** distal; **P:** proximal; **NA:** Não avaliado; **SPT:** síndrome pós-trombótica; **IMC:** índice de massa corpórea

## Anexo 6

Tabela com resultados ultrassonográficos e laboratoriais

TVP N°	US Normal	Refluxo	Espessamento	Segmentos ocluídos	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	D-dímero (mg/L)	PCR (mg/dL)	AD13-GST-FVW73 (%)	AD13-CBA (%)	AD13-Ag (ng/mL)	FVW-Ag (U/dL)	FVW-CBA (%)
TVP 01		X	X		0,493	2,295	6,679	0,17	0,04	105,854	171,293	1195,169	265,627	257,846
TVP 03					1,034	1,881	9,318	0,35	0,679	143,262	199,085	1393,11	201,258	106,315
TVP 05	X				1,173	1,95	8,065	0,44	0,202	72,841	88,499	1112,376	143,564	128,524
TVP 06					3,559	1,291	21,219	0,47	1,74	115,876	69,345	1151,061	266,918	176,573
TVP 08					0,905	6,297	24,695	1,15	0,11	129,777	64,833	1199,408	242,164	197,606
TVP 10					0,788	11,02	9,959	0,31	0,11	95,089	35,887	1190,228	131,635	125,723
TVP 11		X	X	X	1,819	2,218	19,431	0,29	0,106	108,524	148,289	882,159	156,119	222,529
TVP 12		X	X	X	0,882	1,968	18,831	0,3	0,0594	NA	76,699	887,482	148,264	168,645
TVP 15	X				1,647	3,436	41,317	0,29	0,0523	99,688	111,692	985,27	141,742	129,315
TVP 16		X			2,688	6,646	20,478	0,59	1,77	64,162	32,583	706,733	101,296	156,912
TVP 17	X				1,578	19,986	27,332	1,66	0,03	79,096	85	1246,225	83,405	314,115
TVP 20	X				1,114	1,563	9,582	0,27	0,232	121,357	176,901	1022,588	159,964	213,565
TVP 22	X				0,904	12,366	40,669	0,81	0,17	96,032	89,249	1003,366	151,43	157,072
TVP 23			X		0,811	4,099	22,928	0,33	0,302	117,596	197,529	1380,042	215,65	153,897
TVP 27		X	X		19,489	6,984	17,734	1,61	13,5	76,244	113,239	847,116	226,19	171,255
TVP 29					0,377	17,518	14,265	0,67	0,0256	121,637	150	1269,905	65,153	124,769
TVP 30	X				0,54	2,273	14,696	0,46	1,45	104,172	95,127	1058,461	172,076	193,267
TVP 32					1,106	4,924	18,344	0,3	0,23	96,175	88,529	983,739	121,851	94,84
TVP 33					1,046	1,593	20,82	0,33	0,708	100,253	45,969	1048,858	155,02	104,974
TVP 34		X	X		1,213	5,646	27,479	0,18	0,19	87,976	95,241	1054,737	147,812	128,054
TVP 35	X				2,066	1,153	15,467	0,67	0,47	95,956	47,874	963,965	140,972	206,783
TVP 37		X	X	X	0,993	2,448	13,522	0,27	0,116	91,362	89,848	948,93	52,342	77,276
TVP 38	X				0,822	1,476	8,853	0,17	0,0863	85,571	76,445	922,627	108,862	99,357
TVP 39			X		0,92	1,478	8,157	0,17	0,11	96,416	105,229	1129,641	110,659	161,279
TVP 40		X			0,793	2,868	21,881	0,17	0,0461	91,014	92,847	1248,256	89,58	180,36

