

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Margareth Castro Ozelo

**“Alterações moleculares da glicoproteína de membrana
plaquetária Ib α em duas entidades clínicas distintas: na
síndrome de Bernard-Soulier (resultante da perda de função)
e na doença arterial oclusiva (resultante do ganho de função)”**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Valder R. Arruda



Campinas

2004

U N I C A M P
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp
	Oz3a
V	EX
TOMBO BC/	64130
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	10/06/05
Nº CPD	

Bibid: 352008

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

Oz3a

Ozelo, Margareth Castro

Alterações moleculares da glicoproteína de membrana plaquetária Ib α em duas entidades clínicas distintas: na síndrome de Bernard-Soulier (resultante da perda de função) e na doença arterial oclusiva (resultante do ganho de função) / Margareth Castro Ozelo. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Fernando Ferreira Costa; Valder Roberval Arruda
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas (Sangue). 2. Infarto do Miocárdio. 3. Hemostasia. 4. Hematologia. I. Fernando Ferreira Costa. II. Valder Roberval Arruda. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

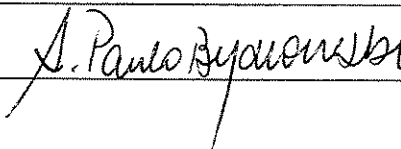
Orientador(a): *Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa



2. Prof(a). Dr(a). Sérgio Paulo Bydlowski

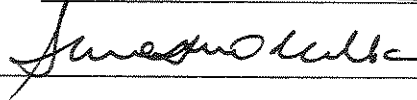


3. Prof(a). Dr(a). Dayse Maria Lourenço

4. Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino Bizzacchi



5. Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Ollala Saad



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/12/2004

Ao Valder,

Pela dedicação e apoio incondicionais ao longo destes anos,
para a conclusão deste trabalho.
Pelo exemplo e incentivo profissional.
Pela amizade.

Agradecimentos

Ao Fernando pelo apoio, compreensão e exemplo.

À Joyce pela amizade e confiança que demonstrou por mim, desde o início da minha carreira profissional.

Ao Aranha amigo e companheiro de sempre, pelo apoio e incentivo.

À “grande” amiga e irmã por afeição Gislaine e ao amigo Vagner.

Ao Erich pelo apoio e ajuda diária.

À Daniela e à Fabíola pela amizade e companhia em tantos finais de semana.

À Ucha e à Deva pela ajuda imprescindível para este trabalho. À Ângela e Dulcinéia pela ajuda nos intermináveis seqüenciamentos.

A todos do laboratório, Silmara, Andrey, Cristina, Tânia, Andréa, João, Rafael e Ricardo, pelo grande apoio e dedicação. À nova amiga Cene pelo incentivo.

À Dra. Irene, à Fernanda, ao Alan pela ajuda na realização dos exames de citometria de fluxo.

A todos os amigos do Hemocentro, em especial Afonso, Katinha, Márcia, Malú, Vagner, Simone, Marcelo e Elvira.

A querida amiga Esme, pelo apoio, dedicação e exemplo a todos nós.

À toda a equipe multidisciplinar: Andréa, Janaína, Márcia, Rosalva e Maria Luísa, obrigada pelo apoio e dedicação.

Aos meus pais e irmãos, pela confiança e compreensão da minha ausência em tantos momentos.

Aos pacientes e voluntários que tornaram esse trabalho possível.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela
FAPESP - Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (95/09112-6).

Lista de Abreviaturas

ADP	adenosina difosfato
Ala (A)	alanina
ApoE-/-	deficiente de ApoE
Asn (N)	asparagina
Ca⁺²	íons cálcio
CD	<i>"cluster differentiation"</i>
CKMB	creatinina fosfoquinase fração MB
Cys (C)	cisteína
DAO	doença arterial oclusiva
DCO	doença coronariana oclusiva
DNA	<i>"desoxyribonucleic acid"</i> ; ácido desoxirribonucleico
DNTP	deoxinucleotídeo
ddNTP	dideoxinucleosídeo trifosfato
EDTA	sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético
EGF-1 e -2	fatores de crescimento epidérmicos 1 e -2
FT	fator tecidual
FVIIa	fator VII ativado
FT/FVIIa	complexo fator VII ativado e fator tecidual
FVa	fator V ativado
FVIIIa	fator VIII ativado
FVIII:C	atividade coagulante do fator VIII
FIXa	fator IX ativado
FIXa/FVIIIa	complexo fator IX ativado e fator VIII ativado
FXa	fator X ativado
FXIa	fator XI ativado
FXIIa	fator XII ativado
FvW	fator de von Willebrand
FvW:Ag	antígeno do fator de von Willebrand
FvW:RCo	atividade cofatora da ristocetina
FITC	fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
Gly (G)	glicina
GP	glicoproteína
GP I$\beta$$\alpha$-h	glicoproteína I β α humana
GP I$\beta$$\alpha$-m	glicoproteína I β α murina
GP I$\beta$$\alpha$^{null}	glicoproteína I β α em animais homozigotos para o alelo mutante (<i>knockout</i>)

HAS	hipertensão arterial sistêmica
His (H)	histidina
HPA-2	" <i>human platelet antigen system 2</i> " sistema antigênico da plaqueta humana –2
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	intervalo de confiança
IPTG	isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilodaltons
Leu (L)	leucina
Lys (K)	lisina
Met (M)	metionina
MgCl₂	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NH₄Cl	cloreto de amônio
NH₄HCO₃	bicarbonato de amônio
OR	" <i>odds ratio</i> "
PAR	" <i>protease-activated receptors</i> ", receptores ativados por proteases
pb	pares de bases
PBS-SAB	tampão fosfato soro de albumina bovina
PCR	" <i>polymerase chain reaction</i> "; reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PE	fluorocromo ficoeritrina
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
pseudo-DvW	pseudo-doença de von Willebrand ou doença de von Willebrand tipo plaquetário
PSGL-1	receptor leucocitário 1 para a P-selectina
RIPA	" <i>ristocetin-induced platelet aggregation</i> ", agregação plaquetária induzida pela ristocetina
RNA_m	RNA mensageiro
rpm	rotações por minuto
SBS	síndrome de Bernard-Soulier
Ser (S)	serina
TFPI	" <i>tissue factor pathway inhibitor</i> "; inibidor do fator tecidual
Thr (T)	treonina
Trp (W)	triptofano
TTPa	tempo de tromboplastina parcialmente ativada
Val (V)	valina
VNTR	" <i>variable number of tandem repeats</i> ", cópias de repetições de números variáveis

Tabelas

Capítulo IV

Tabela 1.	Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na análise do gene da glicoproteína Ib α	51
Tabela 2.	Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na análise do gene das GP Ib β , GP IX e GP V.....	59

Capítulo V

Tabela 3.	Quadro clínico e laboratorial dos pacientes com diagnóstico de síndrome de Bernard-Soulier e seus familiares.....	78
Tabela 4.	Quadro laboratorial dos pacientes com diagnóstico de síndrome de Bernard-Soulier e seus familiares.....	79
Tabela 5.	Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR da GPIb α em populações brasileiras.....	84
Tabela 6.	Frequência dos genótipos e alelos da seqüência Kozak da GP Ib α em populações brasileiras.....	85
Tabela 7.	Frequência dos haplótipos dos polimorfismos da GP Ib α em três grupos étnicos distintos da população brasileira: caucasóides, negróides e indígenas (tribo Parakanã).....	87
Tabela 8.	Avaliação quantitativa, morfológica e funcional das plaquetas entre os membros da família que apresenta o VNTR-E.....	89
Tabela 9.	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico prévio de infarto agudo do miocárdio (IAM) e dos controles pareados.....	95
Tabela 10.	Prevalência dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR da GP Ib α entre pacientes antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.....	96
Tabela 11.	Distribuição do polimorfismo VNTR da GP Ib α de acordo com a severidade da doença aterosclerótica detectada pela arteriografia coronariana nos pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM).....	98
Tabela 12.	Prevalência dos genótipos e alelos do polimorfismo do sistema HPA-2 entre pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.....	99

Tabela 13.	Prevalência dos genótipos e alelos da sequência – 5C/T Kozak do gene da GP Ib α entre pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.....	99
Tabela 14.	Frequência dos haplótipos dos polimorfismos da GPIb α entre pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.....	101

Figuras

Capítulo I

Figura 1.	Geração de trombina a partir do modelo celular da hemostasia da coagulação.....	06
Figura 2.	A participação das plaquetas na formação do trombo.....	09
Figura 3.	Complexo GP Ib-IX-V.....	14
Figura 4.	Esquema do tamanho e estrutura dos genes que codificam as quatro subunidades do complexo GP Ib-IX-V.....	15
Figura 5.	Esquema estrutural da GP Ib α	17
Figura 6.	Mecanismo de ativação do PAR 1.....	21
Figura 7.	Ligação da trombina à GP Ib-IX-V.....	22
Figura 8.	Representação do modelo por cristalografia da interação entre GP Ib α e a trombina.....	23
Figura 9.	Representação do complexo GP Ib-IX-V e as principais mutações presentes na síndrome de Bernard Soulier (SBS) e doença de von Willebrand tipo plaquetário (pseudo-DvW).....	26
Figura 10.	O esfregaço do sangue periférico de camundongos com SBS.....	29
Figura 11.	Modelo da participação das plaquetas na formação da placa ateromatosa.....	31
Figura 12.	Alterações das plaquetas ao serem submetidas a baixas temperaturas.....	36

Capítulo V

Figura 13.	Caso 1. Heredograma do indivíduo AMH (III:2).....	68
Figura 14.	Caso 1. Citometria de fluxo das glicoproteínas plaquetárias e seqüenciamento GP Ib α	69
Figura 15.	Caso 2. Avaliação dos familiares e controles para mutação Leu115→Pro do gene GP Ib α	71

Figura 16.	Caso 2. Heredograma do indivíduo SSM (IV:3).....	72
Figura 17.	Caso 2. Representação dos resultados da citometria de fluxo das glicoproteínas plaquetárias e do seqüenciamento do gene GP Ib α	73
Figura 18.	Caso 3. Heredograma do indivíduo FDSJ (IV:1).....	76
Figura 19.	Caso 3. Citometria de fluxo glicoproteínas plaquetárias e seqüenciamento do gene da GP Ib β	77
Figura 20.	Representação dos diferentes alelos do VNTR do gene da GPIb α	81
Figura 21.	Estudo da família com a rara variante do VNTR alelo E.....	90
Figura 22.	Seqüenciamento da região contendo VNTR do gene da GP Ib α	91
Figura 23.	Caracterização do gene da GP Ib α em primatas não humanos.....	92

Resumo	XV
Summary	XIX

Capítulo I

Introdução	02
1.1. Ativação das vias da coagulação sangüínea.....	03
1.2. Funções hemostáticas e pró-coagulantes plaquetárias.....	07
1.3. Evolução da coagulação sangüínea e das plaquetas.....	10
1.4. Complexo glicoproteína Ib-IX-V.....	13
1.4.1. Glicoproteína Ib α (GP Ib α).....	16
1.5. Interação entre plaqueta e trombina.....	19
1.6. Complexo GP Ib-IX-V e doenças hemorrágicas.....	23
1.7 Alterações moleculares da GP Ib-IX-V relacionadas à síndrome de Bernard-Soulier (SBS).....	24
1.7.1. Modelos animais de doenças das glicoproteínas plaquetárias...27	
1.8. A participação das plaquetas na inflamação e aterosclerose.....	30
1.9. O complexo GP Ib-IX-IV e doenças arteriais oclusivas.....	32
1.10. O complexo GP Ib-IX-IV e alterações não hemostáticas.....	34

Capítulo II

Objetivos	39
------------------------	----

Capítulo III

Casuística	41
3.1. Síndrome de Bernard-Soulier.....	41
3.2. Grupos étnicos.....	42
3.3. Estudo caso-controle do risco para o infarto do miocárdio em função dos polimorfismos da GPIb α	43
3.3.1 Caracterização clínica dos pacientes e controles.....	44
3.3.2. Diagnóstico do infarto agudo do miocárdio.....	45

3.3.3. Avaliação da extensão da doença oclusiva coronariana.....	46
3.4. Primatas não humanos.....	46

Capítulo IV

Materiais e Métodos.....	48
4.1. Extração de DNA genômico.....	48
4.2. Amplificação de seqüências gênicas específicas.....	49
4.3. Determinação de nucleotídeos polimórficos do gene da GPIb α	49
4.3.1. <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR).....	50
4.3.2. Polimorfismo do sistema HPA-2.....	50
4.3.3. Polimorfismo da posição -5 da seqüência Kozak.....	50
4.4. Clonagem dos produtos do PCR.....	52
4.5. Purificação do DNA para seqüenciamento direto.....	53
4.6. Identificação das seqüências nucleotídeas nos genes do complexo Ib-IX-V.....	54
4.6.1. Seqüenciamento manual.....	56
4.6.2. Seqüenciamento automático.....	57
4.7. Avaliação fenotípica e funcional plaquetária.....	60
4.7.1. Avaliação quantitativa e morfológica das plaquetas.....	60
4.7.2. Testes funcionais plaquetários.....	60
4.7.3. Determinação quantitativa das glicoproteínas de membrana plaquetária por citometria de fluxo.....	61
4.7.4. Avaliação da coagulação sangüínea.....	62
4.7.5. Avaliação quantitativa e funcional do fator de von Willebrand (FvW).....	62
4.8. Análise estatística.....	63

Capítulo V

Resultados.....	66
5.1. Caracterização molecular da síndrome de Bernard-Soulier.....	66
5.2. Identificação dos distintos alelos do VNTR.....	80

5.2.1. Distribuição dos polimorfismos da GPIb α nas diversas populações.....	82
5.2.1.1 Comparação da distribuições dos VNTR da GPIb α entre indivíduos de distintos grupos étnicos.....	83
5.2.1.2. Prevalência do polimorfismo da posição –5 C/T da seqüência Kozak entre indivíduos de distintos grupos étnicos.....	85
5.2.1.3. Distribuição dos haplótipos do gene da GPIb α nas diversas populações étnicas.....	86
5.2.1.4. Desequilíbrio de ligação incompleto entre os alelos da GPIb α é comum e presente em todos os grupos étnicos.....	88
5.2.1.5. Identificação do raro alelo VNTR-E	88
5.2.1.6. Homozigose para o alelo VNTR-A é comum entre primatas não-humanos.....	92
5.2.2. Polimorfismos da GP Ib α e o risco para o desenvolvimento do IAM.....	93
5.2.2.1. Os polimorfismos de VNTR da GP Ib α estão associados com a susceptividade para o desenvolvimento de IAM.....	93
5.2.2.2. Associação entre polimorfismos da GP Ib α e a gravidade da doença coronariana.....	96
5.2.2.3. Os polimorfismos do sistema HPA-2 e da seqüência Kozak não estão associados com maior risco para IAM.....	97
5.2.2.4. Haplótipos da GP Ib α e o risco para IAM.....	100

Capítulo VI

Discussão.....	103
6.1. Caracterização molecular da síndrome de Bernard-Soulier.....	103

6.1.1. Os três casos de SBS relatados nesse estudo são decorrentes de mutações de ponto restritas à GP Ib.....	105
6.2. Distribuição dos polimorfismos da GPIb α nas diversas populações....	110
6.2.1. Distribuição dos haplótipos do gene da GPIb α nas diversas populações étnicas.....	113
6.2.2. A presença do raro alelo VNTR-E não altera as características plaquetárias morfológicas ou funcionais.....	114
6.3. Nova possibilidade evolutiva para o aparecimento dos polimorfismos da GPIb α	115
6.4. Polimorfismos da GP Ib α e o risco para o desenvolvimento do IAM.....	116
6.5. A importância funcional das glicoproteínas de membrana plaquetária e particularmente da GP Ib α	121

Capítulo VII

Conclusões.....	124
------------------------	------------

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas.....	127
--	------------

Capítulo IX

Anexo 1.

9.1.1 Freqüência dos alelos VNTR nas diferentes populações estudadas.....	140
9.1.2. Freqüência dos alelo -5C da sequência Kozak nas diferentes populações.....	141

Anexo 2.

9.2. Metanálise de estudos prévios relacionando os polimorfismos da GP Ib α e doença arterial oclusiva.....	142
9.2.1. Frequência dos alelos VNTR nos estudos de doença arterial oclusiva.....	142
9.2.2. Frequência do alelo –5C Kozak nos estudos de doença arterial oclusiva.....	143
9.2.3. Frequência dos alelos HPA-2b nos estudos de doença arterial oclusiva.....	144

Anexo 3.

9.3. Trabalho: “Genetic Variability of Platelet Glycoprotein Ib α Gene”.....	145
---	-----

Ozelo MC, Costa DS, Siqueira LH, Castro V, Gonçalves MS, Menezes RC, Soares M, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Arruda VR. Genetic variability of platelet glycoprotein Ib alpha gene. Am J Hematol. 2004 Oct;77(2):107-16.

Anexo 4.

9.4. Trabalho: “Platelet glycoprotein Ib α polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction”.....	146
---	-----

Ozelo MC, Origa AF, Aranha FJ, Mansur AP, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Pollak ES, Arruda Vr. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction. Thromb Haemost. 2004 Aug;92(2):384-6.

Anexo 5.

9.5. Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Unicamp.....	147
---	-----

As plaquetas estão associadas não só às atividades hemostáticas, como também à resposta inflamatória. O comprometimento funcional das plaquetas está relacionado à ocorrência de patologias hemorrágicas e ao maior risco para desenvolvimento de aterosclerose e doença arterial oclusiva.

O primeiro objetivo deste estudo foi estudar as alterações do complexo das glicoproteínas de membrana plaquetária (GP) Ib(α e β)-IX-V que levam à perda da sua capacidade hemostática, resultando na patologia hemorrágica denominada Síndrome de Bernard-Soulier (SBS). Foram avaliadas as alterações moleculares da GP Ib α , que contém os sítios de ligação para fator de von Willebrand (FvW), trombina e integrinas (presentes na região N-terminal globular da GP Ib α). Entre os casos com plaquetopenia persistente avaliados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, houve a confirmação do diagnóstico de SBS em três pacientes. Em dois destes indivíduos com SBS foi possível identificar duas mutações distintas em homozigose na região N-terminal globular da GP Ib α . Uma destas mutações é resultado da troca de T $\rightarrow$ A, levando à substituição da Cys209 $\rightarrow$ Ser, comprometendo uma das ligações dissulfídicas que ocorrem entre os resíduos Cys209 – Cys248 e Cys211 – Cys268. Esta mesma mutação já havia sido descrita anteriormente por Simsek e cols. (1994). A segunda mutação evidenciou pela primeira vez a ocorrência da troca de T $\rightarrow$ C, com substituição da Leu115 $\rightarrow$ Pro, na região das repetições ricas em leucina da GP Ib α . Em ambos os casos a avaliação por citometria de fluxo mostrou que a GP Ib α estava ausente, sugerindo que estes resíduos sejam essenciais para manter a integridade da molécula.

Resumo

O terceiro paciente apesar do diagnóstico clínico e laboratorial de SBS, confirmado pela ausência das GP Ib α e GP IX pela citometria de fluxo evidenciou exclusivamente uma alteração não descrita no códon iniciador ATG do gene da GP Ib β , levando à substituição da -25Met $\rightarrow$ Arg em heterozigose. No entanto, foi observado que outros membros da família, apesar de assintomáticos, eram portadores da mesma alteração. Embora na literatura, a SBS seja relacionada exclusivamente com mutações ocorrendo nos genes da GP Ib α , GP Ib β e GP IX, é possível que a diferença fenotípica e clínica deste caso possa revelar outros mecanismos reguladores do complexo GP Ib-IX-V possam estar envolvidos na ocorrência da SBS.

Na outra parte deste estudo, foi estudada a prevalência genotípica de três polimorfismos da GP Ib α : seqüência Kozak, HPA-2 e VNTR. A avaliação de 492 indivíduos brasileiros, pertencentes a três grupos étnicos distintos (caucasóides; negróides e indígenas), permitiu a identificação de dez haplótipos distintos, onde: o Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC foi o mais comum (~40%) entre os caucasóides e negróides e o Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC e Kozak-TC/HPA-2aa/VNTR-CC estiveram presentes na mesma proporção entre os indígenas. Embora anteriormente fosse descrita a presença de uma ligação de desequilíbrio entre os polimorfismos VNTR e HPA-2, neste estudo esta ligação não foi completa em cerca de 10% dos indivíduos de todos os três grupos.

Dois indivíduos não relacionados apresentaram uma variante rara, o alelo VNTR – E, onde há perda da seqüência de 39 pb, o que foi confirmado pelo seqüenciamento da região. O estudo funcional das plaquetas destes indivíduos e seus familiares, não evidenciaram diferença em relação às demais variantes do VNTR.

O alelo VNTR-A com quatro cópias da repetição de 39 pb, presente em populações asiáticas, não foi encontrado em nenhum dos cerca de 1.000 indivíduos aqui estudados. No entanto, entre duas espécies de primatas não humanos (chimpanzé e gorila), ambos apresentaram o alelo VNTR-A em homozigose (Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-AA). Foi possível desta maneira sugerir um novo mecanismo evolutivo para o surgimento das variantes do gene da GP Iba, onde diferentemente do proposto anteriormente, acreditamos que a variante com maior número de cópias tenha precedido as demais, e com a perda sucessiva destas cópias, as variantes menores foram surgindo.

Finalmente em um estudo caso-controle investigou-se o risco para ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM) relacionado aos três polimorfismos da GP Iba. Foram avaliados 350 indivíduos com antecedente de IAM, divididos em grupo 1, que foram incluídos no momento do primeiro IAM e grupo 2, que sobreviveram a um ou mais episódio de IAM há mais de seis meses. Estes pacientes foram pareados por sexo, idade e raça a 350 controles. O genótipo VNTR-CD, assim como o alelo D, foi mais freqüente entre os pacientes com IAM que entre os controles. Embora esses resultados sejam diferentes do descrito na literatura. A análise da gravidade da doença coronariana oclusiva, baseada no número de vasos com obstrução de pelo menos 50% do lúmen, mostrou um aumento significativo da prevalência do alelo D entre os indivíduos com doença mais grave. Os resultados deste trabalho corroboram com estudos anteriores sobre a influência dos polimorfismos do gene da GP Iba e a função plaquetária.

Summary

Platelets are associated not only with haemostatic activity, but also with inflammatory response. Functional alterations of platelets are related with bleeding diseases and with a greater risk for developing atherosclerosis and occlusive artery disease.

In this study we analyzed the molecular alterations in the platelet membrane glycoprotein (GP) Ib α , the subunit of the complex GP Ib(α and β)-IX-V. The GP Ib α contains binding sites for von Willebrand factor (vWF), thrombin and actin-binding proteins.

First of all, we studied the mutations in the complex GP Ib-IX-V related with the loss of haemostatic function, resulting in a bleeding disease denominated Bernard-Soulier syndrome (BSS). We identified two distinct mutations in homozygous affecting the N-terminal globular region (where the vWF and thrombin binding sites are located) in two unrelated subjects with BSS. One of these mutations, was first described by Simsek et al., 1994, where a homozygous single base pair mutation T $\rightarrow$ A, resulted in a substitution of a Cys209 $\rightarrow$ Ser, which involving one of the two disulfide loops from the C-terminal flanking sequence between Cys209 – Cys248 and Cys211 – Cys268. The second subject with BSS presented for the first time, the occurrence of a single base pair exchange T $\rightarrow$ C, leading to a single amino acid substitution of the Leu115 $\rightarrow$ Pro, in the region of the leucine-rich repeats of the GP Ib α . In both cases a loss of GP Ib α expression was observed, suggesting that these residues, are essential in maintaining the integrity of the molecule.

The third case of BSS, presents serious hemorrhagic symptoms and an intense reduce in the platelet number, in addition to a lack of expression of GP Ib α and GP IX. Although none of the other family members presented a bleeding history, the mother of the

patient, a maternal uncle and her maternal grandfather, presented a mild macrothrombocytopenia. The sequence of the involved genes (GP Ib α , GP Ib β e GP IX), revealed a non described alteration with the exchange of T $\rightarrow$ G in initial start ATG codon of the GP Ib β gene exclusively, leading to the substitution of the -25Met $\rightarrow$ Arg, in heterozygosity as in the patient and between the affected members of the family. Thus, it may be that the BSS phenotype in this patient involves other proteins or gene regulators related to the complex GP Ib-IX-V. There are no other genes described involving BSS development, except the first three described, GP Ib α , GP Ib β e GP IX.

In the other part of this study, we determined the prevalence of the distinct genetic variants of the GP Ib α , resulting from three polymorphisms: Kozak sequence, HPA-2 and VNTR. First, 492 subjects from three distinct Brazilian ethnic groups were evaluated, including: Caucasians; African descents, and Indigenous. The presence of 10 distinct haplotypes were determined. The most common (~40%) haplotype was the Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC for both Caucasian and African descents. However, among Indigenous, Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC and Kozak-TC/HPA-2aa/VNTR-CC were equally present. Although a strong linkage disequilibrium between VNTR and HPA-2 polymorphism had been observed at first, here we determined incomplete linkage disequilibrium in 10% of the subjects from all ethnic groups.

Two unrelated subjects presented the allele VNTR – E, a rare variant lacking the 39bp repeat, and functional platelet studies among these subjects and their family members revealed no abnormalities. No VNTR-A allele, the largest variant containing 4 copies of the repeats, was identified among approximately 1,000 subjects studied in this population. However, homozygosity for the VNTR-A allele (Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-

AA) was determined in two distinct species of non-human primates (chimpanzee and gorilla). These results suggest a greater complex evolutionary mechanism in the macroglycoprotein region of the GP Iba gene, different from that previously proposed, an hypothesis is that the largest variant, VNTR-A should be considered the oldest allele and that subsequent deletions resulted in the smaller forms.

We also carried out a case-control study correlating the three polymorphisms of the GP Iba and the risk for myocardial infarction (MI) occurrence. 350 subjects who had suffered a previously episode of MI, were divided into: group 1, having suffered the first MI at the moment of inclusion and group 2, who had survived to one or more episodes of MI, in which the last episode had occurred at least six months before enrollment. These patients were matched by sex, age and race to 350 controls. Genotype VNTR-CD, as well as allele D were more frequent among the patients with MI than among controls. Although this differed from that previously described, it was possible to observe that when the severity of coronary artery disease among these patients was analyzed, assigned by the number of affected vessels by coronary angiography, the allele D was also associated with more extensive disease. Also, it is in accordance to functional data related to the polymorphisms of GP Iba gene previously described

I. Introdução

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1. Introdução

Nas últimas décadas ficou evidente o papel crucial que as plaquetas desempenham na coagulação sanguínea e nas doenças cardiovasculares. O reconhecimento da participação plaquetária na fisiopatogenia da reação inflamatória e trombótica na fase avançada da doença arterial oclusiva (DAO) foi objetivamente confirmado pelo efeito clínico benéfico do uso de drogas antiplaquetárias específicas, para o tratamento das doenças arteriais isquêmicas. Vários estudos clínicos randomizados utilizando anticorpos monoclonais específicos para os complexos de glicoproteínas da membrana plaquetária demonstraram: (a) melhora do prognóstico das síndromes coronarianas agudas; (b) menor índice de reoclusão coronariana após os procedimentos de revascularização coronariana percutânea (PATRONO et al., 2004). Atualmente esses anticorpos são rotineiramente utilizados em grande número de pacientes na maioria dos países.

Ainda que as plaquetas tenham sido inicialmente consideradas como participantes passivas e transitórias (células sem núcleo e com vida-média limitada) da coagulação sanguínea, atualmente as plaquetas são reconhecidas como importante fonte de fatores humorais e da coagulação sanguínea, que regulam tanto o sistema da coagulação, como os fenômenos inflamatórios em humanos e outros mamíferos.

No processo da coagulação sanguínea, as plaquetas são as vigilantes das lesões vasculares para evitar hemorragia. No entanto, a adesão plaquetária às estruturas subendoteliais, não discerne entre o reparo fisiológico necessário após a lesão vascular (hemostasia sanguínea) e a adesão aos vasos com lesões ateroscleróticas, em que o acúmulo e ativação plaquetária eventualmente resultam na trombose vascular e subsequente isquemia tecidual. Dessa forma, definir e entender os vários componentes

que participam nos mecanismos de adesão, ativação e agregação plaquetária pode resultar no desenvolvimento de alternativas preventivas de trombose e possivelmente da progressão da aterosclerose. Neste estudo exploramos as bases moleculares das glicoproteínas do complexo Ib-IX-V em duas entidades clínicas distintas, uma resultante do ganho da função plaquetária (doença aterosclerótica e arterial oclusiva) e outra decorrente da redução da função hemostática plaquetária normal (síndrome de Bernard-Soulier).

1.1. Ativação das vias da coagulação sangüínea e o modelo celular da hemostasia

O ponto central na hemostasia sangüínea é o controle da formação da trombina, uma protease essencial que ativa as plaquetas e cliva o fibrinogênio para a formação do coágulo sangüíneo (função pró-coagulante). No entanto, quando a trombina liga-se ao receptor específico endotelial, a trombomodulina, forma o complexo inicial de ativação da principal via de anticoagulação sangüínea pela ativação da proteína C (função anticoagulante).

A geração de trombina ocorre por duas vias distintas, intrínseca e extrínseca, que são intensamente interligadas durante a ativação da coagulação sangüínea. Mais recentemente, um novo conceito foi estabelecido como o mecanismo fisiologicamente aceito para explicar a hemostasia da coagulação *in vivo*, ou seja, o modelo celular da hemostasia com três fases: iniciação, amplificação e propagação (HOFFMAN e MONROE, 2001).

A especificidade de gerar a trombina no local de injúria vascular é inicialmente determinada pela exposição do fator tecidual (FT) em células como fibroblastos e

macrófagos e conseqüente ativação do fator VII (FVIIa). O complexo FT-FVIIa ativa o fator X (FXa) através de proteólise limitada. O FXa na presença do cofator, fator V ativado (FVa), do íon Ca^{+2} e fosfolípídeo, formam o complexo protrombinase, cujo único substrato é a protrombina. Esta fase, conhecida como iniciação do processo de hemostasia, ou também como via extrínseca, embora seja relativamente simples, é mais potente na capacidade de gerar trombina, no entanto, é de curta duração. A quantidade de trombina gerada pelo FT-FVIIa é altamente regulada pelo inibidor da via do FT (TFPI ou *tissue factor pathway inhibitor*) que forma um complexo inibitório quando há formação do FT-FVIIa-FXa (LU et al., 2004). Assim o primeiro estímulo de geração de trombina decorre da fase de iniciação ou via extrínseca; mas a geração contínua de menores quantidades de trombina é função da via intrínseca e via final comum renomeadas como a fase de amplificação e propagação no modelo celular da hemostasia.

As plaquetas circulantes são rapidamente seqüestradas no local de lesão vascular pela exposição de estruturas subendoteliais tais como o colágeno e pelo fator de von Willebrand (FvW), que são ligantes de alta especificidade para distintos complexos da membrana plaquetária. As plaquetas fornecem dessa forma a superfície fosfolipídica que é fundamental para a interação entre os vários fatores da coagulação na presença do íon Ca^{+2} . Essa função essencial das plaquetas é denominada adesão plaquetária, que é posteriormente seguida da agregação plaquetária em resposta ao estímulo protrombótico, o que resulta na amplificação do efeito hemostático. A pequena quantidade de trombina inicialmente gerada representa um potente ativador das plaquetas, o que ocorre através de sua ligação a grupos distintos de receptores plaquetários, como os PARs (receptores ativados por proteases ou *protease-activated*

receptors). Com a ativação plaquetária, há a liberação de fator V (FV) parcialmente ativado, dos grânulos α das plaquetas, para a superfície das mesmas. Através da ação da trombina há a ativação do FV é completa (FVa).

A trombina também se liga a outros receptores plaquetários, como a subunidade GP Ib α do complexo GP Ib-IX-V, onde há o sítio de ligação para o FvW, muitas vezes ainda ligado ao fator VIII (FvW-FVIII). A trombina cliva esta ligação, liberando e ativando o fator VIII (FVIIIa), na superfície da plaqueta. Portanto nessa fase de amplificação, há a ativação, através da trombina, das plaquetas e dos cofatores expostos em sua superfície, gerando o FVa e FVIIIa.

A ativação do fator XI (FXIa) é o ponto inicial da ativação da via intrínseca e neste novo modelo participa da mesma forma como ativador de quantidades adicionais de fator IX (FIXa), que na superfície da membrana plaquetária, em presença de seu cofator, o FVIIIa, formam o complexo, FIXa-FVIIIa, que ativará por sua vez o fator X (FXa). A trombina gerada nessa fase é de menor quantidade, mas o complexo FIXa-FVIIIa não é rapidamente inativado, o que mantém a continuidade da geração da trombina.

Inicialmente a conversão do FXI para FXIa foi considerada dependente da ativação pelo fator XII ativado (FXIIa), da fase de contato. No entanto, a importância funcional dessa via de ativação da coagulação foi sempre motivo de controvérsia. Pacientes com deficiência de fatores da via de contato, clinicamente não apresentam sangramento, o que sugeria que outros mecanismos alternativos deveriam existir para a ativação do FXI. Yun e cols. confirmaram que tal mecanismo alternativo existe, e talvez seja o principal ativador do FXI e que é mediado pela trombina (YUN et al., 2003).

Em resumo, o mecanismo atual para a cinética de geração de trombina é decorrente três fases. Em resposta a lesão tecidual a via do FT-FVIIa é responsável pela formação de trombina em grande quantidade, mas de curta duração pela inibição pelo TFPI (fase iniciação). Essa trombina é suficiente para então ativar diretamente as plaquetas e fatores VIII e V (fase de amplificação). Além disso, a trombina ativa o FXI (o que funciona como *bypass* da via de contato) e que mantém a geração de trombina, em menor quantidade, mas por longa duração para manutenção da hemostasia (fase propagação) (Figura 1).

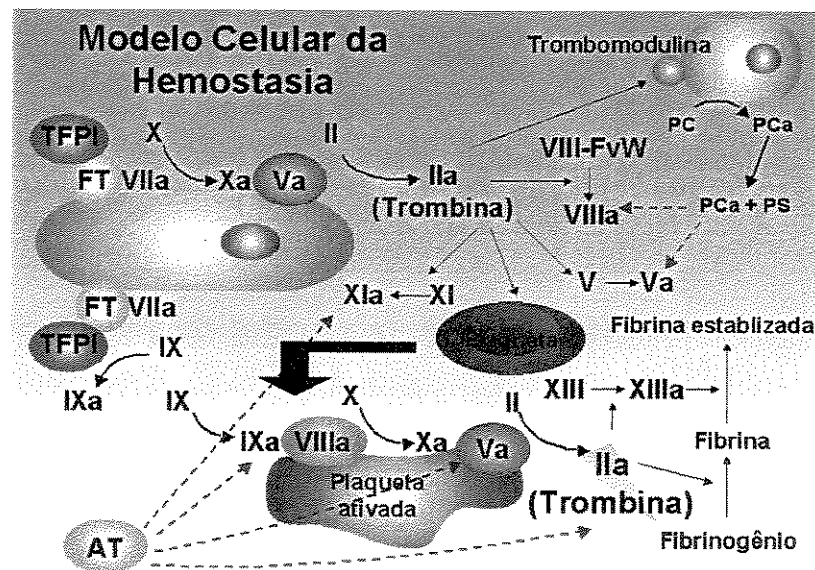


Figura 1. Geração de trombina a partir do modelo celular da hemostasia da coagulação. Após o dano celular, as células portadoras de fator tecidual (FT) como fibroblastos ou monócitos, ao expor o FT, este formará um complexo com fator VII (FT-FVIIa), capaz de ativar fator X e fator IX. Desta maneira haverá a geração de trombina em grande quantidade, porém de curta duração, devido à inibição pelo TFPI. Esta trombina gerada é suficiente para ativar fator VIII, fator V e a própria plaqueta, que uma vez ativada e na presença de fatores VIII e V ativados há uma geração de trombina, em menor quantidade, mas por longa duração. Concomitante há a ativação dos mecanismos inibidores da geração de trombina (linha vermelha tracejada), através da antitrombina (AT) e das proteínas C (PC) e S (PS). Os fatores ativados são indicados pela letra "a".

1.2. Funções hemostáticas e pró-coagulantes plaquetárias

As plaquetas são pequenos fragmentos discóides e anucleados, originários do citoplasma do megacariócito, que circulam na corrente sangüínea (RUGGERI, 2000). A membrana plaquetária é constituída por glicolípídeos como colesterol e fosfolípídeos, que são distribuídos assimetricamente entre o interior e o exterior celular. Na membrana estão localizados os receptores celulares das plaquetas, representados por complexos de glicoproteínas com domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático. Essa organização celular permite à plaqueta receber e traduzir uma variedade de sinais externos de ativação para o meio intracelular, que habitualmente resulta durante a agregação, em sua mudança da forma discóide e na liberação do conteúdo dos grânulos intracelulares. Esse processo é fundamental para a função hemostática plaquetária (KULKARNI et al., 2000). De fato, deficiências hereditárias ou adquiridas da função dos receptores celulares, do conteúdo dos grânulos plaquetários, ou do número das plaquetas, resultam em doenças hemorrágicas com ampla heterogeneidade clínica caracterizadas por sangramentos cutâneo-mucosos ou hemorragias em estruturas anatômicas vitais.

Uma vez ativadas, as plaquetas ligam-se às moléculas de adesão solúveis e levam à contínua deposição de outras plaquetas na superfície do vaso lesado. Isto ocorre através de dois processos, a adesão e a agregação plaquetária (RUGGERI, 2000). A adesão plaquetária é resultante de um mecanismo complexo, envolvendo o seqüestro celular no local da lesão endotelial. Isto depende da interação de quatro receptores sinérgicos, a glicoproteína (GP) Ib-IX-V e as integrinas $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia-IIa), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb-IIIa) e $\alpha_5\beta_1$ (GP Ic-IIIa). Por outro lado, a agregação plaquetária depende somente da GP Ib-IX-V e da GP

IIb-IIIa (RUGGERI, 2002).

O controle da função plaquetária é decorrente do fluxo sangüíneo em que as células estão circulando. O fibrinogênio é o único ligante da GP IIb-IIIa em sistema de fluxo lento, como o sistema venoso. Entretanto, em fluxo rápido como nos vasos arteriais, o fibrinogênio é substituído pelo FvW para a ligação com o complexo GP IIb-IIIa. A representação esquemática da agregação plaquetária está demonstrada na figura 2.

A interação da subunidade Ib α , que faz parte do complexo GP Ib-IX-V e o FvW, é fundamental para o seqüestro transitório de plaquetas e adesão ao endotélio. Esse processo é amplificado pela ativação do receptor GP IIb-IIIa das plaquetas e ligação com colágeno e estruturas subendoteliais. O resultado final é a formação de um agregado plaquetário estável e ligações irreversíveis com o fibrinogênio e o FvW, originando assim um agregado resistente ao fluxo sangüíneo acelerado. Entretanto, em condições de fluxo lento as funções do FvW não são críticas e a ligação das plaquetas com o colágeno é suficiente para permitir a formação de agregado plaquetário estável. O que sugere que mutações que acentuem determinada função plaquetária podem ter repercussões fisiopatológicas distintas em vasos venosos ou arteriais. Além disso, o fluxo sangüíneo também difere entre vasos arteriais afetados ou não por doença aterosclerótica.

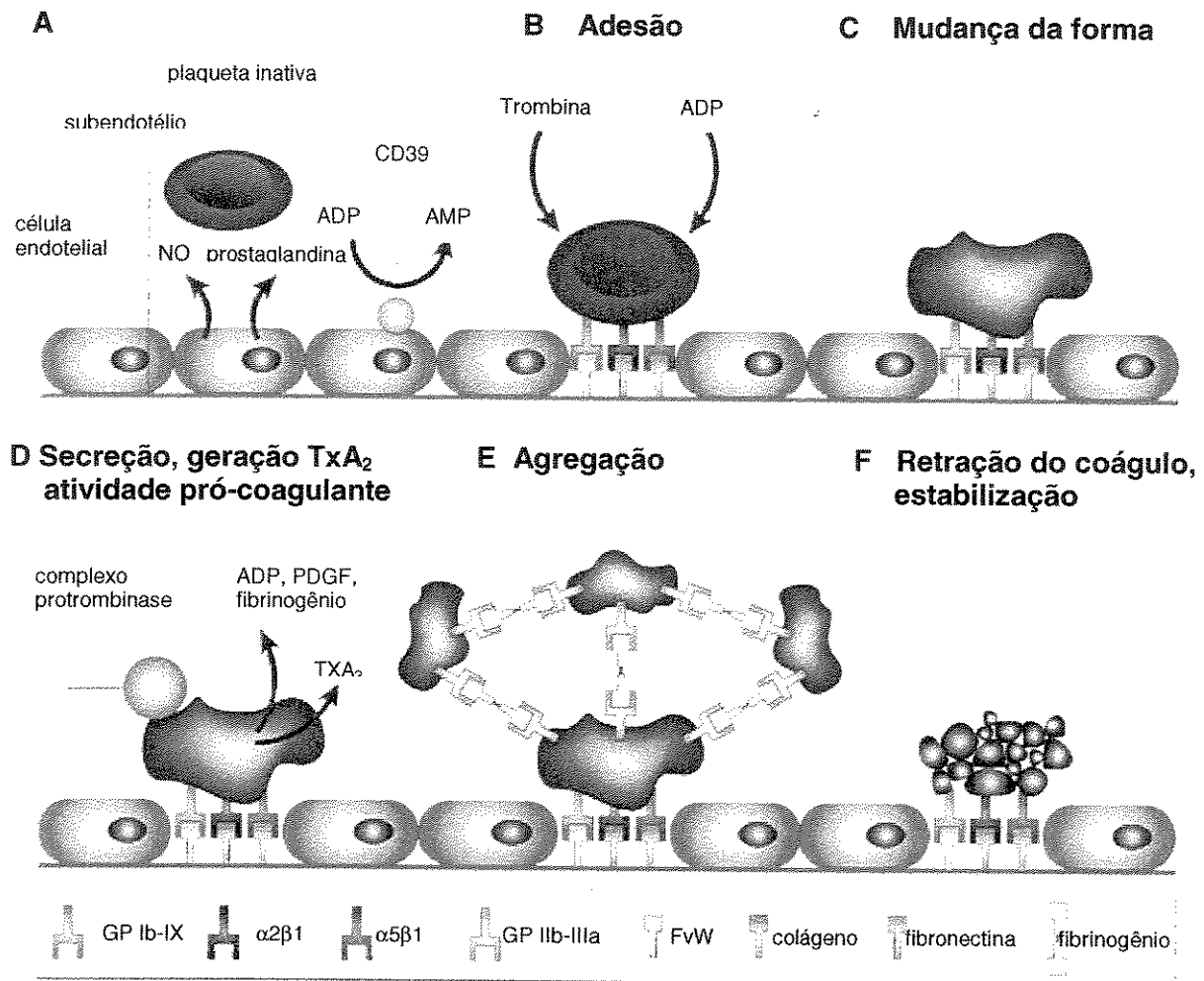


Figura 2. A participação das plaquetas na formação do trombo. **A.** As células endoteliais liberam para a circulação de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), que ajudam a manter as plaquetas circulantes em sua forma inativa. Além disto, as células endoteliais expressam em sua superfície CD39 (ATPDase ou adenosina trifosfato difosfohidrolase), o qual inibe a ativação plaquetária, por converter ADP (adenosina difosfato), um potente ativador plaquetário, em AMP (adenosina monofosfato). **B e C.** Nos locais onde há lesão vascular, as plaquetas se aderem ao subendotélio exposto, através da interação entre colágeno, fator von Willebrand (FvW) e fibronectina aos receptores da membrana plaquetária, integrina $\alpha_2\beta_1$, glicoproteína Ib-IX e integrina $\alpha_5\beta_1$, respectivamente. Tanto a trombina, como o ADP levam à mudança da conformação plaquetária em sua forma ativa. **D.** As plaquetas ativadas secretam ADP, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fibrinogênio, armazenados em seus grânulos de secreção, além de liberarem tromboxano A₂ (TxA_2), de biossíntese imediata. O ADP e TxA_2 liberados causam nas plaquetas circulantes a mudança de sua forma e elas se tornam ativas. **E.** A glicoproteína IIb-IIIa é um receptor da superfície da plaqueta ativada, que se liga ao fibrinogênio, levando a formação de pontes de fibrinogênio entre as plaquetas, resultando assim na agregação plaquetária. Com a formação simultânea da fibrina, através da cascata da coagulação e sua incorporação às plaquetas agregadas, há a formação do trombo plaquetário. **F.** Com a retração do coágulo, o coágulo torna-se estável. Retirado de BHATT and TOPOL, (BHATT e TOPOL, 2003).

