

LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, celular, molecular e do desenvolvimento do(a) aluno(a) **Luis Fernando Bittar Sckayer**.

Campinas, 30 de janeiro de 2009.



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

Orientador(a)

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES
NOS GENES DO FVW E DA ADAMTS13 E SUA CORRELAÇÃO
COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FVIII E FVW
EM PACIENTES COM TROMBOSE VENOSA PROFUNDA**

CAMPINAS

Unicamp

2009

LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES
NOS GENES DO FVW E DA ADAMTS13 E SUA CORRELAÇÃO
COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FVIII E FVW
EM PACIENTES COM TROMBOSE VENOSA PROFUNDA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ORIENTADORA: PROFa. DRA. JOYCE ANNICHINO-BIZZACCHI

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Scxxxxa Sckayer, Luis Fernando Bittar
“Avaliação de alterações moleculares nos genes do FVW e da ADAMTS13 e sua correlação com os níveis plasmáticos de FVIII e FVW em pacientes com trombose venosa profunda” / Luis Fernando Bittar Sckayer. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Trombose venosa. 2. Fator VIII. 3. Fator de von Willebrand. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Molecular changes in vWF and ADAMTS13 genes and their correlation with plasma levels of FVIII and vWF in patients with deep venous thrombosis”

Keywords: • Venous thrombosis
• Factor VIII
• von Willebrand factor

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Profa. Dra. Vânia Maris Morelli

Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula

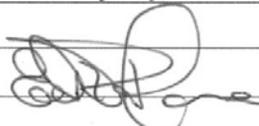
Data da defesa: 30-01-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Luis Fernando Bittar Sekayer

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



Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Vânia Maris Morelli	
Professor (a) Doutor (a) Erich Vinicius de Paula	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/01/2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, César e Rosa Maria, alicerces não apenas da minha existência, mas também das minhas conquistas.

Às minhas irmãs, Maria Esther e Cláudia, verdadeiros exemplos de dedicação e perseverança.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu o dom da vida e me concedeu esta grande oportunidade, satisfazendo os sonhos do meu coração e me fortalecendo nos momentos que mais precisei.

À Dra. Joyce, que desde o início desta jornada depositou confiança em mim, investiu em meu potencial, sempre me orientando e ensinando de forma atenciosa, carinhosa, encorajadora e exemplar.

Ao supervisor do laboratório Érich Vinícius de Paulla pelos constantes ensinamentos, pelas motivações ao longo desta caminhada e por todo apoio.

À biomédica Ucha, que com dedicação e paciência participou de forma ativa durante toda a execução deste projeto, buscando alternativas enriquecedoras e sábias soluções para cada intercorrência vivenciada durante este percurso.

Aos funcionários e verdadeiros apoios para várias etapas deste projeto: Devanira, Cristina, Ricardo, Rafael, Silmara, Tânia e Mayara, por todo auxílio, ensinamento e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia: Graziela, Aline, Ana Cláudia, Mariane, Michelleta, Michele “Paraguaia”, Eloá, Susan, Natália, Andrey, Fernanda Basso, Fernanda Orsi, Carolina, Carla, Brunna, Josie, Daniela Fabri, Guilherme e Vagner.

À Dra. Dulcinéia Martins de Albuquerque, Dra. Maria de Fátima Sonati e Dr. Licio Augusto Velloso, pelas excelentes e valiosas sugestões emitidas no exame de qualificação.

Ao estatístico Roberto Zulli por toda atenção, ajuda e ensinamento com os cálculos e análises deste projeto, sempre muito prestativo e dedicado.

Às secretárias da pós-graduação, Salete e Márcia por toda orientação e apoio.

À minha família, por todo incentivo e amor.

À CAPES que viabilizou financeiramente o desenvolvimento deste projeto.