<b>TVP N°</b>	<b>US Normal</b>	<b>Refluxo</b>	<b>Espessamento</b>	<b>Segmentos ocluídos</b>	<b>IL-6 (pg/mL)</b>	<b>TNF-α (pg/mL)</b>	<b>IL-8 (pg/mL)</b>	<b>D-dímero (mg/L)</b>	<b>PCR (mg/dL)</b>	<b>AD13-GST-FVW73 (%)</b>	<b>AD13-CBA (%)</b>	<b>AD13-Ag (ng/mL)</b>	<b>FVW-Ag (U/dL)</b>	<b>FVW-CBA (%)</b>
<b>TVP 41</b>					0,394	1,486	6,958	0,31	0,02	111,381	100,211	1130,865	79,158	117,862
<b>TVP 42</b>		X	X	X	0,719	5,076	20,924	1,34	0,0673	106,341	137,452	1160,755	156,762	179,401
<b>TVP 43</b>	X				0,709	2,318	17,187	0,26	0,309	83,211	121,008	854,583	148,589	285,642
<b>TVP 45</b>	X				0,755	4,018	8,814	0,5	0,22	108,45	163,213	1190,786	132,725	110,332
<b>TVP 46</b>	X				6,235	1,748	11,837	0,43	2,34	81,441	95,127	967,693	258,429	125,298
<b>TVP 47</b>			X		0,727	2,904	13,25	0,33	0,0713	119,636	162,535	1088,841	120,077	158,332
<b>TVP 48</b>		X	X	X	0,914	9,579	47,836	0,68	0,412	94,85	105,092	1064,677	154,618	115,643
<b>TVP 49</b>			X		0,502	1,528	9,818	0,17	0,02	113,869	128,803	890,587	79,396	93,091
<b>TVP 50</b>	X				0,182	2,201	10,649	0,17	0,0429	109,984	106,093	1320,204	158,316	113,156
<b>TVP 51</b>			X		0,794	5,393	15,566	0,36	0,113	84,613	84,136	1003,274	48,721	50,574
<b>TVP 53</b>	X				4,633	2,189	14,929	NA	0,83	96,493	46,285	941,902	175	114,619
<b>TVP 54</b>					NA	NA	NA	3	0,02	NA	28,495	1119,565	109,914	120,104
<b>TVP 56</b>		X	X		1,714	1,347	16,245	0,25	0,16	73,476	83,834	1109,862	146,379	177,544
<b>TVP 57</b>			X		6,371	2,362	70,614	0,64	0,94	89,191	42,646	993,872	118,364	75,228
<b>TVP 58</b>	X				1,29	2,628	10,159	0,56	0,299	118,318	86,016	1164,567	118,371	144,928
<b>TVP 59</b>		X			0,653	1,528	5,885	0,63	0,373	97,298	83,547	1029,633	146,729	352,003
<b>TVP 60</b>			X	X	0,349	1,205	7,378	0,34	0,00173	137,494	130,483	1598,09	215,265	257,209
<b>TVP 61</b>			X	X	4,634	13,764	191,135	1,3	0,33	103,125	102,515	1392,162	114,381	108,59
<b>TVP 62</b>	X				1,364	1,379	18,196	0,79	0,21	83,172	80,282	448,569	161,131	80,75
<b>TVP 63</b>	X				2,477	2,022	40,959	1,24	0,79	107,719	123,437	1243,268	174,049	123,76
<b>TVP 66</b>		X	X	X	2,184	2,033	13,232	0,67	0,256	103,582	150,069	1202,117	154,899	83,967
<b>TVP 67</b>			X	X	1	12,406	33,484	1,33	0,0196	79,996	98,404	887,087	83,655	95,109
<b>TVP 68</b>		X	X		2,649	2,15	12,599	1,52	0,0236	88,595	146,207	1055,268	111,907	61,301
<b>TVP 69</b>	X				1,869	3,739	18,26	4,23	0,365	77,241	112,25	704,609	433,893	199,458
<b>TVP 70</b>		X	X		3,058	2,205	45,549	1,75	0,483	93,598	75,54	1191,044	111,582	104,87
<b>TVP 71</b>	X				0,992	3,202	19,218	0,29	0,206	94,835	129,379	1256,942	104,245	113,483
<b>TVP 72</b>					1,346	38,878	17,577	0,17	0,02	102,731	90,53	991,91	140,031	86,274
<b>TVP 73</b>		X	X		3,179	4,504	28,724	0,66	0,75	66,903	122,059	921,964	181,337	118,327
<b>TVP 74</b>			X		0,764	0,75	18,669	0,2	0,11	67,484	78,404	865,419	208,185	168,04