1.3. Evolução da coagulação sangüínea e das plaquetas

A hemostasia sangüínea é o resultado do equilíbrio entre sistemas antagônicos e dinâmicos, a coagulação e anticoagulação sangüínea. Uma importante consideração neste sentido é como esse sistema evoluiu para atingir a estrutura com a qual é hoje conhecido. A formação do sistema vascular permitiu que o sangue circulasse em regime de pressão. Assim a coagulação sangüínea deve ter surgido como mecanismo adaptativo para manter o sangue circulando dentro dos vasos sob grande pressão e evitando as hemorragias.

A simples observação de que a função de uma proteína depende da ativação seqüência por outra proteína, nos faz pensar em como foi possível para esse sistema existir, sendo que a falta de um único componente pode comprometer toda uma seqüência de eventos. Os componentes fisiológicos importantes da coagulação de mamíferos têm propriedades funcionais distintas. No entanto, pela observação da organização dos genes, da estrutura das proteínas e das seqüências de aminoácidos, é provável que os vários componentes resultaram da reduplicação e diversificação funcional de somente duas estruturas gênicas diferentes: (I) proteínas dependentes da vitamina K contendo os (a) domínios de ácido glutâmico γ -carboxilado (domínio Gla), (b) seqüências similares a dos fatores de crescimento epidérmicos (EGF-1 e EGF-2) e (c) o domínio serino-protease que estão presentes nos fatores VII, IX, X e proteínas C e Z. (II) proteínas contendo os domínios A1-A2-B-C1-C2 comum aos fatores VIII e V (DAVIDSON et al., 2003).

A protrombina difere das outras serino-proteases por não conter os domínios EGF, mas domínios “*kringles*”; provavelmente uma forma primitiva da protrombina poderia conter os domínios EGF que foram substituídos durante a duplicação gênica e/ou mobilidade de

éxons. A análise de aminoácidos residuais e o uso de códon de transcrição preferencial de regiões importantes relacionadas ao sítio ativo na serino-protease demonstraram que a trombina difere do FVII, FIX, FX e proteína C e sugere que talvez a trombina seja o ancestral das enzimas da coagulação sangüínea (DAVIDSON et al., 2003).

O estudo das proteínas serino-proteases entre vertebrados revelou que ocorreram duplicações de grandes seqüências regionais do genoma, ou mesmo de todo o genoma, durante o processo evolutivo entre os vários vertebrados. Os mecanismos responsáveis por essas modificações ainda não são completamente conhecidos, mas as hipóteses sugerem duas duplicações de todo o genoma de vertebrados, que ocorreram aproximadamente há 500 milhões de anos. Analisando a organização do genoma humano é possível determinar dois padrões: enquanto os genes do FVII e FX estão organizados mais próximos, em seqüência no cromossomo 13q34; os genes de outras proteínas homólogas estão localizados em regiões distintas, tais como o FVIII e FV (cromossomo X e 1, respectivamente), assim como FIX e proteína C (cromossomo X e 2, respectivamente). Baseado nessas observações é possível sugerir que mecanismos moleculares distintos (translocação ou duplicação) ocorreram na evolução da organização das proteínas da coagulação de vertebrados.

Nos estudos de evolução clássicos, em que o tempo de determinada modificação ou divergência detectada numa espécie pode ser estabelecido pela comparação direta com espécies inferiores, revelaram que a organização da coagulação sangüínea como é observada entre os vertebrados, provavelmente ocorreu há 450 milhões de anos. De fato, estudos de vertebrados sem mandíbulas (enguia e hagfish) revelaram a presença

do fibrinogênio, protrombina, fator tecidual, além de pequenos complementos protéicos contendo os domínios Gla-EGF1-EGF2-serino protease.

Dottlitt sugere que no começo existiam apenas o fator tecidual e o fibrinogênio, seguido do aparecimento da protrombina e depois apareceram os outros grupos protéicos (DOOLITTLE, 1993). A presença de plaquetas como células anucleadas observadas em humanos é restrita aos mamíferos e levou ao conceito de que, para ter plaquetas é necessário ser mamífero. Várias evidências sugerem que células ancestrais das plaquetas apresentavam núcleo e múltiplas funções além da hemostasia, como defesa contra microorganismos e ação inflamatória. Ainda que essas funções estejam presentes nas plaquetas, a vantagem da formação de plaquetas em comparação aos ancestrais dessas células não é conhecida. Inicialmente foi sugerido que o aparecimento da placenta e das plaquetas fosse correlacionado. O estudo das plaquetas de marsupiais (mamíferos que não desenvolvem placenta) e de edquina (mamíferos ovíparos), revelaram que todos apresentam plaquetas anucleadas, sem formas anormais e em número semelhante. Portanto, o aparecimento das plaquetas não foi relacionado ao desenvolvimento de placenta nos mamíferos.

Estudos em vertebrados inferiores tais como caranguejos, demonstraram a presença dos amebócitos e em peixe-zebra dos trombócitos. Essas células, também nucleadas, desempenham além de funções hemostáticas, a defesa contra infecções e provavelmente são os ancestrais das plaquetas. É importante ressaltar o fato de que os amebócitos, similar às plaquetas de mamíferos, são capazes de agregação, secreção de fatores de coagulação e têm propriedades de cicatrização e defesa antibacteriana.

Os trombócitos do peixe-zebra ainda apresentam núcleo e têm fatores fenotípicos e funcionais característicos das plaquetas de mamíferos. Jagadeeswaran e cols. (1999) demonstraram que os trombócitos apresentam formação de agregados, pseudopodia e formação de sistema canicular, sendo semelhantes às plaquetas de mamíferos (JAGADEESWARAN et al., 1999). A coleta de sangue total desses animais possibilitou o estudo de agregação e adesão dos trombócitos, assim como a medida da liberação de ADP. Essas células responderam ao estímulo agregante induzido pela ristocetina, colágeno e ácido araquidônico. O uso de aspirina previne a resposta agregante induzida pelo ácido araquidônico e agonistas que induzem a liberação de ADP, revelando a participação da via da ciclo-oxigenase.

De interesse para este estudo é o fato de que os trombócitos do peixe-zebra apresentam estruturas semelhantes às glicoproteínas plaquetárias de humanos. Isto pode ser observado em experimentos em que as células desses vertebrados inferiores foram incubadas com anticorpos policlonais desenvolvidos contra epítomos das glicoproteínas plaquetárias humanas, GP Ib ou do complexo GP IIb-IIIa. Além disso, através do uso desses anticorpos também foi possível reconhecer as glicoproteínas de trombócitos de aves. Em conjunto esses dados demonstraram que os complexos de glicoproteínas identificados na membrana celular plaquetária de humanos, de fato, precedem o aparecimento das próprias plaquetas na forma atualmente identificadas em mamíferos.

1.4. Complexo glicoproteína Ib-IX-V

O complexo GP Ib-IX-V é constituído de quatro subunidades: GP Ib α (CD 42b), GP Ib β (CD 42c), GP IX (CD 42a) e GP V (CD 42d). Estes polipeptídeos são expressos na

membrana plasmática das plaquetas, formando complexos na proporção 2:2:2:1 respectivamente (figura 3). Uma plaqueta humana normal, em sua forma inativa possui cerca de 25.000 cópias da GP Ib α (135 kD, 610 aminoácidos), GP Ib β (25 kD, 18 aminoácidos) e da GP IX (22 kD, 160 aminoácidos), além de cerca de metade deste número da GP V (82 kD, 544 aminoácidos). Este número pode variar em indivíduos normais, sobretudo dependendo do gene da GP Ib α , que possui um polimorfismo na sequência Kozak, de sua região promotora, que pode afetar a eficiência da tradução do RNA mensageiro (RNAm) (AFSHAR-KHARGHAN et al., 1999). Além das plaquetas megacariócitos, apenas as células endoteliais expressam o complexo GP Ib-IX-V. No caso das células endoteliais, algumas vezes apenas a GP Ib α é expressa, mesmo assim em situações especiais, como em resposta à reação inflamatória (LOPEZ et al., 1998). Cada uma das subunidades do complexo GP Ib-IX-V, faz parte da subfamília de proteínas com repetições ricas em leucina. Isto porque em todas há um número variável de repetições de seqüências ricas em leucinas, com cerca de 24 aminoácidos cada uma: GP Ib α com 7 repetições; GP Ib β e GP IX com uma repetição e GP V com 15 repetições

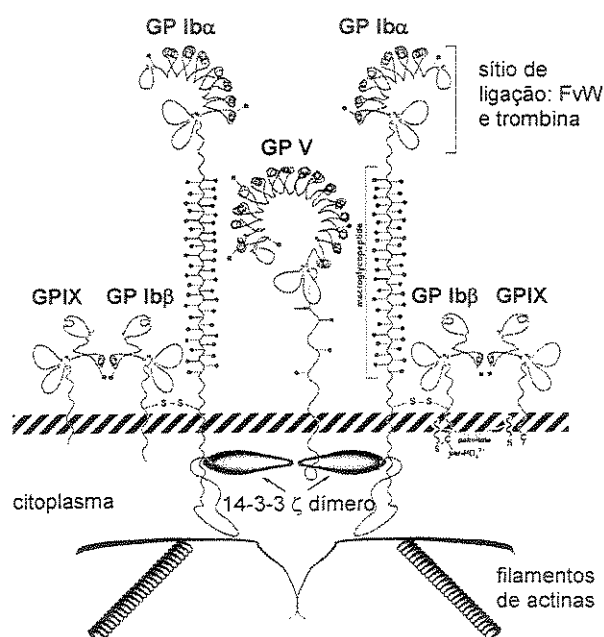


Figura 3. Complexo GP Ib-IX-V.

A GP Ib α está ligada à GP Ib β através de uma ligação dissulfídica e associada através de ligação não covalente à GP IX e GP V, na proporção 2:2:2:1. Retirado Lopez e cols. (LOPEZ et al., 1998).

Os genes que codificam cada uma das quatro subunidades formadoras do complexo GP Ib-IX-V, estão localizados em regiões distintas (figura 4). No entanto, caracteristicamente estes genes são de estrutura semelhante e relativamente compacta. Com exceção do gene da GP IX, que possui 2 íntrons, os demais possuem apenas 1 íntron e apenas no gene da GP Ib β , o íntron interrompe a região codificadora.

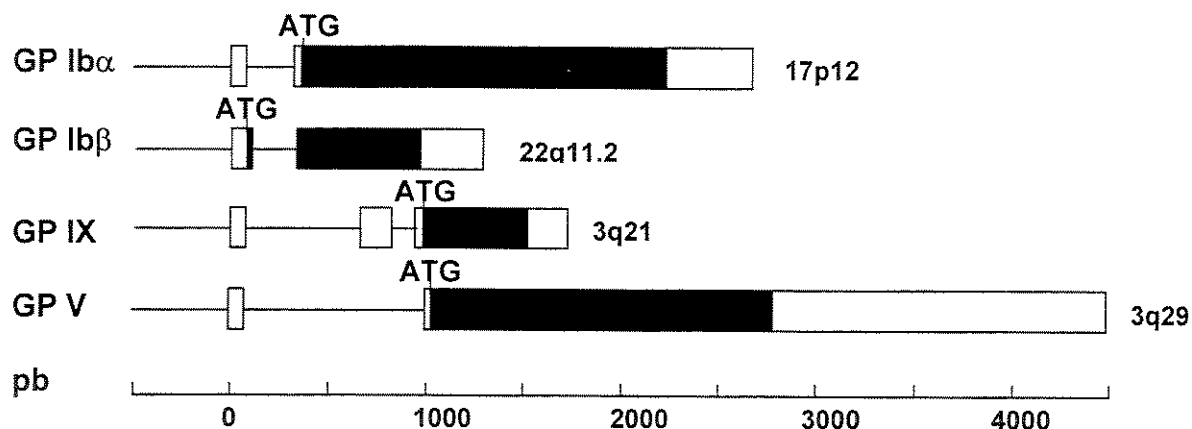


Figura 4. Esquema do tamanho e estrutura dos genes que codificam as quatro subunidades do complexo GP Ib-IX-V. Os éxons estão representados pelos retângulos e os íntrons pela linha contínua. A região codificadora está representada em preto. A posição do códon iniciador ATG de cada gene, também está representada. A localização dos genes nos distintos cromossomos está evidenciada a direita de cada gene. pb, pares de base.

Em camundongos e humanos existe considerável semelhança entre os genes que codificam os componentes do complexo GP Ib-IX-V, variando em ~70% para a GP IX ou GP V e 88% para a GP Ib β .

O gene da GP Ib α canino foi caracterizado por Kenny e cols. (2002) e revela grande homologia tanto na região terminal amino como na carboxi (KENNY et al., 2002).

A seguir serão discutidas as características moleculares e funcionais da GP Ib α .

1.4.1. Glicoproteína Ib α (GP Ib α).

No complexo Ib-IX-V, os sítios de ligação para o FvW e trombina estão situados nos primeiros 282 resíduos da região N-terminal da subunidade GP Ib α , que é formada ac todo por 610 aminoácidos (BERNDT e LOPEZ, 2001). A porção citoplasmática da GP Ib α possui ainda os sítios de interação às proteínas actinas–ligantes e 14-3-3 ζ responsáveis pela sinalização da atividade plaquetária.

O gene da GP Ib α está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p12). Estruturalmente a GP Ib α pode ser dividida em: 1. região N-terminal globular, a qual está subdividida em: (a) região N-terminal (aminoácidos 1 a 35), com a formação de *loop* dissulfídicos entre Cys 4 e Cys 17; (b) 7 repetições ricas em leucina (aminoácidos 36 a 200); (c) seqüência C-terminal (aminoácidos 201 a 268), com dois *loops* dissulfídicos (Cys209 - Cys248 e Cys211 - Cys268); (d) seqüência de cargas negativas (aminoácidos 268 a 282), contendo 3 resíduos de tirosina (posições 276, 278 e 279); 2. região macroglicopeptídica, que forma uma haste alongada, rica em treonina, prolina e serina e contém vários sítios O-glicosilados; 3. região do domínio citoplasmático, onde há o sítio de ligação da actina (treonina 536 a leucina 554), que está envolvida com a integridade do citoesqueleto da plaqueta; além de conter o sítio de ligação com a proteína do complexo de sinalização 14-3-3 ζ (figura 5).

(ISHIDA et al., 1995), confirmaram a presença de quatro alelos, denominados VNTR-A e VNTR-D, dependendo da presença de quatro a uma cópia, respectivamente. Recentemente, foi descrita uma variante rara deste polimorfismo, caracterizado pela ausência da seqüência de 13 aminoácidos, denominado VNTR-E (MUCKIAN et al., 2000). Como este polimorfismo afeta justamente a haste, que forma a região macroglicopeptídica, é importante notar que cada cópia do VNTR, aumenta em 32 Δ, o distanciamento entre a região N-terminal, que possui os sítios de ligação e a superfície da membrana da plaqueta, além de adicionar 5 sítios potenciais para O-glicosilação.

Kuijpers e cols. descreveram outro polimorfismo, afetando a região rica em leucina resultante da substituição da treonina na posição 145, por uma metionina (KUIJPERS et al., 1992). Este polimorfismo afeta a antigenicidade das plaquetas e é a base molecular do sistema antigênico da plaqueta humana -2 (HPA-2 ou *human platelet antigen system* 2). O HPA-2 está envolvido com o desenvolvimento de refratariedade plaquetária transfusional, assim como a púrpura aloimune neonatal. Inicialmente, foi observado que haveria uma ligação em desequilíbrio, entre os polimorfismos do gene da GP Ibα, VNTR e HPA-2, onde os alelos VNTR-A (4 cópias) e -B (3 cópias), estariam associados à presença do HPA-2b (-25Met45), enquanto os alelos VNTR-C (2 cópias) e -D (1 cópia) estariam relacionados com a presença do HPA-2a (Tre145) (SIMSEK et al., 1994a). No entanto, posteriormente, foi demonstrado em estudos populacionais entre negros americanos e caucasóides espanhóis, que esta ligação em desequilíbrio não é completa (ARAMAKI e REINER, 1999; CORRAL et al., 1998).

Um terceiro polimorfismo foi descrito por Kaski e cols. (1996) resultante de um dimorfismo na seqüência 5' não traduzida do gene da GP Ibα, devido à substituição de

T→C, na posição -5 do códon iniciador ATG, sequência reconhecida como Kozak (KASKI et al., 1996). Foi observado que os níveis de expressão da GP Ib α na membrana plaquetária são diretamente afetados por este dimorfismo, de tal forma que o alelo -5C, pode aumentar em 33% a 66% esta expressão, quando presente em heterozigose ou homozigose, respectivamente (AFSHAR-KHARGHAN et al., 1999).

Outros dois polimorfismos de baixa prevalência foram descritos no gene da GP Ib α , o dimorfismo E/F, resultante de uma troca de um C→T na segunda base do códon Asn242 e a presença dos alelos K/L, resultantes da troca de um A→G, no códon Arg342 (KASKI et al., 1996).

1.5. Interação entre plaqueta e trombina

O estudo da ativação plaquetária pela trombina revelou um mecanismo único e complexo, o qual afeta não somente as plaquetas, mas também o efeito de proteases (trombina, FXa, FT-FVIIa) sobre as células endoteliais e talvez outros tecidos.

Coughlin e cols. (2000) há mais de uma década descreveram um elegante modelo pelo qual a trombina ativa a função plaquetária (COUGHLIN, 2000). Esse estudo resultou na identificação de receptores ativados por proteases (PAR ou *protease-activated receptors*).

Durante anos pesquisadores procuraram identificar o ligante dos receptores celulares plaquetários. No entanto, os receptores ativados pelas proteases contêm os próprios ligantes e ativadores. Como exemplificado na figura 6, a trombina cliva uma sequência específica do PAR na porção aminoterminal, o que libera o fragmento de sequência polipeptídica, que por sua vez ativa o receptor. A especificidade desse sistema foi

definida por uma série de experimentos em que os receptores são ativados apenas por peptídeos sintéticos idênticos àqueles que são liberados após a ativação da trombina (SSFLRN).

Existem receptores celulares sensíveis às distintas proteases e atualmente são reconhecidos quatro distintos PARs, denominados PAR-1, -2, -3 e -4. Os diversos receptores diferem na distribuição celular e na resposta às proteases. Nas plaquetas humanas estão presentes o PAR-1 e PAR-4, enquanto em camundongos as plaquetas apresentam PAR-3 e PAR-4. A trombina cliva a extremidade aminoterminal dos PARs -1, -3 e -4, sendo que o PAR-2 é ativado principalmente pela tripsina e pelo complexo FVIIa-FXa.

Assim, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para esses receptores ou mais recentemente, de peptídeos sintéticos com função inibitória específica, oferecer uma nova forma de tratamento das doenças vasculares isquêmicas. Estudo em primata não-humanos utilizando a ligação da artéria femoral como modelo de doença isquêmica periférica, demonstraram que o uso de peptídeos sintéticos é de fato seguro, factível e eficaz (DERIAN et al., 2003).

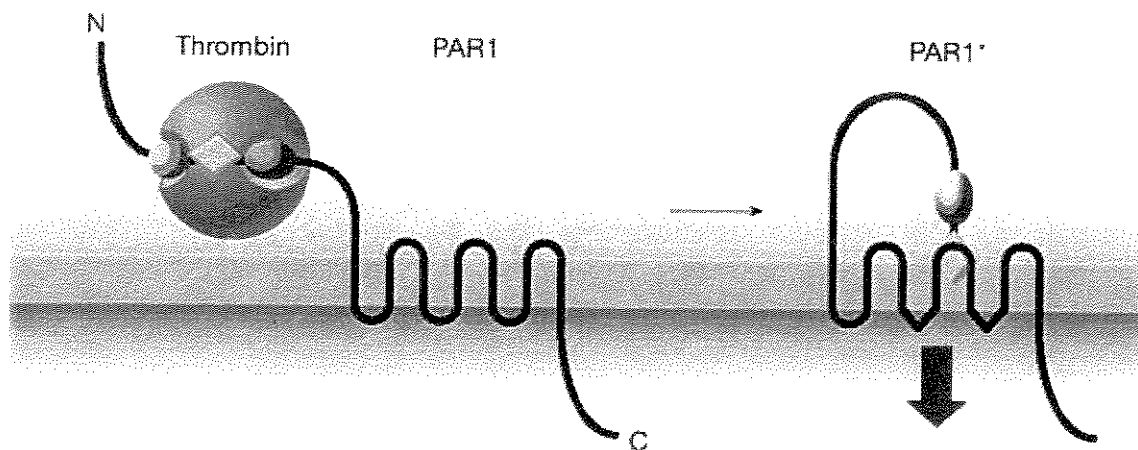
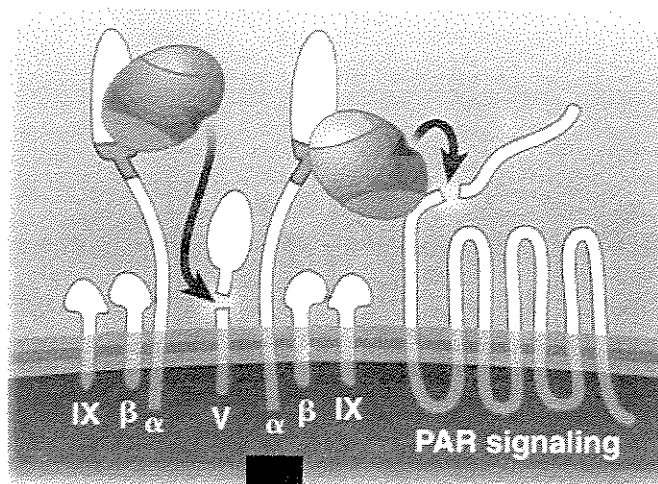
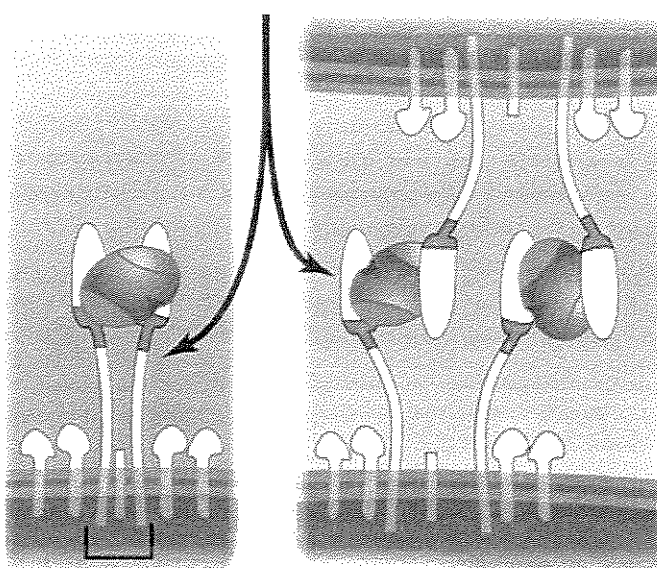


Figura 6. Mecanismo de ativação do PAR 1. A trombina (esfera verde) reconhece o exodomínio N-terminal da proteína G, que está unida ao receptor da trombina, PAR 1. A interação entre a trombina e seu sítio de clivagem, utiliza tanto o sítio N-terminal (esfera azul), como o C-terminal (esfera vermelha). A sequência C-terminal, é semelhante às sequências de inibidores da trombina, como a hirudina. A trombina cliva os peptídeos presentes entre os resíduos Arg41 e Ser42. Isto serve para desmascarar um novo N-terminal, iniciado com uma sequência SFLLRN (amarelo). Esta nova sequência formará uma ligação em laço, intramolecular, com o próprio corpo do receptor, o que ativará uma sinalização transmembrana. A produção do peptídeo SFLLRN sintético, mimetizando a sequência N-terminal para a ligação em laço, poderá ter a função de um agonista independente da clivagem prévia do receptor. Portanto, o PAR 1 é essencialmente, um receptor peptídico, que carrega seu próprio ligante, que será ativado após a clivagem deste receptor. Retirado de Coughlin (COUGHLIN, 2000).

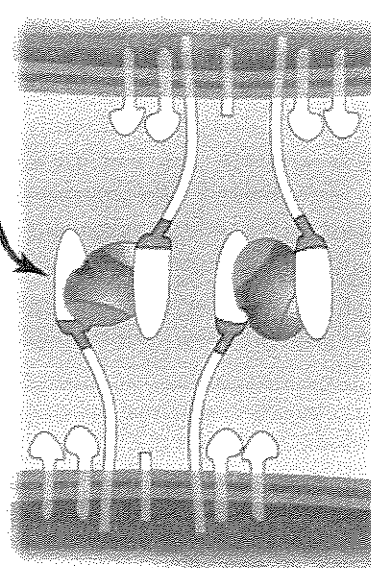
A trombina exerce ação sobre as plaquetas pela ativação do complexo GP Ib-IX-V, ainda que considerado de menor efeito funcional do que pela ação mediada pelos PARs. Recentemente foi sugerido um novo mecanismo pelo qual a ação da trombina e talvez outras proteases da coagulação, possam atuar sobre o complexo GP Ib-IX-V. Como demonstrado na figura 7, a trombina inicialmente cliva parcialmente uma sequência específica da GP V, a resultante dessa ação é então seguida da ativação do PAR (RAMAKRISHNAN et al., 2001).



Agrupamento de GP Ib



B. Sinalização



C. Agregação

Figura 7. Ligação da trombina à GP Ib-IX-V. A. A Trombina, através de seu sítio de ligação (verde), liga-se a segmentos aniônicos do complexo GP Ib-IX-V (laranja), deixando outros sítios de ligação da trombina (azul e vermelho), acessíveis aos demais substratos. A GP V é rapidamente clivada, facilitando a clivagem dos PARs. A ligação bivalente da trombina em seus sítios de ligação (verde e azul), leva a formação de agrupamentos da subunidade GP Ib α na membrana das plaquetas, o que leva a sinalização intracelular das plaquetas. Simultaneamente a formação de pontes de ligação entre as trombinas e a superfície das plaquetas, pode contribuir com a agregação. Retirado Sadler (SADLER, 2003).

Recentemente, dois estudos propuseram a estrutura cristalográfica da interação entre GP Ib α e a trombina (CELIKEL et al., 2003; DUMAS et al., 2003). Em ambos foi descrita uma interação bivalente entre trombina e sua participação na sinalização e agregação plaquetárias (figura 8). A compreensão da estrutura e conformação durante a interação da GP Ib α e trombina, abre outras perspectivas para o desenvolvimento de novas drogas antiagregantes, sobretudo para o tratamento da doença arterial oclusiva.

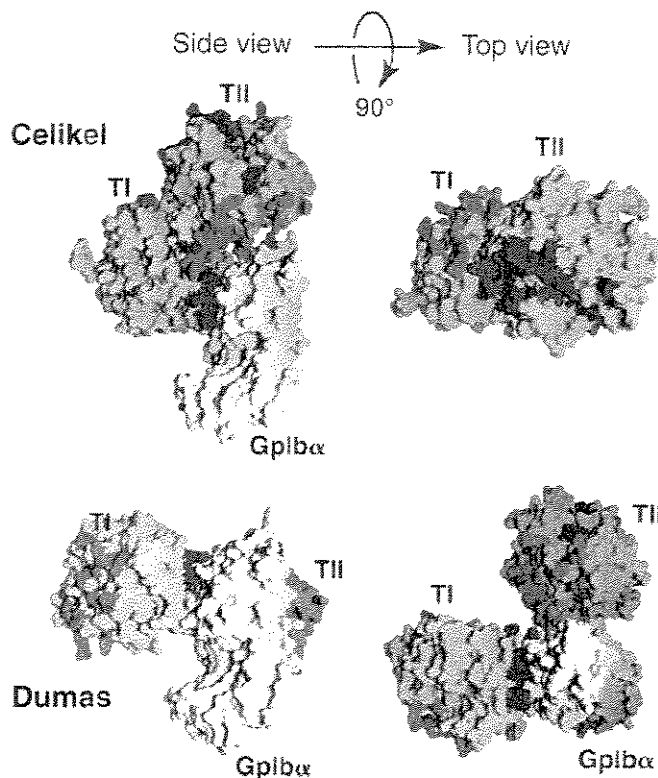


Figura 8. Representação do modelo por cristalografia da interação entre GP Ib α e a trombina. Segundo dois modelos de Celikel e cols. (CELIKEL et al., 2003) acima e Dumas e cols. (DUMAS et al., 2003). O fragmento amino terminal da GP Ib α está representado em cinza e seu segmento aniônico (iniciado por Pro265) em laranja. A trombina pode se ligar à GP Ib α através de dois sítios de ligação, o sítio I (TI em azul) e sítio II (TII em verde). Em vermelho estão representados os sítios ativados de inativação. Retirado de Sadler (SADLER, 2003).

1.6. Complexo GP Ib-IX-V e doenças hemorrágicas

As mutações presentes no complexo GP Ib-IX-V, estão associadas a doenças hemorrágicas raras. Mutações que levam à perda de função, por alteração qualitativa ou quantitativa da GP Ib-IX-V, causam quando em homozigose, a síndrome de Bernard-Soulier (SBS). Por outro lado, duas mutações específicas na região de ligação dissulfídica de dupla volta do gene da GP Ib α (Gly233→Val e Met239→Val), mesmo em heterozigose levam à alteração na conformação da GP Ib α , o que aumenta a afinidade de ligação do FvW plasmático à GP Ib α . Este tipo de alteração é conhecido como pseudo-doença de von Willebrand (pseudo-DvW) ou tipo plaquetário. Na pseudo-DvW embora haja um ganho de função da GP Ib α , a ligação espontânea entre o FvW e a GP

Ib α mutante leva à maior tendência hemorrágica, semelhante ao que é observado na doença de von Willebrand subtipo 2B.

A SBS foi inicialmente descrita em 1948 por Bernard e Soulier (BERNARD, 1996) e atualmente é definida como macrotrombocitopenia com alteração quantitativa ou qualitativa do complexo GP Ib-IX-V. Clínica e laboratorialmente, apresenta sangramento cutâneo-mucoso, aumento do tempo de sangramento, trombocitopenia variável, diminuição na sobrevivência das plaquetas, além da presença de plaquetas gigantes (megaplaquetas).

Baseado nos dados epidemiológicos das populações européias, norte americanas e japonesas, a frequência da SBS é estimada hoje em 1 caso para cada 1 milhão de pessoas e seguindo a lei de Hardy-Weinberg, a frequência dos heterozigotos é em torno de 1 em 500 indivíduos (BALDUINI et al., 2002).

1.7. Alterações moleculares da GP Ib-IX-V relacionadas à síndrome de Bernard-Soulier (SBS).

Classicamente a SBS apresenta herança autossômica recessiva, sendo comum a história de consanguinidade. Embora os indivíduos heterozigotos sejam de maneira geral assintomáticos, algumas vezes, podem apresentar plaquetopenia, além de megaplaquetas circulantes e manifestações hemorrágicas variáveis. Isto foi observado entre os heterozigotos para a mutação Ala156→Val no gene da GP Ib α , responsável pela variante Bolzano, que leva à alteração funcional do complexo Ib-IX-V (cuja descrição virá a seguir) (SAVOIA et al., 2001). Além disso, a mutação Leu57→Phe no gene da GP Ib α é responsável pela ocorrência de SBS, com herança autossômica

dominante (MILLER et al., 1992). De fato, atualmente questiona-se, se a melhor forma de definição da SBS, não seja como uma macrotrombocitopenia autossômica dominante, com penetrância incompleta, onde os raros indivíduos homozigotos apresentam alterações mais graves do fenótipo que os heterozigotos (BALDUINI et al., 2002).

Das quatro subunidades que compõem o complexo GP Ib (α e β)-IX-V, apenas a GP V não evidenciou nenhuma mutação, que pudesse estar relacionada com o desenvolvimento de SBS. A maior frequência de mutações descritas, ocorrem na GP Ib α , onde já foram evidenciadas 19 mutações distintas, segundo referência da base de dados para SBS, que descreve ainda, 12 mutações distintas na GP Ib β e 10 mutações na GP IX (<http://www.bernard-soulier.org>). Algumas das principais mutações envolvendo o complexo GP Ib-IX-V, estão evidenciadas na figura 9.

Algumas mutações da GP Ib α são responsáveis por formas variantes da SBS, onde embora haja alteração funcional, quantitativamente o complexo GP Ib-IX-V está normal, ou apenas com pequena diminuição de sua expressão. A variante Bolzano, decorrente da substituição Ala156→Val, localizado na sexta repetição rica em leucina do gene da GP Ib α , é um exemplo em que embora a expressão da GP Ib α , esteja apenas discretamente diminuída, a capacidade de ligação ao FvW é ausente, mantendo porém a ligação da GP Ib α à trombina intacta. Provavelmente a perda da função da GP Ib α , seja decorrente de alteração na conformação da glicoproteína (DE MARCO et al., 1990). Há ainda outras variantes da SBS, como a variante Nancy I, devido a deleção da Leu179, na região rica em leucina da GP Ib α , com expressão próxima ao normal da GP Ib-IX-V, mas com perda completa da capacidade de ligação ao FvW (DE LA SALLE et al., 1995). A variante Karlstrad é resultante de uma parada a partir da Trp498, que leva à formação de

uma GP Ib α truncada, com perda de parte da porção citoplasmática, mas a expressão do complexo GP Ib-IX-V é preservada, mantendo inclusive a ligação dissulfídica entre a GP Ib α à GP Ib β . No entanto, além de apresentar megaplaquetas circulantes, há comprometimento da capacidade de ligação ao FvW. Isto sugere que o domínio citoplasmático da GP Ib α , embora não seja crítico para a expressão pelo menos parcial do complexo GP Ib-IX-V, é necessário para a função da GP Ib α e para a manutenção do citoesqueleto plaquetário (HOLMBERG et al., 1997).

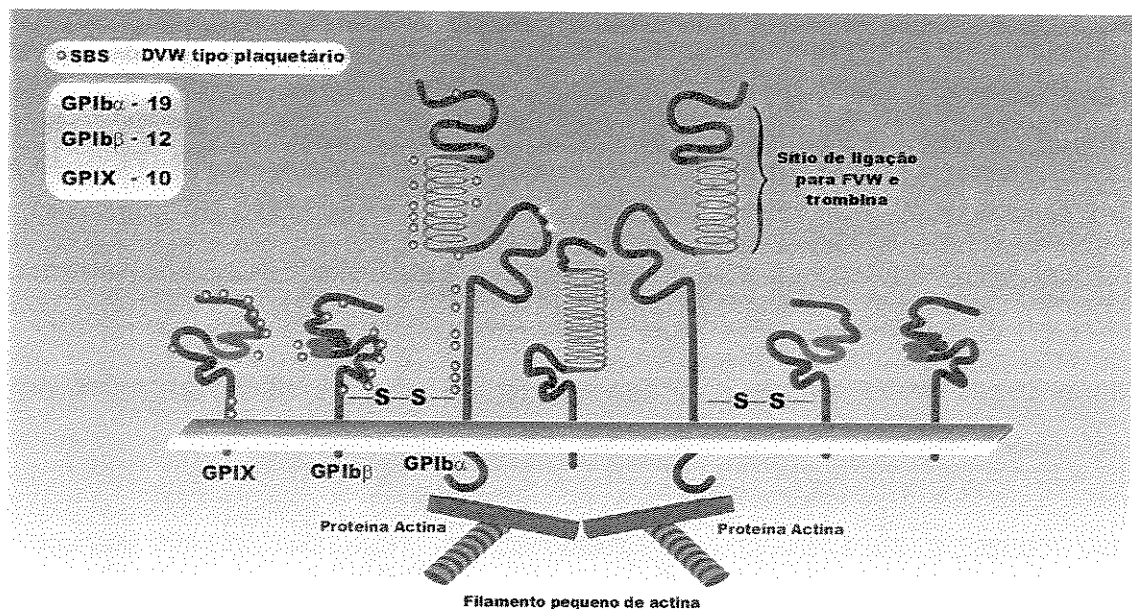


Figura 9. Representação do complexo GP Ib-IX-V e as principais mutações presentes na síndrome de Bernard Soulier (SBS) e doença de von Willebrand tipo plaquetário (pseudo-DvW). Cada uma das glicoproteínas que compõem o complexo, possuem uma sequência rica em leucina (marrom). A GP Ib α , possui os sítios de ligação para o FvW e trombina e está ligada através de pontes dissulfídicas à GP Ib β . Já foram descritas dezenove mutações distintas na GP Ib α , a maioria na região rica em leucina. As mutações Met230Val e Gly233Val no gene da GP Ib α , são responsáveis pela pseudo-DvW, com herança autossômica dominante. Entre indivíduos com SBS, foram descritas ainda 12 mutações distintas na GP Ib β e 10 mutações na GP IX. Adaptado de Bauduini e cols. (BALDUINI et al., 2002).

Embora, a SBS represente uma patologia rara, os estudos e a determinação molecular envolvendo esta patologia têm sido imprescindíveis para o entendimento funcional e estrutural do complexo GP Ib-IX-V. A análise continuada dos defeitos moleculares e genéticos da SBS tem fornecido informações críticas sobre conformação, estrutura e os mecanismos de interação da GP Ib-IX-V com o FvW e a trombina. Este fato tem proporcionado o estudo e desenvolvimento de novas medicações antiagregantes, sobretudo para uso em doenças arteriais oclusivas.

1.7.1. Modelos animais de doenças das glicoproteínas plaquetárias.

O desenvolvimento de animais deficientes nos complexos glicoproteicos da membrana plaquetária revelaram informações importantes das trombopatias hereditárias. Dois tipos de animais foram criados por Ware e cols. (FUJITA et al., 1998; WARE et al., 2000). Inicialmente foi gerado um modelo transgênico em que a expressão da GP Ib α humana (GP Ib α -h) em camundongos normais foi induzida pela injeção do óvulo fecundado *in vitro*. O gene da GP Ib α -h expresso, resultou na formação de um complexo quimérico GP Ib α -h com a GP Ib β -IX-V-murino (FUJITA et al., 1998). Apesar da cópia transgênica competir com o gene endógeno da GP Ib α -murina (GP Ib α -m) para a formação do complexo GP Ib-IX-V, não foi observada nenhuma anormalidade funcional do complexo em resposta ao estímulo *in vitro* pelos vários agonistas da função plaquetária, assim como não houve aumento do tempo de sangramento induzido pelo corte de parte da cauda do animal. Posteriormente, Ware e cols. (2000) desenvolveram um modelo animal em que o gene endógeno da GP Ib α -m foi neutralizado pela indução da recombinação homóloga, através da injeção em células embrionárias multipotentes com uma cópia não

funcional do gene GP Ib α -m (camundongo *knockout*) (WARE et al., 2000). O DNA contendo a seqüência nucleotídea que codifica a resistência ao antibiótico neomicina foi clonado na parte inicial do éxon da GP Ib α -m, o que interrompe a transcrição do RNA e da síntese proteica para a formação do complexo GP Ib-IX-V. Foram gerados animais heterozigotos para o alelo mutante e o cruzamento entre vários animais deu origem a animais homozigotos, que apresentam as características fenotípicas da SBS em humanos. Interessante notar, que camundongos homozigotos são viáveis, desenvolvem-se normalmente e geram número de filhotes comparável aos de animais hemostaticamente normais da mesma linhagem. Assim, a deficiência completa da GP Ib α não está associada a sangramento ou anormalidades do sistema vascular no período embrionário ou neonatal, o que é comumente identificado em modelos murinos de trombastenia de Glanzmann (deficiência do complexo GP IIb ou IIIa), ou deficientes em fatores da coagulação sangüínea (fator tecidual e fatores II, V, VII, X).

Animais com SBS apresentam sangramento prolongado por mais de dez minutos após corte da parte terminal da cauda, sendo que entre animais normais o tempo de sangramento é de 1 a 3 minutos. Animais homozigotos para o alelo mutante (GP Ib α^{nu}) apresentam plaquetas circulantes em número 70% inferior ($0,43 \times 10^6/\mu\text{l.}$) ao de animais normais ($1,5 \times 10^6/\mu\text{l.}$), enquanto os heterozigotos apresentam valores intermediários ($1 \times 10^6/\mu\text{l.}$). O esfregaço do sangue periférico demonstra população homogênea de megaplaquetas nos camundongos com SBS (homozigotos) e população mista naqueles heterozigotos (Figura 10, gentilmente cedida pela Dra Katherine High do *The Children's Hospital of Philadelphia*).

A origem das megaplaquetas observadas na SBS sempre foi motivo de discussão. Esses dados sugerem que a deficiência da GP Ib α é suficiente para a formação dessas células anormais. A caracterização fenotípica da expressão da GP Ib α -m revelou ausência total da GP e não resposta ao estímulo de agregação *in vitro* com ristocetina. O cruzamento entre animais com SBS e transgênicos expressando a GP Ib α -h (como citado anteriormente) resultou em significativa melhora do tempo de sangramento, do número de plaquetas e resposta agregante induzida pela ristocetina. Esses dados são bastante encorajadores para o desenvolvimento de terapêuticas futuras baseadas na reposição de cópias do gene da GP Ib α por transferência gênica através de vetores virais e não virais.