“Para realizar grandes conquistas, não devemos apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

Níveis elevados de fator VIII (FVIII) são um fator de risco independente e prevalente para trombose venosa profunda (TVP), e tem influência do FvW. A ADAMTS13 é responsável pela modulação do tamanho molecular do FvW, clivando os multímeros de altíssimo peso molecular. Alterações moleculares no gene da ADAMTS13 têm correlação com sua atividade. Neste estudo avaliamos a prevalência do polimorfismo A4751G no gene do FvW (região de ligação com a ADAMTS13), os polimorfismos C1797T e C1852G e a mutação C4006T no gene da ADAMTS13 em 435 pacientes com TVP (156M/279F; idade mediana=37) e 580 controles (170M/410F, idade mediana=35). Investigamos a relação entre os genótipos e a dosagem de FVIII e FvW no plasma e o risco de TVP. A dosagem de FVIII:C foi realizada por método coagulométrico de um estágio, e as dosagens de FVIII:Ag e FvW:Ag por método imunoenzimático. As alterações moleculares foram determinadas por PCR e digestão com enzimas específicas, ou SSCP e sequenciamento para confirmação. Pacientes com TVP mostraram níveis significativamente aumentados de FVIII:C (203.7 UI/dl vs. 127 UI/dl; $p < 0.001$), FVIII:Ag (109.6 UI/dl vs. 82.4 UI/dl; $p < 0.001$) e FvW:Ag (154.2 UI/dl vs. 108 UI/dl; $p < 0.001$) quando comparados com o grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos na prevalência das alterações moleculares estudadas. Os indivíduos com genótipo AG (FvW A4751G) apresentavam níveis significativamente reduzidos de FVIII:C ($p = 0.04$). Embora também tenha demonstrado uma discreta associação com níveis diminuídos de FvW:Ag, esta não foi estatisticamente significativa ($p = 0.07$). Os indivíduos com genótipo CG (ADAMTS13 C1852G) apresentavam níveis significativamente aumentados de FVIII:Ag ($p = 0.05$) e FvW:Ag ($p = 0.01$). Apesar da relação com diminuição do FVIII o polimorfismo A4751G não mostrou um efeito protetor para TVP. O polimorfismo ADAMTS13 C1852G está associado à diminuição desta metaloprotease, e sua associação com níveis aumentados de FVIII:Ag e FvW:Ag neste estudo favorece essa hipótese.

Elevated levels of factor VIII (FVIII) are a prevalent and independent risk factor for deep venous thrombosis (DVT), and are affected by von Willebrand factor (vWF) levels. ADAMTS13 is responsible for the modulation of the molecular size of vWF, cleaving the ultra large multimers. Mutations and polymorphisms in the ADAMTS13 gene are related with its activity. This study evaluated the prevalence of polymorphism A4751G in the vWF gene, polymorphisms C1797T, C1852G and the mutation C4006T in the ADAMTS13 gene in 435 patients with DVT and 580 healthy controls. Subsequently, we investigated the relationship between the genotypes and plasma levels of FVIII and vWF and DVT risk. FVIII:C was measured by a one-stage clotting method, and FVIII:Ag and vWF:Ag were measured by chromogenic method. The molecular changes were determined by restriction endonucleases or single strand conformation polymorphism followed by sequencing. Statistical test:U Mann-Whitney, $\alpha = 0.05$. Patients with DVT had higher plasma levels of FVIII:C (mean 203,7 UI/dl vs. 127 UI/dl; $p < 0.001$), FVIII:Ag (mean 109,6 UI/dl vs. 82,4 UI/dl; $p < 0.001$) and vWF:Ag (154,2 UI/dl vs. 108 UI/dl; $p < 0.001$) when compared to controls. We observed no statistical difference in the prevalence of all molecular changes studied between patients and controls. A4751G heterozygotes had significantly reduced levels of FVIII:C ($p = 0,04$). Although there was a slight association with reduced levels of vWF: Ag, this association was not statistically significant ($p = 0,07$). C1852G heterozygotes had significantly elevated levels of FVIII:Ag ($p = 0,05$) and vWF:Ag ($p = 0,01$). Despite the relative decline of FVIII:C with the A4751G polymorphism there was no protective effect for DVT. The C1852G polymorphism is associated with a reduction of ADAMTS13, and its association with increased levels of FVIII: Ag and vWF: Ag observed in this study supports this hypothesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
aa	Aminoácidos
ACH	Anticoncepcional hormonal
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ATIII	Antitrombina III
Ca ⁺⁺	Cálcio
Cys	Cisteína
DNA	“ <i>desoxyribonucleic acid</i> ”; ácido dextrorribonucléico
dNTP	deoxibucleotídeos trifosfato
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético
ELISA	“ <i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i> ”
EP	Embolia pulmonar
<i>et al.</i>	E outros (as)
FT	Fator tecidual
FII	Fator II da coagulação ou Protrombina
FV	Fator V da coagulação
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII da coagulação
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII da coagulação
FVIIIa	Fator VIII da ativado
FIX	Fator IX da coagulação
FIXa	Fator IX ativado
FX	Fator X da coagulação
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI da coagulação

FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII da coagulação
FXIIa	Fator XII ativado
FXIII	Fator XIII da coagulação
FXIIIa	Fator XIII ativado
FvW	Fator de von Willebrand
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
Ile	Isoleucina
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Kilodaltons
LRP	“LDL receptor related protein”
μL	Microlitro
μg/mL	Micrograma por mililitro
Met	Metionina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mg/dl	Miligrama por decilitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanomolar
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
OR	“Odds Ratio”
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
PCR	“Polymerase chain reaction”; reação em cadeia da polimerase
PC	Proteína C

PCa	Proteína C ativada
PS	Proteína S
Pro	Prolina
PTT	Púrpura trombocitopênica trombótica
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSCP	<i>“Single strand conformation polymorphism”</i>
TBE	Tampão Trizma/ácido bórico/ EDTA
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	<i>“Tissue factor pathway inhibitor”</i> ; inibidor do fator tecidual
Thr	Treonina
TRH	Terapia de reposição hormonal
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
TVP	Trombose venosa profunda
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
UI/dl	Unidade Internacional por decilitro
U/mL	Unidade por mililitro
VLDL	Lipoproteínas de baixíssimo peso molecular

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Características clínicas dos pacientes com TVP e do grupo controle.....	49
Tabela 2- Comparação das dosagens plasmáticas de fatores da coagulação entre o grupo controle e o grupo de pacientes com TVP.....	50
Tabela 3- Participantes do estudo molecular.....	51
Tabela 4- Características dos pacientes e controles analisados quanto aos polimorfismos C1797T no gene da ADAMTS13 e A4751G no gene do FvW.....	51
Tabela 5- Prevalência dos polimorfismos/mutação no grupo controle e no grupo TVP.....	52
Tabela 6- Comparação dos genótipos do polimorfismo FvW A4751G em relação às dosagens plasmáticas do FvW, FVIII:Ag e FVIII:C no grupo controle.....	53
Tabela 7- Comparação entre os genótipos do polimorfismo ADAMTS13 C1852G em relação às dosagens plasmáticas no grupo TVP.....	53
Tabela 8- Comparação entre os genótipos do polimorfismo ADAMTS13 C1852G em relação às dosagens plasmáticas no grupo controle...	54
Tabela 9- Comparação entre os genótipos para o polimorfismo ADAMTS13 C1852G em relação às dosagens plasmáticas (avaliação dos 2 grupos juntos).....	54