TVP N°	US Normal	Refluxo	Espessamento	Segmentos ocluídos	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	D-dímero (mg/L)	PCR (mg/dL)	AD13-GST-FVW73 (%)	AD13-CBA (%)	AD13-Ag (ng/mL)	FVW-Ag (U/dL)	FVW-CBA (%)
TVP 75	X				0,575	4,389	20,486	0,17	0,036	104,113	114,621	1406,587	127,665	145,261
TVP 76					3,531	1,994	33,199	1,9	0,93	106,261	88,776	1267,34	231,351	174,736
TVP 77		X	X		2,265	3,629	15,629	0,77	0,0776	70,761	76,085	1021,884	194,236	201,176
TVP 78	X				0,57	1,834	15,737	0,44	0,0655	78,184	82	988,152	214,676	155,259
TVP 81	X				1,382	1,627	8,103	0,36	0,0579	71,13	92,633	1015,554	158,195	171,729
TVP 82		X	X		10,401	1,581	22,137	0,49	0,88	94,969	101,48	1139,229	248,446	169,869
TVP 84	X				0,976	1,86	42,9	0,22	0,0753	115,678	170,276	1288,293	97,375	144,698
TVP 85		X	X	X	1,221	1,249	30,331	0,17	0,81	82,295	92,668	887,155	176,26	151,54
TVP 86		X			2,085	0,999	6,853	1	1,05	90,041	109,034	1290,154	151,646	272,618
TVP 87		X	X		1,141	7,776	25,883	0,35	0,391	99,024	134,621	1197,728	87,712	176,06
TVP 88		X	X		1,297	4,968	23,125	1,33	0,578	109,247	173,103	1188,23	285,516	296,921
TVP 89	X				0,832	1,933	24,002	0,17	0,18	139,71	204,223	1959,098	150,246	100,408
TVP 90					2,483	1,639	12,85	0,46	0,25	90,233	115,588	837,964	184,831	148,239
TVP 91		X	X		1,305	6,587	31,844	1,52	0,0703	88,728	152,345	1178,751	132,454	221,791
TVP 92		X	X		1,636	4,129	41,722	0,4	0,21	87,174	199,249	943,863	120,766	106,451
TVP 93	X				0,684	7,871	23,414	1,39	2,07	91,427	112,828	1049,775	71,988	180,872
TVP 94		X			0,98	1,683	11,197	0,4	0,104	95,926	118,552	1140,657	191,078	250,468
TVP 95		X	X	X	1,517	1,153	16,908	2,36	0,331	84,4	89,467	860,516	228,99	166,207
TVP 96			X	X	0,946	0,931	31,892	0,29	0,074	101,404	159,921	1129,437	205,571	126,192
TVP 97	X				3,303	3,091	130,427	0,57	0,323	121,171	141,759	1248,776	197,852	166,105
TVP 98			X		1,443	2,276	8,867	1,65	0,38	93,028	148,695	1427,275	209,449	132,351
TVP 99	X				1,415	1,092	37,395	0,32	0,04	111,041	182,088	1428,499	110,319	125,118
TVP100		X	X		11,694	1,34	23,439	0,61	0,85	96,833	94,567	907,746	211,969	115,249

**TVP N°:** identificação numérica dos pacientes; **US:** ultrassom; **PCR:** Proteína C Reativa

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Annichino-Bizzacchi, J. M. Avaliação clínica, laboratorial e molecular de pacientes brasileiros portadores de trombose venosa. (Livre Docência). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
2. Arruda, V. R., J. M. Annichino-Bizzacchi, *et al.* Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. Thromb Haemost, v.78, n.6, Dec, p.1430-3. 1997.
3. Bernardo, A., C. Ball, *et al.* Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. Blood, v.104, n.1, Jul 1, p.100-6. 2004.
4. Bongers, T. N., M. P. De Maat, *et al.* High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. Stroke, v.37, n.11, Nov, p.2672-7. 2006.
5. Carrier, M., M. A. Rodger, *et al.* Residual vein obstruction to predict the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with deep vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis. J Thromb Haemost, v.9, n.6, Jun, p.1119-25.
6. Chung, D. W. e K. Fujikawa. Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13. Biochemistry, v.41, n.37, Sep 17, p.11065-70. 2002.
7. Cosmi, B., C. Legnani, *et al.* D-dimer and residual vein obstruction as risk factors for recurrence during and after anticoagulation withdrawal in patients with a first episode of provoked deep-vein thrombosis. Thromb Haemost, v.105, n.5, May, p.837-45.
8. Crawley, J. T., J. K. Lam, *et al.* Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. Blood, v.105, n.3, Feb 1, p.1085-93. 2005.
9. De Visser, M. C., S. R. Poort, *et al.* Factor X levels, polymorphisms in the promoter region of factor X, and the risk of venous thrombosis. Thromb Haemost, v.85, n.6, Jun, p.1011-7. 2001.
10. Donadelli, R., F. Banterla, *et al.* In-vitro and in-vivo consequences of mutations in the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost, v.96, n.4, Oct, p.454-64. 2006.
11. Donadelli, R., J. N. Orje, *et al.* Size regulation of von Willebrand factor-mediated platelet thrombi by ADAMTS13 in flowing blood. Blood, v.107, n.5, Mar 1, p.1943-50. 2006.
12. Dong, J. F. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. J Thromb Haemost, v.3, n.8, Aug, p.1710-6. 2005.