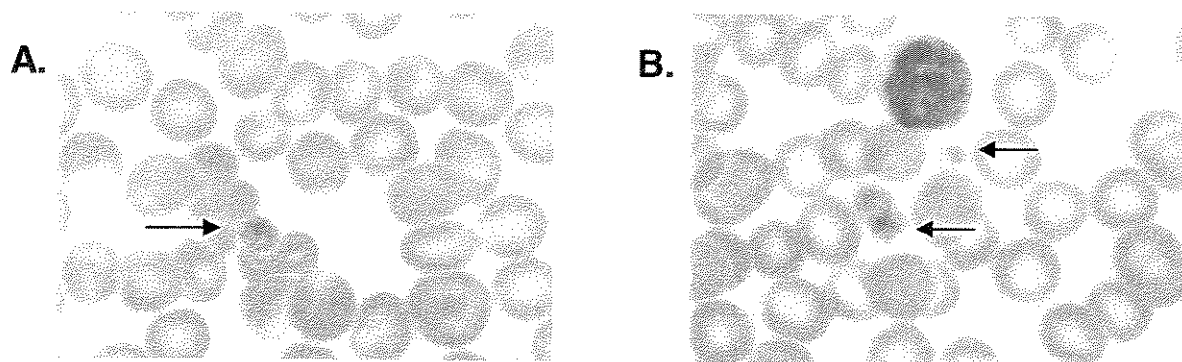


Figura 10. O esfregaço do sangue periférico de camundongos com SBS. Os animais homozigotos (A) para o alelo mutante (GP Ib α^{null}) demonstram população homogênea de megaplaquetas, enquanto nos animais heterozigotos (B) há população mista, com plaquetas de tamanho normal e presença de megaplaquetas.

Não há até o momento a identificação de modelos animais naturais para a deficiência de glicoproteínas do complexo GP Ib-IX-V ou GP IIb-IIIa. Ainda que trombopatias hereditárias com a presença de megaplaquetas sejam identificadas em cães, de uma forma geral, as características funcionais das plaquetas não têm semelhança com

doenças em humanos e são de fato complexas além de apresentarem características mistas entre SBS e trombastenia Glanzmann.

1.8. A participação das plaquetas na inflamação e aterosclerose

Embora as plaquetas sejam reconhecidas e definidas como integrantes do sistema hemostático, é inquestionável a participação e a importância das mesmas na resposta inflamatória. Devido à atividade pró-inflamatória e trombótica das plaquetas, elas são hoje reconhecidamente associadas à fisiopatologia e desenvolvimento de doenças que incorporam estes dois sistemas, como acontece com a aterosclerose.

A fisiopatologia da aterosclerose é multifatorial. No entanto, alguns aspectos são considerados de grande relevância, como a deposição de lípidos na parede dos vasos que são então metabolizados de forma anormal e causam uma infiltração de leucócito no local. Assim, há a formação de um ambiente inflamatório, envolvendo as células endoteliais, que uma vez afetadas, aumentam seu potencial de interação com outras células, incluindo as plaquetas. Isto pode ocorrer de diversas maneiras. Uma delas pelo próprio aumento da liberação de FvW pelas células endoteliais, o que atrai as plaquetas ao local. Além disto, as plaquetas interagem com diversos produtos de bactérias, anticorpos e outros microorganismos. Desta maneira, infecções recorrentes podem agravar o desenvolvimento da aterosclerose, sobretudo através da participação das plaquetas (RUGGERI, 2002).

As plaquetas têm a capacidade de atrair os leucócitos no local da injúria vascular através de diferentes mecanismos, como pela expressão na membrana plaquetária de moléculas de adesão (P-selectina), ou pela ligação direta da plaqueta com células

circulantes. A GP Ib α contém o sítio de ligação para a *Mac-1* (CD11b/CD18), uma integrina leucocitária, da família das integrinas β_2 , responsável pela interação entre as plaquetas e os leucócitos. No local da injúria vascular, as plaquetas ativadas passam a expressar P-selectina em grande quantidade na sua superfície, antes estocadas nos grânulos plaquetários α . Isto faz com que os leucócitos circulantes sejam atraídos para a superfície das plaquetas ativadas e rolem através da conexão entre P-selectina e seu receptor na membrana do leucócito, a PSGL-1. Até que ocorra uma firme adesão entre as plaquetas e os leucócitos, através da ligação entre a GP Ib α e a *Mac-1*. Esta ligação acaba facilitando a migração dos leucócitos para o interior da matriz subendotelial e dos tecidos (figura 11). Este mecanismo está relacionado com a presença de reação inflamatória no local da formação do trombo, além de contribuir para a formação de aterosclerose e de reestenose pós-angioplastia (WEYRICH et al., 2003).

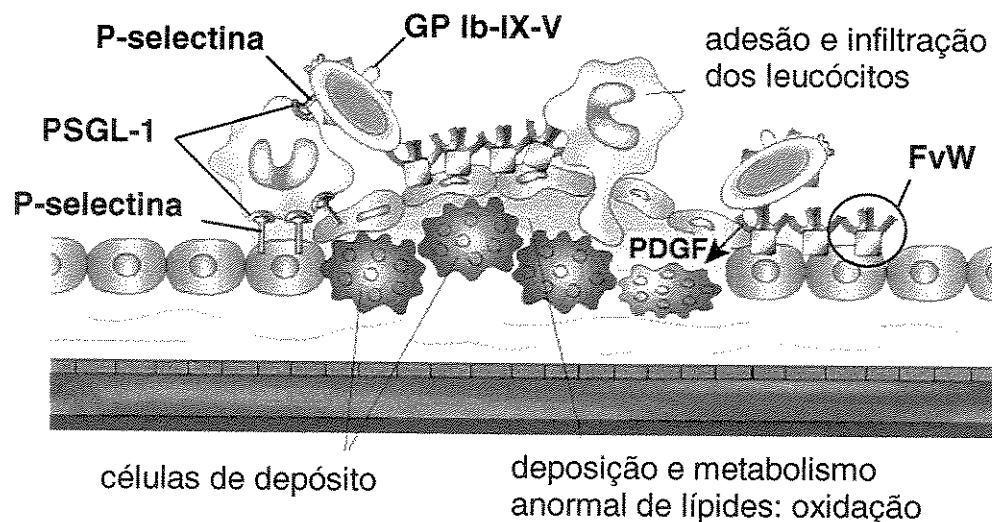


Figura 11. Modelo da participação das plaquetas na formação da placa aterosclerótica. As células endoteliais anormais, passam a expressar substratos específicos de adesão (P-selectina e FvW), levando a adesão plaquetária local. As plaquetas ativadas também passam a expressar P-selectina em sua superfície e os leucócitos circulantes são atraídos para o local e irão aderir às plaquetas e células endoteliais através da conexão entre P-selectina e o receptor na membrana do leucócito, a PSGL-1 (receptor leucocitário 1 para a P-selectina). Esta ligação acaba facilitando a migração dos leucócitos para o interior da matriz subendotelial e dos tecidos. As plaquetas ativadas, também liberam substâncias como o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), o que estimula o crescimento da placa aterosclerótica e influencia no metabolismo das lipoproteínas, favorecendo a formação das células de gordura. Retirado de Ruggeri, 2002 (RUGGERI, 2002).

Estudos recentes evidenciaram a importância do complexo GP Ib-IX-V na fisiopatologia da lesão aterosclerótica. Massberg e cols. (2002), utilizando camundongos deficientes de ApoE (ApoE^{-/-}), os quais precocemente desenvolvem lesões ateromatosas, demonstraram através do bloqueio dos sítios de ligação da GP Ib α com anticorpos monoclonais (anti-GP Ib α), uma redução de ~35% da lesão ateromatosa na porção superior da aorta e de ~63% nas coronárias destes animais, quando comparados a animais ApoE^{-/-} sem uso de anti-GP Ib α . Nos animais onde a GP Ib α havia sido bloqueada, foi possível observar ainda uma redução de 75% da adesão dos leucócitos ao subendotélio vascular, sugerindo que a redução na lesão aterosclerótica está relacionada com o mecanismo de interação entre as plaquetas e os leucócitos (MASSBERG et al., 2002). Isto evidencia que as plaquetas, particularmente a GP Ib α , têm importante participação na formação da lesão aterosclerótica. Portanto, o bloqueio funcional da GP Ib α pode servir de estratégia no desenvolvimento de uma nova terapêutica antiesclerótica.

1.9. O complexo GP Ib-IX-IV e doenças arteriais oclusivas (DAO)

Com o reconhecimento da participação das plaquetas e particularmente dos receptores de membrana plaquetária, no desenvolvimento da aterosclerose e DAO, houve o interesse entre vários estudos de correlacionar a presença de determinados polimorfismos, freqüentes nos genes que codificam estes receptores e a predisposição para o desenvolvimento de doença arterial, sobretudo a coronariana oclusiva (DCO).

Particularmente os polimorfismos presentes no gene da GP Ib α , entre eles o HPA-2 (Tre145→Met), polimorfismo VNTR e mais recentemente o dimorfismo Kozak (-5C),

sugeriram uma correlação entre os diferentes alelos da GP Ib α e DAO, embora esta relação não tenha sido totalmente esclarecida. O anexo 2 traz um resumo dos estudos previamente publicados, que correlacionam estes polimorfismos e DAO.

De fato como descrito anteriormente, foi possível demonstrar em estudos prévios, que a presença destes polimorfismos estão relacionados à alteração na expressão das GP ou mesmo na capacidade de adesividade plaquetária. Assim, a presença do alelo -5C na sequência Kozak está relacionada ao aumento da expressão da GP Ib α na membrana plaquetária (AFSHAR-KHARGHAN et al., 1999; CADROY et al., 2001; JILMA-STOHLAWETZ et al., 2003).

Ao correlacionar os diferentes alelos do VNTR da GP Ib α com DAO, os primeiros estudos, sugeriam que a presença dos alelos VNTR-A e -B, com 4 e 3 repetições de 39 pb, respectivamente, estariam relacionados ao maior risco de doença coronariana oclusiva (MURATA et al., 1997) e doença cerebrovascular oclusiva (GONZALEZ-CONEJERO et al., 1998). No entanto, outros estudos que se seguiram não evidenciaram esta correlação (BAKER et al., 2001; DOUGLAS et al., 2002; MERCIER et al., 2000) e de fato nenhuma avaliação da possível diferença fenotípica, funcional ou na expressão da GP Ib α , entre as variantes do VNTR, justificavam esta associação. Posteriormente, Kenny e cols. (KENNY et al., 2002), observaram que o alelo VNTR-D era mais freqüente entre indivíduos com angina instável que sofreram IAM, que aqueles que apresentavam angina instável, mas sem registro de episódio prévio de IAM. Mais recente, Afshar-Kharghana e cols. (AFSHAR-KHARGHAN et al., 2004) observaram que a presença dos genótipos VNTR-BB ou BC, assim como dos genótipos VNTR-CD e DD era mais freqüente entre negros americanos com doença coronariana, sugerindo que o genótipo

VNTR-CC nestes indivíduos levaria a um efeito protetor para DCO.

Outro polimorfismo da GP Ib α foi também avaliado em diversos estudos, entre indivíduos que apresentavam doença arterial oclusiva. A presença do alelo -5C Kozak, o qual está relacionado com o aumento da expressão da GP Ib α na membrana plaquetária, foi mais freqüente entre indivíduos com doença cerebrovascular oclusiva (BAKER et al., 2001; HSIEH et al., 2004; SONODA et al., 2001) e doença coronariana oclusiva (KENNY et al., 2002). No entanto novamente isto não foi comprovado por outros estudos (CORRAL et al., 2000; CROFT et al., 2000; FRANK et al., 2001; ISHIDA et al., 2000; MEISEL et al., 2001; SANTOSO et al., 2002) e de fato, um dos estudos observou um resultado inesperado de menor freqüência do alelo -5C entre indivíduos com antecedente de IAH (DOUGLAS et al., 2002).

Poucos estudos buscaram correlacionar o polimorfismo HPA-2 e doença arterial oclusiva (BAKER et al., 2001; MURATA et al., 1997) e em apenas um deles o alelo HPA-2b foi mais freqüente entre indivíduos com doença coronariana oclusiva (SONODA et al., 2000).

1.10. O complexo GP Ib-IX-IV e alterações não hemostáticas

Uma das grandes dificuldades enfrentadas pela medicina transfusional está relacionada à falta de estoques e ao alto custo da transfusão de plaquetas. Em contraste aos demais hemocomponentes, as plaquetas coletadas têm validade limitada, de no máximo cinco dias, para serem transfundidas. Isto ocorre devido ao tipo de armazenamento das plaquetas, que são mantidas à temperatura ambiente, o que facilita a contaminação por bactérias e compromete sua atividade hemostática. No entanto, tentativas anteriores (

estocagem das plaquetas em baixas temperaturas, mostraram que este método não é eficaz, devido o rápido clearance das plaquetas logo após terem sido transfundidas, apesar destas plaquetas preservarem sua atividade hemostática.

Recentemente, Hoffmeister e cols. (HOFFMEISTER et al., 2003) descreveram o mecanismo pelo qual as plaquetas após serem refrigeradas têm meia-vida curta na circulação. As plaquetas refrigeradas, ao serem transfundidas expressam aglomerados da subunidade GP Ib α , que são reconhecidos pela integrina Mac-1 dos macrófagos hepáticos (células de Kupffer). Anteriormente acreditava-se que a causa do aumento do clearance das plaquetas refrigeradas na circulação era decorrente de alterações em sua forma discóide achatada, pelo aumento da concentração de Ca⁺² citoplasmático e rearranjo dos filamentos de actina, tornando-as arredondadas. No entanto, Hoffmeister e cols. (2003), ao evitar estes eventos, utilizando quelantes de Ca⁺² permeáveis à membrana e evitando a alteração dos filamentos de actina, mantendo assim a forma discóide das plaquetas refrigeradas, observou que mesmo assim elas eram rapidamente eliminadas da circulação quando transfundidas. No entanto, ao transfundir as plaquetas previamente refrigeradas em camundongos deficientes de Mac-1, a meia vida das mesmas era preservada. O mesmo aconteceu, quando as plaquetas refrigeradas, foram tratadas com uma metaloproteinase, que causa a remoção proteolítica de parte da GP Ib α . É provável que estas plaquetas ao serem submetidas a baixas temperaturas, sofram alterações, formando os aglomerados de GP Ib α que são reconhecidos pelas integrinas Mac-1, mantendo, no entanto sua capacidade de ligação ao FvW intacta (figura 12). Interessante notar, que as mesmas alterações foram observadas *in vivo*. Neste mesmo estudo, foi visto que camundongos ao serem mantidos a 4°C por 2 horas, apresentavam

diminuição do número de plaquetas circulantes, em relação aos animais mantidos a temperatura ambiente. Portanto, é provável que o aumento do clearance das plaquetas, após serem submetidas a baixas temperaturas, seja um mecanismo fisiológico. Uma explicação proposta pelo autor que pudesse justificar um ganho com este mecanismo, é que o mesmo evitaria que um organismo ao ser submetido a baixas temperaturas, situação em que há lentificação da circulação, tivesse o aumento do risco de trombose, sobretudo coronariana e cerebral, que poderiam ser letais.

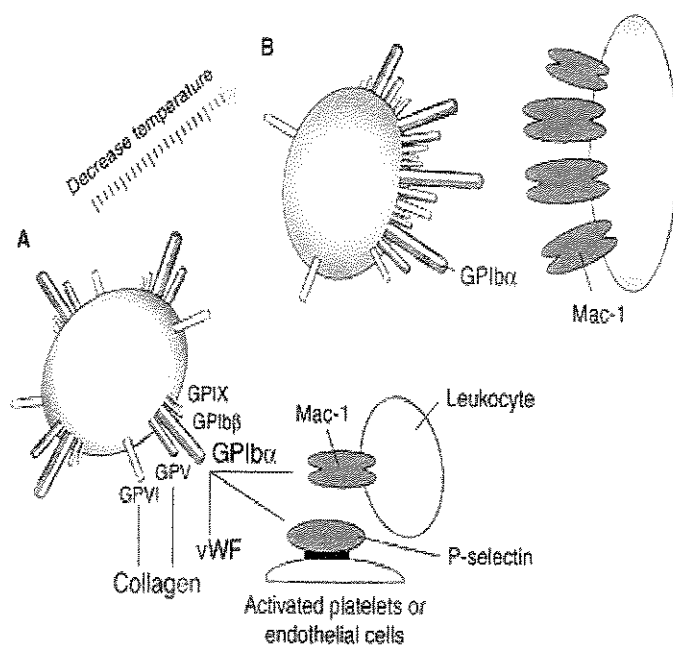


Figura 12. Alterações das plaquetas ao serem submetidas a baixas temperaturas. A. A GPIIb/IIIa possui sítios de ligação para o FvW, P-selectina (exposta na membrana das plaquetas ativadas e das células endoteliais) e para as integrinas Mac-1, da membrana dos leucócitos. B. Ao serem submetidas a baixas temperaturas, estas plaquetas formam aglomerados da GPIIb/IIIa tornando-as mais sensíveis ao reconhecimento de Mac-1, sobretudo na superfície das células de Kupffer, no fígado. Com isso há aumento do clearance das plaquetas que foram submetidas a temperaturas baixas. Retirado de (ANDREWS e BERNDT, 2003).

Estes achados trazem uma nova perspectiva para o desenvolvimento tecnológico de métodos que possibilitem a conservação de plaquetas por maior tempo, diminuindo os gastos com descarte de plaquetas não transfundidas e melhorando a disponibilidade das mesmas.

Em resumo, as plaquetas estão associadas não só a atividades hemostáticas, mas participam também da resposta inflamatória. O comprometimento funcional plaquetário

relaciona-se à ocorrência de patologias hemorrágicas, às trombopatias e em outro extremo, ao maior risco para desenvolvimento de aterosclerose e doença arterial oclusiva. As plaquetas possuem complexos glicoproteicos transmembrana que atuam, sobretudo como receptores. Entre eles o complexo GP Ib-IX-V, possui os sítios de ligação para FvW, trombina, P-selectina e integrinas (Mac-1), situados na subunidade GP Ib α , ligações essenciais para a adesão, inter-relação com a coagulação, agregação e atividade inflamatória plaquetária, respectivamente. Alterações na GP Ib-IX-V, com perda da sua capacidade hemostática, estão relacionadas ao desenvolvimento de trombopatias, como da SBS e a doença de von Willebrand tipo plaquetário. Por outro lado, polimorfismos na GP Ib α , têm sido relacionados à antigenicidade plaquetária e ao risco de doença arterial oclusiva, como é o caso do infarto agudo do miocárdio. O estudo e identificação das alterações na GP Ib α , têm sido essenciais para o seu conhecimento funcional e estrutural, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antiagregantes, nos casos de doença arterial, assim como terapia gênica para SBS.

Neste estudo, realizado pela primeira vez em nossa população, avaliamos a participação do complexo GP Ib-IX-V, sobretudo da subunidade GP Ib α , em duas situações distintas: na perda de sua função, avaliando pacientes com diagnóstico de SBS e no ganho de função, correlacionando os polimorfismos presentes na GP Ib α e risco de doença coronariana oclusiva. Além disto foi proposto neste estudo um novo modelo evolutivo para o aparecimento destes polimorfismos na GP Ib α .

II. Objetivos

II. Objetivos

Do exposto anteriormente são objetivos deste estudo:

1. Investigação molecular com análise dos genes do complexo GP Ib(α e β)-IX-V, entre pacientes com diagnóstico de SBS atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp.
2. Determinação da frequência gênica e de haplótipos dos três principais polimorfismos presentes no gene da GP Ib α , em três grupos étnicos distintos, que compõem a população brasileira.
3. Determinação da frequência gênica e de haplótipos dos três principais polimorfismos presentes no gene da GP Ib α , entre indivíduos após infarto agudo do miocárdio e grupo controle (estudo caso-controle).

III. Casuística

3. Casuística

Neste projeto foram realizados três estudos que envolveram: (1) indivíduos com SBS, (2) indivíduos da população geral, representantes de distintos grupos étnicos, e (3) indivíduos com IAM e grupo controle. Limitado número de primatas não-humanos tais como chimpanzé e gorilas foram incluídos neste estudo.

3.1. Síndrome de Bernard-Soulier

Durante a investigação clínico-laboratorial de pacientes com distúrbios hemorrágicos encaminhados ao Ambulatório de Hemostasia da UNICAMP foram identificados três pacientes, não relacionados, em que o conjunto de dados clínicos e laboratoriais permitiu o diagnóstico de SBS.

O diagnóstico foi baseado nos seguintes dados:

- a) História de sangramentos cutâneo-mucosos de recorrência;
- b) Diminuição do número total de plaquetas na presença de plaquetas gigantes na avaliação da lâmina do esfregaço do sangue periférico.
- c) Anormalidades nos testes funcionais plaquetários, incluindo:
 - Prolongamento do tempo de sangramento pelo método de Ivy;
 - Resposta reduzida ou ausente da agregação plaquetária induzida pela ristocetina (*ristocetin-induced platelet aggregation -RIPA*);
 - Resposta normal da agregação plaquetária induzida por adrenalina; adenosinadifosfato ou ADP e colágeno;

d) Determinação da deficiência isolada das glicoproteínas do complexo GP Ib-IX-V da membrana plaquetária pela técnica de citometria de fluxo, utilizando marcadores monoclonais para: GP Ib α (CD42b); GP IX (CD42a); GP IIb (CD41) e GP IIIa (CD61).

3.2. Grupos Étnicos

A análise da frequência gênica dos polimorfismos da GP Ib α foi inicialmente realizada em 492 indivíduos que representam três grupos étnicos distintos: caucasóide, descendentes de africanos (negróides) e indígenas. Os indivíduos de cada grupo foram selecionados em três regiões distintas do país. Os descendentes de caucasóides ou negróides são provenientes de famílias sem miscigenação de raças até no mínimo a terceira geração de cada indivíduo. Os grupos étnicos foram formados por:

- *Caucasóides*: 280 indivíduos não relacionados (143 masculinos : 137 femininos), com idade entre 18 a 68 anos (média de idade: 40,7 anos). Este grupo foi composto por doadores de sangue, técnicos de laboratório, estudantes de medicina e médicos da região de Campinas. Esses indivíduos possuíam ascendência européia, em sua maioria proveniente da Itália, Espanha, Portugal, Áustria e Alemanha.
- *Negróides*: 145 indivíduos não relacionados (79 masculinos : 66 femininos), com idade entre 12 a 72 anos (média de idade: 42 anos). Este grupo foi composto por estudantes, técnicos de laboratório e médicos da Universidade Federal da Bahia, cidade de Salvador-BA. As amostras de DNA foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra Marilda de Souza Gonçalves. Esta população de ascendência africana foi formada por indivíduos negros que inicialmente foram selecionados como

participantes de estudos da caracterização molecular dos haplótipos do gene da globina β .

- *Indígenas*: 67 índios da tribo Parakanã que pertencem à raça Tupi (33 masculinos : 34 femininos), com idade entre 13 a 70 anos (média de idade: 34,4 anos). Estes índios habitam duas regiões distintas da Amazônia Oriental e compõem um grupo racial indígena onde não é observada a miscigenação com outros grupos étnicos (BLACK FL, 1980). Mesmo tendo sido excluídas amostras de familiares de primeiro grau, esse grupo ainda contém indivíduos que provavelmente possam ser relacionados devido ao freqüente casamento entres familiares de primeiro grau. As amostras de sangue deste grupo foram coletadas durante campanhas de imunização para hepatite viral e cedidas gentilmente pelos Dr. Raimundo C. Menezes e Dr. Manoel Soares do Instituto Evandro Chagas, Belém-PA.

3.3. Estudo caso-controle do risco para o infarto do miocárdio em função dos polimorfismos da GP Iba

Neste estudo caso-controle, foram avaliados 350 pacientes com diagnóstico confirmado de infarto agudo do miocárdio (IAM), que foram divididos em dois grupos, de acordo com a história clínica destes indivíduos.

No **grupo 1**, foram incluídos 170 pacientes atendidos na unidade coronariana do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (INCOR), no período entre julho de 1997 a março de 1998. Este grupo incluiu 120 homens e 50 mulheres, com idade entre 29 a 79 anos (média de idade: $54 \pm 10,8$ anos). Isto representa 47% do total de pacientes atendidos no serviço com clínica de dor precordial, cujo diagnóstico inicial foi IAM. Nesta

seleção foram considerados apenas os pacientes não relacionados, com diagnóstico confirmado do primeiro episódio de IAM, ou seja, sem antecedente de episódio prévio de IAM.

No **grupo 2**, foram avaliados 180 pacientes encaminhados pelo ambulatório de cardiologia clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP. O período de recrutamento durou de janeiro de 1994 a dezembro de 1995 e representou 91% dos pacientes convidados. O grupo de pacientes com antecedente prévio de IAM incluiu 103 homens e 77 mulheres e com idade entre 22 a 85 anos (média de idade: $54 \pm 13,5$ anos). Todos os pacientes tiveram o diagnóstico objetivo de pelo menos um episódio de IAM, sendo o último episódio documentado há no mínimo 6 meses do momento de inclusão no estudo. A mortalidade relacionada a um episódio de IAM é maior até os primeiros 28 dias (ROSAMOND et al., 1998), o que pode variar de acordo com acesso a atendimento médico e tratamento empregado, sexo, idade e presença de comorbidades. Este índice tende a cair nos meses subsequentes, motivo pelo qual consideramos neste grupo apenas pacientes que haviam “sobrevivido” a episódio prévio de IAM.

O grupo controle foi constituído de 350 indivíduos não relacionados, que foram aleatoriamente pareados ao grupo de pacientes de acordo com idade, sexo, raça. O grupo controle foi constituído por doadores de sangue, funcionários, estudantes e médicos do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

3.3.1 Caracterização clínica dos pacientes e controles

Uma história clínica completa, com ênfase no histórico pessoal e familiar para doença cardiovascular, foi obtida de cada indivíduo incluído no estudo. Os indivíduos

selecionados para controle foram incluídos somente na ausência de história clínica de doença cardiovascular isquêmica.

Entre os dados clínicos e laboratoriais considerados durante a seleção dos pacientes e controles foram considerados:

- História familiar para doença cardiovascular isquêmica, quando um membro da família com até dois graus de parentesco, apresentou doença isquêmica coronariana, doença arterial isquêmica periférica ou acidente vascular cerebral isquêmico.
- Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida como pressão arterial sistólica ≥ 140 mm Hg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mm Hg, ou em uso contínuo de medicação anti-hipertensiva.
- Histórico de tabagismo pregresso ou no momento de sua inclusão, considerando o hábito de fumar no mínimo cinco cigarros por dia por período superior a seis meses.
- Índice de massa corporal (IMC), avaliado pela fórmula: $\text{peso (kg)} / \text{altura (m)}^2$
- Amostras de sangue foram coletadas para quantificação do nível sérico de colesterol total e triglicérides, sendo definido como hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia, quando nível de colesterol total ≥ 220 mg/dl e/ou triglicérides ≥ 150 mg/dl ou quando o indivíduo estava sob tratamento específico.
- Diabetes mellitus foi definida conforme os critérios diagnósticos definidos pela Organização Mundial da Saúde (ALBERTI e ZIMMET, 1998).

3.3.2. Diagnóstico do infarto agudo do miocárdio

O diagnóstico de IAM foi baseado na presença de pelo menos dois dos seguintes critérios:

- a) dor precordial típica por período maior que 20 minutos;
- b) alterações típicas ao eletrocardiograma: supradesnivelamento do segmento ST $\geq$ 1 mm em pelo menos duas derivações frontais ou $\geq$ 2 mm em pelo menos duas derivações precordiais no eletrocardiograma de repouso.
- c) elevação no nível sérico da enzima creatinina fosfoquinase fração MB (CKMB) $\geq$ 25 IU
- d) aparecimento de novas ondas Q ao eletrocardiograma em repouso.

3.3.3. Avaliação da extensão da doença coronariana oclusiva (DCO)

O exame angiográfico da circulação coronariana foi realizado em 287 pacientes (82% do total de pacientes incluídos no estudo). Nos vasos coronarianos em que foi observada redução de no mínimo 50% de sua luz, foram considerados acometidos por doença vascular oclusiva.

3.4. Primatas não humanos

A caracterização de seqüências polimórficas do gene da GP I β de primatas não humanos foi comparada com dados obtidos com as diversas amostras de humanos. O DNA genômico de duas diferentes espécies de primatas não humanos, *Gorilla gorilla* (NG05251) e *Pan troglodytes* ou chimpanzé (NG06939) foram obtidas do *National Institute on Aging (NIA - Aging Cell Culture Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, EUA)*.

IV. Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Extração de DNA genômico

Foram coletados 5 a 10 ml de sangue periférico em frasco estéril, contendo solução com 10% de EDTA (sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético). Após centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos os eritrócitos foram lisados com uma mistura das soluções de cloreto de amônio NH_4Cl 0,144 M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio NH_4HCO_3 0,01 M (0,5 vez o volume de células), formando assim o precipitado com leucócitos. Para a lise dos leucócitos foi usada a solução de TKM I (Tris-HCl 10mM pH 7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20 mM) e posteriormente foi adicionado 200µl de Triton X-100 (Sigma Chemical, CO, Steinheim, Alemanha), esse procedimento foi repetido duas vezes. Adicionou-se então, ao precipitado 400 µl da solução TKM II (Tris-HCl 10mM pH 7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20 mM) e 25 µl de SDS 10 % (dodecil sulfato de sódio) e a mistura foi incubada a 55°C por 30 minutos.

A precipitação do DNA foi realizada pela incubação de 180 µl de NaCl 5 M a temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a fase aquosa foi transferida para novo tubo contendo a mistura composta por fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, em uma proporção de 25:24:1 (volume/volume) e o procedimento foi repetido por duas vezes. A seguir uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionada (volume/volume) repetindo-se a centrifugação e finalmente a precipitação do DNA foi realizada pela adição de acetato de sódio 3 M pH 5,3 (10% volume) e etanol absoluto gelado (3 vezes o volume). O DNA foi solubilizado em solução de Tris 10 mM pH 8,0 : EDTA 0,1 mM pH 7,4 ou em água desionizada e estéril.

concentração e pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro à partir dos valores de densidade ótica nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm.

4.2. Amplificação de Sequências Gênicas Específicas

As regiões gênicas de interesse foram amplificadas a partir de amostras do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI et al., 1988) utilizando-se os diversos oligonucleotídeos sintéticos descritos na tabela 1.

As reações foram realizadas num volume final de 30 µl contendo: ~0,5 µg de DNA genômico; 1,0 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); tampão da enzima polimerase (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl); 400ng de cada oligonucleotídeo (tabela 1) e 2 U de Taq DNA polimerase. As reações foram incubadas a 94°C durante 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA seguida de 35 ciclos de 94°C (1 minuto), temperatura de anelamento (1 minuto) (veja tabela 1) e 72°C (1 minuto). Após esses ciclos, para finalização da extensão, incubou-se por 7 minutos a 72°C. Para a realização das reações foi utilizado um ciclador automático de temperatura (PTC-100® Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc.).

4.3. Determinação de nucleotídeos polimórficos do gene da GP Ib α

Foram pesquisados três polimorfismos previamente identificados na região promotora ou codificadora do gene da GP Ib α . As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos sintéticos descritos na tabela 1.

4.3.1. Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)

A identificação dos VNTRs da GP Ib α foi realizada em duas reações independentes em que o tamanho do produto do PCR permite a distinção entre os diversos alelos. A primeira reação utilizou os oligonucleotídeos denominados VNTR-F2 e VNTR-B4 e a segunda reação utilizou os oligonucleotídeos VNTR-F3 e B4, conforme descrito previamente (GONZALEZ-CONEJERO et al., 1998). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% e então visualizados sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

4.3.2. Polimorfismo do sistema HPA-2

A identificação do polimorfismo HPA-2 da GP Ib α foi realizada conforme descrito anteriormente por Castro e cols. (CASTRO et al., 1999). Para a determinação da presença dos alelos HPA-2a ou 2b, o produto de PCR obtido foi submetido à digestão utilizando a enzima de restrição *Bsa* HI (New England Biolabs, Beverly, MA).

4.3.3. Polimorfismo da posição -5 da sequência Kozak

A identificação do polimorfismo Kozak -5/C do gene GP Ib α foi realizada conforme descrito anteriormente por Ishida e cols. (ISHIDA et al., 2000). Para a determinação da presença dos alelos T ou C, o produto de PCR obtido foi submetido à digestão, utilizando a enzima de restrição *Ava* II (MBI Fermentas, Lituania).

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na análise do gene da glicoproteína Iba

	Oligonucleotídeos	Posição *	Produto	Temperatura de anelamento	Referência**
Iba 1-S	5'-TCC ACT CAA GGC TCC CTT GC-3'	3037-3055	595 pb	60°C	Noda et al., 1995
Iba 1-AS	5'-GGG CTC CTG AAT GGG CTG GA-3'	3612-3631			
Iba 2-S	5'-CAA CAA CTT GAC TGA GCT CC-3'	3586-3606	560 pb	58°C	Noda et al., 1995
Iba 2-AS	5'-CCA CAT TCC CAC CTA GAT GGA-3'	4126-4146			
Iba 3-S	5'-ATT CTA CTC ATG GTC CAC TG-3'	4043-4062	557 pb	60°C	Noda et al., 1995
Iba 3-AS	5'-CCT GGG CTT CTA TGT CTT GG-3'	4580-4599			
Iba 4-S	5'-TTC TCC ACC CCG ACT TTT GC-3'	4549-4568	454 pb	60°C	Noda et al., 1995
Iba 4-AS	5'-CTG TGG GCT CTC CTA TTG GGA-3'	4983-5002			
Polimorfismos					
Kozak-S	5'-AGA AGA GAG AAG GAC GGA GTC GAG-3'	2757-2780	467 pb	58°C	Ishida et al., 2000
Kozak-AS	5'-AGG ATG GTT GTG TCT TTC GGC-3'	3203-3223			
HPA2-S	5'-GGA CCC TGG ATC TAT CCC ACA A-3'	3355-3376	437 pb	57° C	Castro et al., 1999
HPA2-AS	5'-TTC AGC ATT GTC CTG CAG C-3'	3773-3791			
VNTR-F2	5'-CTT GGT GAT GAA GGT GAC ACA GAC-3'	3915-3938	446 (alelo E) a	58°C	Gonzalez-Conejero et al., 1998
VNTR-B4	5'-GCT TGT GGC AGA CAC CAG GAT GG-3'	4378-4400	602 (alelo A)		
VNTR-F3	5'-CAC TAC TGA ACC AAC CCC A -3'	4202-4223	159 (alelo E) a	60° C	Gonzalez-Conejero et al., 1998
VNTR-B4	5'- GCT TGT GGC AGA CAC CAG GAT GG -3'	4378-4400	315 (alelo A)		

*número de nucleotídeo de acordo com Wenger e cols. (WENGER et al., 1988) (GenBank M22403).

** (NODA et al., 1995); (ISHIDA et al., 2000); (CASTRO et al., 1999); (GONZALEZ-CONEJERO et al., 1998)

4.4. Clonagem dos produtos do PCR

Os vários produtos do PCR foram clonados de acordo com instruções do sistema de vetor pMOS Blue T[®] (Amershan Life Science). Para cada produto do PCR a ser clonado, foi preparada uma reação de ligação contendo: 1 µl do tampão de ligase (Tris-HCl 100 mM pH 8,8; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM, triton 1%); 0,5µl de ATP 10 mM; 1 µl de vetor a 50 ng/µl de T4 DNA ligase; 2 µl do produto do PCR a ser clonado e água livre de nuclease para completar o volume para 10 µl. A reação foi homogeneizada e incubada a 16°C por 12-16 horas. O produto dessa reação foi incubado por 30 minutos no gelo com 20 µl de células competentes DH5α seguido da incubação a 42°C por 2 minutos. Posteriormente o produto da ligação foi adicionado a 80 µl de meio SOC a temperatura ambiente, seguida de incubação sob agitação por 3 horas a 250 rpm e em seguida dividida em várias placas de cultura incubadas a 37°C por 16-18 horas. Placas estéreis de Petri contendo 20 µl de IPTG (isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo) a 100 mM e 35 µl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-galactosídeo) 50 mg/ml por placa permitem a detecção direta e rápida de colônias em que o inserto de interesse foi eficientemente clonado. O vetor pMOS Blue permite uma triagem através de colônias brancas (recombinantes) e azuis. As colônias brancas obtidas foram retiradas e colocadas em 5 ml de meio líquido LB contendo os antibióticos ampicilina (50 µg/ml) e tetraciclina (15 µg/ml). Os tubos foram mantidos sob agitação intensa a 37 °C. Após o crescimento das colônias bacterianas as células foram precipitadas por centrifugação e incubadas com 100 µl de uma solução de glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM seguida da adição de 200 µl da solução (NaOH 0,2N, SDS 1%) que foi então incubada por 5 minutos em banho de gelo. Após esse período foram adicionados 150 µl de solução III (acetato de potássio pH 4,8). A

solução final foi então centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Para a obtenção do DNA, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e em seguida adicionado 250 µl de fenol saturado e 250 µl de álcool isoamílico, mantendo-os sob agitação vigorosa por 1 minuto, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. Ao sobrenadante acrescentou-se 5 ml de clorofórmio/álcool isomílico mantendo-se sob agitação vigorosa por 1 minuto e centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. Ao sobrenadante foi acrescentado 800 µl de etanol absoluto gelado e 40 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2. As amostras foram mantidas em freezer -80°C por 2 horas. Após este período foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado, enquanto que o precipitado foi diluído em água estéril. Foi adicionado à preparação de plasmídeo 2 µl de RNASE T1 (*Aspergillus oryzae*) e incubadas a 37°C por 12-16 horas. Os plasmídeos recombinantes foram identificados pela amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos do plasmídeo (T7 e U19).

4.5. Purificação do DNA para seqüenciamento direto

O produto final da reação do PCR contém a seqüência gênica de interesse assim como os oligonucleotídeos sintéticos e DNTPs que podem interferir com a qualidade da reação de seqüenciamento. Para a realização da remoção dos oligonucleotídeos remanescentes foi utilizado o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire - Inglaterra), de acordo com recomendações do fabricante.

4.6. Identificação das seqüências nucleotídeas nos genes do complexo Ib-IX-V

A caracterização molecular da deficiência do complexo GP Ib-IX-V na superfície plaquetária de indivíduos com síndrome de Bernard-Soulier, assim como a de alelos raros do VNTR da GP Ib α foram realizadas pelo seqüenciamento direto do DNA. O seqüenciamento do DNA requer uma população homogênea de fragmentos de DNA que são usualmente clonados em um vetor plasmídeo ou *phage*.

A reação de seqüenciamento é uma reação enzimática que utiliza a DNA polimerase e terminadores específicos de cadeias de DNA e recentemente foi adaptada para métodos automáticos. Durante a realização desse estudo, esses dois métodos de seqüenciamento foram aplicados. Os oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) utilizados estão descritos na tabela 1 (gene GP Ib α) e tabela 2 (genes GP Ib β e GP IX).

No método manual descrito por Sanger e cols. utiliza-se a DNA polimerase para sintetizar a cópia complementar de uma cadeia simples do DNA a ser seqüenciado. A DNA polimerase não tem a capacidade de iniciar a síntese do DNA, mas sim o alongamento a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo idêntico à região a ser seqüenciada que se anela ao grupo fosfato localizado na extremidade 5' do deoxinucleotídeo (DNTP). Esse método é baseado na propriedade da DNA polimerase em usar 2'-3'-dideoxynucleosídeo trifosfato (ddNTP) como substrato. Quando o ddNTP é incorporado à cadeia de oligonucleotídeo sintetizada à partir da amostra de DNA a ser seqüenciada, o alongamento da cadeia é interrompido nas posições G,A,T,C porque a cadeia de DNA perde o grupo hidroxila da extremidade 3'.

Para determinar a especificidade de cada uma das bases, o produto a ser seqüenciado (produto do PCR e mistura de quantidade idêntica de DNTP), é dividido em quatro reações

separadas, cada uma contendo apenas um ddNTP e a DNA polimerase. A relação entre dNTP-ddNTP é ajustada para permitir o alongamento da síntese do DNA complementar até a incorporação do ddNTP pela DNA polimerase.

A DNA polimerase começa então a incorporar o nucleotídeo complementar à extremidade 3' do oligonucleotídeo anelado a região do DNA a ser seqüenciado. Como a quantidade de ddNTP é habitualmente mínima, a incorporação do ddNTP ocorre ocasionalmente, o que permite que vários fragmentos de DNA de diversos tamanhos sejam formados a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo. Cada tubo contém cadeias de DNA sintetizadas de tamanhos distintos na dependência do ddNTP adicionado, por exemplo, no tubo contendo o ddATP, todas as cópias complementares do DNA foram interrompidas quando a base T estava presente na amostra de DNA template. Como todas as reações são realizadas simultaneamente e contém o mesmo oligonucleotídeo sintético complementar ao DNA template fixo pelo anelamento na extremidade 5', somente a variação da extremidade 3' determina os diferentes produtos de reação.

Os produtos dos quatro tubos de reações de seqüenciamento do DNA recém sintetizados são aplicados em gel de poliacrilamida que permite a separação eletroforética do DNA de acordo com o comprimento da seqüência nucleotídica. Após a eletroforese o gel é então seco e exposto ao filme de raio-X para a auto-radiografia. As seqüências mais curtas incorporaram os nucleotídeos próximos dos oligonucleotídeos e assim migram mais rapidamente, como todas as bandas foram sintetizadas a partir do mesmo DNA template, ao final a leitura do gel revela a seqüência complementar ao DNA original.

O princípio do seqüenciamento automático é basicamente idêntico ao manual. A principal diferença é que os oligonucleotídeos adicionados a cada um dos quatro tubos do DNA template estão marcados com quatro compostos fluorescentes distintos para cada base A,T,C,G e não com um composto radioativo comum a todos os tubos como no método manual. A síntese do DNA ocorre com a adição dos ddNTP, como descrito acima, mas os conteúdos de todos os quatro tubos são então misturados em um único *pool*. Durante a eletroforese, as diversas cadeias de DNA passam pela fonte de laser localizada na base do gel, que então excita o composto fluorescente. A luz emitida é então detectada por um fotomultiplicador que determina simultaneamente cada um dos diferentes compostos fluorescentes. Essas informações são depositadas automaticamente no computador, o qual mostra as várias bases detectadas pelo laser pela formação de picos de excitação coloridos. As vantagens desse método comparado ao manual consistem em não necessitar de radionucleotídeos, de gel de poliacrilamida e da observação contínua do tempo de eletroforese além da necessidade de exposição imediata do gel para posterior leitura da seqüência.

4.6.1. Seqüenciamento manual

Neste experimento a marcação radioativa ocorre na extremidade 3' da cadeia de alongamento do DNA devido à incorporação de ddNTP marcado com ^{33}P . Dessa forma, a DNA polimerase incorporando eficientemente os ddNTP- ^{33}P resultará na necessidade de quantidades menores de radioisótopos.

Em tubos denominados: G, A, T, C, foram colocados 2 μl do nucleotídeo *master mix* (dITP) e 0,5 μl de ddNTP (G, A, T, C) marcado com ^{33}P (Amersham Pharmacia) de

acordo com as instruções do fabricante. Em outro tubo colocou-se 1 µl do PCR purificado, 2 µl do tampão da reação (Tris-HCl 260 mM, pH 9,5; MgCl₂ 65 mM), 1 µl do oligonucleotídeo complementar da região a ser seqüenciada, 2 µl da enzima *Thermo Sequenase DNA polimerase* e água para 17,5µl. Foram transferidos para cada tubo com dideoxinucleotídeo (G, A, T, C) 4 µl dessa mistura, homogeneizando-se com os 2,5 µl da mistura de terminação. As reações foram colocadas em ciclador automático de temperatura e submetidas a uma pré-desnaturação de 5 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos: 94°C (30 segundos); 56-60°C (30 segundos) e 72°C (1 min). A reação foi interrompida pela adição de 4 µl da solução de 95% formamida; 20 Mm EDTA; 0,05% bromofenol blue; 0,05% xilenocianol. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida 5,7g; bisacrilamida 0,3g; uréia 50g; taurina 8 vezes) em placa de 35 x 50 cm e 0,4 mm de espessura por 2 a 3 horas a 70 a 90 W. A autoradiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raio-X por aproximadamente 24 a 72 horas.

4.6.2. Seqüenciamento automático

As reações para o seqüenciamento automático foram realizadas utilizando o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para esta reação utilizou-se 20 ng do produto de PCR purificado, 1,6 pMol de oligonucleotídeo *sense* e *antisense* (em reações separadas), 1,5 µl da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *Big Dye* e água destilada estéril (volume final 10 µl). Em ciclador automático de temperatura (PTC-100® Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc.), as amostras foram

submetidas à desnaturação inicial 96°C (1 minuto) e 30 ciclos: 96°C (10 segundos); 57°C (5 segundos); 60°C (4 minutos). O produto da reação de seqüenciamento foi então submetido à purificação com 2 µl de acetato de amônio 7,5 M e 50 µl de etanol absoluto foram adicionados aos 10 µl da reação e posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 7 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para secagem dos poços. O produto da purificação foi armazenado a – 20°C, protegido da luz com papel alumínio até a eletroforese. Para a eletroforese, adicionou-se 2,0 µl de uma mistura de formamida deionizada (Invitrogen); 25 mM EDTA (pH 8,0) com azul dextran (50 mg/ml), na proporção de 5:1 em cada poço. As amostras foram homogeneizadas, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e colocadas em gelo para, a seguir serem aplicadas em gel de poliacrilamida 2 mm de espessura e separados por eletroforese em seqüenciador automático (ABI Prism 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). O gel é composto por 4,5% de acrilamida / bisacrilamida (19:1, volume final 10 ml); 36g de uréia; 1 g de resina Dowex; 10 ml tampão TBE 10 vezes (Tris, ácido bórico EDTA dissódico). Desta solução, utiliza-se 20 ml para a montagem da placa, adicionando-se 130 µl de persulfato de amônio (100 mg/ml) e 13 µl de TEMED. Após 2 horas de polimerização, a placa é limpa e colocada em cassete para a eletroforese. As condições de eletroforese foram: voltagem: 1680 KV; amperagem: 50,0 mA; potência: 150 Watts; temperatura do gel: 50°C; potência do laser: 40,0 mW; tempo de corrida: cerca de 4 horas.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na análise do gene das GP Ib β , IX e V.

Oligonucleotídeos		Posição	Produto	Temperatura de anelamento	Referência§
Glicoproteína Ib β					
Ibb 1-S	5'- ATGTTGGTGA -3'	115-124*	504 pb	60°C	Ludlow et al., 1996
Ibb 1-AS	5'- TGGGCGACATCTCTGAGT -3'	602-619*			
Ibb 2-S	5'-TTACTGCGGCGCTTCCCTTG-3'	641-660*	694 pb	58°C	Kunishima et al., 1997
Ibb 2-AS	5'-GAGTTTGCAGGCCCGTGTTG-3'	1315-1335*			
Ibb 3-S	5'-GCAACAACCTGACGGCGCTG-3'	844-864*	289 pb	60°C	Kunishima et al., 1997
Ibb 3-AS	5'-AAGGCCCAGCAGCGCAAGCT-3'	1113-1133*			
Glicoproteína IX					
GPIX1-S	5'-GCTCCTGCCTCTGGAAATAG-3'	-107 a -88**	214 pb	58°C	Noda et al., 1995
GPIX1-AS	5'-GGAGGCCATGCTGGGTAATA-3'	88 a 107**			
GPIX2-S	5'-TTTCCCAGAGGAGAAGGCTG-3'	806-825**	435 pb	55° C	Noda et al., 1995
GPIX2-AS	5'-GAGGCTGCAGTCACAGTGC-3'	1223-1241**			
GPIX3-S	5'-TCGATGTGACGCAGAACCCC-3'	1200-1220**	377 pb	55° C	Noda et al., 1995
GPIX3-AS	5'-GTTTGGGCTGACCAGGCTTG-3'	1558-1577**			
Glicoproteína V					
GPV1-S	5'-TTCAGTACAGGCGCGAACGC-3'	2361-2380***	734 pb	58°C	Noda et al., 1995
GPV1-AS	5'-AACTGCAGCTCCGTCAGGGC-3'	3076-3095***			
GPV2-S	5'-GGTTGCTTGGAGCACAGGCT-3'	2983-3003***	911 pb	58° C	Noda et al., 1995
GPV2-AS	5'-AGGGGCTTCCGAGGAGCTGT-3'	3875-3894***			
GPV3-S	5'-AACCGCACCCAGCTGCGCAC-3'	3313-3332***	845 pb	55° C	Noda et al., 1995
GPV3-AS	5'-CCTCCGAGCCACATCTGGTCA-3'	4138-4158***			

* número de nucleotídeo de acordo com Yagi e cols. (YAGI et al., 1994) (GenBank AF006988).

** número de nucleotídeo de acordo com Hickey e cols. (HICKEY e ROTH, 1993) (GenBank M80478).

*** número de nucleotídeo de acordo com Lanza e cols. (LANZA et al., 1993) (GenBank Z23091).

§ (LUDLOW et al., 1996); (KUNISHIMA et al., 1997); (NODA et al., 1995).

4.7. Avaliação fenotípica e funcional plaquetária

Entre os indivíduos com síndrome de Bernard Soulier e seus familiares, assim como entre os indivíduos que apresentavam o alelo VNTR-E, foram realizados os seguintes exames para a avaliação fenotípica e funcional plaquetária:

4.7.1. Avaliação quantitativa e morfológica das plaquetas

A partir de amostra de sangue periférico coletado em EDTA, foi realizado hemograma, com contagem do número total de plaquetas, que foi confirmado através da contagem manual. Quando necessário, por exemplo, na presença de agregados plaquetários ou grande número de plaquetas gigantes, a coleta foi repetida em citrato de sódio a 3,8%. O esfregaço do sangue periférico em lâmina foi simultaneamente realizado para avaliação da presença de plaquetas gigantes, assim como excluir alterações nas demais séries, como a presença de inclusões basófilas nos neutrófilos.

4.7.2. Testes funcionais plaquetários

- Teste de Ivy modificado: avalia o tempo de interrupção espontânea do sangramento seguido de uma incisão na face interna do antebraço, a uma pressão constante de 40 mmHg empregando-se o dispositivo Simplate IIR® (Organon Teknika, EUA).
- Teste da agregação plaquetária: amostras de sangue periférico (~9 ml) foram coletadas em 1 ml de citrato de sódio 3,2% e centrifugadas a 800 ou 1000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi transferido para um tubo de plástico e o restante foi novamente centrifugado a 3.000 rpm por 15

minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A agregação foi realizada no agregômetro PACKS-4 (Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA).

- Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (*ristocetin-induced platelet aggregation -RIPA*): para a realização deste teste utilizou-se um volume de 450 µl de PRP, ao qual foi adicionado ristocetina (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EUA), em uma concentração inicial de 1 mg/ml, seguida de concentrações finais variáveis, até atingir a concentração capaz de promover 30% de agregação. Em indivíduos normais essas concentrações variam de 0,7 a 1,2 mg/ml.
- Agregação plaquetária com diversos agonistas: da maneira semelhante foram realizados testes de agregação plaquetária do PRP com concentrações específicas dos agentes agregantes: adrenalina 0,1 µM e 3 µM; adenosinadifosfato ou ADP 1 µM e 3 µM; colágeno 1 µg/ml e ácido aracdônico 500ug/ml e plasma bovino 50ul.

4.7.3. Determinação quantitativa das glicoproteínas de membrana plaquetária por citometria de fluxo.

Neste experimento, 5 µl do PRP foi transferido para um tubo de poliestireno (12 x 75 mm), onde foram adicionados 200 µl de solução de paraformaldeído a 1% e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 2 ml de solução tampão PBS-SAB (tampão fosfato 0,1M e SAB, soro albumina bovina, a 0,2%, pH. 7,2 a 7,4) e a mistura obtida foi centrifugada a 1800 rpm por 15 minutos. Ao precipitado foram adicionados 45 µl de PBS-SAB, além de 10 µl de um dos anticorpos monoclonais específicos conjugados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) para permitir a visualização. Esses anticorpos reconhecem os

diversos componentes dos complexos de glicoproteínas tais como anti - GP Iba (CD42b-PE), anti - GPIX (CD42a-FITC), anti - GPIIb (CD41-FITC) e anti - GPIIIa (CD61-FITC) (Beckman Coulter Immunotech, France). Como controles negativos foram utilizados anticorpos de camundongos IgG1-PE e IgG2a-FITC (Beckman Coulter Immunotech, France). Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e repetidas lavagens com tampão PBS-SAB foi determinada a quantificação de cada glicoproteína pela aquisição de 10.000 células no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) seguida de análises a partir da aquisição de 10.000 células, utilizando-se o programa CellQuest (Becton Dickinson).

4.7.4. Avaliação da coagulação sangüínea

Foram realizados os seguintes testes laboratoriais para a avaliação da coagulação sangüínea: tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcialmente ativado e tempo de trombina em aparelho Thrombolyzer® Rack Rotor (Organon Teknika).

4.7.5. Avaliação quantitativa e funcional do fator de von Willebrand (FvW)

- A quantificação do antígeno do fator de Von Willebrand (FvW:Ag) plasmático foi determinada por ELISA utilizando o anticorpo capturante de coelho anti-FvW humano (Dako A0082, Dinamarca) para a captura do antígeno e o anticorpo de coelho anti-FvW humano conjugado com peroxidase (Dako P226, Dinamarca) marcado para a determinação da quantidade de antígeno do FvW (MAZZINI et al 2000).

- A determinação da atividade coagulante residual do fator VIII (FVIII:C) foi realizada pelo ensaio em um estágio baseado na correção do TTPA de plasma humano artificialmente deficiente em fator VIII (Biomérieux Inc., Carolina do Norte-EUA) em aparelho Thrombolyzer® Rack Rotor (Organon Teknika).
- A atividade cofatora da ristocetina (FVW:RCo) em induzir agregação plaquetária de um pool de células normais. Nessa técnica foram utilizadas plaquetas liofilizadas (NL Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA) que foram ressuspensas em 5 mL de tampão TRIS-salina (TRIS 0.05 M, NaCl 0,15M; azida sódica 0.02%), para obtenção de cerca de 300×10^3 células/mL. Para a realização da curva de calibração foi utilizado o calibrador S.A.R.P. (*Specialty Assayed Reference Plasma* - NL Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA), nas diluições 1:2; 1:4 e 1:8 em tampão TRIS-salina. Em 400 µl das plaquetas obtidas, são adicionados 50 µl de ristocetina liofilizadas (NL Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA) na concentração de 10 mg/ml e 50 µl do plasma teste diluído 1:2 e 1:4. As análises foram realizadas no agregômetro PACKS-4 (Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA). Os resultados da atividade cofatora de ristocetina foram obtidos a partir da curva da calibração. Foram considerados normais os valores entre 50 e 150 % de atividade de acordo com a padronização realizada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp.

4.8. Análise Estatística

Para comparar a frequência dos genótipos e haplótipos do gene da GP Ibα entre os vários grupos de indivíduos da população geral ou com diagnóstico de IAM estudados foram empregados o teste qui-quadrado para a maioria das comparações. Entretanto,

quanto o número de amostras foi inferior a cinco o teste exato de Fischer foi utilizado e em ambos testes considerou-se o nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$). Na análise do parâmetro idade no estudo caso-controle, foi utilizado o teste paramétrico de *Student*. O *odds ratio* (OR) foi utilizado para avaliação do risco de infarto do miocárdio em relação aos genótipos e haplótipos da GP *Ib α* . A variação do OR estimado nas amostras avaliadas foi considerada a partir do cálculo de 95% de intervalo de confiança (I.C.) obtido pelo método de Cornfield. Foi considerado risco para infarto do miocárdio quando OR (95% I.C.) > 1.

A interação entre os polimorfismos da GP *Ib α* em relação às diversas variáveis consideradas fatores de risco para doença coronariana oclusiva (obesidade, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia e história familiar de doença oclusiva vascular) foi definida pelo método estatístico de regressão logística. Aquelas variáveis que na análise individual demonstrou nível descritivo de probabilidade abaixo de 10% foram considerados como possíveis fatores de risco para IAM. A seguir, essas variáveis foram avaliadas conjuntamente pelo método de regressão logística. Todos esses testes estatísticos mencionados foram realizados utilizando o programa S-Plus versão 2000 para Windows (MathSoft, Inc, 1999).

O grau de gravidade da doença coronariana foi definido pelo número de vasos em que pelo menos 50% da luz vascular foi acometida pela doença aterosclerótica. A correlação entre o número de vasos afetados e os polimorfismos da GP *Ib α* foi realizada pelo teste do qui-quadrado para tendência linear e para avaliação foi utilizado o programa Epi Inf versão 6 (*Centers for Disease Control and Prevention - US Department of Health and Human Service*).

V. Resultados

5. Resultados

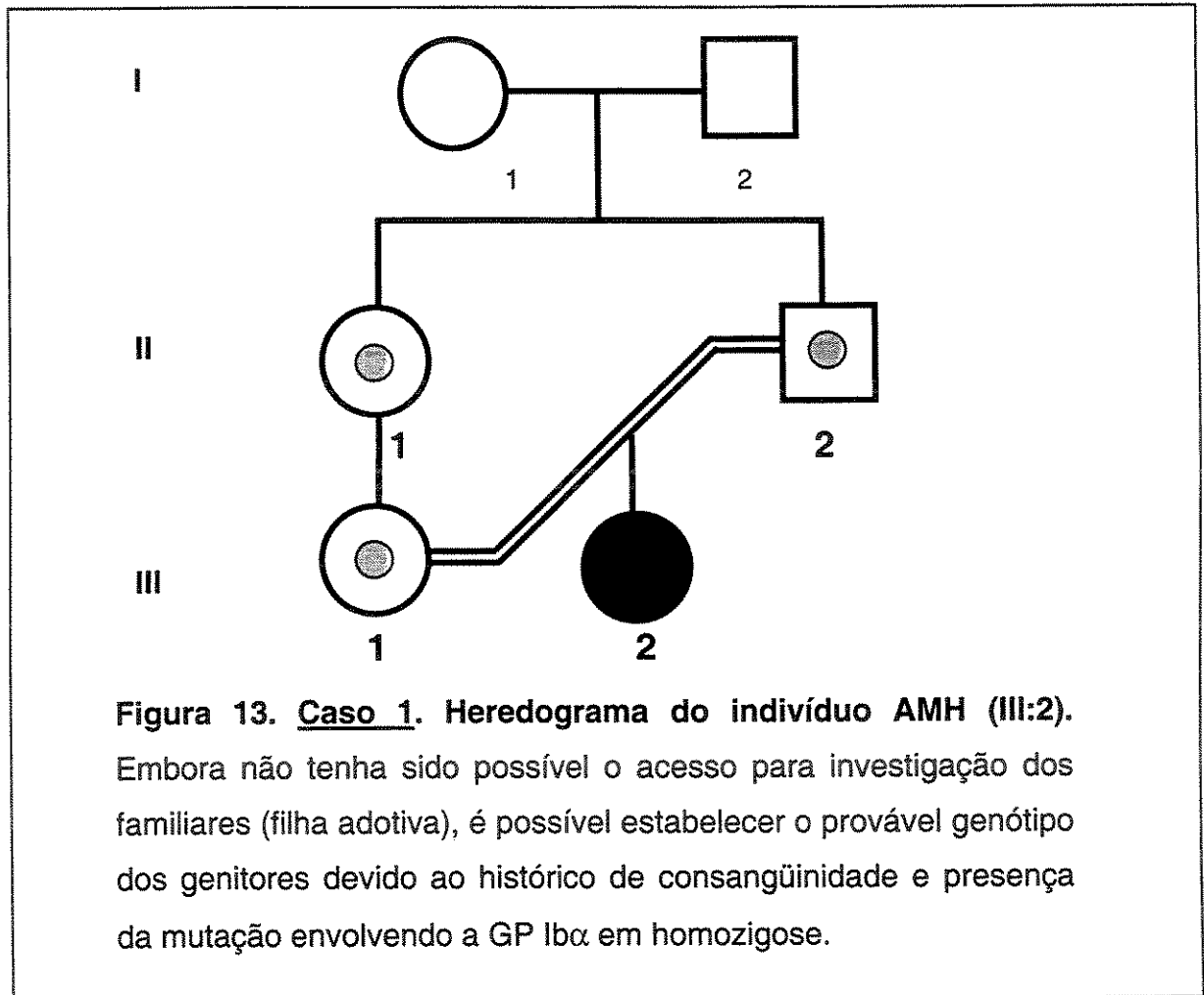
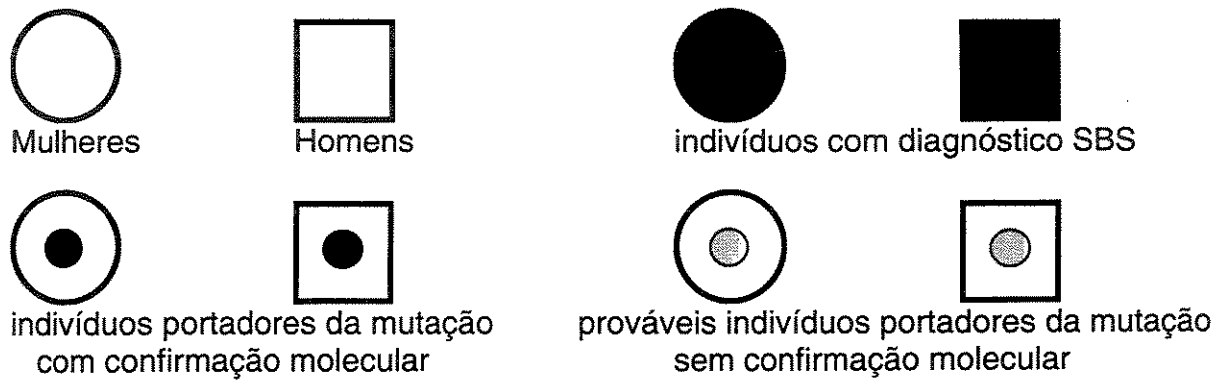
5.1. Caracterização molecular da Síndrome de Bernard-Soulier

Os casos descritos exemplificam o quadro clínico e laboratorial típicos da SBS e dessa forma a caracterização das mutações nos diversos genes que compõem o complexo do receptor plaquetário formado pelas glicoproteínas Ib(α e β)-IX-V. Nas tabelas 3 e 4 estão resumidos o quadro clínico e laboratorial dos indivíduos com SBS e familiares.

Caso 1. AMH, 27 anos, sexo feminino, brasileira, caucasóide. História desde os dois anos de idade com quadros recorrentes de epistaxe bilateral, de dois a três episódios semanais. Recebeu diagnóstico na época de púrpura trombocitopênica imune (PTI) em outro serviço, sendo tratada com corticoterapia e tendo recebido repetidas transfusões de concentrado de hemácias e plaquetas. Apresentou menarca aos 13 anos com sangramento abundante e desde então em uso contínuo de hormonioterapia com bloqueio dos ciclos menstruais. Aos 12 anos de idade foi avaliada pelo serviço de Genética Clínica da Unicamp, pois apresentava atraso no desenvolvimento neuromotor, dificuldade de aprendizagem e certo grau de agressividade. Na avaliação clínica, foram observados diversos sinais que sugeriam tratar-se de uma síndrome genética, com obesidade, macrocrania, fronte curta, sinofre, pregas epicânticas com fendas palpebrais oblíquas para cima, lábio inferior invertido, língua fissurada e palato alto, pescoço curto, cifose, pés alargados, hirsutismo constitucional e acantose nigricans. Ainda que a paciente fosse filha adotiva e os antecedentes familiares fossem desconhecidos, sabia-se do antecedente de consanguinidade, sendo a paciente filha da união entre tio materno e sobrinha. Foi realizada na época, a avaliação de cariótipo cujo resultado embora fosse 46,XX, evidenciou na pesquisa de sítio frágil do cromossomo X, positividade em du-

células, entre 218 células contadas e analisadas. O laudo final sugeriu trata-se de caso de síndrome do cromossomo X frágil. Aos 23 anos foi encaminhada ao ambulatório do Hemocentro da Unicamp quando foi diagnosticada SBS. Exames laboratoriais: hemograma com anemia discreta hipocrômica e microcítica e plaquetopenia ($26 \text{ a } 70 \times 10^9 / \text{L}$) e volume plaquetário médio (VPM) entre 18,1 a 20,4 fL (normal 7 a 11fL). Ao esfregaço do sangue periférico observava-se presença exclusivamente megaplaquetas. Tempo de sangramento (TS) foi de 19' (normal: 2'15" a 9' 30"). A agregação plaquetária foi ausente quando induzida com ristocetina a 1mg/mL, sem melhora ao adicionar plasma bovino. A agregação foi normal quando utilizado como agente agonista o ADP a $3\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$; a adrenalina $0,3\mu\text{M}$ e o colágeno $1\mu\text{g/ml}$ e $1,5\text{ mg/ml}$ e $2,0\text{ mg/ml}$. Em uso crônico e contínuo de anticoncepcional oral, apresentava quantificação de FVIII:C 230.6% (normal: 60 a 150%), FvW:Ag 145 UI/dL (normal 60 a 100 UI/dL) e cofator de ristocetina 143,9 % (normal 50 a 100%). A avaliação das glicoproteínas de membrana plaquetárias por citometria de fluxo mostrou a ausência da expressão da GP Ib α (CD42b) e 84,62% das células apresentavam expressão para GP IX (CD42a), 99% para GP IIb (CD41) e 92,8% para glicoproteína IIIa (CD 61). No entanto, foi possível notar uma nítida diminuição da intensidade de fluorescência da GP IX nas plaquetas da paciente em relação ao controle (figura 14), sugerindo que embora a GP IX estivesse presente na maioria das células analisadas, a mesma estava expressa em menor quantidade que o normal. Por outro lado, a intensidade de fluorescência das GP IIb e GP IIIa foi mais intensa na paciente que no controle. Esta observação é comum nos casos da SBS, devido à presença de megaplaquetas, com maior superfície da membrana, tendem a expressar mais intensamente a GP IIb-IIIa.

Legenda para os heredogramas



A avaliação molecular do gene da GP I β , evidenciou a presença da troca de base T→ na posição 3741 (de acordo com a numeração em Wenger e cols. (WENGER et al. 1988)) levando à mutação em homozigose da cisteína na posição 209 por uma serina (figura 14). Esta mutação já foi descrita anteriormente por Simsek et al. (SIMSEK et al. 1998).

1994a) e está localizada na sequência C-terminal, sendo que a Cys 209, participa de uma das ligações dissulfídicas. O seqüenciamento dos genes da GP Ib β e GP IX neste caso foram normais.

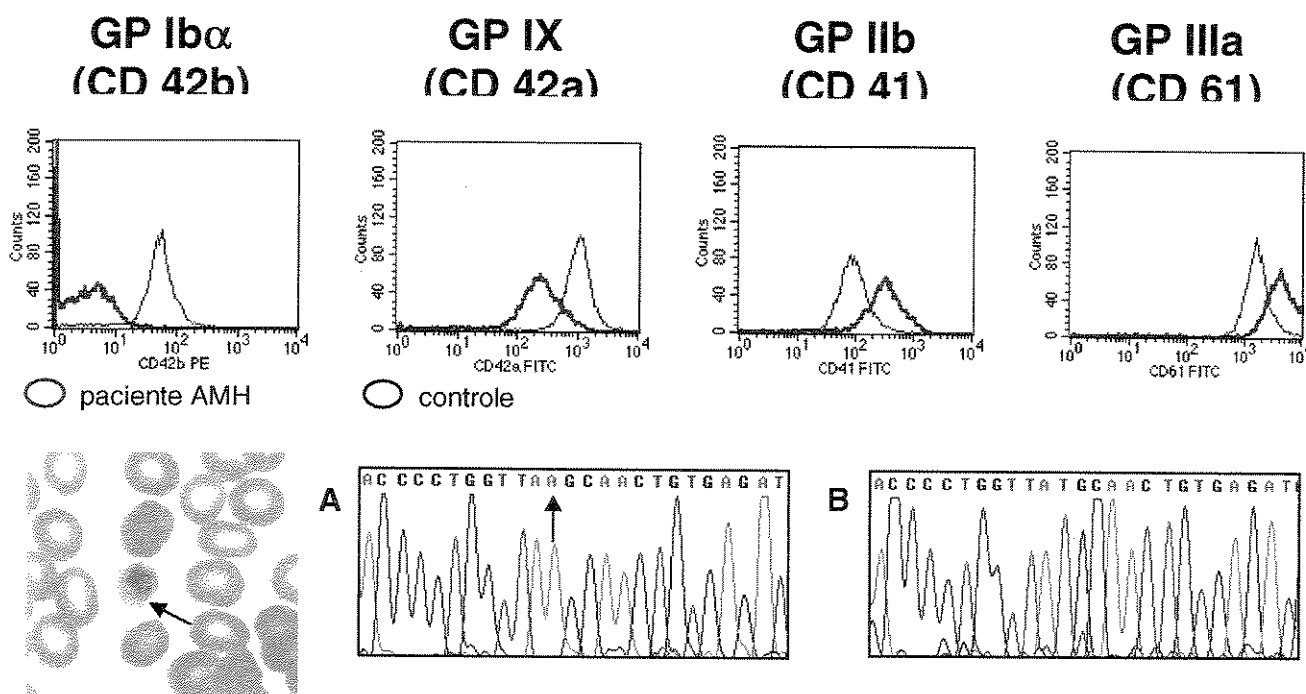


Figura 14. Caso 1. Citometria de fluxo das glicoproteínas plaquetárias e seqüenciamento GP Ib α . Acima a análise das glicoproteínas plaquetárias por citometria de fluxo, comparando o resultado da paciente AMH (vermelho) e controle normal (azul). A avaliação da GP Ib α (CD 42b) no caso da paciente AMH foi ausente e pouco diminuída para a GP IX (CD42a) em relação ao controle. A intensidade de fluorescência das GP IIb (CD41) e GP IIIa (CD61) foi mais intensa na paciente AMH que no controle. No esfregaço do sangue periférico observa-se presença de freqüentes megaplaquetas (seta). O seqüenciamento do gene da GP Ib α (A: paciente e B: controle); evidenciou uma troca de base de um T→A na posição 3741 (seta) levando a substituição de uma cisteína na posição 209 por uma serina (Cys 209 → Ser).

Caso 2. SSM, 30 anos, sexo masculino, brasileiro, filho de pais libaneses. História desc a adolescência de gengivorragia esporadicamente, associada à escovação. Aos 23 an evoluiu com sangramento abundante após extração dentária, com melhora após uso c selante de fibrina e sutura local. Na ocasião, foi observada a presença de plaquetopen e feito o diagnóstico de síndrome de Bernard-Soulier em outro serviço. Aos 26 anos f submetido à correção cirúrgica de hérnia de hiato esofágico, apresentando sangramen excessivo com necessidade transfusional e controle com uso de desmopressir (DDAVP) via endovenosa e transfusão de plaquetas. Nega outros antecedentes hemorrágicos. Apresenta antecedente de consangüinidade, os pais são primos e primeiro grau. Nega história familiar hemorrágica, incluindo pais e dois irmãos ma velhos. Exames laboratoriais: hemograma evidencia apenas plaquetopenia, co contagem entre $20 \text{ a } 32 \times 10^9 / \text{L}$ e volume plaquetário médio (VPM) entre 19,4 a 20 (normal 7 a 11fL). Ao esfregaço do sangue periférico observa-se presença de freqüente megaplaquetas. Tempo de sangramento 27'57" (normal: 2'15" a 9'30"). Teste c agregação plaquetária ausência de agregação induzida pela ristocetina a 1mg/mL; 1 mg/ml e 2,0 mg/ml. Quantificação de FVW:Ag 80 UI/dL e FVIII:C 223,6% e cofator c ristocetina 127,6% (normal 50 a 100%). A avaliação das glicoproteínas de membrar plaquetárias por citometria de fluxo mostrou a ausência da expressão da GP Ib (CD42b) e 98% das plaquetas apresentavam expressão para GP IX (CD42a), 99% pa GP IIb (CD41) e 96% para glicoproteína IIIa (CD 61).

A avaliação molecular do gene da GP Ib α , evidenciou a presença da troca de base T→ na posição 3212 (de acordo com a numeração em Wenger e cols. (WENGER et a 1988)) levando à mutação em homozigose da leucina na posição 115 por uma prolin

Esta mutação leva a perda do sítio de digestão reconhecido pela enzima de restrição AlwN I (New England BioLabs® Inc.). A digestão do produto de PCR referente à região da mutação descrita, utilizando a enzima AlwN I, confirmou que os pais de SSM e sua irmã apresentam esta mutação em heterozigose, enquanto seu irmão, assim como outros 50 controles não relacionados testados, foram todos negativos para a presença desta mutação (figura 15). Estes achados foram confirmados pelo seqüenciamento da região (figura 17). Esta mutação está localizada na região rica em leucina e não há relato de ter sido anteriormente identificada. O seqüenciamento dos genes da GP Ib β e GP IX neste caso foram normais.

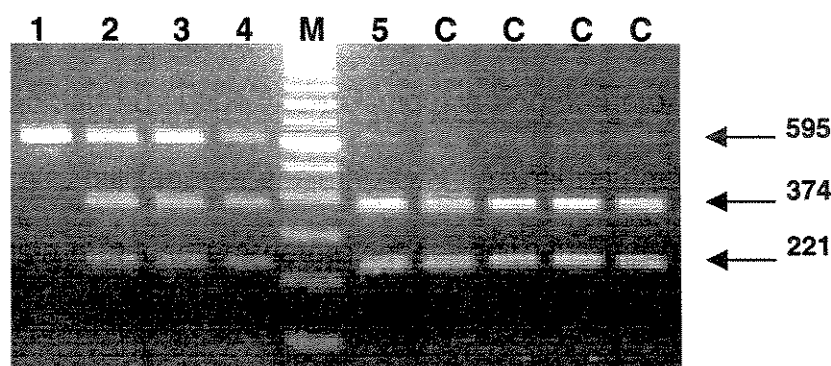


Figura 15. Caso 2. Avaliação dos familiares e controles para mutação Leu115→Pro do gene GP Ib α . Representação da digestão do produto de PCR com 595 pb, referente à região rica em leucina da GP Ib α (oligonucleotídeos Iba 1-S e Iba 1-AS), pela enzima de restrição AlwN I. Na presença da mutação Leu115→Pro há perda do sítio de restrição da enzima AlwN I, como pode ser observado na linha 1, representando o sujeito SSM, que apresenta a mutação em homozigose. Entre os familiares de SSM, observa-se que seu pai (linha 2), sua mãe (linha 3) e sua irmã (linha 4), são heterozigotos para a mutação. Seu irmão (linha 5), assim como todos os 50 controles testados (C), não apresentam a mutação.

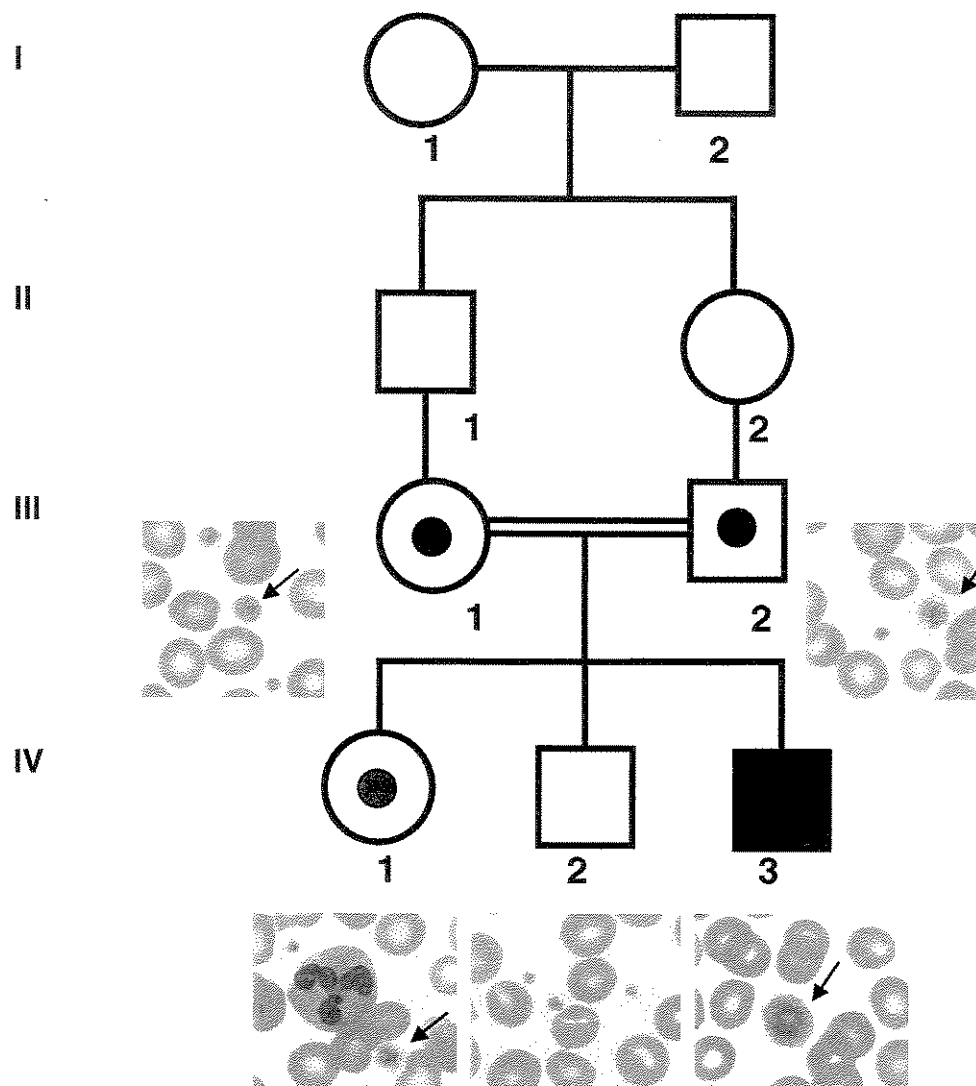


Figura 16. Caso 2. Heredograma do indivíduo SSM (IV:3), com diagnóstico de SBS e cujo estudo molecular mostrou a presença da mutação Leu115→Pro no gene da GP Ib α . Sua mãe (III:1) e seu pai (III:2) são primos em primeiro grau e confirmaram ser heterozigotos para a mesma mutação. Foi possível ainda avaliar sua irmã (IV:1) que foi heterozigota para a mutação enquanto que seu irmão não apresentou alteração no gene da GP Ib α . Na avaliação do esfregaço do sangue periférico foi possível observar que os indivíduos heterozigotos apresentaram dupla população de plaquetas com tamanho normal e megaplaquetas (setas).

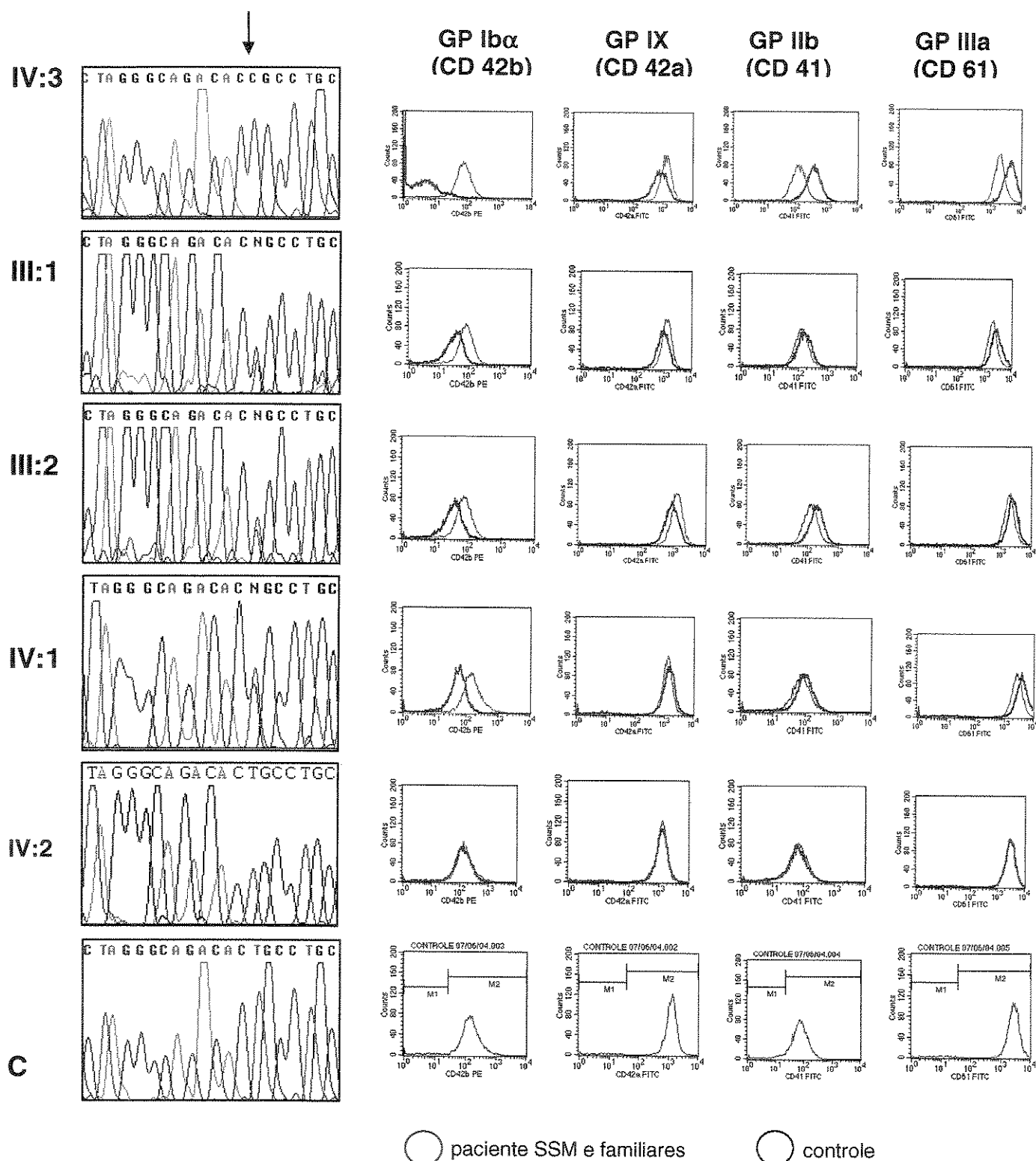
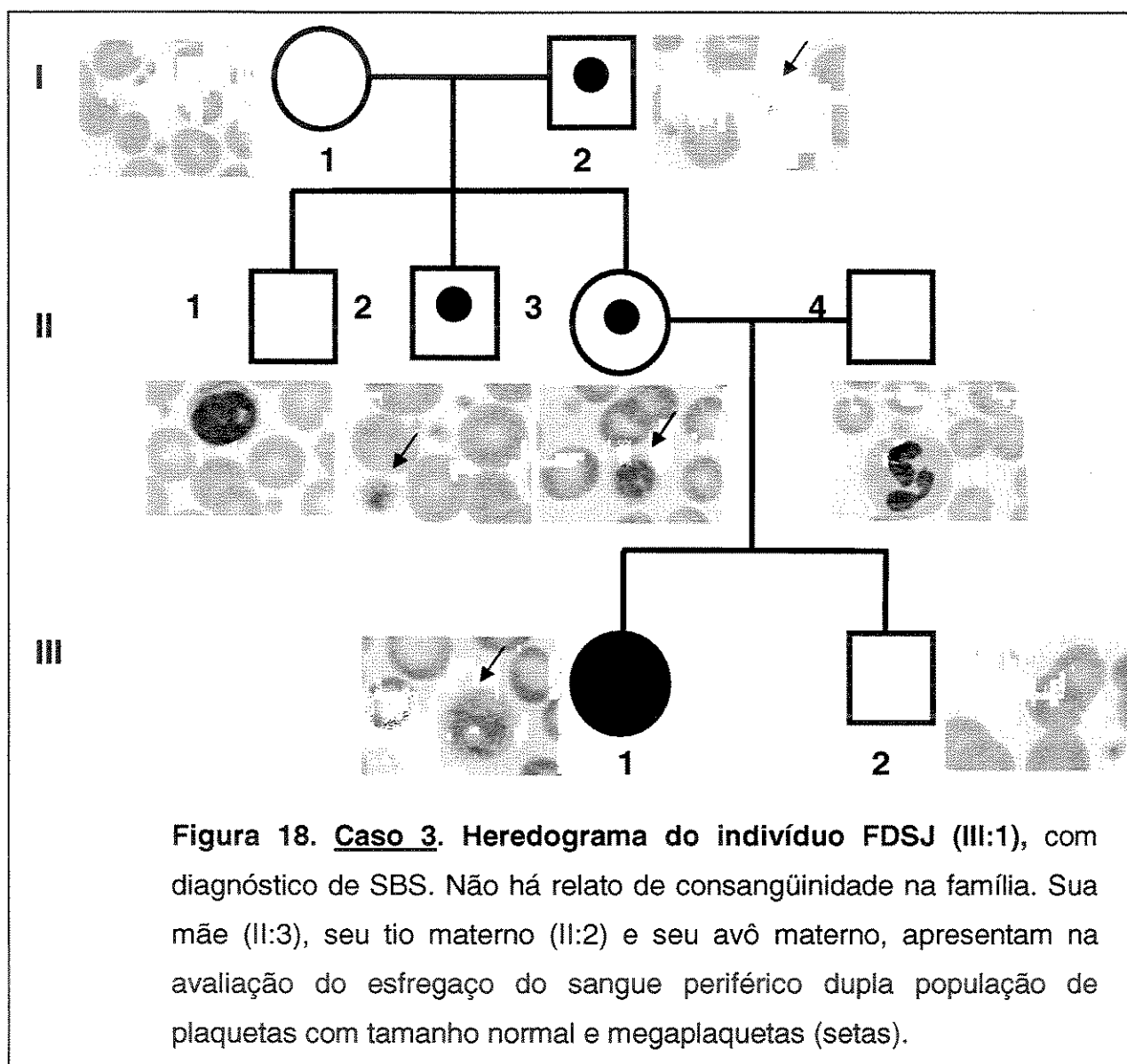


Figura 17. Caso 2. Representação dos resultados da citometria de fluxo das glicoproteínas plaquetárias e do seqüenciamento do gene da GP Ib α . Em vermelho, paciente SSM (IV:3) e seus familiares (III:1 mãe; III:2 pai; IV:1 irmã; IV:2 irmão) e em azul, controle (C). A intensidade de fluorescência da GP Ib α está ausente no sujeito SSM (IV:3) e diminuída nos familiares heterozigotos para a presença da mutação (III:1 mãe; III:2 pai; IV:1 irmã) em relação ao controle. A seta indica a troca base T→C, levando à mutação Leu115→Pro no gene da GP Ib α .