13. Dong, J. F., J. L. Moake, *et al.* ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. Blood, v.100, n.12, Dec 1, p.4033-9. 2002.
14. Esmon, C. T. The impact of the inflammatory response on coagulation. Thromb Res, v.114, n.5-6, p.321-7. 2004.
15. Favalaro, E. J., J. Smith, *et al.* Laboratory testing for von Willebrand's disease: an assessment of current diagnostic practice and efficacy by means of a multi-laboratory survey. RCPA Quality Assurance Program (QAP) in Haematology Haemostasis Scientific Advisory Panel. Thromb Haemost, v.82, n.4, Oct, p.1276-82. 1999.
16. Fox, E. A. e S. R. Kahn. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. Thromb Haemost, v.94, n.2, Aug, p.362-5. 2005.
17. Gallinaro, L., M. G. Cattini, *et al.* A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. Blood, v.111, n.7, Apr 1, p.3540-5. 2008.
18. Gerritsen, H. E., P. L. Turecek, *et al.* Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Thromb Haemost, v.82, n.5, Nov, p.1386-9. 1999.
19. Groot, E., P. G. De Groot, *et al.* The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. Curr Opin Hematol, v.14, n.3, May, p.284-9. 2007.
20. Hansson, P. O., L. Welin, *et al.* Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. 'The Study of Men Born in 1913'. Arch Intern Med, v.157, n.15, Aug 11-25, p.1665-70. 1997.
21. He, S., H. Cao, *et al.* Are increased levels of von Willebrand factor in chronic coronary heart disease caused by decrease in von Willebrand factor cleaving protease activity? A study by an immunoassay with antibody against intact bond 842Tyr-843Met of the von Willebrand factor protein. Thromb Res, v.103, n.3, Aug 1, p.241-8. 2001.
22. Heijboer, H., D. P. Brandjes, *et al.* Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. N Engl J Med, v.323, n.22, Nov 29, p.1512-6. 1990.
23. Hoshiba, Y., K. Hatakeyama, *et al.* Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. J Thromb Haemost, v.4, n.1, Jan, p.114-20. 2006.
24. Hulstein, J. J., P. J. Van Runnard Heimel, *et al.* Acute activation of the endothelium results in increased levels of active von Willebrand factor in

- hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome. J Thromb Haemost, v.4, n.12, Dec, p.2569-75. 2006.
25. Jager, A., V. W. Van Hinsbergh, *et al.* von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.19, n.12, Dec, p.3071-8. 1999.
  26. Jenkins, P. V. e J. S. O'donnell. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? Transfusion, v.46, n.10, Oct, p.1836-44. 2006.
  27. Jezovnik, M. K. e P. Poredos. Idiopathic venous thrombosis is related to systemic inflammatory response and to increased levels of circulating markers of endothelial dysfunction. Int Angiol, v.29, n.3, Jun, p.226-31.
  28. Kahn, S. R. Measurement properties of the Villalta scale to define and classify the severity of the post-thrombotic syndrome. J Thromb Haemost, v.7, n.5, May, p.884-8. 2009.
  29. Kahn, S. R., H. Partsch, *et al.* Definition of post-thrombotic syndrome of the leg for use in clinical investigations: a recommendation for standardization. J Thromb Haemost, v.7, n.5, May, p.879-83. 2009.
  30. Kahn, S. R., H. Shbaklo, *et al.* Determinants of health-related quality of life during the 2 years following deep vein thrombosis. J Thromb Haemost, v.6, n.7, Jul, p.1105-12. 2008.
  31. Kahn, S. R., I. Shrier, *et al.* Determinants and time course of the postthrombotic syndrome after acute deep venous thrombosis. Ann Intern Med, v.149, n.10, Nov 18, p.698-707. 2008.
  32. Kamphuisen, P. W., J. C. Eikenboom, *et al.* High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. Br J Haematol, v.115, n.1, Oct, p.156-8. 2001.
  33. Kamphuisen, P. W., R. Lensen, *et al.* Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia. Br J Haematol, v.109, n.3, Jun, p.519-22. 2000.
  34. Kayal, S., J. P. Jais, *et al.* Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.3 Pt 1, Mar, p.776-84. 1998.
  35. Kokame, K. e T. Miyata. Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. Semin Hematol, v.41, n.1, Jan, p.34-40. 2004.
  36. Koster, T., A. D. Blann, *et al.* Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. Lancet, v.345, n.8943, Jan 21, p.152-5. 1995.