Caso 3. FDSJ, 25 anos, feminina, branca (ascendência italiana). Início acompanhamento aos dois anos de idade em outro serviço, onde foi diagnosticada síndrome de Bernard-Soulier. História clínica de epistaxe recorrente bilateral desde infância, evoluindo com quadros hemorrágicos graves e necessidade transfusional em diversas ocasiões. Apresentou menarca aos 13 anos de idade, com ciclos de hiperflux menstrual e melhora após introdução de terapêutica hormonal. Apesar do tratamento crônico irregular com reposição de ferro, evoluiu com persistência de níveis baixos de ferro e ferritina sérica. Aos 14 anos de idade foi diagnosticada a presença de sorologia positiva para vírus da hepatite C, sem sinais de alteração hepática até o presente momento. Nega história de consanguinidade ou antecedente hemorrágico na família.

Exames laboratoriais: hemograma com anemia hipocrômica e microcítica persistente de leve a moderada intensidade, plaquetas com contagem entre $15 \text{ a } 20 \times 10^9 / \text{L}$ e volume plaquetário médio (VPM) de 17,7 a 20,5 (normal 7 a 11 fL). Ao esfregaço do sangue periférico observa-se presença de megaplaquetas. Tempo de sangramento superior a 5 minutos. Teste de agregação plaquetária com ausência de agregação induzida pelo ristocetina a 1mg/mL; 1,5 mg/mL e 2,0 mg/mL. Quantificação de FVW:Ag 200 UI/dL FVIII:C 195%. A avaliação laboratorial dos familiares evidenciou que a mãe, um tio materno e o avô materno da paciente, embora assintomáticos apresentavam número de plaquetas discretamente reduzido, com presença de plaquetas de volume normal e megaplaquetas. A figura 18, com o heredograma da família, mostra o esfregaço de sangue periférico da paciente e demais familiares avaliados. O pai, o único irmão, assim como outro tio materno e a avó materna da paciente apresentavam plaqueta numericamente e morfolologicamente normais. No estudo funcional dos familiares, apenas

a agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) apresentou resultado alterado (hipoagregante) entre os familiares que apresentavam alteração plaquetária ao hemograma. O resultado da citometria de fluxo para as glicoproteínas plaquetárias foi alterado apenas para a paciente, que não apresentou expressão da GP Ib α e GP IX, com aumento da expressão para as GP IIb e GP IIIa em relação ao controle normal, provavelmente devido à presença das megaplaquetas (figura 19). O seqüenciamento dos genes da GP Ib α e GP IX foram normais para a paciente e seus pais. No entanto, o seqüenciamento do gene da GP Ib β da paciente, assim como dos familiares com alteração numérica e morfológica das plaquetas (mãe, avô materno e um dos tios maternos), evidenciou uma troca de base de um T→G no códon iniciador ATG em heterozigose, levando à substituição da metionina na posição 1 para uma arginina (-25Met → Arg). O seqüenciamento da mesma região entre seu pai e demais familiares foi normal (figura 19).



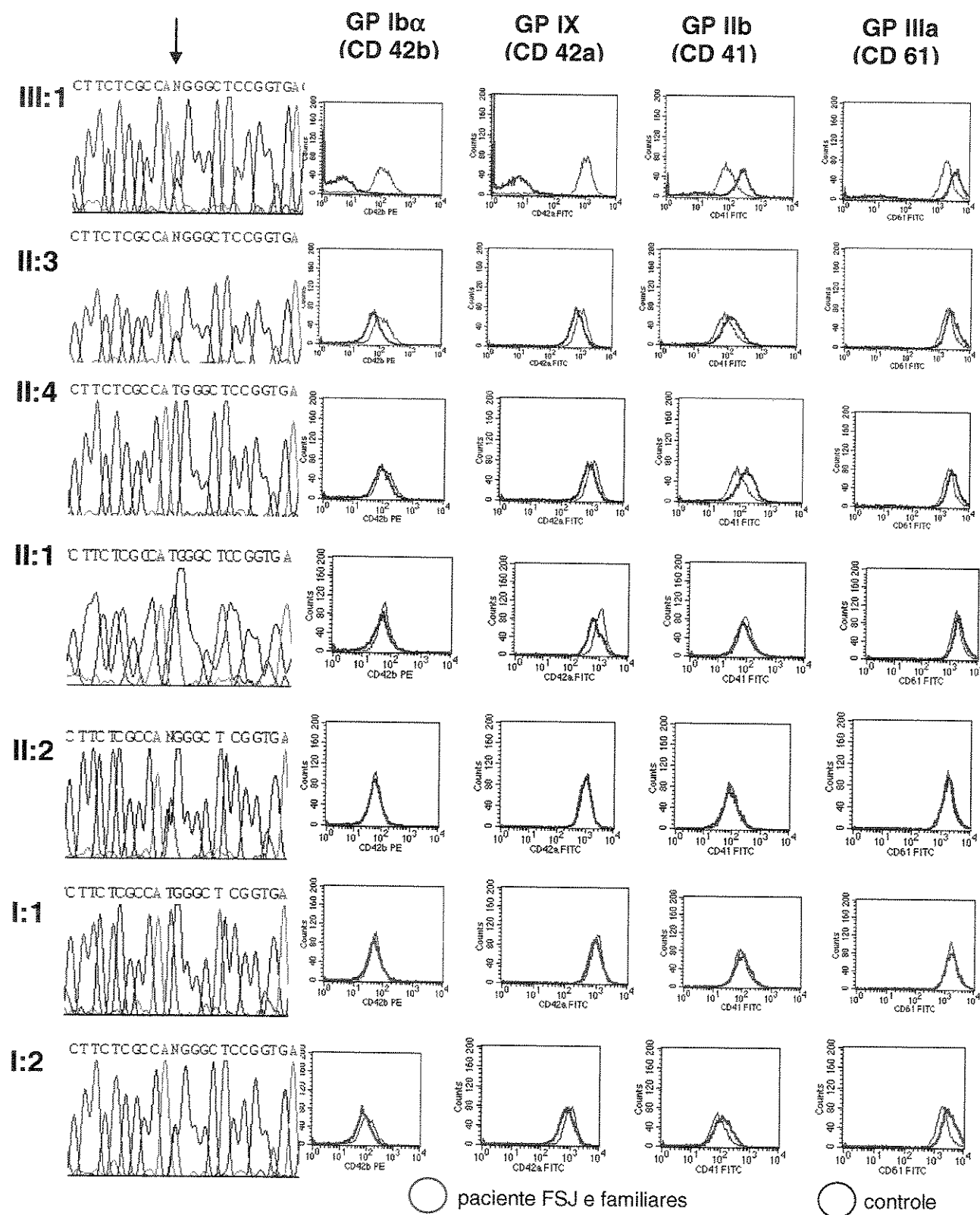


Figura 19. Caso 3. Representação dos resultados da citometria de fluxo das glicoproteínas plaquetárias e do seqüenciamento da GP Ib β . Apenas a paciente (III:1) apresentou alteração na expressão da GP, com ausência das GP Ib α e GP IX e discreto aumento das GP IIb e GP IIIa. No entanto, o seqüenciamento do gene da GP Ib β evidenciou a troca do T→G no códon iniciador ATG (seta) em heterozigose, levando a substituição da -25Met → Arg, tanto para a paciente (III:1), como para aqueles com dupla população plaquetária (mãe, II:3; tio II:2 e avô materno I:2). O seqüenciamento dos demais familiares com plaquetas normais (pai, II:4; tio II:1 e avó materna I:1) não mostrou alteração

Tabela 3. Quadro clínico e laboratorial dos pacientes com diagnóstico de síndrome de Bernard-Soulier e seus familiares.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Raça (ascendência)	História hemorrágica	Consangüinidade	Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	VPM (VR: 7-11fL)	Megaplaquetas	TS	RIPA (VR: 0,7 a 1,2 mg/ml)	Diagnósticos associados
Caso 1											
AMH (III:2)	27	F	Branca (não informada)	Moderado: epistaxe e hipermenorréia	Presente (pai tio da mãe)	26 a 70	18,1 – 20,4	frequentes	19'	Ausente	Sindrômico com RDNPM*
Caso 2											
SSM (IV:3)	30	M	Branca (libanesa)	Leve: Epistaxe e gengivorragia ausente	Presente (pais: primos 1°)	20 a 32	19,4 - 20,6	frequentes	27'57"	Ausente	Hérnia de hiato – correção em maio/2000
Pai (III:2)	71	M		ausente		107	9,0	moderadas	8'36"	Hipoagregante (3,13 mg/ml)**	Coronariopatia isquêmica: uso de ácido acetil salicílico
Mãe (III:1)	63	F		ausente		90	11,5	moderadas	4'05"	Hipoagregante (1,44 mg/ml)	
Irmã (IV:1)	35	F		hipermenorréia		55	8,7	moderadas	4'12"	Hipoagregante (2,74 mg/ml)	
Irmão (IV:2)	33	M		ausente		394	6,3	ausentes	1'50"	Normal (1,03 mg/ml)	
Caso 3											
FDSJ (III:1)	25	F	Branca (italiana)	Grave: epistaxe e hipermenorréia ausente	Ausente	15 a 20	17,7-20,5	frequentes	50'	Ausente	Portadora vírus hepatite C
Pai (II:4)	44	M		ausente		155-168	9,8 – 18,5	ausente	2'58"	Normal (1,02 mg/ml)	
Mãe (II:3)	43	F		ausente		80 a 107	11,3	moderadas	4'20"	Hipoagregante (1,29 mg/ml)	
Irmão (III:2)	22	M		ausente		208	11,1	ausentes	3'39"	Normal	
Tio materno (II:1)	46	M		ausente		336	9,5	ausentes	3'56"	Normal (0,8 mg/ml)	
Tio materno (II:2)	42	M		ausente		110	12,3	moderadas	3'33"	Hipoagregante (1,88 mg/ml)	
Avô materno (I:2)	69	M		ausente		102	10,6	moderadas	2'49"	Hipoagregante (1,59 mg/ml)	
Avô materno (I:1)	70	F		ausente		196	8,6	ausentes	6'30"	Normal (0,72 mg/ml)	

VR: valor de referência; VPM: volume plaquetário médio; RIPA: agregação plaquetária induzida pela ristocetina;

* Síndrome genética não definida, apresentando ao exame: RDNPM, obesidade, agressividade, macrocrania, sínofre, pregas epicânticas com fendas palpebrais oblíquas para cima, lábio inferior evertido, língua fissurada, palato alto pescoço curto, cifose, pés alargados, hirsutismo e acantose nigricans. Cariótipo 46, XX; com pesquisa de sítio frágil do cromossomo X positiva (2 células em 218 células em metafases analisadas).

**Exame realizado em vigência do uso de ácido acetil salicílico (100mg/dia uso contínuo)

Tabela 4. Quadro laboratorial dos pacientes com diagnóstico de síndrome de Bernard-Soulier e seus familiares.

Paciente	FvW:Ag (UI/dL)	FvW:RCo (%)	FVIII:C (%)	agregação plaquetária com outros agentes agonistas					plasma bovino (50ul)
				adrenalina (0,1 e 3 µM)	ADP (3 e 1µM)	colágeno (1µg/ml) VR:75 a 90%	ácido aracdônico (500ug/ml)		
AMH (III:2)	145	143,9	230,58	normal	normal	diminuído	NR	ausente	
SSM (IV:3)	80	127,6	223,56	normal	normal	diminuído 61,4%	normal	ausente	
Pai (III:2)	104	76,3	179,35	ausência de 2º onda**	normal	ausência de 2º onda**	ausência de 2º onda**	presente	
Mãe (III:1)	140	396,2	268,58	normal	normal	diminuído 61,8%	NR	presente	
Irmã (IV:1)	180	118,9	158,68	normal	normal	normal	NR	presente	
Irmão (IV:2)	100	190,7	189,21	ausência 2º onda com 3µM	ausência 2º onda com 1µM	normal	NR	presente	
FSJ (III:1)	75	320	252,94	NR (baixo nº plaquetas)	NR (baixo nº plaquetas)	NR (baixo nº plaquetas)	NR (baixo nº plaquetas)	NR (baixo nº plaquetas)	
Pai (II:4)	140	214	247,58	normal	normal	normal	normal	normal	
Mãe (II:3)	140	193,2	346,88	normal	normal	normal	normal	normal	
Irmão (III:2)	166,6	NR	120	normal	normal	normal	normal	NR	
Tio materno (II:1)	145	256,0	222,46	normal	normal	normal	normal	normal	
Tio materno (II:2)	85	138,8	153,43	normal	normal	normal	normal	normal	
Avô materno (I:2)	240	254,4	243,84	normal	normal	normal	normal	normal	
Avó materno (I:1)	110	205,7	262,52	normal	normal	normal	normal	normal	

NR: não realizado; VR: valor de referência; FvW:Ag, antígeno do fator de von Willebrand; FvW:Rco, atividade cofatora da ristocetina; FVIII:C atividade coagulante do fator VIII; ADP, adenosina difosfato.

**Exame realizado em vigência do uso de ácido acetil salicílico (100mg/dia uso contínuo)

5.2. Identificação dos distintos alelos do VNTR

A presença de seqüências nucleotídicas repetitivas de 39 pb idênticos (*variable number of tandem repeats*-VNTR) na região macroglicopeptídica do gene da GP Ib α resulta na formação de alelos polimórficos. Os alelos podem ser identificados diretamente por diferentes padrões de migração do produto do PCR em gel de eletroforese, variando de 4 cópias (VNTR-A) até uma única cópia (VNTR-D). Raramente a deleção dessa seqüência de repetição pode ocorrer, então nenhum dos 39 pb é detectado, formando o alelo VNTR-E. Como a detecção desses alelos VNTRs é feita pela simples observação do tamanho do produto do PCR é importante que mais de um experimento seja para a certificar os específicos alelos. Neste estudo nós utilizamos dois PCRs independentes para cada amostra do DNA genômico testado. O primeiro par de oligonucleotídeos (VNTR-F2 e VNTR-B4) originou os produtos de PCR de 563 pb, 524 pb, 485 pb e 446 pb correspondendo aos alelos do VNTR B, C, D e E respectivamente (Figura 20, Painel A). Utilizando um segundo par de oligonucleotídeos (VNTR-F3 e VNTR-B4) os fragmentos de PCR obtidos foram de 276 pb, 237 pb, 198 pb, and 159 pb correspondendo aos alelos do VNTR B, C, D, and E, respectivamente (Figura 20, Painel B). Em todos os casos analisados, houve concordância entre as duas análises de PCR realizadas para cada caso. Não foi identificado nenhum humano entre os casos aqui analisados, com o VNTR-A.

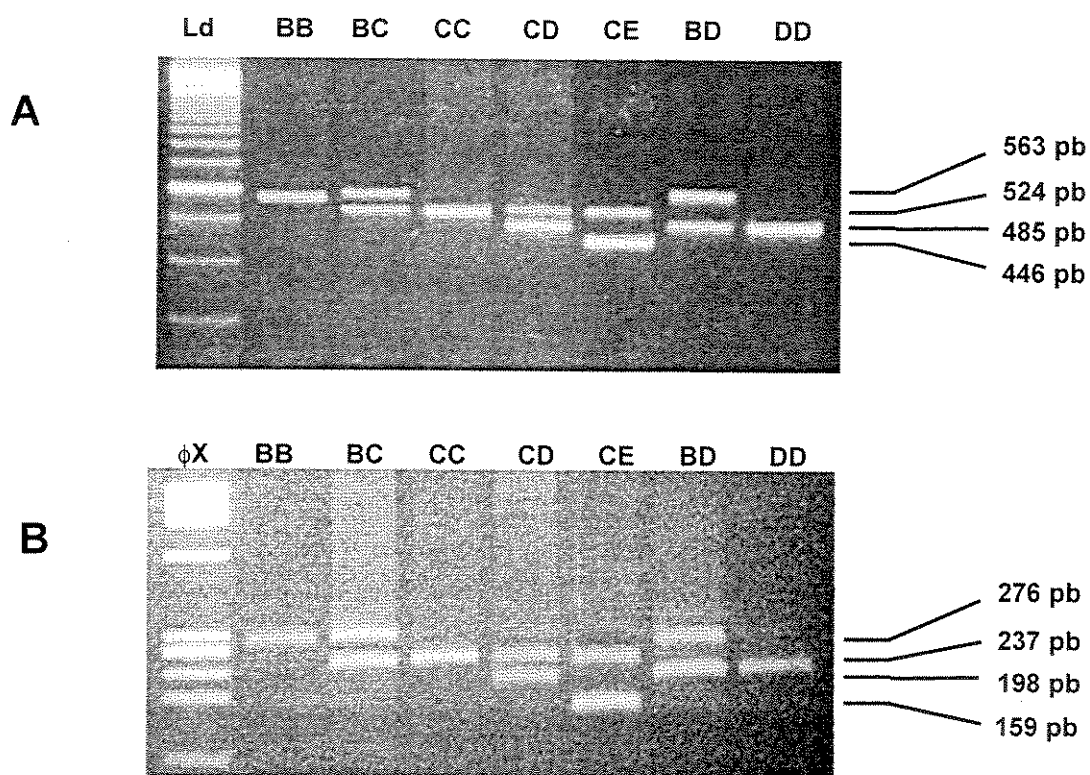


Figura 20. Representação dos diferentes alelos do VNTR do gene da GP Ib α . O genótipo para o polimorfismo VNTR, de todos os sujeitos deste estudo, foi determinado a partir da realização de dois PCRs independentes. Os produtos destas reações podem ser visualizados em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

Painel A. Utilizando os oligonucleotídeos localizados na porção 3915-3938 (VNTR-F2) e 4378-4400 (VNTR-B4), do gene da GP Ib α , resultou em produtos de PCR com 563 pb, 524 pb, 485 pb e 446 pb correspondendo aos alelos do VNTR B, C, D e E, respectivamente. Ld: ladder, marcador de peso molecular para cada 100 pb.

Painel B. Os mesmos DNAs genômicos foram amplificados, utilizando os oligonucleotídeos na regiões 4202-4223 (VNTR-F3) e 4378-4400 (VNTR-B4), do gene da GP Ib α , resultou em produtos de PCR com 276 pb, 237 pb, 198 pb e 159 pb, correspondendo aos alelos do VNTR B, C, D e E, respectivamente. ϕ X: marcador de peso molecular digerido pela enzima de restrição Hae III. pb: pares de base

5.2.1. Distribuição dos polimorfismos da GP $Ib\alpha$ nas diversas populações.

Parra e cols. (PARRA et al., 2003) relataram recentemente que entre brasileiros a identificação do grupo étnico ao qual um determinado indivíduo pertence não pode ser baseada simplesmente na caracterização fenotípica. Como não há até o momento nenhum método ideal, seja clínico ou molecular, que permita o reconhecimento inquestionável do grupo étnico ao que o indivíduo pertence, optamos por um critério alternativo. Os indivíduos descendentes de imigrantes da Europa (caucasóides) ou da África foram incluídos somente quando não havia mistura de raças naquela família, pelo menos nas últimas três gerações. Ainda que esse critério não seja o ideal, foi possível determinar que esse critério de seleção resultou em grupo de indivíduos em que a distribuição dos distintos alelos da GP $Ib\alpha$ estava balanceada. A frequência dos genótipos do VNTR entre os descendentes de caucasóides e africanos foi distribuída de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (VNTR: $\chi^2_{(3)} = 1.12$; $0.7 < P < 0.8$ e $\chi^2_{(2)} = 1.91$; $0.3 < P < 0.5$, respectivamente). De forma semelhante à distribuição dos alelos Kozak -5C/T estava em equilíbrio na população estudada ($\chi^2_{(1)} = 2.91$; $0.05 < P < 0.1$, and $\chi^2_{(1)} = 0.163$; $0.5 < P < 0.7$) entre os descendentes de caucasóides e negróides, respectivamente. Dessa forma, esses dados sugerem que os indivíduos analisados podem ser considerados representativos das referidas populações.

Por outro lado, entre os Indígenas Parakanãs, a distribuição dos alelos da GP $Ib\alpha$ não está em equilíbrio, o que era anteriormente esperado. Essa população vive em duas tribos separadas na Amazônia Oriental e geograficamente estão isolados dos outros grupos. Vários fatores podem contribuir para a distribuição desses alelos, entre eles, a prática comum de casamentos consanguíneos, poligamia e isolamentos impostos

geograficamente transitórios ou definitivos. Não foi possível demonstrar miscigenação com outras raças, até a década de 70, quando a determinação do sistema HLA e de alguns grupos sanguíneos, tais como ABO, Duffy e Diego foram estudados por Black e cols. (BLACK FL, 1980).

5.2.1.1 Comparação das distribuições dos VNTR da GP Ib α entre indivíduos de distintos grupos étnicos.

A comparação da prevalência do genótipo BC foi maior entre descendentes de africanos do que caucasóides 26.2% vs. 16.4%, respectivamente ($P < 0.02$; $\chi^2 = 5.75$), assim como o alelo B foi mais comum entre os africanos do que entre os caucasóides (0.158 v 0.109; $P < 0.04$; $\chi^2 = 4.28$). Nenhuma outra diferença na prevalência dos diversos genótipos e alelos foi determinada entre esses grupos (Tabela 5).

Entre os Indígenas somente os alelos B e C foram identificados. A prevalência do genótipo CC foi maior entre os Indígenas (79%) comparado com 66.7% ($P < 0.05$; $\chi^2 = 3.84$) entre caucasóides ou 62% entre negróides ($P < 0.01$; $\chi^2 = 6.03$). A prevalência do alelo C foi maior entre os Indígenas do que entre os caucasóides ($P < 0.05$; $\chi^2 = 3.8$) ou de negróides ($P < 0.02$; $\chi^2 = 5.8$). O genótipo BC foi mais comum entre os negróides do que entre os Indígenas (26.2%vs. 17.9%, $P < ; \chi^2 = .$).

Tabela 5. Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR da GP Iba em populações brasileiras.

	Caucasóides (n = 280)	Negróides (n = 145)	Parakanã (n = 67)
Genótipo (%)			
BB	5 (1,8%)	3 (2,1%)	2 (3%)
BC	46 (16,4%)	38 (26,2%)	12 (17,9%)
CC	187 (66,7%)	90 (62,1%)	53 (79,1%)
CD	31 (11,1%)	9 (6,2%)	0
DD	4 (1,4%)	3 (2,1%)	0
BD	5 (1,8%)	2 (1,3%)	0
CE	2 (0,8%)	0	0
Frequência alélica			
B	0,109	0,158	0,119
C	0,809	0,783	0,881
D	0,079	0,059	0
E	0,003	0	0

Teste χ^2 , ou Teste de Fisher para as amostras menores, foram utilizados para comparar as diferenças entre as três populações brasileiras distintas, considerando a frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR da GP Iba.

A frequência entre brasileiros caucasóides e negróides foi estatisticamente significativa apenas para o genótipo BC ($P < 0.02$; $\chi^2 = 5.75$) e para alelo B ($P < 0.04$; $\chi^2 = 4.28$). Nenhum alelo D foi identificado entre os Parakanãs. Isto pode explicar em parte a diferença entre Parakanãs e caucasóides para o genótipo CC ($P < 0.05$; $\chi^2 = 3.84$) e para o alelo C ($P < 0.05$; $\chi^2 = 3.8$). Da mesma forma foi observada uma diferença entre os Parakanãs e negróides para o genótipo CC ($P < 0.01$; $\chi^2 = 6.03$) e para alelo C ($P < 0.02$; $\chi^2 = 5.8$).

5.2.1.2. Prevalência do polimorfismo da posição –5 C/T da sequência Kozak entre indivíduos de distintos grupos étnicos

Na Tabela 6 está demonstrada a prevalência dos genótipos e alelos da GP Ib α na posição –5 C/T da sequência Kozak. Não houve diferenças entre a frequência gênica dos diversos alelos entre caucasóides ou negróides (0.139 v 0.169 respectivamente, $P = 0.25$). Entretanto o alelo –5C foi mais comum entre os indígenas (0.254) quando comparados aos caucasóides (0.139; $P < 0.001$; $\chi^2 = 10.45$) ou negróides (0.169; $P < 0.04$; $\chi^2 = 4.17$).

Tabela 6. Frequência dos genótipos e alelos da sequência Kozak da GP Ib α em populações brasileiras.

	Caucasóides (n = 280)	Negróides (n = 145)	Parakanã (n = 67)
Genótipo (%)			
TT	203 (72,5%)	99 (68,3%)	34 (50,7%)
TC	76 (27,1%)	43 (29,6%)	32 (47,8%)
CC	1 (0,4%)	3 (2,1%)	1 (1,5%)
Frequência alélica			
T	0,861	0,831	0,746
C	0,139	0,169	0,254

Teste χ^2 , ou Teste de Fisher para as amostras menores, foram utilizados para comparar as diferenças entre as três populações brasileiras distintas, considerando a frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo Kozak do gene da GP Ib α .

5.2.1.3. Distribuição dos haplótipos do gene da GP Ib α nas diversas populações étnicas.

Anteriormente nosso grupo relatou a prevalência dos alelos dos sistemas HPA-1 até HPA-5 entre indivíduos dos diversos grupos étnicos (CASTRO et al., 1999). Na Tabela 7 está demonstrado a distribuição dos diversos haplótipos que englobam os polimorfismos do HPA-2, VNTR e -5C/T Kozak da GP Ib α entre indivíduos dos três grupos étnicos. Foram identificados 10 haplótipos distintos, sendo que o mais comum entre negróides (38%) e caucasóides (43,6%) foi o mesmo Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC. Entre os Indígenas os haplótipos Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC e Kozak-TC/HPA-2aa/VNTR-CC foram igualmente prevalentes.

Tabela 7. Frequência dos haplótipos dos polimorfismos da GP Iba em três grupos étnicos distintos da população brasileira: caucasóides, negróides e indígenas (tribo Parakanã).

HPA-2	VNTR	Caucasóides				Negróides				Parakanã			
		seqüência Kozak				seqüência Kozak				seqüência Kozak			
		TT	TC	CC		TT	TC	CC		TT	TC	CC	
bb	BB	3	1			2				1	1		
bb	BC					1				2			
ab	BB	1				1							
ab	BC	35	10			23	10			7	3		
ab	BD	5					2						
ab	CC	8	4			8	4				3		
ab	CD	1				1							
aa	BC	1				2	1	1					
aa	CC	122	52	1		55	21	2		24	25		1
aa	CD	22	8			4	4						
aa	CE	2											
aa	DD	3	1			2	1						
Total		203	76	1		99	43	3		34	32		1

5.2.1.4 Desequilíbrio de ligação incompleto entre os alelos da GP Iba é comum presente em todos os grupos étnicos.

Estudos anteriores demonstraram que os alelos do VNTR-A e B estão em ligação de desequilíbrio com o HPA-2b, enquanto os alelos VNTR-C e D com o HPA-2a. Neste estudo foi observada a ligação de desequilíbrio incomum entre o HPA-2b com o VNTR-C em 32 de 340 (9,4%) indivíduos informativos, ou seja, aqueles com o genótipo VNTR-C ou HPA-2bb. A maior prevalência dessa associação foi determinada entre os negróides (14%), seguida de 10% entre Indígenas e 6% entre caucasóides.

De maneira semelhante, a associação incomum entre os alelos HPA-2a e VNTR-B identificada em 7 de 361 (2%) de todos casos informativos (ou seja, genótipos HPA-2 ou VNTR-BB). A associação HPA-2a/VNTR-B ocorre em 5% dos negróides (n=5) e em ~1% dos caucasóides (n=2).

A análise conjunta do VNTR, HPA-2 com o polimorfismo da sequência Kozak revelou que a grande maioria apresenta o alelo -5C associado com o VNTR-C ou D e HPA-2a. Entretanto em um caucasiano e um indígena foi identificado o haplótipo Kozak-TC/HPA-2bb/VNTR-BB. Finalmente em um indivíduo negróide foi determinado o raro haplótipo Kozak-CC/HPA-2aa/VNTR-BC.

5.2.1.5. Identificação do raro alelo VNTR-E.

Neste estudo foi possível identificar em dois indivíduos caucasóides, não relacionados o raro alelo VNTR-E em associação com o VNTR-C (figura 21). O seqüenciamento da região ao redor da deleção dos 39pb demonstrou um polimorfismo neutro do aminoácido prolina 395 (mudança de A para G na posição 4301) (figura 22). Esses indivíduos

apresentaram número de plaquetas normal, assim como a morfologia celular. Além disso, a quantificação das diversas glicoproteínas plaquetárias por citometria de fluxo, demonstrou que os vários complexos de GP estão preservados. O estudo funcional das plaquetas desses indivíduos e de alguns de seus familiares, não revelou nenhuma anormalidade no tempo de sangramento de Ivy, agregação plaquetária em respostas aos vários agonistas, incluindo ristocetina que na superfície plaquetária reflete anormalidades do complexo GP Ib-IX-V (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação quantitativa, morfológica e funcional das plaquetas entre os membros da família que apresenta o VNTR-E.

Indivíduo	Plaquetas ($\times 10^9$ /L)	VPM (fL)	TS	RIPA (mg/mL)	FvW:RCo (%)	FVIII:C (%)	Intensidade média de Fluorescência			
							Ib α (CD 42b)	IX (CD 42a)	IIb (CD 41)	IIIa (CD 61)
Valores normais	130 - 400	7.2 - 11.1	2' - 9'	0.7 a 1.2	50 - 150	60-150	85.06 (± 32.39)*	708.12 (± 226.17)*	65.87 (± 55.5)*	1136.47 (± 438.25)*
I.1	311	6.2	7'03"	1.2	264	161.8	113.42	677.38	72.15	753.88
I.2	389	6.6	5'52"	1.1	273	108.7	86.61	654.67	46.33	1340.95
II.1	419	6.1	5'58"	0.8	208	143.1	97.52	708.79	86.86	1147.09
II.2	143	7.3	4'13"	1.2	127.7	177.7	105.45	701.80	45.55	870.42

VPM: volume plaquetário médio; TS: tempo de sangramento; RIPA: agregação plaquetária induzida pela ristocetina; FvW:Rco, atividade cofatora da ristocetina; FVIII:C: atividade coagulante do fator VIII.

* Intensidade média de fluorescência (unidade arbitrária) obtida pelos anticorpos contra GP Ib α , GP I, GP IIb, GP IIIa em controles ($SD \pm$).

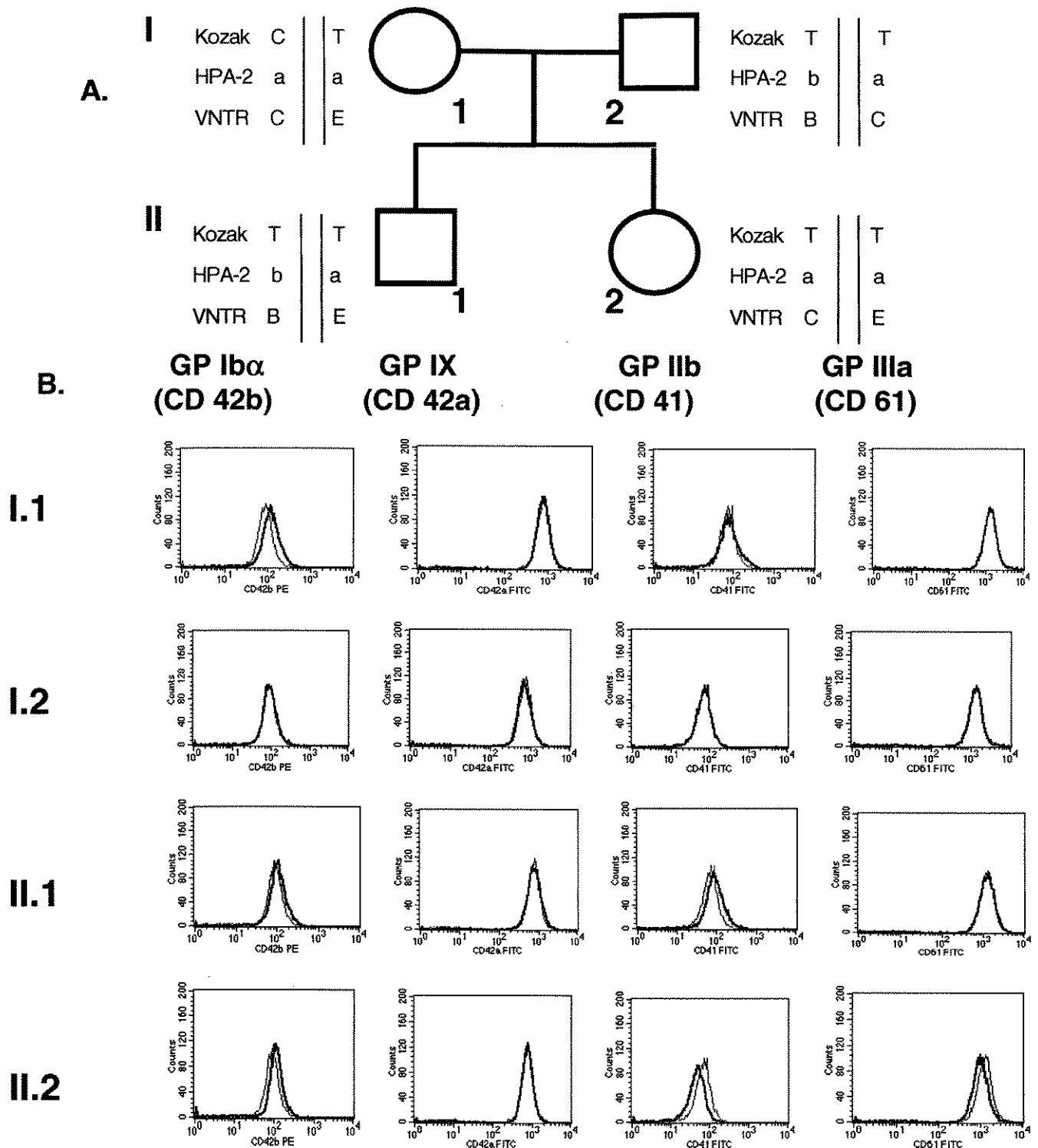


Figura 21. Estudo da família com a rara variante do VNTR alelo E. **A.** Heredograma com a representação dos haplótipos dos polimorfismos da GP Ib α (Kozak, HPA-2 e VNTR) de cada membro da família estudada. A seta indica o indivíduo primeiramente identificado nesta família com o alelo E. **B.** Análise por citometria de fluxo das glicoproteínas plaquetárias, entre os membros da família com a variante E (vermelho), em comparação com controle cujo haplótipo é Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC (azul). Não há diferença significativa na intensidade de fluorescência para a GP Ib α , entre os membros que apresentam o alelo E e o controle. Pode-se notar no entanto, uma discreta expressão maior no indivíduo I.2, que pode ser explicado pela presença do alelo Kozak -5C.

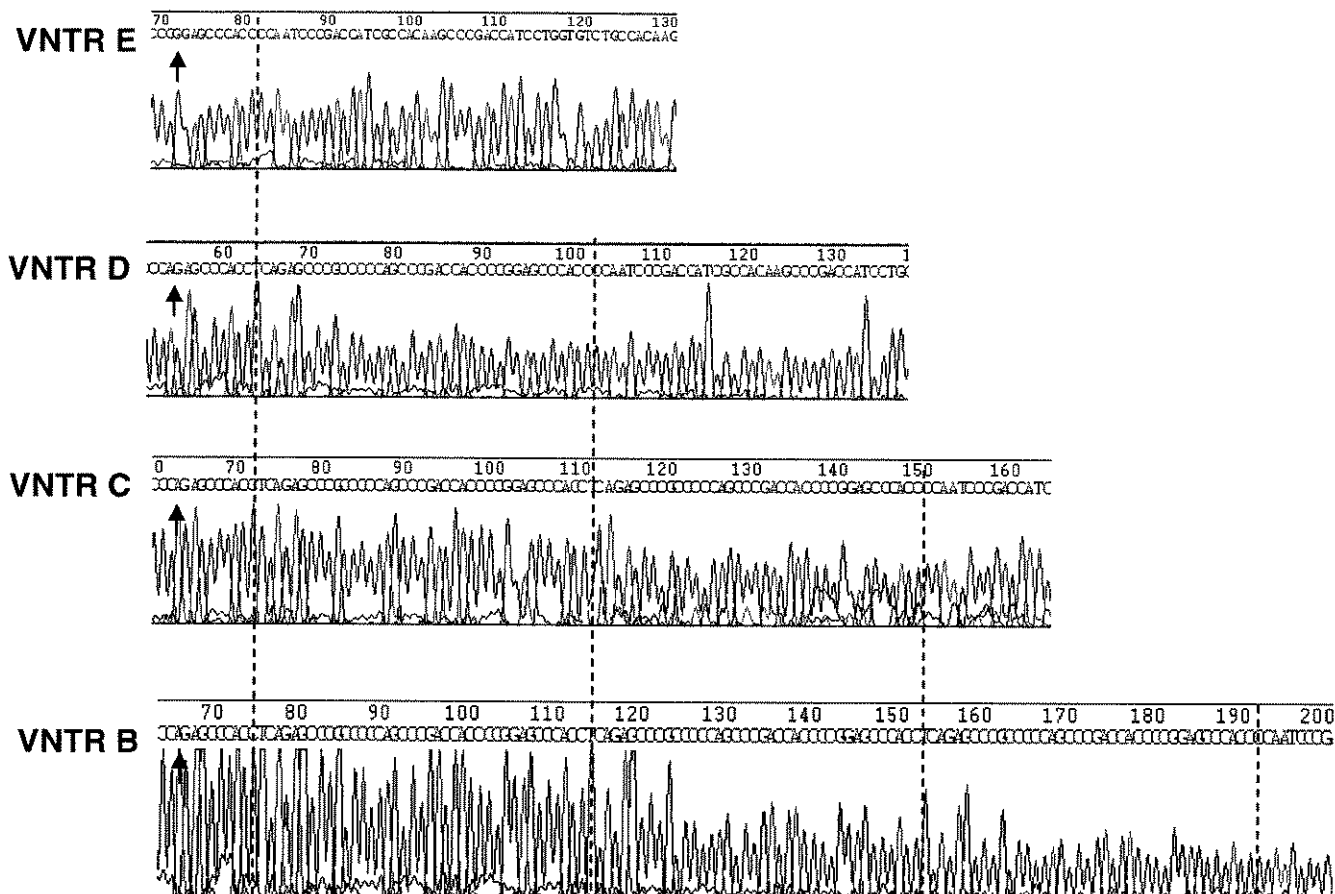


Figura 22. Seqüenciamento da região contendo VNTR do gene da GP Ib α . Os alelos distintos B ao E do VNTR, estão representados de baixo para cima. As linhas tracejadas representam cada cópia da repetição com 39 bp. O alelo E, sem nenhuma cópia da repetição com 39 pb, apresenta uma mudança neutra de A $\rightarrow$ C na posição 4301 (prolina 395).

5.2.1.6. Homozigose para o alelo VNTR-A é comum entre primatas não-humanos.

O alelo VNTR-A não foi identificado em nenhum dos 1.000 humanos estudados em nosso laboratório, incluindo os indivíduos dos estudos relatados neste projeto. No entanto, quando nós analisamos o DNA genômico de dois primatas não-humanos (chimpanzé e gorila) para a identificação dos polimorfismos da GP Iba utilizando os mesmos oligonucleotídeos para o estudo em humanos, os dois animais apresentaram o genótipo Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-AA. É interessante observar que exatamente o contrário do que é reconhecido em humanos (ISHIDA et al., 1995), em primatas o alelo VNTR-A está ligação com o alelo HPA-2a. A presença da homozigose para esse alelo incomum foi confirmada pelo seqüenciamento direto do produto do PCR (figura 23).

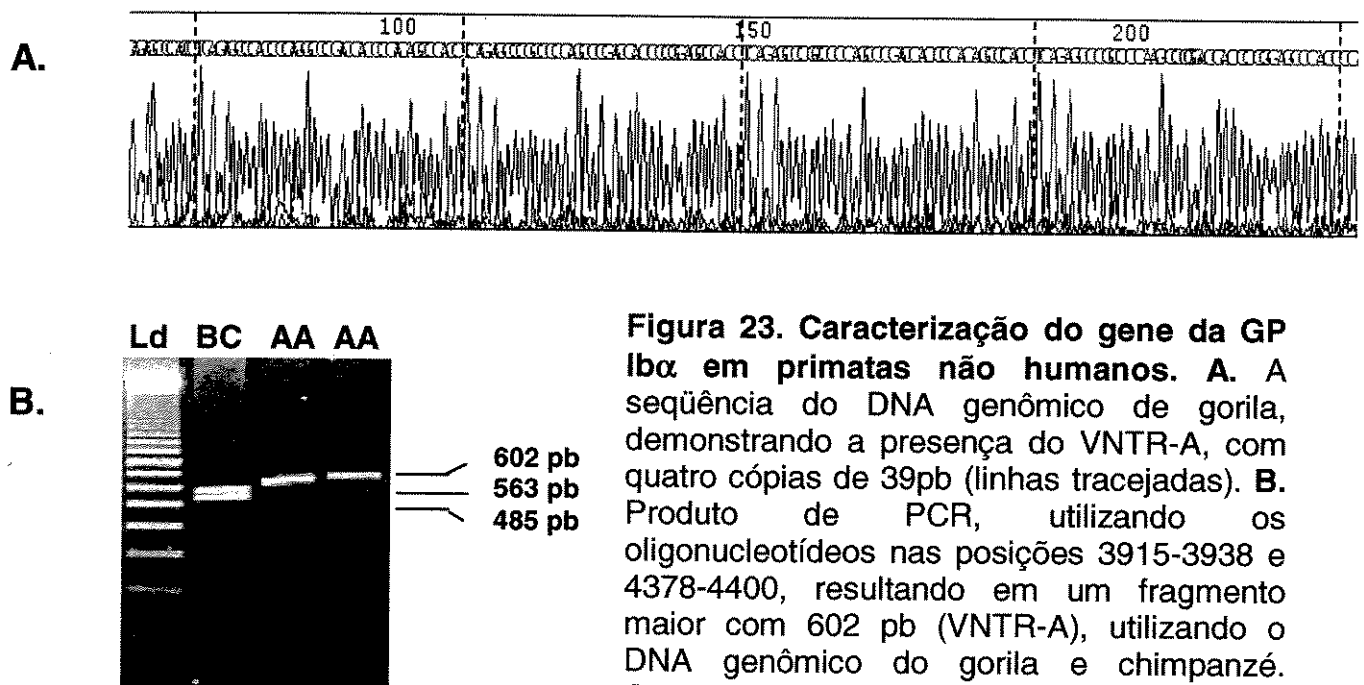


Figura 23. Caracterização do gene da GP Iba em primatas não humanos. A. A seqüência do DNA genômico de gorila, demonstrando a presença do VNTR-A, com quatro cópias de 39pb (linhas tracejadas). **B.** Produto de PCR, utilizando os oligonucleotídeos nas posições 3915-3938 e 4378-4400, resultando em um fragmento maior com 602 pb (VNTR-A), utilizando o DNA genômico do gorila e chimpanzé. Controle com DNA humano previamente caracterizado Ld: marcador molecular.

5.2.2. Polimorfismos da GP I α e o risco para o desenvolvimento do IAM

Os dados clínicos e laboratoriais dos grupos de indivíduos com IAM e controles estão resumidos na Tabela 9. Os indivíduos foram pareados de acordo com raça, sexo, idade e massa corporal. Entre os demais parâmetros clínicos e laboratoriais analisados, com exceção de hipertensão arterial e Diabetes mellitus no grupo 1 (pacientes que sofreram o primeiro IAM) e hipertrigliceridemia no grupo 2 (sobreviventes de IAM), todos os demais fatores de risco para doença vascular oclusiva foram mais prevalentes entre os pacientes com IAM do que entre os controles.

A distribuição dos vários alelos da GP I α (Kozak, VNTR, and HPA-2) entre os indivíduos dos grupos controles revelou que está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, esses dados sugerem que esse grupo de indivíduos, ainda que não idênticos àqueles com IAM, representam uma amostra adequada e representativa da população geral.

5.2.2.1. Os polimorfismos de VNTR da GP I α estão associados com a susceptibilidade para o desenvolvimento de IAM.

A frequência dos genótipos e alelos dos diversos VNTR determinadas nos dois grupos estão representados na Tabela 10.

O genótipo CD foi mais freqüente entre os indivíduos com IAM do que entre os controles em ambos os grupos, sendo observado uma diferença estatisticamente significativa (grupo 1: 9,4% pacientes vs. 3,5% controles; $P = 0,047$; OR, 2.84; 95% CI, 1,10 – 8,36 e grupo 2: 14.4% pacientes vs. 6.6%, controles; $P = 0,026$; OR, 2.36; 95% CI, 1,10 – 5,16). Como os grupos caso-controle não são idênticos com relação à prevalência dos vários fatores de risco para doença arterial oclusiva, esses dados foram analisados e corrigidos para

eliminar o risco decorrente desses fatores e não do genótipo do VNTR. Após a regressão logística, o genótipo CD embora no grupo 1 tenha apresentado $P = 0,07$, no grupo 2 o risco associado ao genótipo CD foi independente dos outros fatores para IAM ($P = 0,01$). Por outro lado, o genótipo BC foi menos freqüentes entre os indivíduos com IAM comparado aos controles em ambos os grupos, sendo que esta diferença estatisticamente diferente no grupo 2 (grupo 1: 18,2% pacientes vs. 26,5% controles; $P = 0,09$; OR: 0,62; 95% CI: 0,36 – 1,07 e grupo 2: 15% pacientes vs. 27,2%, controles; $P = 0,007$; OR: 0,47; 95% CI: 0,27 – 0,82). No grupo 2, a prevalência do alelo B foi também menor entre os indivíduos com IAM do que entre os controles (8,9 vs 14,4 respectivamente; $P = 0,027$; OR: 0,58; 95% CI: 0,35 – 0,94). A análise da regressão logística revelou que apenas o genótipo BC no grupo 2, apresenta associação com menor prevalência de IAM ($P = 0,04$).

A prevalência do alelo D foi maior entre os indivíduos com IAM do que entre os controles mas apenas no grupo 1 esta diferença atingiu nível estatisticamente significativo (grupo 1: 7,9% pacientes vs. 3,5% controles; $P = 0,02$; OR: 2,36; 95% CI: 1,12 – 5,03 e grupo 2: 8,9% pacientes vs. 5,3%, controles; $P = 0,18$). Após análise por regressão logística, esta diferença no grupo 1 mostrou $P = 0,06$.

Tabela 9. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico prévio de infarto agudo do miocárdio (IAM) e dos controles pareados.

	Grupo 1 (primeiro IAM)			Grupo 2 (sobreviventes de IAM)		
	Pacientes n = 170 (%)	Controles n = 170 (%)	P*	Pacientes n = 180 (%)	Controles n = 180 (%)	P*
Idade, anos (mínimo – máximo)	54.5 ± 10.8 (29 - 78)	53 ± 11 (28 - 74)	NS	54 ± 13.5 (22 - 85)	50 ± 13.5 (20 - 82)	NS
Idade ≤ 50 anos no primeiro IAM	61 (35.9%)	61 (35.9%)	NS	68 (37.8%)	68 (37.8%)	NS
Sexo masculino	120 (70.6%)	120 (70.6%)	NS	103 (57.2%)	103 (57.2%)	NS
Não Caucasóides	13 (7.6%)	13 (7.6%)	NS	28 (15.5%)	28 (15.5%)	NS
Índice de massa corporal (kg/m ²)	27 ± 4	26 ± 3	NS	27 ± 3	26 ± 7	NS
Hipertensão †	65 (38.2%)	75 (44.1%)	NS	128 (71.1%)	70 (38.8%)	< .001
Fumantes / ex-fumantes	88 (51.8%)	28 (16.5%)	< .001	108 (60%)	30 (16.7%)	< .001
Colesterol ≥ 220 mg/dl ou sob terapia	120 (70.6%)	91 (53.5%)	< .001	124 (68.9%)	97 (53.9%)	.0034
Triglicérides ≥ 150 mg/dl ou sob terapia	123 (72.3%)	100 (58.8%)	.008	80 (44.4%)	85 (47.2%)	NS
Diabetes mellitus tipo I ou II ‡	8 (4.7%)	10 (5.9%)	NS	45 (25%)	11 (6.1%)	< .001
História familiar §	45 (26.5%)	17 (10%)	< .001	47 (26.1%)	21 (11.6%)	< .001

* Teste χ^2 foi usado para comparação entre os valores associados aos fatores de risco para doença coronariana entre pacientes e controles. NS: não significativo.

† Hipertensão arterial sistêmica foi devida como pressão sistólica ≥ 140 mm Hg ou pressão diastólica ≥ 90 mm Hg ou sob tratamento anti-hipertensivo.

‡ Diabetes mellitus foi definido de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde

§ História familiar foi definida quando um membro da família com até dois graus de parentesco, apresentou doença isquêmica coronariana, doença arterial isquêmica periférica ou acidente vascular cerebral isquêmico.

Tabela 10. Prevalência dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR da GP Iba entre pacientes antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.

	Grupo 1 (primeiro IAM)			Grupo 2 (sobreviventes de IAM)		
	Pacientes n = 170 (%)	Controles n = 170 (%)	P* (OR)	Pacientes n = 180 (%)	Controles n = 180 (%)	P* (OR)
Genótipo						
BB	1 (0,6)	1 (0,6)	NS	2 (1,1)	1 (0,6)	NS
BC	31 (18,2)	45 (26,5)	0,09 (0,62)	27 (15)	49 (27,2)	0,007 (0,47)
CC	116 (68,2)	115 (67,6)	NS	123 (68,3)	113 (62,7)	NS
CD	16 (9,4)	6 (3,5)	0,047 (2,84)	26 (14,4)	12 (6,6)	0,026 (2,36)
DD	5 (3)	3 (1,8)	NS	1 (0,6)	3 (1,7)	NS
BD	1 (0,6)	0	NS	1 (0,6)	1 (0,6)	NS
CE	0	0		0	1 (0,6)	NS
Alelo						
B	34 (10)	47 (13,8)	NS	32 (8,9)	52 (14,4)	0,027 (0,58)
C	279 (82,1)	281 (82,7)	NS	299 (83,1)	288 (80)	NS
D	27 (7,9)	12 (3,5)	0,02 (2,36)	29 (8)	19 (5,3)	NS
E	0	0		0	1 (0,3)	NS

* Teste χ^2 foi usado para comparar os valores de prevalência de genótipo e alelo do polimorfismo VNTR entre os pacientes e controles. OR: *odds ratio*. NS: não significativo.

5.2.2.2. Associação entre polimorfismos da GP Iba e a gravidade da doença coronariana.

A maioria dos indivíduos, 287 entre os 350 casos com IAM (82%), sendo 132 do grupo 1 e 155 do grupo 2, foram avaliados por angiografia coronariana para a determinação do número de vasos com doença oclusiva grave, definida como obstrução de pelo menos 50% do lúmen vascular. Na Tabela 11 está demonstrada a distribuição dos diversos polimorfismos da GP Iba e a gravidade da doença coronariana. O estudo angiográfico foi normal em 26,5% (76 / 287) dos casos, o que está de acordo com dados obtidos em

outros estudos. A prevalência do genótipo CD foi maior entre os indivíduos com 2 ou 3 vasos acometidos quando comparados com aqueles sem oclusão grave ou restrita a 1 vaso apenas em ambos os grupos ($\chi^2_{\text{T}} = 4,65$; $P = 0,031$; OR: 4,0 em relação aos indivíduos com genótipo CD e sem alteração angiográfica no grupo 1 e $\chi^2_{\text{T}} = 4,94$; $P = 0,026$; OR: 4,0 no grupo 2). A prevalência do alelo D foi igualmente maior entre os indivíduos com doença oclusiva mais grave ($\chi^2_{\text{T}} = 6,43$; $P = 0,011$; OR: 4,14 no grupo 1 e $\chi^2_{\text{T}} = 5,49$; $P = 0,019$; OR: 3,47 no grupo 2). Em contraste, apenas no grupo 2 (sobreviventes de IAM), a prevalência do genótipo CC, assim como do alelo C, foi maior entre os indivíduos com doença menos extensa do que nos indivíduos com mais de dois vasos afetados ($\chi^2_{\text{T}} = 10,97$; $P = 0,0009$; OR: 0,18 para o genótipo CC e $\chi^2_{\text{T}} = 8,62$; $P = 0,003$; OR: 0,27 para o alelo C). Os indivíduos do grupo 2 apresentaram ainda diferença no genótipo BC, mais freqüente entre os pacientes com doença coronariana oclusiva mais intensa ($\chi^2_{\text{T}} = 4,44$; $P = 0,035$; OR: 3,39), no entanto esta diferença não foi observada para o alelo B ($P = 0,104$). Nenhuma diferença foi encontrada em relação à gravidade da doença coronariana oclusiva e os demais polimorfismos da GP Ibx estudados (sistema HPA-2 e da seqüência Kozak).

5.2.2.3. Os polimorfismos do sistema HPA-2 e da seqüência Kozak não estão associados com maior risco para IAM.

A prevalência dos distintos alelos e genótipos dos polimorfismos do HPA-2 (tabela 12) e do alelo -5C da seqüência Kozak (tabela 13), foi igualmente distribuída entre indivíduos com IAM e controles, nos dois grupos, não havendo nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 11. Distribuição do polimorfismo VNTR da GP Iba de acordo com a severidade da doença aterosclerótica detectada pela arteriografia coronariana nos pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM).

VNTR	Grupo 1						Grupo 2					
	Número de vasos afetados						Número de vasos afetados					
	0 vaso	1 vaso	2 vasos	3 vasos	P* (OR)	P* (OR)	0 vaso	1 vaso	2 vasos	3 vasos	P* (OR)	P* (OR)
Genótipo	n = 45 (%)	n = 39 (%)	n = 36 (%)	n = 12 (%)			n = 31 (%)	n = 75 (%)	n = 19 (%)	n = 30 (%)		
BB	1 (2,2)	0	0	0	—	—	0	2 (2,6)	0	0	—	—
BC	9 (20)	10 (25,6)	5 (13,9)	2 (16,7)	0,512	0,512	3 (9,7)	8 (10,7)	3 (15,8)	8 (26,7)	0,035 (3,39)	0,035 (3,39)
CC	33 (73,4)	26 (66,7)	22 (61,1)	8 (66,7)	0,335	0,335	25 (80,6)	56 (74,7)	13 (68,4)	13 (43,3)	0,0009 (0,18)	0,0009 (0,18)
CD	1 (2,2)	2 (5,1)	7 (19,4)	1 (8,3)	0,031 (4,0)	0,031 (4,0)	3 (9,7)	9 (12)	2 (10,5)	9 (30)	0,026 (4,0)	0,026 (4,0)
DD	1 (2,2)	1 (2,6)	1 (2,8)	1 (8,3)	0,426	0,426	0	0	1 (5,3)	0	—	—
BD	0	0	1 (2,8)	0	—	—	0	0	0	0	—	—
Alelo												
B	11 (12,2)	10 (12,8)	6 (8,3)	2 (8,3)	0,390	0,390	3 (4,8)	12 (8)	3 (7,9)	8 (13,3)	0,104	0,104
C	76 (84,5)	64 (82,1)	56 (77,8)	19 (79,2)	0,301	0,301	56 (90,3)	129 (86)	31 (81,6)	43 (71,7)	0,003 (0,27)	0,003 (0,27)
D	3 (3,3)	4 (5,1)	10 (13,9)	3 (12,5)	0,011 (4,14)	0,011 (4,14)	3 (4,8)	9 (6)	4 (10,5)	9 (15)	0,019 (3,47)	0,019 (3,47)

* P foi calculado usando a análise de χ^2 tendência linear em proporção para comparar os valores de genótipo e alelo de cada polimorfismo da GP Iba e severidade de doença aterosclerótica detectada pela arteriografia coronariana entre pacientes. OR, odds ratio relacionado ao resultado basal ou arteriografia coronária normal.

Tabela 12. Prevalência dos genótipos e alelos do polimorfismo do sistema HPA-2 entre pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.

	Grupo 1 (primeiro IAM)			Grupo 2 (sobreviventes de IAM)		
	Pacientes n = 170 (%)	Controles n = 170 (%)	P*	Pacientes n = 178 (%)†	Controles n = 180 (%)	P*
Genótipo						
aa	135 (79,4)	126 (74,1)	0,25	144 (80,9)	131 (72,8)	0,09
ab	33 (19,4)	43 (25,3)	0,19	32 (18)	48 (26,7)	0,06
bb	2 (1,2)	1 (0,6)	—	2 (1,1)	1 (0,5)	—
Alelo						
a	303 (89,1)	295 (86,8)		320 (89,9)	310 (86,1)	
b	37 (10,9)	45 (13,2)	0,41	36 (10,1)	50 (13,9)	0,15

*Teste χ^2 foi usado para comparar os valores de prevalência de genótipo e alelo do sistema HPA-2 entre os pacientes e controles.

† Em dois casos o genótipo do HPA-2 não pode ser determinado.

Tabela 13. Prevalência dos genótipos e alelos da sequência – 5C/T Kozak do gene da GP Iba entre pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles

	Grupo 1 (primeiro IAM)			Grupo 2 (sobreviventes de IAM)		
	Pacientes n = 168 (%)†	Controles n = 170 (%)	P*	Pacientes n = 174 (%)†	Controles n = 180 (%)	P*
Genótipo						
TT	132 (78,6)	126 (74,1)	0,40	122 (70,1)	130 (72,8)	0,75
TC	32 (19)	44 (25,9)	0,17	48 (27,6)	48 (26,7)	0,94
CC	4 (2,4)	0	0,06	4 (2,3)	2 (0,5)	0,44
Alelo						
T	296 (88,1)	296 (87,1)		292 (83,9)	308 (85,6)	
C	40 (11,9)	44 (12,9)	0,77	56 (16,1)	52 (14,4)	0,61

*Teste χ^2 foi usado para comparar os valores de prevalência de genótipo e alelo da sequência Kozak entre os pacientes e controles. NS: não significante.

† Em dois casos entre os pacientes do grupo 1 e seis casos entre os pacientes do grupo 2, o genótipo da sequência Kozak não pode ser determinada.

5.2.2.4. Haplótipos da GP Iba e o risco para IAM

Os diversos polimorfismos determinados neste estudo permitem a direta comparação com os estudos populacionais discutidos anteriormente. A distribuição dos haplótipos encontrados nos dois estudos caso-controle está representada na tabela 14. Os resultados demonstraram que o haplótipo mais comum entre os diversos grupos étnicos da população brasileira estudada,

Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC, foi igualmente presente entre os indivíduos com IAM e controles (grupo 1: 50,5% vs. 48,8%; grupo 2: 44,3% vs. 45,5%, respectivamente). Entretanto, em ambos os grupos indivíduos com IAM apresentaram maior frequência do haplótipo Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CD do que os controles (grupo 1: 7,1% pacientes vs. 1,2% controles; $P = 0,01$; OR: 6,46; 95% CI: 1,34 – 42,49 e grupo 2: 9,8% pacientes vs. 3,3%, controles; $P = 0,02$; OR: 3,14; 95% CI: 1,13 – 9,16). Nenhuma outra diferença significativa foi observada para os demais haplótipos.

Tabela 14. Frequência dos haplótipos dos polimorfismos da GP Iba entre pacientes com antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e controles.

		Grupo 1 (primeiro IAM)						Grupo 2 (sobreviventes de IAM)					
		Pacientes n = 168			Controles n = 170			Pacientes n = 174			Controles n = 180		
		seqüência Kozak			seqüência Kozak			seqüência Kozak			seqüência Kozak		
HPA-2	VNTR	TT	TC	CC	TT	TC	CC	TT	TC	CC	TT	TC	CC
bb	BB	1				1					2		1
bb	BC	1											
ab	BB												
ab	BC	24	4		36	6		21	3		35	10	
ab	BD		1					1			1		
ab	CC	2			1			3	4			1	
ab	CD	1								1			
aa	BC	1		1	1	2			3			3	1
aa	CC	85	25	3	83	31		77	30	4	82	29	1
aa	CD	12	2		2	4		17	8		6	5	
aa	CE										1		
aa	DD	5			3			1			3		
Total		132	32	4	126	44		122	48	4	130	48	2

VI. Discussão

6. Discussão

As plaquetas desempenham papel central na interface entre a hemostasia sangüínea e a inflamação, que são intimamente correlacionadas ao desenvolvimento da aterosclerose e controle da angiogênese.

As plaquetas aderem à superfície vascular através do receptor GP Ib-IX-V sendo que, o principal componente desse complexo é a GP Ib α . Neste estudo nós exploramos as alterações moleculares das diversas glicoproteínas do complexo GP Ib-IX-V em duas entidades clínicas, uma resulta da redução da função hemostática plaquetária normal (síndrome de Bernard-Soulier) e a outra decorrente do ganho da função plaquetária (aterosclerose e doença arterial oclusiva).

6.1. Caracterização molecular da SBS

A casuística discutida neste estudo não engloba todos os casos de macrotrombocitopenias em que a presença de megaplaquetas sugeriu o diagnóstico de SBS. Considerando a prevalência dessa doença 1 indivíduo afetado a cada 1 milhão de habitantes (BALDUINI et al., 2002) e a população da região de Campinas (~3 milhões de pessoas), os três casos de SBS apresentados neste estudo refletem razoavelmente o esperado para essa região do país. Atualmente a estimativa real da prevalência de casos de SBS tem sido motivo de grande debate. Acredita-se que vários casos não sejam diagnosticados corretamente e podem ser comumente interpretados como PTI refratária ao tratamento (LOPEZ et al., 1998). Somente casos de herança recessiva e clinicamente sintomáticos são, de fato, reconhecidos como SBS. Essas características foram recentemente desafiadas pela observação de que prevalência estimada de heterozigotos (1:500 indivíduos) pode gerar dois grupos de SBS, autossômica

recessiva (rara) e mais recentemente a forma comum autossômica dominante (SAVOIA et al., 2001), que comparativamente apresenta alta prevalência na Itália. Assim, a investigação clínica e laboratorial detalhada de casos de plaquetopenia com morfologia ou volume celular característicos de megaplaquetas, além da revisão de casos de PTI refratária, podem propiciar uma mais acurada determinação da prevalência de SBS.

Os genes que codificam as glicoproteínas ($Ib\alpha$, $Ib\beta$, IX e V) apresentam não só sua organização genômica, região promotora com seqüências para expressão tecidual específica semelhantes, mas também, as proteínas expressas são similares (proteínas ricas em leucina, com 60% de similaridade). Inicialmente foi sugerido que a estrutura compacta e simples dos genes das diversas glicoproteínas fosse menos susceptível à mutações espontâneas (figura 4). Esses genes estão distribuídos em três cromossomos distintos. Geralmente a expressão gênica originária deriva de um éxon e contém raros sítios CpG (*hot spot* para mutações em humanos). Além disso, todos os íntrons dessas glicoproteínas estão localizados na região 5' não-codificadora, o que dificulta a repercussão funcional de mutações, que resultam na remoção do sítios de excisão de RNAm, como por exemplo as mutações no gene da globina β (gene com apenas dois íntrons e três éxons) relacionadas à β -talassemia (OLIVIERI, 1999). Em conjunto esses dados sugerem que as mutações na SBS provavelmente resultem de mecanismos endógenos de mutagênese e que a consangüinidade familiar seria um fator determinante na identificação de indivíduos com SBS.

Do ponto de vista molecular, a interpretação atual da SBS pode também ser revisada. Estudos de Savoia e cols. (2001) e Sachs e cols. (2003) demonstraram que apenas duas mutações no gene da GPI $b\alpha$ (SAVOIA et al., 2001) ou da GPIX (SACHS et al.,

2003), explicam uma grande porcentagem de casos de SBS clinicamente sintomáticos e em famílias não relacionadas.

Apesar da amostra limitada de casos de SBS discutidas neste estudo, nós identificamos casos que podem colaborar para o entendimento dessa patologia complexa e que as bases moleculares ainda está em evolução.

6.1.1. Os três casos de SBS relatados neste estudo são decorrentes de mutações de ponto restritas à GP Ib

A base molecular de dois casos (1 e 2) representam a herança recessiva da SBS, decorrente de mutação em homozigose no gene da GP Ib α . A revisão das mutações da SBS relata 19 mutações espontâneas no gene da GP Ib α , o que representa 63% dos indivíduos não relacionados com mutação determinada no gene da GP Ib α , ou 46% de todas as mutações relacionadas a SBS.

A mutação Cys209 $\rightarrow$ Ser observada no caso 1, afeta a região funcional da proteína GP Ib α , presente na região C-terminal, onde há a formação de dois *loops* maiores, formados por uma das duas ligações dissulfídicas envolvendo o resíduo de cisteína, aqui a Cys209 – Cys248 foi acometida. Essa mutação já foi descrita em outros pacientes de origem européia (GONZALEZ-MANCHON et al., 2001; SIMSEK et al., 1994b). A perda da expressão da GP Ib α , demonstrado pela citometria de fluxo e a diminuição (mas não ausência) da GP IX da membrana plaquetária, estão de acordo com dados obtidos em outros pacientes com a mesma mutação. Isto sugere que a perda da ligação dissulfídica entre os resíduos Cys209 – Cys248 é essencial para manter a integridade da molécula GP Ib α . Os resíduos de cisteína são extremamente

conservados entre as proteínas ricas em leucina do complexo Ib-IX-V, assim como quando comparadas com outras proteínas da mesma família mas de diferentes espécies (LOPEZ et al., 1998). Assim mutações nos resíduos de cisteína são provavelmente pouco toleradas nas proteínas ricas em leucina.

Uma mutação não descrita anteriormente em pacientes com SBS foi identificada no caso 2. A mudança de Leu115→Pro afeta a região das repetições ricas em leucina da região N-terminal globular da GP Ib α . Comumente regiões ricas em leucina estão envolvidas na interação entre proteínas-proteínas ou proteínas-matrix extracelular. Assim, esses resíduos quando substituídos por outros aminoácidos, resultam na perda da função da proteína. Essa mudança de aminoácido pode afetar não só o caráter hidrofóbico, pois a leucina é 25% mais hidrofóbica que a prolina, mas também a conformação da proteína, uma vez que a leucina é comumente associada a formações de torções na proteína. A SBS já foi relacionada a outras mutações envolvendo a troca de uma leucina por prolina, tendo sido relatadas mutações tanto no gene da GP Ib α , onde três casos não relacionados apresentaram esta troca na posição 129 (ANTONUCCI et al., 2000; KOSKELA et al., 1999; LI et al., 1995), como no gene da GP IX, na posição 7 (LANZA et al., 2002) e 40 (NORIS et al., 1998).

No caso 3 a SBS foi decorrente da troca de base T→G no códon iniciador ATG do gene da GP Ib β , levando à substituição -25Met → Arg em heterozigose no gene da GP Ib β . O indivíduo afetado apresenta população homogênea de megaplaquetas e a citometria de fluxo demonstrou ausência da expressão da GP Ib α e da GPIX na membrana plaquetária. A mutação no códon iniciador ATG é comumente associada à ausência de expressão do gene *upstream*, por exemplo, nos genes da globina β (β -

talassemia 0) (JANKOVIC et al., 1990) ou α -globina (α -talassemia) (PIRASTU et al., 1984). Dados experimentais sugerem que a subunidade GP Ib β é crítica para manter a ligação entre a GP Ib α e a GP IX. Além disso estudos de expressão heterólogos demonstraram que a GP Ib β e a GP IX parecem estabilizar a GP Ib α prevenindo a degradação intracelular da proteína (KENNY et al., 1999).

O estudo familiar mostrou que indivíduos assintomáticos com a mesma mutação apresentam população mista, com megaplaquetas e plaquetas de tamanho normal, sendo que ao contrário da paciente, a expressão quantitativa das GP Ib α e GP IX pela citometria de fluxo foi normal.

A presença de megaplaquetas na SBS pode ser compreendida pelo tipo de associação que há entre o complexo GP Ib-IX-V e o citoesqueleto plaquetário. Um dos componentes do citoesqueleto da membrana das plaquetas é o ABP, ou também denominado filamina. Este componente possui uma ligação direta ao complexo GP Ib-IX. Como há falha nesta ligação, as plaquetas no SBS, não só perdem sua forma discoíde, como também, apresentam aumento do seu volume e maior deformabilidade que as plaquetas de indivíduos normais (LOPEZ, 1994).

Baseado em outros estudos de pacientes com SBS (KENNY et al., 1999) e mais recentemente na caracterização do camundongo *knockout* para a GP Ib β (KATO et al., 2004), fica claro que a deficiência isolada da GP Ib β é suficiente para a formação de megaplaquetas. No entanto, a grande discrepância entre o genótipo e o fenótipo da paciente e dos familiares, reside em dois fatos: (a) expressão clínica de sangramentos e (b) ausência da expressão das GP Ib α e GP IX, por citometria de fluxo.

O caso 3 poderia ser analisado na linha corrente atual que visa interpretar a SBS como uma doença autossômica dominante com penetrância incompleta (BALDUINI et al.,

2002), e os casos 1 e 2 como exemplos de casos raros de SBS onde os indivíduos são homozigotos para o alelo mutante. No caso 3, a pesquisa para outras doenças como deficiência de von Willebrand ou deficiência de fatores da coagulação, descartaram esses diagnósticos (dados não mostrados). É claro que avaliar todos os outros moduladores da expressão fenotípica da doença exige também, determinar alterações que não são facilmente identificadas com métodos laboratoriais de rotina. Assim como estudos detalhados da fibrinólise e mesmo a presença concomitante de alterações relacionadas a quadros de hipercoagulabilidade, como o fator V Leiden e a mutação da protrombina 20210A, que parecem estar relacionados com a melhora do quadro clínico hemorrágico, como sugerido entre pacientes hemofílicos (VAN DIJK et al., 2004). Por outro lado, enquanto a busca de modificadores da gravidade da SBS poderia ser ainda investigada para explicar a diferença clínica, esses dados não explicariam a deficiência de expressão das GP Ib α e GP IX detectada por citometria de fluxo.

A GP Ib β é o componente mais importante para manter a interação entre a GP Ib α e GP IX. Estudos de transfecção de células *in vitro* demonstraram que é possível formar polipeptídeos entre GP Ib α e GP Ib β e entre GP Ib β e GP IX; mas não entre GP Ib α e GP IX na ausência de GP Ib β (LOPEZ et al., 1998). Dessa forma, a redução significativa da expressão da GP Ib α e GP IX na paciente e a mutação da GP Ib β sugerem relação causal.

Outra possibilidade é que existam mutações na GPV (atualmente em andamento em nosso laboratório), e conseqüente instabilidade do complexo GP Ib-IX-V. Essa hipótese é remota, pois até o momento não foi identificada nenhuma mutação no gene da GPV em casos de SBS (KENNY et al., 1999). Além disso, a GPV não é crítica para a expressão da GP Ib-IX (LOPEZ et al., 1998). Mas a participação da GPV em mediar a

resposta plaquetária à trombina, justifica excluir anormalidades neste componente do complexo plaquetário.

Uma segunda possibilidade para justificar a diferença entre a paciente e seus familiares é a haploinsuficiência por micro-deleções de regiões que codificam as diferentes glicoproteínas. Casos distintos de mutações na GPIIb β com deleções do outro alelo exemplificam casos de hemizigose na SBS (BUDARF et al., 1995; KENNY et al., 1999; LUDLOW et al., 1996; NAKAGAWA et al., 2001).

No caso 3, nós identificamos a presença de dois alelos da GP Ib α (cromossomo 17) e da GP Ib β (cromossomo 22) por determinação de seqüências polimórficas comumente encontradas nesses genes. No entanto, não há polimorfismos comuns descritos nos genes da GPIX ou GP V, ambos localizados no braço longo cromossomo 3 (3q21 e 3q29, respectivamente). Assim, para excluir a possibilidade de micro-deleções dessas regiões nós pretendemos realizar a avaliação citogenética por método de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), pois a análise do cariótipo, por metodologia convencional não tem sensibilidade adequada. Essas regiões do cromossomo 3 são de grande interesse, pois contêm vários genes que podem estar relacionados à megacariocitopoiese. É interessante notar, que rearranjos cromossômicos envolvendo a região cromossômica 3q21 foi associada ao desenvolvimento de leucemia mielóide aguda (LMA) e/ou síndrome mielodisplásica onde ao diagnóstico o número de plaquetas é normal ou elevado (LAHORTIGA et al., 2004). Chang e cols. (2002) relataram um caso de LMA *de novo* com trombocitose (contagem de plaquetas superior a $3.500 \times 10^9/L$) e presença de freqüentes megaplaquetas, em que na região 3q21 foi identificada em uma nova translocação cromossômica (CHANG et al., 2003). Além disso, a região 3q21 também engloba o gene do GATA-2, importante na regulação da

diferenciação eritropoiese e megacariocitopoiese (LAHORTIGA et al., 2004). Na região cromossômica 3q29 em humanos foi recentemente identificado o gene de uma nova proteína ricas em leucina, denominada Lib, que é muito semelhante a GP V. A indução da expressão de Lib resulta no desenvolvimento de lesões β -amilóide (em ratos) encontrada no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (SATO et al., 2002). Estão planejados estudos para determinar a expressão de todos os componentes do complexo GP Ib-IX-V por Western blot do lisado celular e também da determinação da expressão gênica por RT-PCR. A caracterização molecular e fenotípica desse caso poderá revelar dados importantes envolvidos na regulação do complexo GP Ib-IX-V. Em conjunto os três casos de SBS aqui descritos demonstram a heterogeneidade clínica e molecular das deficiências das glicoproteínas plaquetárias. Até o momento, 41 mutações distintas relacionadas à SBS foram descritas e nossos casos adicionarão novas mutações nos genes da GP Ib α e da GP Ib β .

Interessante notar que um dos casos foi inicialmente diagnosticado PTI refratária à corticoterapia e somente anos após, o diagnóstico de SBS foi definido. O que reforça a necessidade de maiores estudos nessa. Assim, a caracterização molecular de outros casos de SBS em nosso meio é importante para revelar se há semelhança dos estudos realizados na Itália (SAVOIA et al., 2001) e na Alemanha (SACHS et al., 2003) e se um número restrito de mutações possam ser associados à SBS e assim propiciar a base racional para o rastreamento de provável SBS entre pacientes com PTI refratária.

6.2. Distribuição dos polimorfismos da GP Ib α nas diversas populações

Entre os polimorfismos descritos na GP Ib α , três apresentam maior relevância por influenciarem a expressão e/ou função deste receptor (AFSHAR-KHARGHAN et al.,

1999; CADROY et al., 2001; JILMA-STOHLAWETZ et al., 2003; KASKI et al., 1996). Estes polimorfismos, na posição -5 C/T da seqüência Kozak, HPA-2 e VNTR do gene da GP Iba, apresentam distribuição variada entre os indivíduos com ascendência étnica distinta (ARAMAKI e REINER, 1999; CORRAL et al., 1998; LOPEZ et al., 1992; SIMSEK et al., 1994a).

A população brasileira representa uma das populações com maior variação étnica. A colonização européia, a população indígena local e a presença das diversas populações africanas vindas ao Brasil durante o período da escravidão, deram origem a uma diversidade étnica entre os brasileiros, fazendo com que muitas vezes as características fenotípicas raciais, como cor da pele, olhos, cabelos, sejam insuficientes na determinação da influência étnica entre estes indivíduos (PARRA et al., 2003).

Considerando a influência observada pelos polimorfismos presentes na GP Iba no mecanismo da doença arterial oclusiva, foi objetivo deste estudo determinar a distribuição dos polimorfismos da seqüência Kozak e VNTR e associado aos dados anteriormente descritos para o HPA-2 (CASTRO et al., 1999), determinar os haplótipos possíveis da GP Iba, em três grupos étnicos distintos, provenientes de regiões distintas do Brasil: caucasóides, da região de Campinas - SP; descendentes de africanos, da região de Salvador - BA e indígenas da Amazônia Oriental.

Pudemos observar que, quando comparados os indivíduos do grupo negróide aos do grupo caucasóide, apenas o genótipo VNTR-BC, mais freqüente no grupo negróide (26% vs. 16%, respectivamente), mostrou diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($P < 0.02$). No entanto, a freqüência alélica das distintas variantes do polimorfismo VNTR, incluindo VNTR-B e VNTR-C, não foi diferente entre estes dois grupos. Além disto, assim como observado para o HPA-2, anteriormente determinado

nestes mesmos indivíduos (CASTRO et al., 1999), os genótipos e alelos da GP Ibx na posição -5 C/T da sequência Kozak, foram igualmente distribuídos entre os indivíduos destes dois grupos.

Esta mesma diferença também pôde ser observada quando comparamos o grupo brasileiro caucasóide aos negros norte americanos (ARAMAKI e REINER, 1999; LOPEZ et al., 1992), conforme mostrado no anexo 1. No entanto, ao comparar caucasóides do Brasil aos da Europa e América do Norte, não houve diferença, exceto ao grupo de indivíduos europeus descritos por Simsek, e cols. (SIMSEK et al., 1994a), com maior prevalência do alelo VNTR-B. No entanto, neste grupo europeu, a diferença na frequência do alelo VNTR-B, foi estatisticamente significativa não só ao ser comparada ao grupo de caucasóides do Brasil, descritos neste estudo, assim como aos caucasóides austríacos e norte americanos (LOPEZ et al., 1992); finlandeses (KASKI et al., 1996) e espanhóis (CORRAL et al., 1998).

No grupo indígena brasileiro estudado, da tribo Tupi Parakanã, a prevalência dos alelos VNTR-C e Kozak -5C, foi maior quando comparado aos grupos brasileiros caucasóide e negróide. Particularmente sobre o polimorfismo VNTR é interessante notar que o alelo VNTR-D, presente entre brasileiros caucasóides e negróides, está ausente no grupo indígena, o que pode explicar em parte o predomínio do VNTR-C neste grupo, uma vez que as variantes VNTR-B, têm frequência alélica semelhante entre os três grupos (0,109; 0,158 e 0,119 entre caucasóides, negróides e Parakanãs, respectivamente). Além disto, o alelo VNTR-A não foi encontrado em nenhum grupo.

Quando comparamos a frequência destes polimorfismos entre o grupo Parakanã e as demais populações anteriormente estudadas, é interessante notar que a prevalência do dimorfismo Kozak é semelhante entre o grupo indígena brasileiro e populações

orientais como japoneses e coreanos (AFSHAR-KHARGHAN et al., 1999; ISHIDA et al., 2000). No entanto, a prevalência das diversas variantes possíveis para o VNTR, difere entre o grupo indígena aqui estudado e as demais populações, sobretudo pela ausência das variantes VNTR-D e VNTR-A, esta última predominantemente presente numa frequência entre 8 a 15% em populações orientais (ISHIDA et al., 1995; ISHIDA et al., 2000; MOROI et al., 1984). É provável que a frequência alélica para o polimorfismo VNTR do gene da GP Ib α entre os Parakanãs, particularmente distinto aos outros resultados encontrados, seja decorrente de uma variação gênica influenciada por uma tendência genética ou uma pressão seletiva específica da região e em grande parte devido a alta incidência de casamentos consangüíneos nessa população (CAVALLI-SFORZA et al., 1988).

6.2.1. Distribuição dos haplótipos do gene da GP Ib α nas diversas populações étnicas

É descrito que os polimorfismos HPA-2 e VNTR do gene da GP Ib α estão em ligação de desequilíbrio. Assim, a presença dos alelos com maior número de cópias do VNTR (VNTR-A e VNTR-B) estão associados ao HPA-2b (de menor frequência), enquanto as variantes VNTR-C e VNTR-D estão associadas ao HPA-2a (LOPEZ et al., 1992; SIMSEK et al., 1994a).

No entanto, ao analisarmos a prevalência dos polimorfismos -5C/T Kozak, HPA-2 e VNTR do gene da GP Ib α (tabela 7), foi possível determinar a presença de até dez haplótipos distintos entre os casos informativos. Neste estudo, o haplótipo mais freqüente encontrado (~40%) foi Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC, tanto entre o grupo caucasóide como entre o grupo negróide. No entanto entre os indivíduos do grupo de

Parakanãs, os haplótipos Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC e Kozak-TC/HPA-2aa/VNTR-CC estão presentes na mesma proporção.

Em 10% destes casos, encontramos a associação HPA-2b/VNTR-C, presente em: 6 % caucasóide, 14% negróide e 10% indígena. Interessante notar, que a prevalência do haplótipo HPA-2b/VNTR-C, entre negros foi seis vezes maior que os 2,2% anteriormente relatado entre negros norte americanos (ARAMAKI e REINER, 1999).

A associação HPA-2a/VNTR-B já havia sido anteriormente descrita em cerca de 6% entre caucasóides espanhóis e negros norte americanos (ARAMAKI e REINER, 1999; CORRAL et al., 1998). Neste estudo, encontramos este haplótipo em 5% dos negros e 1% entre os caucasóides.

Portanto, assim como observado em outras populações estudadas (ARAMAKI e REINER, 1999; CORRAL et al., 1998), a ligação em desequilíbrio descrita entre os polimorfismos HPA-2 e VNTR do gene da GP Ib α não é completa. Neste estudo foi possível ainda observar que os haplótipos incomuns estão presentes nas três amostras populacionais brasileiras estudadas, ou seja, caucasóides, negros e indígenas.

6.2.2. A presença do raro alelo VNTR-E não altera as características plaquetárias morfológicas ou funcionais.

De grande interesse neste estudo foi a identificação de dois indivíduos caucasóides, não relacionados, que apresentaram o raro alelo VNTR-E. Este mesmo alelo havia sido descrito por Muckian e cols. (2000), em associação à variante VNTR-C em um único indivíduo caucasóide (MUCKIAN et al., 2000).

Nenhuma alteração morfológica ou funcional foi observada entre estes indivíduos, ou seus familiares portadores do alelo VNTR-E, embora tenha sido avaliado apenas em heterozigose.

Neste estudo foi possível pela primeira vez, o seqüenciamento deste alelo com sucesso. Em ambos os casos, entre os quais não foi possível estabelecer nenhum grau de parentesco, foi identificado um polimorfismo neutro do aminoácido Pro395 (mudança de A para G na posição 4301).

6.3. Nova possibilidade evolutiva para o aparecimento dos polimorfismos da GP Ib α

Inicialmente, um modelo evolutivo para o aparecimento dos polimorfismos da GP Ib α foi proposto. Neste modelo foi sugerido que os alelos possíveis do VNTR atualmente reconhecidos, com até quatro cópias, eram decorrentes da adição de cópias extras de 39 pb ao alelo de cópia única (VNTR-D), formando assim as variantes maiores (ISHIDA et al., 1995; LOPEZ et al., 1992; SIMSEK et al., 1994a).

Neste estudo, pudemos observar que em duas espécies de primatas, próximas aos humanos, gorila e chimpanzé, o polimorfismo VNTR estava presente em homozigose em sua maior variante, ou seja, o alelo A com quatro cópias de 39 pb. Os dois animais apresentaram o genótipo Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-AA e portanto ao contrário do que é reconhecido em humanos (ISHIDA et al., 1995), em primatas o alelo VNTR-A está em ligação ao alelo HPA-2a.

Nossa hipótese evolutiva para o aparecimento das diversas variantes para o VNTR, como é hoje observado, é ao contrário da adição de cópias extras entre os humanos, a perda progressiva destas cópias. Nesta situação, consideramos que o alelo A é de fato

a variante mais antiga, assim como observado nas amostras de DNA de gorila e chimpanzé. Interessante notar que foi recentemente proposto por Osawa e cols. (OSAWA et al., 2003), uma hipótese semelhante para a origem evolutiva de um outro polimorfismo do tipo VNTR que está presente no gene da cistatina B, associado a uma forma progressiva de epilepsia mioclonal em humanos. Osawa e cols. descreveram que primatas não humanos possuem variantes do VNTR em maior número de cópias também no gene da cistatina B. Assim é provável que em espécies de primatas não humanos, os genes sejam relativamente estáveis e há pouca alteração entre membros de espécies próximas, mesmo considerando regiões mais susceptíveis à variação, como é o caso das regiões que contenham os polimorfismos do tipo VNTR. Por outro lado, é provável que estas variantes maiores sejam menos estáveis entre humanos, sobretudo em raças diferentes, levando à perda progressiva de suas cópias durante o processo evolutivo humano.