37. Lam, J. K., C. K. Chion, *et al.* Further characterization of ADAMTS-13 inactivation by thrombin. J Thromb Haemost, v.5, n.5, May, p.1010-8. 2007.
38. Lattuada, A., E. Rossi, *et al.* Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. Haematologica, v.88, n.9, Sep, p.1029-34. 2003.
39. Levi, M., T. Van Der Poll, *et al.* Bidirectional relation between inflammation and coagulation. Circulation, v.109, n.22, Jun 8, p.2698-704. 2004.
40. Levy, G. G., D. G. Motto, *et al.* ADAMTS13 turns 3. Blood, v.106, n.1, Jul 1, p.11-7. 2005.
41. Loscalzo, J. Pathogenesis of thrombosis. New York: McGraw-Hill. 1995 (Hematology)
42. Maffei, F. Trombose venosa profunda dos membros inferiores: incidência, patologia, fisiopatologia e diagnóstico. Rio de Janeiro: Medsi. 1995
43. Mannucci, P. M., M. T. Canciani, *et al.* Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. Blood, v.98, n.9, Nov 1, p.2730-5. 2001.
44. Mannucci, P. M., C. Capoferri, *et al.* Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. Br J Haematol, v.126, n.2, Jul, p.213-8. 2004.
45. Mannucci, P. M., A. Parolari, *et al.* Opposite changes of ADAMTS-13 and von Willebrand factor after cardiac surgery. J Thromb Haemost, v.3, n.2, Feb, p.397-9. 2005.
46. Marcucci, R., F. Cesari, *et al.* ADAMTS-13 activity in the presence of elevated von Willebrand factor levels as a novel mechanism of residual platelet reactivity in high risk coronary patients on antiplatelet treatment. Thromb Res, v.123, n.1, p.130-6. 2008.
47. McEntegart, A., H. A. Capell, *et al.* Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), v.40, n.6, Jun, p.640-4. 2001.
48. Meijers, J. C., W. L. Tekelenburg, *et al.* High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. N Engl J Med, v.342, n.10, Mar 9, p.696-701. 2000.
49. Mello, T. Fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX e FXI como fatores de risco para tromboembolismo venoso em pacientes de uma população brasileira. (Doutorado). Fisiopatologia Médica - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
50. Mello, T. B., F. L. Orsi, *et al.* Long-term prospective study of recurrent venous thromboembolism in a Hispanic population. Blood Coagul Fibrinolysis, v.21, n.7, Oct, p.660-5.

51. Mello, T. B., L. H. Siqueira, *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms are not risk factors for venous thromboembolism. Thromb Res, v.121, n.5, p.625-9. 2008.
52. Minano, A., A. Ordonez, *et al.* AB0 blood group and risk of venous or arterial thrombosis in carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A polymorphisms. Haematologica, v.93, n.5, May, p.729-34. 2008.
53. Moake, J. L. Thrombotic microangiopathies. N Engl J Med, v.347, n.8, Aug 22, p.589-600. 2002.
54. \_\_\_\_\_. von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Semin Hematol, v.41, n.1, Jan, p.4-14. 2004.
55. Moriguchi-Goto, S., A. Yamashita, *et al.* ADAMTS-13 attenuates thrombus formation on type I collagen surface and disrupted plaques under flow conditions. Atherosclerosis, Aug 13. 2008.
56. Plaimauer, B., J. Fuhrmann, *et al.* Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. Blood, v.107, n.1, Jan 1, p.118-25. 2006.
57. Poort, S. R., F. R. Rosendaal, *et al.* A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood, v.88, n.10, Nov 15, p.3698-703. 1996.
58. Poredos, P. e M. K. Jezovnik. The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis. Int Angiol, v.26, n.4, Dec, p.306-11. 2007.
59. Pottier, P., M. Fouassier, *et al.* D-dimers, thrombin-antithrombin complexes, and risk factors for thromboembolism in hospitalized patient. Clin Appl Thromb Hemost, v.15, n.6, Dec, p.666-75. 2009.
60. Prandoni, P. e S. R. Kahn. Post-thrombotic syndrome: prevalence, prognostication and need for progress. Br J Haematol, v.145, n.3, May, p.286-95. 2009.
61. Prandoni, P., A. W. Lensing, *et al.* The diagnostic value of compression ultrasonography in patients with suspected recurrent deep vein thrombosis. Thromb Haemost, v.88, n.3, Sep, p.402-6. 2002.
62. Reitsma, P. H. e F. R. Rosendaal. Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study. J Thromb Haemost, v.2, n.4, Apr, p.619-22. 2004.
63. Ridker, P. M., M. Cushman, *et al.* Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med, v.336, n.14, Apr 3, p.973-9. 1997.