6.4. Polimorfismos da GP I β e o risco para o desenvolvimento do IAM

É estimado que no Brasil 350.000 indivíduos sofrem IAM ao ano. Em um recente levantamento publicado por Mansur e cols. (2002), a média do coeficiente de mortalidade anual relacionada à IAM em nosso país, entre os anos de 1979 a 1996 foi de cerca de 150 / 100.000 habitantes com idade ≥ 30 anos (MANSUR ADE et al., 2002).

A completa e rápida reperfusão da circulação coronária após um episódio de IAM está associada com a melhora da sobrevida. Segundo dados obtidos através do registro realizado em quatorze países através do GRACE (*Global Registry of Acute Coronary Events*) a mortalidade relacionada à doença coronariana nos primeiros seis meses

após o evento é atualmente de 4,8% (EAGLE et al., 2004).

Devido à heterogeneidade da população brasileira, é possível que a ampla diversidade genética encontrada em nossa população, possa apresentar riscos distintos para o desenvolvimento de patologias com múltiplos fatores etiológicos relacionados, como acontece com a doença arterial oclusiva.

Tendo como modelo o que foi observado para doença trombótica venosa, onde a presença de alterações genéticas está intensamente relacionada ao risco de trombose venosa e suas complicações, nos últimos anos vários estudos buscaram correlacionar distintos marcadores genéticos também para o risco do desenvolvimento de DAO. Neste contexto, sem dúvida as plaquetas aparecem como candidatas, pois participam ativamente não só fisiologicamente na formação do trombo, como também devido sua inter-relação ao sistema inflamatório, na fisiopatologia da aterosclerose.

De fato, diversos estudos buscaram correlacionar os polimorfismos envolvendo as glicoproteínas de membrana plaquetárias, entre elas a GP Ib α e o risco para doença arterial oclusiva. No entanto, nem sempre foi possível estabelecer esta correlação, como pode ser observado no anexo 2.

Sendo assim considerando a diversidade genética encontrada em nossa população, incluindo a prevalência dos polimorfismos presentes na GP Ib α , como discutido anteriormente, foi objetivo deste estudo correlacionar três polimorfismos presentes na GP Ib α ; seqüência Kozak, HPA 2 e VNTR e o risco do desenvolvimento de doença coronariana oclusiva. Foi optado pela realização de um estudo caso-controle, incluindo indivíduos que haviam apresentado episódio prévio de IAM e controles da população normal, pareado por sexo, idade e raça. Com o intuito de evitar a seleção prévia de casos com melhor prognóstico, excluindo casos que pudessem ter maior morbidade

relacionada ao episódio de IAM, este estudo foi dividido em dois grupos, de acordo com a história clínica destes indivíduos. Em um primeiro grupo foram incluídos apenas indivíduos não correlacionados, logo após terem sofrido o primeiro episódio de IAM, ou seja, neste grupo foram reconhecidos como casos recentes de IAM, sem antecedente prévio de outro episódio. No segundo grupo foram incluídos indivíduos não correlacionados que haviam apresentado um ou mais episódios de IAM, sendo o último episódio há mais de seis meses do momento da inclusão e portanto reconhecidos como “sobreviventes” à história prévia de IAM.

O genótipo VNTR-CD foi estatisticamente mais freqüente entre os pacientes com IAM que entre os controles nos dois grupos estudados. No grupo onde os casos foram incluídos logo após o primeiro episódio de IAM, o alelo D foi também estatisticamente mais freqüente entre os pacientes, embora isso não tenha sido observado no grupo 2, onde os indivíduos são “sobreviventes” de episódios de IAM. Uma hipótese é que os indivíduos com o alelo VNTR-D, possam apresentar doença oclusiva mais grave e portanto com maior índice de mortalidade, diminuindo sua prevalência entre os indivíduos do grupo 2. De fato, ao analisar a gravidade da doença coronariana oclusiva entre pacientes dos dois grupos, baseada no número de vasos com obstrução de pelo menos 50% do lúmen, novamente o alelo D foi estatisticamente mais freqüente entre os indivíduos com doença mais grave.

Simultaneamente, o genótipo VNTR-CC, assim como o alelo VNTR-C, foram mais prevalentes entre os indivíduos do grupo 2 com doença oclusiva menos grave, ou seja, com menor número de vasos acometidos e que sobreviveram aos episódios de IAM. Isto sugere um potencial efeito “protetor” deste alelo. Esta observação está de acordo com o recente relato de Afshar-Kharghan e cols. (AFSHAR-KHARGHAN et al., 2004)

que encontraram uma baixa frequência do alelo VNTR-C entre norte-americanos descendentes de africanos com DCO, sugerindo também neste grupo, um efeito “protetor”. Embora a correlação entre alelo VNTR-D, com apenas uma cópia da sequência de 39 bp e IAM seja diferente do que foi observado em estudos anteriores, onde foi sugerido que doença arterial oclusiva estaria relacionada à presença do alelo VNTR-B, com três cópias (GONZALEZ-CONEJERO et al., 1998; MURATA et al., 1997), os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com dados obtidos em análises funcionais dos polimorfismos da GP Ib α .

Primeiramente Afshar-Kharghan e cols. descreveram que a presença do alelo -5C na sequência Kozak está relacionada ao aumento da expressão da GP Ib α na membrana plaquetária, tanto em células transfectadas, como em plaquetas de humanos com a presença deste alelo (AFSHAR-KHARGHAN et al., 1999). Posteriormente, Cadroy e cols. (CADROY et al., 2001) observaram em um modelo *ex vivo* do fluxo sanguíneo arterial, onde foram avaliados quarenta indivíduos considerados controles normais para doença arterial oclusiva, que a presença do haplótipo Kozak-TT da GP Ib α , sob condições fisiológicas de fluxo arterial (650 s⁻¹) estava relacionado com menor capacidade de adesividade que o haplótipo Kozak-CT. Mas em fluxo arterial alto, como observado em condições fisiopatológicas por estenose destes vasos (2600 s⁻¹), nenhum dos polimorfismos da GP Ib α estudados, VNTR e Kozak, mostraram diferença funcional, apenas o polimorfismo 807C-T na GP Ia evidenciou esta diferença. Embora seja importante notar que esse estudo tenha sido conduzido com número reduzido de indivíduos e não tenham sido incluídos homozigotos para alelos Kozak-C ou VNTR-D. No entanto, mais recentemente Jilma-Stohlawetz e cols. (JILMA-STOHLAWETZ et al., 2003) num estudo funcional envolvendo 233 indivíduos saudáveis, observaram que sob

condições de alto fluxo, semelhante ao observado em locais de estenose arterial, a adesividade plaquetária era de 15 a 20% maior entre os indivíduos portadores dos genótipos Kozak-TT ou VNTR-CD quando comparadas às demais variantes da GP Iba. Os resultados obtidos com estes estudos funcionais justificam tanto os dados observados entre o grupo de pacientes aqui apresentados, como descrito por Kenny e cols. (KENNY et al., 2002) que observou a maior frequência do alelo VNTR-D entre indivíduos com angina instável que sofreram IAM, que aqueles que apresentavam angina instável, mas sem registro de episódio prévio de IAM.

Neste estudo, a avaliação dos outros dois polimorfismos da GP Iba, sequência Kozak e HPA-2, não mostraram associação direta com risco de IAM. É importante notar, que no grupo 1 os únicos quatro indivíduos homozigotos para o alelo -5C Kozak pertenciam ao grupo dos pacientes e no grupo 2 este mesmo genótipo, Kozak-CC estava representado duas vezes mais entre os pacientes. No entanto, novamente com número restrito de casos, apenas quatro pacientes e dois controles. Embora a análise da frequência alélica do -5C Kozak, não tenha evidenciado diferença, esta maior frequência do genótipo Kozak-CC entre os pacientes pode ser sugestiva de uma influência no risco para IAM, apesar de ser evidente a necessidade da análise de um maior número de casos.

Apesar dos inúmeros estudos já realizados correlacionando polimorfismos de diversos genes distintos e doença arterial oclusiva, a doença aterosclerótica, que é a causa fisiopatológica mais comum nessa situação, parece de fato ser resultado da interação entre diversos fatores, incluindo de causa genética, em consequência aos hábitos pessoais e ambientais (EPSTEIN et al., 1999). No entanto, assim como proposto recentemente por Yamada e cols. (YAMADA et al., 2002) o desenvolvimento de uma

base de dados incluindo diversos polimorfismos simultaneamente para a correlação com a susceptibilidade à doença coronariana, parece ser a melhor forma de se avaliar os fatores genéticos envolvidos. Mesmo assim, o modelo ideal para este tipo de investigação será ainda mais útil, se for aplicado a várias populações distintas. Estes dados poderão contribuir no futuro ao desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, assim como identificar medidas preventivas neste tipo de patologia.

6.4.1 Avaliação da predisposição genética para doença arterial oclusiva (DAO)

As doenças arteriais oclusivas em pacientes jovens brasileiros são de alta morbidade e mortalidade. Além disso, o impacto social que decorre da incapacitação desses indivíduos jovens pode ser facilmente estimada. Assim, reconhecer as pessoas com alto risco para essas doenças vasculares é crítico para oferecer opções terapêuticas e preventivas mais efetivas.

Nas trombooses venosas em pacientes jovens, apenas duas mutações (fator V de Leiden e protrombina 20210A) explicam pelo menos 30% dos casos não selecionados. No entanto, nas doenças arteriais ficou claro nos últimos anos que identificar os fatores de riscos hereditários obrigará a investigação de vários genes. De fato, ao relacionar fatores de risco presentes em uma determinada população para outra com etnia distinta é observado em algumas situações resultados inconclusivos. Yamada e cols. (2002) identificaram por microarrays genes relacionados à DAO, através de um grande estudo realizado entre japoneses após episódio de IAM e população controle local (YAMADA et al., 2002). No entanto, quando os mesmos genes foram estudados na população italiana, não houve relação com a presença de doença vascular (MANNUCCI et al., 2003).

Os estudos aqui relatados podem ser interpretados em duas fases da abordagem epidemiológica dos pacientes com DAO. Inicialmente, é possível propor que os polimorfismos da GP Iba podem ser incluídos entre os genes relacionados à DAO na nossa população, não isoladamente, mas em conjunto aos outros tais como os polimorfismos presentes nos genes da enzima metil-tetra hidrofolato redutase (MTHFR) (ARRUDA et al., 1997; VOETSCH et al., 2000), do FXIII (FRANCO et al., 2000), das apolipoproteínas (IZAR et al., 2003; MANSUR et al., 2000), entre outros.

Esses genes podem ser utilizados para a construção de microarrays em que talvez seja possível estratificar o risco para determinada DAO e/ou resposta ao tratamento. Desta forma, poderá ser possível minimizar a ocorrência de DAO e direcionar o tratamento “individualizado” para os casos. O objetivo final dessa abordagem é diminuir a morbidade e mortalidade das doenças vasculares, principalmente entre indivíduos jovens da nossa população. Essas doenças assolam sobremaneira mulheres jovens e principalmente de classe econômica desfavorável (DUNCAN et al., 1992; SIQUEIRA NETO et al., 1996) e especialmente em áreas rurais, a educação e saúde das crianças depende quase que exclusivamente da força de trabalho feminino.

Programas populacionais deste tipo serão fundamentais para a seguridade social e econômica do país, onde o aumento da expectativa de vida, o envelhecimento da população brasileira e a morbidade das doenças vasculares em jovens oferecem um cenário desfavorável para o crescimento do país.

VII. Conclusões

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, concluímos que:

Objetivo 1. Investigação molecular com análise dos genes do complexo GP Ib(α e β)-IX-V, em indivíduos com SBS.

- A confirmação do diagnóstico de SBS foi determinada em três pacientes. Dois casos apresentaram herança de caráter autossômico recessivo, com a presença de mutação de ponto em homozigose em regiões altamente conservadas do gene da GP Ib α . Uma nova mutação na região rica em leucina (Leu115→Pro) foi identificada no caso 2, enquanto o caso 1 revelou a mudança de Cys209 → Ser. No terceiro indivíduo foi identificada uma mutação em heterozigose no códon iniciador do gene da GP Ib β (-25Met→Arg). A diferença fenotípica e clínica deste caso em relação aos familiares portadores da mesma alteração, poderá revelar que outros mecanismos reguladores do complexo GP Ib-IX-V possam estar envolvidos na ocorrência da SBS.

Objetivo 2. Determinação da frequência gênica e de haplótipos dos três principais polimorfismos presentes no gene da GP Ib α , em três grupos étnicos brasileiros distintos.

- A avaliação de três grupos étnicos brasileiros (caucasóide, negróide e indígena) evidenciou a presença de dez haplótipos distintos do gene da GP Ib α , em relação a presença dos polimorfismos: sequência Kozak, HPA-2 e VNTR. Embora anteriormente fosse descrita a presença de uma ligação de desequilíbrio entre os polimorfismos VNTR e HPA-2, neste estudo esta ligação não foi completa em cerca de 10% dos indivíduos de todos os três grupos. Foi ainda possível, a identificação de dois indivíduos com a variante rara VNTR-E.

- A partir da genotipagem para os polimorfismos presentes no gene da GP Ib α , de duas espécies de primatas não humanos, foi possível sugerir um novo mecanismo evolutivo para o surgimento das variantes do gene da GP Ib α , onde diferentemente do proposto anteriormente, acreditamos que o alelo VNTR-A, com maior número de cópias, tenha precedido os demais alelos e com a perda sucessiva destas cópias, as variantes menores foram surgindo.

Objetivo 3. Determinação da frequência gênica e de haplótipos dos três principais polimorfismos presentes no gene da GP Ib α , entre indivíduos que sofreram IAM e grupo controle (estudo caso-controle).

- O genótipo VNTR-CD, assim como o alelo D, foi mais freqüente entre os pacientes com IAM que entre os controles. A análise da gravidade da doença coronariana oclusiva, baseada no número de vasos com obstrução de pelo menos 50% do lúmen, mostrou um aumento significativo da prevalência do alelo D entre os indivíduos com doença mais grave. Estes dados correlacionam com recentes estudos funcionais de plaquetas de indivíduos com o genótipo VNTR-CD. Além disso foi possível identificar o genótipo VNTR-CC está relacionado a menor gravidade da doença oclusiva, o que também colabora com recentes dados entre outras populações.

VIII. Referências

8. Referências

- AFSHAR-KHARGHAN, V.;LI, C.Q.;KHOSHNEVIS-ASL, M.;LOPEZ, J.A. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. **Blood**, 94: 186-91, 1999.
- AFSHAR-KHARGHAN, V.;MATIJEVIC-ALEKSIC, N.;AHN, C.;BOERWINKLE, E.;WU, K.K.;LOPEZ, J.A. The variable number of tandem repeat polymorphism of platelet glycoprotein Ibalpha and risk of coronary heart disease. **Blood**, 103: 963-5, 2004.
- ALBERTI, K.G.;ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, 15: 539-53, 1998.
- ANDREWS, R.K.;BERNDT, M.C. Platelet physiology: in cold blood. **Curr Biol**, 13: R282-4, 2003.
- ANTONUCCI, J.V.;MARTIN, E.S.;HULICK, P.J.;JOSEPH, A.;MARTIN, S.E. Bernard-Soulier syndrome: common ancestry in two African American families with the GP Ib alpha Leu129Pro mutation. **Am J Hematol**, 65: 141-8, 2000.
- ARAMAKI, K.M.;REINER, A.P. A novel isoform of platelet glycoprotein Ib alpha is prevalent in African Americans. **Am J Hematol**, 60: 77-9, 1999.
- ARRUDA, V.R.;VON ZUBEN, P.M.;CHIAPARINI, L.C.;ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.;COSTA, F.F. The mutation Ala677-->Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb Haemost**, 77: 818-21, 1997.
- BAKER, R.I.;EIKELBOOM, J.;LOFTHOUSE, E.;STAPLES, N.;AFSHAR-KHARGHAN, V.;LOPEZ, J.A.;SHEN, Y.;BERNDT, M.C.;HANKEY, G. Platelet glycoprotein Ibalpha Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke. **Blood**, 98: 36-40, 2001.
- BALDUINI, C.L.;IOLASCON, A.;SAVOIA, A. Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy. **Haematologica**, 87: 860-80, 2002.

BERNARD, J. [History of congenital thrombocytic hemorrhagic dystrophy]. **C R Acad Sci III**, 319: 727-32, 1996.

BERNDT, M.;LOPEZ, J. Platelet glycoprotein Ib-IX-V complex and platelet adhesion. In: *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice* (Fourth Edition ed.), edited by RW C. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001, p. 493.

BHATT, D.L.;TOPOL, E.J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. **Nat Rev Drug Discov**, 2: 15-28, 2003.

BLACK FL, S.F., LAYRISSE Z, FRANCO MHLP, HARRIS NS, WEINER TA. Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in Parakanã Indians of Brazil. **Am J Phys Anthropol**, 52: 119-32, 1980.

BUDARF, M.L.;KONKLE, B.A.;LUDLOW, L.B.;MICHAUD, D.;LI, M.;YAMASHIRO, D.J.;MCDONALD-MCGINN, D.;ZACKAI, E.H.;DRISCOLL, D.A. Identification of a patient with Bernard-Soulier syndrome and a deletion in the DiGeorge/velo-cardio-facial chromosomal region in 22q11.2. **Hum Mol Genet**, 4: 763-6, 1995.

CADROY, Y.;SAKARIASSEN, K.S.;CHARLET, J.P.;THALAMAS, C.;BONEU, B.;SIE, P. Role of 4 platelet membrane glycoprotein polymorphisms on experimental arterial thrombus formation in men. **Blood**, 98: 3159-61, 2001.

CASTRO, V.;ORIGA, A.F.;ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.;SOARES, M.;MENEZES, R.C.;GONCALVES, M.S.;COSTA, F.F.;ARRUDA, V.R. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. **Eur J Immunogenet**, 26: 355-60, 1999.

CAVALLI-SFORZA, L.L.;PIAZZA, A.;MENOZZI, P.;MOUNTAIN, J. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85: 6002-6, 1988.

CELIKEL, R.;MCCLINTOCK, R.A.;ROBERTS, J.R.;MENDOLICCHIO, G.L.;WARE, J.;VARUGHESE, K.I.;RUGGERI, Z.M. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha. **Science**, 301: 218-21, 2003.

CHANG, V.T.;AVIV, H.;HOWARD, L.M.;PADBERG, F. Acute myelogenous leukemia associated with extreme symptomatic thrombocytosis and chromosome 3q translocation: case report and review of literature. **Am J Hematol**, 72: 20-6, 2003.

CORRAL, J.;GONZALEZ-CONEJERO, R.;LOZANO, M.L.;RIVERA, J.;VICENTE, V. New alleles of the platelet glycoprotein Ibalpha gene. **Br J Haematol**, 103: 997-1003, 1998.

CORRAL, J.;LOZANO, M.L.;GONZALEZ-CONEJERO, R.;MARTINEZ, C.;INIESTA, J.A.;RIVERA, J.;VICENTE, V. A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of GPIb alpha does not affect expression and is not a major risk factor for arterial thrombosis. **Thromb Haemost**, 83: 23-8, 2000.

COUGHLIN, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, 407: 258-64, 2000.

CROFT, S.A.;HAMPTON, K.K.;DALY, M.E.;STEEDS, R.P.;CHANNER, K.S.;SAMANI, N.J. Kozak sequence polymorphism in the platelet GPIbalpha gene is not associated with risk of myocardial infarction. **Blood**, 95: 2183-4, 2000.

DAVIDSON, C.J.;TUDDENHAM, E.G.;MCVEY, J.H. 450 million years of hemostasis. **J Thromb Haemost**, 1: 1487-94, 2003.

DE LA SALLE, C.;BAAS, M.J.;LANZA, F.;SCHWARTZ, A.;HANAU, D.;CHEVALIER, J.;GACHET, C.;BRIQUEL, M.E.;CAZENAVE, J.P. A three-base deletion removing a leucine residue in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha associated with a variant of Bernard-Soulier syndrome (Nancy I). **Br J Haematol**, 89: 386-96, 1995.

DE MARCO, L.;MAZZUCATO, M.;FABRIS, F.;DE ROIA, D.;COSER, P.;GIROLAMI, A.;VICENTE, V.;RUGGERI, Z.M. Variant Bernard-Soulier syndrome type bolzano. A congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX complex. **J Clin Invest**, 86: 25-31, 1990.

DERIAN, C.K.;DAMIANO, B.P.;ADDO, M.F.;DARROW, A.L.;D'ANDREA, M.R.;NEDELMAN, M.;ZHANG, H.C.;MARYANOFF, B.E.;ANDRADE-GORDON, P. Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. **J Pharmacol Exp Ther**, 304: 855-61, 2003.

- DOOLITTLE, R.F. The evolution of vertebrate blood coagulation: a case of Yin and Yang. **Thromb Haemost**, 70: 24-8, 1993.
- DOUGLAS, H.;MICHAELIDES, K.;GOROG, D.A.;DURANTE-MANGONI, E.;AHMED, N.;DAVIES, G.J.;TUDDENHAM, E.G. Platelet membrane glycoprotein Ibalpha gene - 5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor for the occurrence of coronary thrombosis. **Heart**, 87: 70-4, 2002.
- DUMAS, J.J.;KUMAR, R.;SEEHRA, J.;SOMERS, W.S.;MOSYAK, L. Crystal structure of the Gplbalpha-thrombin complex essential for platelet aggregation. **Science**, 301: 222-6, 2003.
- DUNCAN, B.B.;SCHMIDT, M.I.;POLANCZYK, C.A.;MENGUE, S.S. [High mortality rates among Brazilian adult populations--an international comparison]. **Rev Assoc Med Bras**, 38: 138-44, 1992.
- EAGLE, K.A.;LIM, M.J.;DABBOUS, O.H.;PIEPER, K.S.;GOLDBERG, R.J.;VAN DE WERF, F.;GOODMAN, S.G.;GRANGER, C.B.;STEG, P.G.;GORE, J.M.;BUDAJ, A.;AVEZUM, A.;FLATHER, M.D.;FOX, K.A. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. **Jama**, 291: 2727-33, 2004.
- EPSTEIN, S.E.;ZHOU, Y.F.;ZHU, J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. **Circulation**, 100: e20-8, 1999.
- FRANCO, R.F.;PAZIN-FILHO, A.;TAVELLA, M.H.;SIMOES, M.V.;MARIN-NETO, J.A.;ZAGO, M.A. Factor XIII val34leu and the risk of myocardial infarction. **Haematologica**, 85: 67-71, 2000.
- FRANK, M.B.;REINER, A.P.;SCHWARTZ, S.M.;KUMAR, P.N.;PEARCE, R.M.;ARBOGAST, P.G.;LONGSTRETH, W.T., JR.;ROSENDAAL, F.R.;PSATY, B.M.;SISCOVICK, D.S. The Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ibalpha and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women. **Blood**, 97: 875-9, 2001.
- FUJITA, H.;HASHIMOTO, Y.;RUSSELL, S.;ZIEGER, B.;WARE, J. In vivo expression of murine platelet glycoprotein Ibalpha. **Blood**, 92: 488-95, 1998.

GONZALEZ-CONEJERO, R.;LOZANO, M.L.;RIVERA, J.;CORRAL, J.;INIESTA, J.A.;MORALEDA, J.M.;VICENTE, V. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. **Blood**, 92: 2771-6, 1998.

GONZALEZ-MANCHON, C.;LARRUCEA, S.;PASTOR, A.L.;BUTTA, N.;ARIAS-SALGADO, E.G.;AYUSO, M.S.;PARRILLA, R. Compound heterozygosity of the GPIbalpha gene associated with Bernard-Soulier syndrome. **Thromb Haemost**, 86: 1385-91, 2001.

HICKEY, M.J.;ROTH, G.J. Characterization of the gene encoding human platelet glycoprotein IX. **J Biol Chem**, 268: 3438-43, 1993.

HOFFMAN, M.;MONROE, D.M., 3RD. A cell-based model of hemostasis. **Thromb Haemost**, 85: 958-65, 2001.

HOFFMEISTER, K.M.;FELBINGER, T.W.;FALET, H.;DENIS, C.V.;BERGMEIER, W.;MAYADAS, T.N.;VON ANDRIAN, U.H.;WAGNER, D.D.;STOSSEL, T.P.;HARTWIG, J.H. The clearance mechanism of chilled blood platelets. **Cell**, 112: 87-97, 2003.

HOLMBERG, L.;KARPMAN, D.;NILSSON, I.;OLOFSSON, T. Bernard-Soulier syndrome Karlstad: Trp 498-->Stop mutation resulting in a truncated glycoprotein Ib alpha that contains part of the transmembranous domain. **Br J Haematol**, 98: 57-63, 1997.

HSIEH, K.;FUNK, M.;SCHILLINGER, M.;ENDLER, G.;JANISIW, M.;REISINGER, M.;UNGER, P.;GREISENEGGER, S.;LANG, W.;LALOUSCHEK, W.;MANNHALTER, C. Vienna Stroke Registry. Impact of the platelet glycoprotein Ib alpha Kozak polymorphism on the risk of ischemic cerebrovascular events: a case-control study. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 15: 469-73, 2004.

ISHIDA, F.;FURIHATA, K.;ISHIDA, K.;YAN, J.;KITANO, K.;KIYOSAWA, K.;FURUTA, S. The largest variant of platelet glycoprotein Ib alpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine145. **Blood**, 86: 1357-60, 1995.

ISHIDA, F.;ITO, T.;TAKEI, M.;SHIMODAIRA, S.;KITANO, K.;KIYOSAWA, K. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib alpha with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease. **Br J Haematol**, 111: 1247-9, 2000.

IZAR, M.C.;FONSECA, F.A.;IHARA, S.S.;KASINSKI, N.;SANG, W.H.;LOPES, I.E.;PINTO LDO, E.;RELVAS, W.G.;LOURENCO, D.;TUFIK, S.;DE PAOLA, A.A.;CARVALHO, A.C. Risk Factors, biochemical markers, and genetic polymorphisms in early coronary artery disease. **Arq Bras Cardiol**, 80: 379-95, 2003.

JAGADEESWARAN, P.;SHEEHAN, J.P.;CRAIG, F.E.;TROYER, D. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. **Br J Haematol**, 107: 731-8, 1999.

JANKOVIC, L.;EFREMOV, G.D.;JOSIFOVSKA, O.;JURICIC, D.;STOMING, T.A.;KUTLAR, A.;HUISMAN, T.H. An initiation codon mutation as a cause of a beta-thalassemia. **Hemoglobin**, 14: 169-76, 1990.

JILMA-STOHLAWETZ, P.;HOMONCIK, M.;JILMA, B.;KNECHTELSDORFER, M.;UNGER, P.;MANNHALTER, C.;SANTOSO, S.;PANZER, S. Glycoprotein Ib polymorphisms influence platelet plug formation under high shear rates. **Br J Haematol**, 120: 652-5, 2003.

KASKI, S.;KEKOMAKI, R.;PARTANEN, J. Systematic screening for genetic polymorphism in human platelet glycoprotein Ibalpha. **Immunogenetics**, 44: 170-6, 1996.

KATO, K.;MARTINEZ, C.;RUSSELL, S.;NURDEN, P.;NURDEN, A.;FIERING, S.;WARE, J. Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ibbeta produces a Bernard-Soulier phenotype with increased alpha-granule size. **Blood**, 104: 2339-44, 2004.

KENNY, D.;MORATECK, P.A.;GILL, J.C.;MONTGOMERY, R.R. The critical interaction of glycoprotein (GP) IBbeta with GPIX-a genetic cause of Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, 93: 2968-75, 1999.

KENNY, D.;MUCKIAN, C.;FITZGERALD, D.J.;CANNON, C.P.;SHIELDS, D.C. Platelet glycoprotein ibalpha receptor polymorphisms and recurrent ischaemic events in acute coronary syndrome patients. **J Thromb Thrombolysis**, 13: 13-9, 2002.

KOSKELA, S.;PARTANEN, J.;SALMI, T.T.;KEKOMAKI, R. Molecular characterization of two mutations in platelet glycoprotein (GP) Ib alpha in two Finnish Bernard-Soulier syndrome families. **Eur J Haematol**, 62: 160-8, 1999.

KUIJPERS, R.W.;FABER, N.M.;CUYPERS, H.T.;OUWEHAND, W.H.;VON DEM BORNE, A.E. NH2-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. **J Clin Invest**, 89: 381-4, 1992.

KULKARNI, S.;DOPHEIDE, S.M.;YAP, C.L.;RAVANAT, C.;FREUND, M.;MANGIN, P.;HEEL, K.A.;STREET, A.;HARPER, I.S.;LANZA, F.;JACKSON, S.P. A revised model of platelet aggregation. **J Clin Invest**, 105: 783-91, 2000.

KUNISHIMA, S.;LOPEZ, J.A.;KOBAYASHI, S.;IMAI, N.;KAMIYA, T.;SAITO, H.;NAOE, T. Missense mutations of the glycoprotein (GP) Ib beta gene impairing the GPIb alpha/beta disulfide linkage in a family with giant platelet disorder. **Blood**, 89: 2404-12, 1997.

LAHORTIGA, I.;VAZQUEZ, I.;AGIRRE, X.;LARRAYOZ, M.J.;VIZMANOS, J.L.;GOZZETTI, A.;CALASANZ, M.J.;ODERO, M.D. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. **Genes Chromosomes Cancer**, 40: 179-89, 2004.

LANZA, F.;DE LA SALLE, C.;BAAS, M.J.;SCHWARTZ, A.;BOVAL, B.;CAZENAVE, J.P.;CAEN, J.P. A Leu7Pro mutation in the signal peptide of platelet glycoprotein (GP)IX in a case of Bernard-Soulier syndrome abolishes surface expression of the GPIb-V-IX complex. **Br J Haematol**, 118: 260-6, 2002.

LANZA, F.;MORALES, M.;DE LA SALLE, C.;CAZENAVE, J.P.;CLEMETSON, K.J.;SHIMOMURA, T.;PHILLIPS, D.R. Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucine-rich glycoprotein family cleaved during thrombin-induced platelet activation. **J Biol Chem**, 268: 20801-7, 1993.

LI, C.;MARTIN, S.E.;ROTH, G.J. The genetic defect in two well-studied cases of Bernard-Soulier syndrome: a point mutation in the fifth leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha. **Blood**, 86: 3805-14, 1995.

LOPEZ, J.A. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 5: 97-119, 1994.

- LOPEZ, J.A.;ANDREWS, R.K.;AFSHAR-KHARGHAN, V.;BERNDT, M.C. Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, 91: 4397-418, 1998.
- LOPEZ, J.A.;LUDWIG, E.H.;MCCARTHY, B.J. Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications. **J Biol Chem**, 267: 10055-61, 1992.
- LU, G.;BROZE, G.J., JR.;KRISHNASWAMY, S. Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. **J Biol Chem**, 279: 17241-9, 2004.
- LUDLOW, L.B.;SCHICK, B.P.;BUDARF, M.L.;DRISCOLL, D.A.;ZACKAI, E.H.;COHEN, A.;KONKLE, B.A. Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. **J Biol Chem**, 271: 22076-80, 1996.
- MANNUCCI, P.M.;PEYVANDI, F.;ARDISSINO, D. Risk of myocardial infarction and polymorphisms in candidate genes. **N Engl J Med**, 348: 1176-7; author reply -7, 2003.
- MANSUR ADE, P.;SOUZA MDE, F.;TIMERMAN, A.;RAMIRES, J.A. Trends of the risk of death due to circulatory, cerebrovascular, and ischemic heart diseases in 11 Brazilian capitals from 1980 to 1998. **Arq Bras Cardiol**, 79: 269-84, 2002.
- MANSUR, A.P.;ANNICCHINO-BIZZACCHI, J.;FAVARATO, D.;AVAKIAN, S.D.;CESAR, L.A.;RAMIRES, J.A. Angiotensin-converting enzyme and apolipoproteins genes polymorphism in coronary artery disease. **Clin Cardiol**, 23: 335-40, 2000.
- MASSBERG, S.;BRAND, K.;GRUNER, S.;PAGE, S.;MULLER, E.;MULLER, I.;BERGMEIER, W.;RICHTER, T.;LORENZ, M.;KONRAD, I.;NIESWANDT, B.;GAWAZ, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **J Exp Med**, 196: 887-96, 2002.
- MAZZINI, J.;HACKEL, C.;ANNICCHINO-BIZZACCHI, J.M. Allelic frequencies of three VNTRs in intron 40 of the human von Willebrand factor gene in types 1, 2, and 3 von Willebrand disease patients and controls of a Brazilian population. **Thromb Res**, 100: 489-94, 2000.

MEISEL, C.;AFSHAR-KHARGHAN, V.;CASCORBI, I.;LAULE, M.;STANGL, V.;FELIX, S.B.;BAUMANN, G.;LOPEZ, J.A.;ROOTS, I.;STANGL, K. Role of Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ibalpha as a risk factor for coronary artery disease and catheter interventions. **J Am Coll Cardiol**, 38: 1023-7, 2001.

MERCIER, B.;MUNIER, S.;BERTAULT, V.;MANSOURATI, J.;BLANC, J.J.;FEREC, C. Myocardial infarction: absence of association with VNTR polymorphism of GP Ibalpha. **Thromb Haemost**, 84: 921-2, 2000.

MILLER, J.L.;LYLE, V.A.;CUNNINGHAM, D. Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib alpha leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. **Blood**, 79: 439-46, 1992.

MOROI, M.;JUNG, S.M.;YOSHIDA, N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. **Blood**, 64: 622-9, 1984.

MUCKIAN, C.;HILLMANN, A.;KENNY, D.;SHIELDS, D.C. A novel variant of the platelet glycoprotein Ibalpha macroglycopeptide region lacks any copies of the "perfect" 13 amino acid repeat. **Thromb Haemost**, 83: 513-4, 2000.

MURATA, M.;MATSUBARA, Y.;KAWANO, K.;ZAMA, T.;AOKI, N.;YOSHINO, H.;WATANABE, G.;ISHIKAWA, K.;IKEDA, Y. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. **Circulation**, 96: 3281-6, 1997.

NAKAGAWA, M.;OKUNO, M.;OKAMOTO, N.;FUJINO, H.;KATO, H. Bernard-Soulier syndrome associated with 22q11.2 microdeletion. **Am J Med Genet**, 99: 286-8, 2001.

NODA, M.;FUJIMURA, K.;TAKAFUTA, T.;SHIMOMURA, T.;FUJIMOTO, T.;YAMAMOTO, N.;TANOUE, K.;ARAI, M.;SUEHIRO, A.;KAKISHITA, E.;ET AL. Heterogeneous expression of glycoprotein Ib, IX and V in platelets from two patients with Bernard-Soulier syndrome caused by different genetic abnormalities. **Thromb Haemost**, 74: 1411-5, 1995.

NORIS, P.;ARBUSTINI, E.;SPEDINI, P.;BELLETTI, S.;BALDUINI, C.L. A new variant of Bernard-Soulier syndrome characterized by dysfunctional glycoprotein (GP) Ib and severely reduced amounts of GPIX and GPV. **Br J Haematol**, 103: 1004-13, 1998.

- OLIVIERI, N.F. The beta-thalassemias. **N Engl J Med**, 341: 99-109, 1999.
- OSAWA, M.;KANEKO, M.;HORIUCHI, H.;KITANO, T.;KAWAMOTO, Y.;SAITOU, N.;UMETSU, K. Evolution of the cystatin B gene: implications for the origin of its variable dodecamer tandem repeat in humans. **Genomics**, 81: 78-84, 2003.
- PARRA, F.C.;AMADO, R.C.;LAMBERTUCCI, J.R.;ROCHA, J.;ANTUNES, C.M.;PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100: 177-82, 2003.
- PATRONO, C.;COLLER, B.;FITZGERALD, G.A.;HIRSH, J.;ROTH, G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. **Chest**, 126: 234S-64S, 2004.
- PIRASTU, M.;SAGLIO, G.;CHANG, J.C.;CAO, A.;KAN, Y.W. Initiation codon mutation as a cause of alpha thalassemia. **J Biol Chem**, 259: 12315-7, 1984.
- RAMAKRISHNAN, V.;DEGUZMAN, F.;BAO, M.;HALL, S.W.;LEUNG, L.L.;PHILLIPS, D.R. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98: 1823-8, 2001.
- ROSAMOND, W.D.;CHAMBLESS, L.E.;FOLSOM, A.R.;COOPER, L.S.;CONWILL, D.E.;CLEGG, L.;WANG, C.H.;HEISS, G. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. **N Engl J Med**, 339: 861-7, 1998.
- RUGGERI, Z.M. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. **J Clin Invest**, 105: 699-701, 2000.
- RUGGERI, Z.M. Platelets in atherothrombosis. **Nat Med**, 8: 1227-34, 2002.
- SACHS, U.J.;KROLL, H.;MATZDORFF, A.C.;BERGHOFER, H.;LOPEZ, J.A.;SANTOSO, S. Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous Asn-45Ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany. **Br J Haematol**, 123: 127-31, 2003.
- SADLER, J.E. Structural biology. A menage a trois in two configurations. **Science**, 301: 177-9, 2003.

SAIKI, R.K.;GELFAND, D.H.;STOFFEL, S.;SCHARF, S.J.;HIGUCHI, R.;HORN, G.T.;MULLIS, K.B.;ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-91, 1988.

SANTOSO, S.;ZIMMERMANN, P.;SACHS, U.J.;GARDEMANN, A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. **Thromb Haemost**, 87: 345-6, 2002.

SATOH, K.;HATA, M.;YOKOTA, H. A novel member of the leucine-rich repeat superfamily induced in rat astrocytes by beta-amyloid. **Biochem Biophys Res Commun**, 290: 756-62, 2002.

SAVOIA, A.;BALDUINI, C.L.;SAVINO, M.;NORIS, P.;DEL VECCHIO, M.;PERROTTA, S.;BELLETTI, S.;POGGI, IOLASCON, A. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, 97: 1330-5, 2001.

SIMSEK, S.;BLEEKER, P.M.;VAN DER SCHOOT, C.E.;VON DEM BORNE, A.E. Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib alpha and HPA-2 alloantigens. **Thromb Haemost**, 72: 757-61, 1994a.

SIMSEK, S.;NORIS, P.;LOZANO, M.;PICO, M.;VON DEM BORNE, A.E.;RIBERA, A.;GALLARDO, D. Cys209 Ser mutation in the platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene is associated with Bernard-Soulier syndrome. **Br J Haematol**, 88: 839-44, 1994b.

SIQUEIRA NETO, J.I.;SANTOS, A.C.;FABIO, S.R.;SAKAMOTO, A.C. Cerebral infarction in patients aged 15 to 40 years. **Stroke**, 27: 2016-9, 1996.

SONODA, A.;MURATA, M.;IKEDA, Y.;FUKUUCHI, Y.;WATANABE, K. Stroke and platelet glycoprotein Ibalpha polymorphisms. **Thromb Haemost**, 85: 573-4, 2001.

SONODA, A.;MURATA, M.;ITO, D.;TANAHASHI, N.;OHTA, A.;TADA, Y.;TAKESHITA, E.;YOSHIDA, T.;SAITO, I.;YAMAMOTO, M.;IKEDA, Y.;FUKUUCHI, Y.;WATANABE, K. Association between platelet glycoprotein Ibalpha genotype and ischemic cerebrovascular disease. **Stroke**, 31: 493-7, 2000.

- VAN DIJK, K.;VAN DER BOM, J.G.;FISCHER, K.;GROBBEE, D.E.;VAN DEN BERG, H.M. Do prothrombotic factors influence clinical phenotype of severe haemophilia? A review of the literature. **Thromb Haemost**, 92: 305-10, 2004.
- VOETSCH, B.;DAMASCENO, B.P.;CAMARGO, E.C.;MASSARO, A.;BACHESCHI, L.A.;SCAFF, M.;ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.;ARRUDA, V.R. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. **Thromb Haemost**, 83: 229-33, 2000.
- WARE, J.;RUSSELL, S.;RUGGERI, Z.M. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97: 2803-8, 2000.
- WENGER, R.H.;KIEFFER, N.;WICKI, A.N.;CLEMETSON, K.J. Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene. **Biochem Biophys Res Commun**, 156: 389-95, 1988.
- WEYRICH, A.S.;LINDEMANN, S.;ZIMMERMAN, G.A. The evolving role of platelets in inflammation. **J Thromb Haemost**, 1: 1897-905, 2003.
- YAGI, M.;EDELHOFF, S.;DISTECHE, C.M.;ROTH, G.J. Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib beta. **J Biol Chem**, 269: 17424-7, 1994.
- YAMADA, Y.;IZAWA, H.;ICHIHARA, S.;TAKATSU, F.;ISHIHARA, H.;HIRAYAMA, H.;SONE, T.;TANAKA, M.;YOKOTA, M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. **N Engl J Med**, 347: 1916-23, 2002.
- YUN, T.H.;BAGLIA, F.A.;MYLES, T.;NAVANEETHAM, D.;LOPEZ, J.A.;WALSH, P.N.;LEUNG, L.L. Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. **J Biol Chem**, 278: 48112-9, 2003.

IX. Anexos

Anexo 1. Frequência dos polimorfismos da GP Iba em populações distintas e sua correlação com amostras populacionais brasileiras

9.1.1. Frequência dos alelos VNTR nas diferentes populações estudadas

População	VNTR frequência alélica	Referência	Brasileiros		
			Caucasóides (n = 280)	Negros (n = 145)	Parakanã (n = 67)
			B 0,109 C 0,810 D 0,079 E 0,002	B 0,158 C 0,783 D 0,059	B 0,119 C 0,881 D 0
Caucasóides austriacos e norte americanos (n = 54)	B 0,083 C 0,806 D 0,111	Lopez, 1992	P = 0,427 P = 0,901 P = 0,264	P = 0,053 P = 0,621 P = 0,074	P = 0,360 P = 0,108 —
Negros norte americanos (n = 49)	B 0,194 C 0,704 D 0,102	Lopez, 1992	P = 0,018 P = 0,016 P = 0,435	P = 0,419 P = 0,114 P = 0,145	P = 0,118 P < 0,001 —
Aborígenes australianos (n = 53)	B 0,075 C 0,878 D 0,047	Lopez, 1992	P = 0,190 P = 0,101 P = 0,256	P = 0,033 P < 0,001 P = 0,660	P = 0,261 P = 0,939 —
Asiáticos (n = 50)	B 0,070 C 0,670 D 0,260	Lopez, 1992	P = 0,238 P = 0,001 P < 0,001	P = 0,026 P = 0,024 P < 0,001	P = 0,210 P < 0,001 —
Caucasóides europeus (106)	B 0,354 C 0,571 D 0,075	Simsek, 1994	P < 0,001 P < 0,001 P = 0,886	P < 0,001 P < 0,001 P = 0,452	P < 0,001 P < 0,001 —
Finlandeses (n = 50)	B 0,130 C 0,820 D 0,050	Kaski, 1996	P = 0,539 P = 0,827 P = 0,316	P = 0,491 P = 0,429 P = 0,745	P = 0,808 P = 0,194 —
Caucasóides espanhóis (n = 729)	A 0,001 B 0,105 C 0,804 D 0,090	Corral, 1998	— P = 0,794 P = 0,753 P = 0,420	— P = 0,009 P = 0,397 P = 0,081	— P = 0,603 P = 0,031 —
Caucasóides norte americanos (n = 125)	B 0,076 C 0,840 D 0,084	Aramaki, 1999	P = 0,147 P = 0,317 P = 0,793	P = 0,003 P = 0,491 P = 0,251	P = 0,159 P = 0,283 —
Negros norte americanos (n = 121)	B 0,211 C 0,752 D 0,037	Aramaki, 1999	P < 0,001 P = 0,060 P = 0,030	P = 0,121 P = 0,403 P = 0,080	P = 0,027 P = 0,003 —
Indígenas norte americanos (n = 101)	A 0,010 B 0,104 C 0,797 D 0,089	Aramaki, 1999	— P = 0,845 P = 0,673 P = 0,639	— P = 0,082 P = 0,403 P = 0,196	— P = 0,658 P = 0,046 —

População	VNTR frequência alélica	Referência	Brasileiros		
			Caucasóides (n = 280)	Negros (n = 145)	Parakanã (n = 67)
			B 0,109	B 0,158	B 0,119
			C 0,810	C 0,783	C 0,881
			D 0,079	D 0,059	D 0
			E 0,002		
Japoneses (n = 131)	A 0,073	Moroi, 1984	—	—	—
	B 0,011		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
	C 0,561		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
	D 0,355		$P < 0,001$	$P < 0,001$	—
Japoneses (n = 103)	A 0,155	Ishida, 1995	—	—	—
	B 0,010		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
	C 0,539		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
	D 0,296		$P < 0,001$	$P < 0,001$	—
Japoneses (n = 314)	A 0,086	Ishida, 2000	—	—	—
	B 0,011		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
	C 0,505		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
	D 0,398		$P < 0,001$	$P < 0,001$	—
Simsek, 1994 vs. Corral, 1998, Kaski, 1996, Lopez, 1992			alelo B : $P < 0,001$		

9.1.2. Frequência dos alelo -5C da sequência Kozak nas diferentes populações

População	Kozak -5C frequência alélica	Referência	Brasileiros		
			Caucasóides (n = 280)	Negros (n = 145)	Parakanã (n = 67)
			0,139	0,169	0,254
Finlandeses (n = 50)	0,16	Kaski, 1996	$P = 0,585$	$P = 0,836$	$P = 0,084$
Negros Norte americanos (n = 46)	0,174	Afshar-Kharghan, 1999	$P = 0,381$	$P = 0,912$	$P = 0,156$
Aborígenes australianos (n = 19)	0,079	Afshar-Kharghan, 1999	$P = 0,293$	$P = 0,154$	$P = 0,021$
Asiáticos (n = 34)	0,162	Afshar-Kharghan, 1999	$P = 0,616$	$P = 0,886$	$P = 0,139$
Caucasóides franceses (n = 186)	0,132	Afshar-Kharghan, 1999	$P = 0,742$	$P = 0,181$	$P < 0,001$
Caucasóides Espanhóis (n = 729)	0,113	Corral, 1998	$P = 0,097$	$P = 0,007$	$P < 0,001$
Japoneses (n = 314)	0,283	Ishida, 2000	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P = 0,486$
Coreanos (n = 48)	0,219	Ishida, 2000	$P = 0,045$	$P = 0,273$	$P = 0,541$

Anexo 2. Metanálise de estudos prévios relacionando os polimorfismos da GP Ib α e doença arterial oclusiva.

9.2.1. Frequência dos alelos VNTR nos estudos de doença arterial oclusiva

Referência	VNTR	frequência alélica n/N (frequência alélica)			OR (95% IC)	P
		casos	controles			
Murata, 1997						
DCO $\leq$ 60 anos idade	VNTR-A	11/62 (0,18)	10/174 (0,06)		3,5 (1,3-9,6)	0,01
	VNTR-B	3/62 (0,05)	1/174 (0,006)		8,8 (0,8-223)	0,06
Gonzalez-Conejero, 1998						
DCO	VNTR-B	29/202 (0,14)	18/202 (0,09)		1,7 (0,9-3,35)	0,09
DCVO	VNTR-B	25/208 (0,12)	12/208 (0,06)		2,2 (1,04-4,8)	0,03
Mercier, 2000						
DCO	VNTR-B	23/298 (0,08)	33/414 (0,08)		0,97 (0,5-1,7)	NS
Baker, 2001						
DCVO	VNTR-B	15/414 (0,04)	12/386 (0,03)		1,17 (0,5-2,7)	NS
	VNTR-D	36/414 (0,09)	25/386 (0,06)		1,38 (0,8-2,4)	NS
Kenny, 2002						
DCO *	VNTR-D	7/56 (0,125)	121/1790 (0,13)		2,4 (0,9-6,1)	0,05
Douglas, 2002						
DCO **	VNTR-B	9/176 (0,05)	25/336 (0,07)		0,67 (0,3-1,6)	NS
Afshar-Kharghan, 2004						
DCO						
Entre negros Americanos	BC+BB	35/80 (44%) [¶]	19/84 (23%) [¶]		5,6 (1,2-26,6) [§]	0,01
	CD+DD	12/80 (15%) [¶]	5/84 (6%) [¶]		21,7 (4,3-109) [§]	0,000
Entre caucasóides	BC+BB	26/265 (10%) [¶]	31/275 (11%) [¶]		1,1 (0,4-2,6) [§]	NS
	CD+DD	33/265 (13%) [¶]	25/275 (9%) [¶]		1,4 (0,8-3,1) [§]	NS

* Indivíduos caucasóides com angina instável que apresentaram infarto do miocárdio (casos) vs grupo de indivíduos cau com angina instável sem evolução para infarto do miocárdio (controles).

** Indivíduos caucasóides e hindus submetidos à cateterismo que apresentaram infarto do miocárdio (casos) vs grupo de ir submetidos à cateterismo que não apresentaram infarto do miocárdio (controles).

[¶] frequência genotípica (análise número de indivíduos), n/N: número de indivíduos/número de indivíduos totais (percentual).
[§] Risco relativo calculado após ajuste pelas diversas variáveis clínicas (idade, sexo, raça, hipertensão arterial, diabetes colesterolemia, tabagismo e etilismo).

DCO doença coronariana oclusiva; DCVO doença cerebrovascular oclusiva; IAM: infarto agudo do miocárdio; n/N: nú alelos/número de alelos totais; OR (95% IC): odds ratio (95% intervalo de confiança); NS: não significativo.

9.2.2. Frequência do alelo -5C Kozak nos estudos de doença arterial oclusiva

Referência	Frequência alélica -5C n/N (frequência alélica)			OR (95% CI)	P
	Casos	controles			
Corral, 2000					
DCO	25/202 (0,12)	22/202 (0,11)		1,16 (0,60-2,22)	NS
DCVO	24/208 (0,11)	20/208 (0,10)		1,23 (0,63-2,40)	NS
Croft, 2000					
DCO (IAM)	120/1078 (0,11)	108/996 (0,11)		1,03 (0,78-1,36)	NS
Ishida, 2000					
DCO	71/156 (46%) ¶	91/158 (58%) ¶		1,35 (0,76-2,42)	NS
Sonoda, 2001					
DCVO	121/470 (0,26)	125/634 (0,20)		1,4 (1,05-1,9)	0,02
Frank, 2001					
DCO *	12/156 (0,08)	97/768 (0,13)		0,58 (0,29-1,11)	NS
DCVO *	12/82 (0,15)	97/768 (0,13)		1,19 (0,59-2,35)	NS
Baker, 2001					
DCVO	74/410 (0,18)	50/386 (0,13)		1,48 (0,99-2,23)	0,06
Meisel, 2001					
DCO	353/1842 (0,18)	272/1968 (0,14)		1,12 (0,94-1,34)	NS
Kenny, 2002					
DCO **	14/66 (0,21)	244/1960 (0,12)		1,9 (0,99-3,6)	0,05
Douglas, 2002					
DCO ***	15/176 (0,08)	55/336 (0,16)		0,48 (0,25-0,9)	0,02
Santoso, 2002					
DCO	706/4984 (0,14)	146/1046 (0,14)		1,02 (0,84-1,24)	NS
Hsieh, 2004					
DCVO				3,5 (1,5-7,9)	0,003

* Mulheres jovens (18 a 44 anos) que apresentaram infarto do miocárdio (casos do grupo DCO) ou acidente vascular cerebral isquêmico (casos do grupo DCVO) vs mulheres saudáveis da mesma região e idade.

** Indivíduos caucasóides com angina instável que apresentaram infarto do miocárdio (casos) vs grupo de indivíduos caucasóides com angina instável sem evolução para infarto do miocárdio (controles).

*** Indivíduos caucasóides e hindus submetidos à cateterismo que apresentaram infarto do miocárdio (casos) vs grupo de indivíduos submetidos à cateterismo que não apresentaram para infarto do miocárdio (controles).

¶ frequência genotípica CT+CC, n/N: número de indivíduos/número de indivíduos totais (percentual).

DCO: doença coronariana oclusiva; IAM: infarto agudo do miocárdio; DCVO: doença cerebrovascular oclusiva; n/N: número de alelos/número de alelos totais; OR (95% IC): odds ratio (95% intervalo de confiança); NS: não significativo.

9.2.3. Frequência dos alelo HPA-2b nos estudos de doença arterial oclusiva

Referência	Frequência alélica HPA-2b n/N (frequência alélica)		OR (95% CI)	P
	Casos	controles		
Murata, 1997				
DCO ≤ 60 anos idade	14/88 (0.159)	16/200 (0.08)	2.5 (1,1-5,8)	0,05
Sonoda, 2000				
DCO	55/400 (0,14)	47/634 (0,08)	2,0 (1,3-3,1)	0,009
Baker, 2001				
DCVO	31/412 (0,07)	25/382 (0,06)	1,16 (0,65-2,08)	NS

0.1 0.2 1 5 10
menor risco maior risco

DCO: doença coronariana oclusiva; DCVO: doença cerebrovascular oclusiva; n/N: número de alelos/número de alelos totais; OR (95% IC): *odds ratio* (95% intervalo de confiança); NS: não significativo.

Anexo 3

Trabalho:

“Genetic Variability of Platelet Glycoprotein Ib α Gene”

autores: Margareth C. Ozelo, Devanira S.P. Costa, Lucia H. Siqueira, Vagner Castro, Marilda S. Gonçalves, Raimundo C. Menezes, Manoel Soares, Joyce M. Annichino-Bizzacchi, Fernando F. Costa, Valder R. Arruda.

Aceito para publicação na *“American Journal of Haematology”*.

Ozelo MC, Costa DS, Siqueira LH, Castro V, Gonçalves MS, Menezes RC, Soares M, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Arruda VR. Genetic variability of platelet glycoprotein Ib alpha gene. Am J Hematol. 2004 Oct;77(2):107-16.

Anexo 4

Trabalho:

“Platelet glycoprotein Ib α polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction”.

Autores: Margareth C. Ozelo, Andrea F. Origa, Francisco J. P. Aranha, Antonio P. Mansur, Joyce M. Annichino-Bizzacchi, Fernando F. Costa, Eleanor S. Pollak, Valder R. Arruda.

Aceito para publicação na “*Thrombosis and Haemostasis*”.

Ozelo MC, Origa AF, Aranha FJ, Mansur AP, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Pollak ES, Arruda Vr. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2004 Aug;92(2):384-6.

Genetic Variability of Platelet Glycoprotein Ib α Gene

Margareth C. Ozelo,¹ Devanira S.P. Costa,¹ Lucia H. Siqueira,¹ Tania M.F. Machado,¹
Vagner Castro,¹ Marilda S. Gonçalves,² Raimundo C. Menezes,³ Manoel Soares,³
Joyce M. Annichino-Bizzacchi,¹ Fernando F. Costa,¹ and Valder R. Arruda^{4*}

¹Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

²Department of Pharmacology, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

³Evandro Chagas Institute, Belém, Pará, Brazil

⁴Department of Pediatrics, The Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania

Platelet membrane glycoprotein (GP) Ib α is a critical component of platelet adhesion complex to subendothelium structures following tissue injury or pathological surfaces, such as atherosclerotic plaques. Polymorphisms of the GPIb α gene have been associated with a high risk for occlusive vascular disease, and its distribution varies considerably among distinct populations. These polymorphisms comprise the human platelet antigen (HPA)-2 system, the –5C/T dimorphism of the Kozak sequence, and the variable number of tandem 39-bp repeats (VNTR). Here we report the prevalence of the GPIb α gene polymorphisms among Brazilians, a highly ethnically diverse population. We analyzed 492 subjects of European, African, or Indigenous origin. It was possible to determine ten distinct haplotypes. The most common (~40%) haplotype was the Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC for both Caucasian and African descent. However, among Indigenous, Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC and Kozak-TC/HPA-2aa/VNTR-CC were equally present. Although a strong linkage disequilibrium between VNTR and HPA-2 polymorphism had also been observed, here we determined incomplete linkage disequilibrium in 10% of subjects from all ethnic groups. VNTR-E, a rare variant lacking the 39-bp repeat, was identified in two unrelated subjects, and functional platelet studies revealed no abnormalities. The VNTR-A allele, the largest variant containing four copies of the repeats, was not identified in this population. However, homozygosity for the VNTR-A allele (Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-AA) was determined in two distinct species of nonhuman primates. These results suggest a greater complex evolutionary mechanism in the macroglycoprotein region of the GPIb α gene and may be useful in the design of gene–disease association studies for vascular disease. *Am. J. Hematol.* 77:107–116, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: glycoprotein Ib alpha; polymorphism; platelet; genetic diversity

INTRODUCTION

Platelets have a central role in the blood coagulation by adhesion to exposed vascular subendothelium following vascular injury. Platelet adhesion is mediated by glycoprotein (GP) Ib α -Ib β -IX-V complex, in which the GPIb α subunit contains binding sites for von Willebrand factor, thrombin, and actin-binding proteins [1]. Loss of function mutations in the human GPIb α gene is the most common molecular defect associated with the bleeding disorders known as Bernard-Soulier syndrome [2]. Disruption of the murine GPIb α gene recapitulates closely the human disease [3]. Platelets also participate in atherogenesis and subsequent formation of occlusive thrombi is

dependent on platelet adhesion to the atherosclerotic plaque rupture [4].

Polymorphisms on the GP Ib-IX-V complex have been characterized. These polymorphisms are mostly restricted to the GPIb α subunit and can alter platelet

*Correspondence to: Valder R. Arruda, M.D., Ph.D., The Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania School of Medicine, 3516 Civic Center Blvd., ARC-302F, Philadelphia, PA 19104. E-mail: arruda@email.chop.edu

Received for publication 8 December 2003; Accepted 5 April 2004

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ajh.20148

demonstrated [31]. Blood samples were collected by researchers from the Evandro Chagas Institute.

Nonhuman Primates

Genomic DNA from two different species of non-human primates, *Gorilla gorilla* (NG05251) and *Pan troglodytes* or chimpanzee (NG06939), were obtained from NIA Aging Cell Culture Repository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) and genotyped using the same primers for studies in human samples.

Genotyping for VNTR Polymorphism of the GPIb α Gene

Identification of the VNTR polymorphism of the GPIb α gene was performed by two distinct polymerase chain reaction (PCR) assays as previous described by Gonzalez-Conejero et al. [18]. The first pair of primers were located at nucleotides 3915–3938 and 4378–4400, and the second pair of primers were located in 4202–4223 and 4378–4400. The PCR products were separated by electrophoresis in a 3% agarose gel and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

Genotyping for HPA-2

The characterization of the HPA-2 alleles was performed as reported by Castro et al. [32]. Following digestion of the PCR products with *Bsa*HI in the presence of HPA-2a, three fragments of 61, 116, and 242 bp were obtained, whereas in the presence of HPA-2b allele, only two fragments (61 and 358 bp) were observed.

Genotyping for Kozak Sequence Polymorphism

Identification of the Kozak polymorphism in the GPIb α gene was performed by PCR using primers corresponding to nucleotides 2757–2780 and 3203–3224 as previous described [24]. Amplified products were digested with *Ava*II (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). The genotype –5T is identified by the presence of fragments of 131, 161, and 175 bp, whereas for the allele –5C only two fragments of 131 and 336 bp were obtained.

Molecular and Functional Characterization of the VNTR-E Allele

The PCR product using primers corresponding to nucleotides 4202–4223 and 4378–4400 of the VNTR-E allele was directly cloned into pGEM-T vector (Promega Corporation, Madison, WI). Four positive clones were further sequenced using the ABI-Prism®

377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Blood samples were collected for characterization of platelet morphology and functional assays from subjects carrying the VNTR-E allele. The Ivy bleeding time, ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) test, and platelet aggregation to various agonists were performed as described [33]. Platelet glycoprotein content was determined in platelet-rich plasma. Binding of fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) conjugated monoclonal antibody against GPIb α (CD42b-PE), GPIX (CD42a-FITC), GPIIb (CD41-FITC), and GPIIIa (CD61-FITC) (Beckman-Coulter Immunotech, Marseille, France) was determined by the direct method. Negative controls consisted of non-immune mouse IgG1-PE and IgG2a-FITC (Beckman-Coulter Immunotech). The fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA), and a fluorescence histogram was obtained.

Statistical Analysis

The statistical significance of the differences between groups were calculated by χ^2 or Fisher's exact tests for small samples using the Epi Info program [34]. Differences were considered statistical significant for P values ≤ 0.05 . The χ^2 goodness-of-fit test was applied to determine whether the observed genotype frequencies were in agreement with the Hardy–Weinberg equilibrium.

RESULTS

Frequencies of Genotypes and Haplotypes of the VNTR Polymorphism of the GPIb α

PCR products using the pair of primers located at nucleotides 3915–3938 and 4378–4400, resulted in fragments of 563 bp (allele B), 524 bp (allele C), 485 bp (allele D), and 446 bp (allele E). A second PCR assay using a pair of primers located in 4202–4223 and 4378–4400 resulted in the identification of four visible fragments of 276, 237, 198, and 159 bp corresponding to the alleles B, C, D, and E, respectively (Fig. 1). There was complete agreement on the results obtained by independent PCR assays. The genotype frequencies of VNTR among those with Caucasian ($\chi^2_{(3)} = 0.52$; $0.90 < P < 0.95$) or African descent ($\chi^2_{(2)} = 1.91$; $0.30 < P < 0.50$) fit the Hardy–Weinberg equilibrium well. This was further confirmed by the analysis of the distribution of the Kozak alleles among those with Caucasian ($\chi^2_{(1)} = 2.91$; $0.05 < P < 0.1$) or African descent ($\chi^2_{(1)} = 0.163$; $0.5 < P < 0.7$). Together these data suggest that these individuals are representative of their own populations.

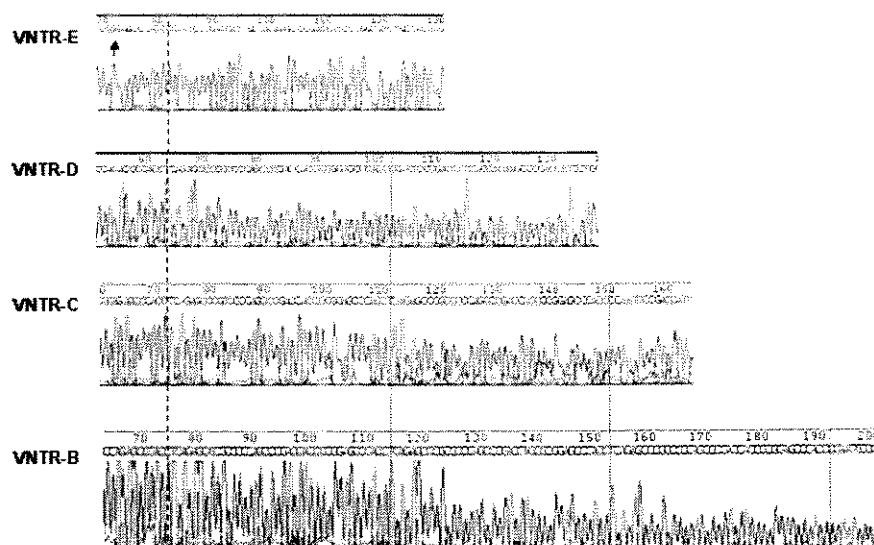


Fig. 2. Sequencing of the GPI α gene from human subjects. DNA sequence of the E allele is shown on the top, with no tandem repeat of the 39-bp sequence. The arrow demonstrated the neutral change A $\rightarrow$ G at position 4301. The VNTR alleles D, C, and B are shown from the top to the bottom. Tandem repeated sequences are flanked by dotted lines. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Homozygosity for the VNTR-A Allele Is Common Among Nonhuman Primates

We were not able to detect human subjects with VNTR-A allele. However, when we analyzed the genomic DNA obtained from nonhuman primates for the GPI β polymorphisms, both animals carry the genotype Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-AA. The presence of the homozygosity of the VNTR-A allele was confirmed by the sequence of the PCR products corresponding to this region (Fig. 4).

DISCUSSION

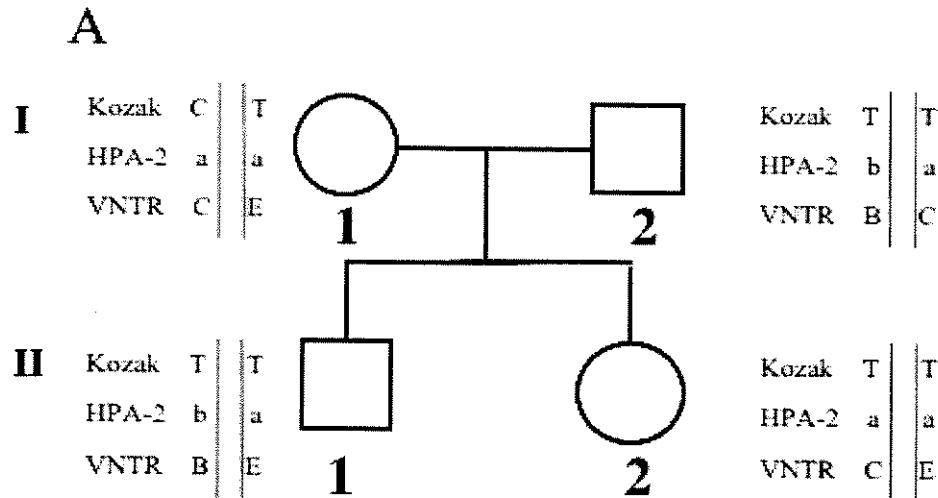
Brazil has one of the most ethnically heterogeneous populations in the world. The slaves, who originated from ethnically diverse African populations, admixed with each other as well as with people from European descent and the Indigenous of Brazil [29]. This makes the Brazilian gene pool highly heterogeneous.

Occlusive vascular disease is a prominent health problem in Brazil, especially among adults younger than 45 years [35–37]. To better understand the genetic basis of complex diseases such as atherosclerosis and occlusive vascular disorders, studies in both African and non-African populations are important to test the hypothesis that common disease often are caused by common susceptibility alleles (for review, see Tishkoff and Williams [38]). It is possible that Brazilians provide a good population to test this hypothesis, because subjects of distinct backgrounds living under similar environmental conditions may or may not have similar susceptibility to vascular disease. Thus, the identification

of specific genes commonly distributed among these individuals could provide an opportunity to recognize gene pool-associated disease.

Several reasons lead us to exploit the distribution of GPI β alleles among Brazilians, such as the central role of platelet adhesion in the atherosclerosis process and the unique characteristic of the GPI β gene, which is encoded by a single exon [1,4,39]. All three characterized polymorphisms are located either in the promoter or in the coding region, which influence the amount of the receptor expression and/or its function [5,6,15,16]. Moreover, it is known that the distribution of the distinct alleles is heterogeneous among subjects of distinct ethnic backgrounds [8,12,14].

Overall, we determined that GPI β VNTR polymorphisms present a highly heterogeneous distribution among Brazilians, markedly among those of African descent. Interestingly, the differences of the VNTR alleles among Brazilians of African or Caucasian descent were restricted to the genotype BC or B allele, which was higher among Africans than Caucasians (26% vs. 16%, respectively). Moreover, the prevalence of the VNTR alleles among African Brazilians also differs from that of African Americans [13]. Africa has a highly heterogeneous population, and these subjects have been understudied compared with non-African populations [38]. The heterogeneity among those of African descent can be explained, in part, by the distinct origin of the early population brought from Africa through slave trade. In Brazil, they originated mainly from Angola, Congo, and Mozambique, whereas African Americans descended from regions extending from Senegal to Western

**B**

Subjects	Platelet count ($\times 10^9/L$)	Mean Platelet Volume (fL)	Ivy Bleeding Time (mins)	RIPA* (mg/mL)	VNTR Genotype	Mean Fluorescence Intensity			
						Ib α (CD 42b)	IX (CD 42a)	IIb (CD 41)	IIIa (CD 61)
Normal Control	130 - 400	7.2 - 11.1	2 - 9	0.7 - 1.2	CC (n=1)	85.06	708.12	65.87	1136.47
I.1	311	6.2	7.05	1.2	CE	113.42	677.38	72.15	753.88
I.2	389	6.6	5.87	1.1	BC	86.61	654.67	46.33	1340.95
II.1	419	6.1	5.97	0.8	BE	97.52	708.79	86.86	1147.09
II.2	143	7.3	4.22	1.2	CE	105.45	701.80	45.55	870.42

*RIPA: Ristocetin-induced platelet aggregation; minimal dose required to achieve more than 60% of platelet aggregation.

Fig. 3. Pedigree of the proband and family members with a rare VNTR-E variant. (A) The Kozak, HPA-2, and VNTR genotypes are represented for each family member. The arrow indicates the proband. (B) Platelet morphological, phenotypic, and functional characteristics; normal values represent data obtained from local laboratory controls ($n = 50$).

Nigeria and from Eastern Nigeria to Angola [30]. In contrast, no difference was determined regarding Kozak dimorphism when African Brazilians were compared to African Americans [5].

In contrast to those of African descent, comparison among Caucasians from Brazil with those from Europe or North America shows no difference in the distribution of the VNTR alleles or Kozak dimorphism [8,13,15].

Among Brazilians of Indigenous descent, the prevalence of VNTR allele C or Kozak -5C allele was higher compared to Brazilians of non-Indigenous descent. In addition, the prevalence of Kozak dimorphism in the Indigenous population was similar to that described among Oriental populations, e.g., Japanese or Korean [24]. However, the prevalence of VNTR alleles differs between Indigenous and the Oriental populations. Notably is the absence of the largest

VNTR, the A allele, which is present in 8–15% of Oriental population [7,24,32]. The distinct prevalence of these alleles among Indigenous population in this study may be influenced by genetic drift or region-specific selection pressure and importantly, by the high rate of consanguineous marriage [40].

It is known that HPA-2 and VNTR alleles are in strong linkage disequilibrium. The largest VNTR alleles (alleles A and B) are associated with HPA-2b (the lesser frequent), while VNTR alleles C or D are associated with HPA-2a [8–12]. Overall, we report here that 10% of informative cases presented the allele HPA-2b/VNTR-C. The lowest prevalence was determined among Caucasians (6%), but this is the first demonstration of such association in this group. It is interesting to note that we identified 14% among those of African descent and 10% among the Indigenous population with HPA-2b/VNTR-C alleles,

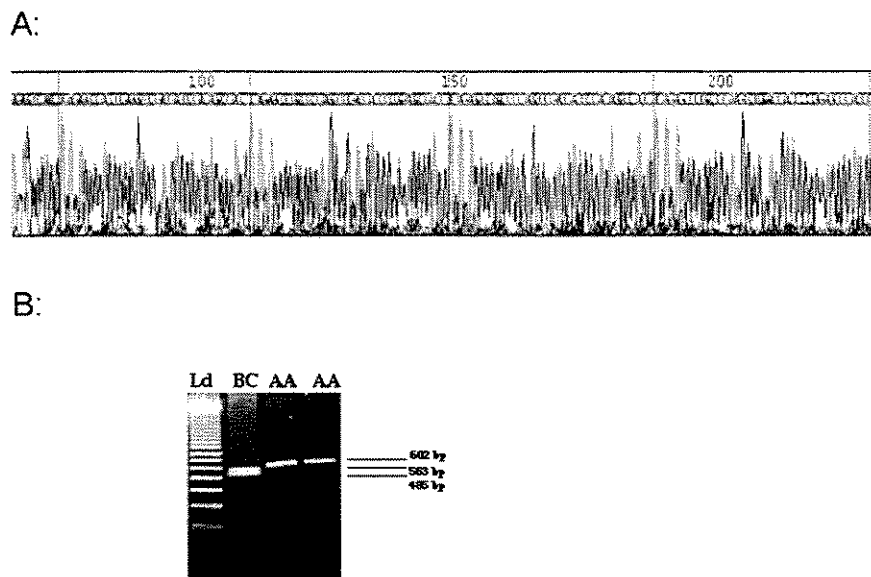


Fig. 4. Characterization of the GPI α gene from nonhuman primates. (A) Sequence of genomic DNA from gorilla demonstrated the A allele characterized by four tandem repeats. (B) PCR products using primers located at positions 3915–3938 and 4378–4400 resulted in a single large fragment of 602 bp (VNTR-A allele) using genomic DNA from gorilla or chimpanzee. Control DNA from a human subject previously characterized as a carrier of alleles BC is shown. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

which is 6-fold higher than the 2.2% among those of African descent as reported by Aramaki and Reiner [13]. The association of HPA-2a/VNTR-B was detected in ~6% of Caucasians from Spain or African Americans. It was reported that this is present in 5% of those of African descents and 1% among Caucasians [13,14]. Thus, we showed that the linkage disequilibrium in our population is not complete. Indeed, it is relatively common and affected all three ethnic groups.

We cannot rule out that admixture among individuals from distinct ethnic groups occurred in earlier generations, which could explaining some of the results observed in this study. However, this is an unlikely hypothesis because, using a similar criteria selection, we were able to demonstrate that mutations that were highly prevalent among Caucasians were not identified among African descents [41–43].

In addition, we have identified the rare VNTR null allele (VNTR-E) in two unrelated individuals of Caucasian descent. Together with a previous case reported by Muckian et al. [10], the variant VNTR-E has been reported only among Caucasians. Here the subjects were clinically asymptomatic regarding bleeding or thrombosis events. Platelet morphological, immunophenotype, and functional characterization of the affected subject and family members demonstrated no abnormality among carriers of the genotype VNTR-CE or VNTR-BE.

Initially, an evolutionary model of GPI α haplotypes was proposed. In this model, the addition of

extra copies to the initial VNTR allele of one copy (allele D) gave rise to larger VNTR [8,9,12]. Here we showed that GPI α gene in two closest species of non-human primates, gorilla and chimpanzee, presented homozygosity for the VNTR-A alleles (four copies of 39 bp). We hypothesize that, instead of the addition of new copies with a series of tandem duplication, the evolutionary model could have been a result of loss of these copies. Thus, the VNTR-A should be considered the oldest allele and the subsequent deletions resulted in the smaller forms. Recently, Osawa et al. [44] reported a possible evolutionary origin of another VNTR present in the promoter region of the cystatin B gene, associated with human progressive myoclonus epilepsy. They have determined that, among nonhuman primates, this repeat segment has stable copies, in contrast to the variable forms observed in the same sequence in humans, suggesting that this VNTR arose after the humans and hominoids split. It was hypothesized that once the VNTR gained additional repeats units, as observed in early hominoid ancestors, the allele could become unstable and, during the human evolutionary process, lost the tandem repeats elements, resulting in the smallest variant as those detected in humans.

In summary, despite the differences in the distribution of several GPI α alleles among subjects from distinct ethnic backgrounds, we were able to determine that the most common (~40%) haplotype was the Kozak-TT/HPA-2aa/VNTR-CC for individuals of Caucasian and African descent. However, among the Indigenous population, Kozak-TT/HPA-2aa/

VNTR-CC and Kozak-TC/HPA-2aa/VNTR-CC were equally present. Whether carriers of these alleles have increased susceptibility to vascular diseases in Brazil remains to be determined in large population studies.

REFERENCES

- Lopez J, Berndt M. The GPIb-IX-V complex. In: Michelson A, editor. Platelets. San Diego: Elsevier Science; 2002. p 85–104.
- Lopez J, Andrews R, Afshar-Kharghan V, Berndt M. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998;91:4397–4418.
- Ware J, Russell S, Ruggeri Z. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2803–2808.
- Ruggeri Z. Platelet in atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:1227–1234.
- Afshar-Kharghan V, Li C, Khoshnevis-Asl M, Lopez J. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ib alpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V. *Blood* 1999;94:186–191.
- Cadroy Y, Sakariassen K, Charlet J, et al. Role of four platelet glycoprotein polymorphisms on experimental arterial thrombus formation in men. *Blood* 2001;98:3159–3161.
- Moroi M, Jung S, Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood* 1984;64:622.
- Lopez J, Ludwig E, McCarthy B. Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13 amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. *J Biol Chem* 1992;267:10055–10061.
- Ishida F, Furihata K, Ishida K, et al. The largest variant of platelet glycoprotein Iba has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine. *Blood* 1995;86:1356.
- Muckian C, Hillmann A, Kenny D, Shields D. A novel variant of the platelet glycoprotein Ib alpha macroglycopeptide region lacks copies of the perfect 13 amino acid repeat. *Thromb Haemost* 2000;83:513–514.
- Kuijpers R, Faber N, Cuypers H, Ouwehand W, von dem Borne A. NH₂-Terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine 145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992;89:381–384.
- Simsek S, Bleeker P, van der Schoot C, von dem Borne A. Association of variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib alpha and HPA-2 alloantigens. *Thromb Haemost* 1994;72:757–761.
- Aramaki K, Reiner A. A novel isoform of platelet glycoprotein Ib alpha is prevalent among African Americans. *Am J Hematol* 1999;60:77–79.
- Corral J, Gonzales-Conejero R, Lozano M, Rivera J, Vicente V. New alleles of the platelet glycoprotein Ib alpha gene. *Br J Haematol* 1998;103:997–1003.
- Kaski S, Kekomaki R, Partanen J. Systemic screening for genetic polymorphism in human glycoprotein Ib alpha. *Immunogenetics* 1996;44:170–176.
- Jilma-Stohlawetz P, Homoncik M, Jilma B, et al. Glycoprotein Ib polymorphisms influence platelet plug formation under high shear rates. *Br J Haematol* 2003;120:652–655.
- Baker R, Eikebon J, Lofthouse E, et al. Platelet glycoprotein Ib alpha Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke. *Blood* 2001;98:36–40.
- Gonzales-Conejero R, Lozano M, Rivera J, et al. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein Ib alpha associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998;92:2771–2776.
- Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997;96:3281–3286.
- Simmons R, Hermilda J, Rezende S, Lane D. Haemostatic genetic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:374–385.
- Sonoda A, Murata M, Ito T, et al. Association between platelet glycoprotein Ib alpha genotype and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000;31:493–497.
- Corral J, Lozano M, Gonzales-Conejero R, et al. A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of GPIb alpha does not affect expression and is not a major risk factor for arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2000;83:23–28.
- Frank M, Reiner A, Schwartz S, et al. The Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ib alpha and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women. *Blood* 2001;97:875–879.
- Ishida F, Ito T, Takei M, et al. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib alpha with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphisms, and its relationship with coronary artery disease. *Br J Haematol* 2000;111:1247–1249.
- Santoso S, Zimmermann P, Sachs U, Gardemann A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2002;87:345–346.
- Anand S, Yusuf S, Devanese S, et al. Differences in risk factors, atherosclerosis, and cardiovascular disease between ethnic groups in Canada: the study of health assessment and risk in ethnic groups (SHARE). *Lancet* 2000;356:279–284.
- Dowling N, Austin H, Dilley A, et al. The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study. *J Thromb Haemost* 2003;1:80–87.
- Kniffin D Jr, Baron J, Barrett J, Birkmeyer D, Anderson F Jr. The epidemiology of diagnosed pulmonary embolism and deep venous thrombosis in the elderly. *Arch Intern Med* 1994;154:861–866.
- Parra F, Amado R, Lambertucci J, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:177–182.
- Curtin P. The Slave Atlantic trade: a census. Milwaukee: University of Wisconsin Press; 1969.
- Black F, Salzano F, Layrisse Z, et al. Restriction persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in Parakanas Indians of Brazil. *Am J Phys Anthropol* 1980;52:119–132.
- Castro V, Origa A, Goncalves M, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1 to 5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 1999;26:355–360.
- Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:173–190.
- Dean A, Dean J, Coulombier D, et al. Epi Info, version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.
- Duncan B, Schmidt S, Polanczyk C, Mengue S. High mortality rates among Brazilians adult populations as an international comparison. *Rev Assoc Med Bras* 1992;38:138–144.
- Siqueira Neto J, Santos A, Fabio SRC, Sakamoto A. Ischemic stroke in patients under age 45. *Stroke* 1996;10:113–124.
- Voetsch B, Damasceno B, Camargo E, et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. *Thromb Haemost* 2000;83:229–233.
- Tishkoff S, Williams S. Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease. *Nature Rev* 2002;3:611–621.
- Roos R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–126.

40. Cavalli-Sforza L, Piazza A, Menozzi P, Mountain J. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archeological, and linguistic data. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 6002-6006.
41. Arruda V, Siqueira L, Chiaparini L, et al. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997;78:1430-1433.
42. Arruda V, Siqueira L, Goncalves M, et al. Prevalence of the mutation C677 to T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998;78:332-335.
43. Arruda V, von Zuben P, Soares M, et al. Very low incidence of Arg506 to Gln mutation in the factor V gene among the Amazonian and the Brazilian black populations. *Thromb Haemost* 1996;75: 860-861.
44. Osawa M, Kaneko M, Horiuchi H, et al. Evolution of the cystatin B gene: implications for the origin of its variable dodecamer tandem repeat in humans. *Genomics* 2003;81:78-84.

Platelets and Blood Cells

Platelet glycoprotein Ib α polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction

Margareth C. Ozelo¹, Andrea F. Origa¹, Francisco J. P. Aranha¹, Antonio P. Mansur², Joyce M. Annichino-Bizzacchi¹, Fernando F. Costa¹, Eleanor S. Pollak³, Valder R. Arruda^{3,4}

¹State University of Campinas, Campinas, Brazil

²University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA

⁴The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Summary

Platelet glycoprotein Iba (GPIba) gene polymorphisms have been reported to affect the risk of developing coronary heart disease. Here, within the GPIba gene, we determine the association between the variable number of tandem repeats (VNTR), the -5C/T Kozak sequence dimorphism, and the human platelet antigen (HPA)-2 polymorphisms with occurrence of myocardial infarction (MI). Patients (n=180) presenting survivors of MI were compared to 180 controls matched by age, gender, and race. Carriers of VNTR-CD genotype had a 2-fold higher risk for MI compared to controls. The prevalence of VNTR-BC was lower among patients than among controls

(P=.007). These data are in agreement with recent reports of increased plug formation by human platelets containing VNTR-CD but no other VNTR genotypes. Among patients, the number of vessels severely occluded was greater among carriers of the D-allele (P=.019) or VNTR-CD (P=.026) and lower among carriers of the C-allele (P=.003) or VNTR-CC (P=.0009) compared to non-carriers of these alleles. No influence was seen with the Kozak or HPA-2 polymorphisms. Determination of VNTR of the GPIba gene may prove useful for identifying high-risk individuals for MI.

Keywords

Arterial disease, coronary heart disease, myocardial infarction, platelet glycoprotein Ib α , polymorphism VNTR

Thromb Haemost 2004; 92: 384–6

Introduction

Platelets participate in physiologic thrombin formation and in the pathologic development of atherosclerotic lesions (1). The GPIIb/IX/V complex mediates platelet adhesion to subendothelial matrix. Polymorphisms of this complex are restricted to the GPIb α gene (2).

Some (3-5) but not all (6-10) studies have demonstrated an association of GPIb α alleles with the development myocardial infarction (MI). The inconsistency of results is no surprise since studies diverge in selection criteria such as the time of patient enrollment, population size, age, ethnic background, and other factors.

Coronary heart disease is an emerging public health problem in Brazil, especially amongst young patients (11). The Brazilian population is highly heterogeneous and it is characterized by a genetic admixture of Europeans, African immigrants and native Indigenous descendents. Here we report findings of the GPI α polymorphisms among Brazilian patients with MI.

Materials and methods

The patient group comprised 180 (90%) out of 198 subjects who survived at least one episode of MI, diagnosed as previously reported (12). Controls consisted of non-related subjects referred by the patients or candidates for blood donation at the

Correspondence to:
Valder R. Arruda, MD, PhD
The Children's Hospital of Philadelphia
University of Pennsylvania School of Medicine
3615 Civic Center Blvd
Philadelphia, PA 19104, USA
Tel.: +1 215 590-4907, Fax: +1 215 590-3660
E-mail: arruda@email.chop.edu

Received December 6, 2003
Accepted after resubmission May 6, 2004

Financial support:
This study was supported by grant from FAPESP - Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (95/09112-6) to V.R.A.

Prepublished online July 9, 2004 DOI: 10.1160/TH03-12-0744

Anexo 5

Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Unicamp.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

☐ cep@fcm.unicamp.br

Ofício CEP 194/2004
Em 30/07/2004

Prezada Pesquisadora,

Vimos por este acusar o recebimento do ofício Hemato/Hemostasia 011/04 datado de 27/07 p.p., informando que o projeto intitulado **“Estudo das bases moleculares da glicoproteína de membrana plaquetária Ib α em duas entidades clínicas distintas: na síndrome de Bernard Soulier (resultante da perda de função) e na doença arterial oclusiva (resultante do ganho de função)”**, o qual foi objeto de sua tese de doutoramento, a ser defendida brevemente, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, que não foi submetido a este CEP/FCM, uma vez que a coleta de dados foi realizada nos períodos de 1994 ao início de 1997, sendo assim, anterior a sua formação.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevemo-nos.
Cordialmente.


Prof. Dra. Carmen Silva Bertuzzo
Presidente do CEP/FCM/UNICAMP

Ilma. Sra.
Margareth Castro Ozelo
Médica Hematologista/Hemoterapeuta
Hemocentro/UNICAMP