64. Robetorye, R. S. e G. M. Rodgers. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. Am J Hematol, v.68, n.4, Dec, p.256-68. 2001.
65. Rosencher, J., T. Mirault, *et al.* [Risk factors for recurrent venous thromboembolism]. Rev Mal Respir, v.28, n.4, Apr, p.453-62.
66. Rosendaal, F. R. Risk factors for venous thrombotic disease. Thromb Haemost, v.82, n.2, Aug, p.610-9. 1999a.
67. \_\_\_\_\_. Venous thrombosis: a multicausal disease. Lancet, v.353, n.9159, Apr 3, p.1167-73. 1999b.
68. Roumen-Klappe, E. M., M. Den Heijer, *et al.* Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. J Vasc Surg, v.35, n.4, Apr, p.701-6. 2002.
69. Roumen-Klappe, E. M., M. C. Janssen, *et al.* Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study. J Thromb Haemost, v.7, n.4, Apr, p.582-7. 2009.
70. Ruggeri, Z. M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. Thromb Res, v.120 Suppl 1, p.S5-9. 2007.
71. Sadler, J. E., J. L. Moake, *et al.* Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, p.407-23. 2004.
72. Schmutz, M., M. S. Dunn, *et al.* The activity of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS-13 in newborn infants. J Thromb Haemost, v.2, n.2, Feb, p.228-33. 2004.
73. Shbaklo, H., C. A. Holcroft, *et al.* Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome. Thromb Haemost, v.101, n.3, Mar, p.505-12. 2009.
74. Shelat, S. G., P. Smith, *et al.* Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. J Thromb Haemost, v.4, n.8, Aug, p.1707-17. 2006.
75. Silverstein, M. D., J. A. Heit, *et al.* Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. Arch Intern Med, v.158, n.6, Mar 23, p.585-93. 1998.
76. Siragusa, S., A. Malato, *et al.* Residual vein thrombosis to establish duration of anticoagulation after a first episode of deep vein thrombosis: the Duration of Anticoagulation based on Compression UltraSonography (DACUS) study. Blood, v.112, n.3, Aug 1, p.511-5. 2008.
77. Tao, Z., K. Anthony, *et al.* Novel ADAMTS-13 mutations in an adult with delayed onset thrombotic thrombocytopenic purpura. J Thromb Haemost, v.4, n.9, Sep, p.1931-5. 2006.

78. Tirado, I., J. Mateo, *et al.* The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. Thromb Haemost, v.93, n.3, Mar, p.468-74. 2005.
79. Tsai, A. W., M. Cushman, *et al.* Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). Am J Med, v.113, n.8, Dec 1, p.636-42. 2002.
80. Tzavara, V., P. G. Vlachoyiannopoulos, *et al.* Evidence for non-adaptive immune response in HIV infection. Eur J Clin Invest, v.27, n.10, Oct, p.846-9. 1997.
81. Van Aken, B. E., M. Den Heijer, *et al.* Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. Thromb Haemost, v.83, n.4, Apr, p.536-9. 2000.
82. Van Aken, B. E., P. H. Reitsma, *et al.* Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis. Br J Haematol, v.116, n.1, Jan, p.173-7. 2002.
83. Van Hylckama Vlieg, A., I. K. Van Der Linden, *et al.* High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. Blood, v.95, n.12, Jun 15, p.3678-82. 2000.
84. Vedantham, S. Valvular dysfunction and venous obstruction in the post-thrombotic syndrome. Thromb Res, v.123 Suppl 4, p.S62-5. 2009.
85. Vischer, U. M. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. J Thromb Haemost, v.4, n.6, Jun, p.1186-93. 2006.
86. White, R. H., H. Zhou, *et al.* Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. Thromb Haemost, v.90, n.3, Sep, p.446-55. 2003.
87. Yamashita, A., T. Sumi, *et al.* Detection of von Willebrand factor and tissue factor in platelets-fibrin rich coronary thrombi in acute myocardial infarction. Am J Cardiol, v.97, n.1, Jan 1, p.26-8. 2006.