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Vias de ativação da cascata da coagulação.....	19
Figura 2- Estrutura do polipeptídeo precursor do Fator de von Willebrand..	23
Figura 3- Estrutura primária do gene e da proteína da ADAMTS13.....	26
Figura 4- SSCP para o polimorfismo C1852G no gene da ADAMTS13.....	40
Figura 5- Sequenciamento para polimorfismo C1852G no gene da ADAMTS13.....	42
Figura 6- SSCP para o polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13.....	42
Figura 7- Sequenciamento para polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13.....	43
Figura 8- Análise de restrição para polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13.....	44
Figura 9- Análise de restrição para mutação C4006T no gene da ADAMTS13.....	45
Figura 10- Análise de restrição para o polimorfismo A4751G no gene do FvW.....	47

	PÁG.
RESUMO	<i>vii</i>
ABSTRACT	<i>viii</i>
1- INTRODUÇÃO	16
1.1- Tromboembolismo venoso	17
1.2- Fator VIII	18
1.3- Fator de Von Willebrand	23
1.4- ADAMTS-13	25
1.4.1- O Polimorfismo 1852C/G (Pro618Ala).....	27
1.4.2- A mutação 4006 C/T (Arg1336Trp).....	27
2- JUSTIFICATIVA	28
3- OBJETIVOS	30
4- CASUÍSTICA	32
4.1- Grupo de pacientes com TVP	33
4.2- Grupo controle	33
5- METODOLOGIA	35
5.1- Coleta de sangue	36
5.2- Dosagem dos fatores da coagulação	36
5.2.1- FVIII:C.....	36
5.2.2- FVIII:Ag.....	36
5.2.3- FvW:Ag.....	37
5.3- Análise dos polimorfismos/mutações	38

5.3.1- Extração de DNA de sangue periférico.....	38
5.3.2- Determinação das alterações nos genes da ADAMTS13 e do FvW.....	39
5.3.2.1- Polimorfismo 1852C/G (Pro618Ala).....	39
5.3.2.2- Mutação 4006 C/T (Arg1336Trp).....	44
5.3.2.3- Polimorfismo 1584 A/G.....	46
5.4- Análise estatística.....	47
6- RESULTADOS.....	48
6.1- Características clínicas.....	49
6.2- Dosagens plasmáticas.....	49
6.3- Análise das alterações moleculares.....	50
7- DISCUSSÃO.....	56
7.1- Características clínicas.....	57
7.2- Dosagens plasmáticas.....	58
7.3- Análise de polimorfismos e mutações.....	58
7.3.1- Polimorfismo no gene do FvW.....	59
7.3.2- Polimorfismos no gene da ADAMTS13.....	60
8- CONCLUSÕES.....	63
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
10- ANEXOS.....	75
Anexo 1- Questionário.....	76
Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Tromboembolismo venoso

A trombose é definida como um processo patológico resultante da ativação e propagação inapropriada do sistema hemostático normal, resultando na formação de um trombo que pode acometer tanto o sistema venoso como o arterial [Loscalzo, 1995].

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença freqüente, e por vezes, grave e fatal. A incidência de TEV aumenta com a idade, sendo de 1/100.000 na infância e de 1/100 em idosos [Rosendaal,1997], e é semelhante entre homens e mulheres [Fowkes *et al.*,2003].

Um estudo norte-americano demonstrou que afro-descendentes e caucasóides possuem incidências maiores de TEV (29/100.000 e 23/10.000, respectivamente) quando comparados aos hispânicos (14/100.000) e asiáticos (6/100.000) [White *et al.*,1998]. No Brasil os estudos mostraram que a incidência de TEV é semelhante ao descrito em outros países [Pereira *et al.*, 2007].

O TEV pode se manifestar como trombose venosa profunda (TVP), superficial e embolia pulmonar. A primeira afeta principalmente as veias profundas de membros inferiores, embora possa acometer outros sítios venosos, tais como os vasos dos membros superiores, cerebrais, abdominais e retina [Maffei *et al.*, 2004].

Em sua fase aguda, a TVP provoca sintomas relacionados à obstrução venosa, tais como: edema, eritema e aumento da temperatura do membro afetado. A principal complicação nesta fase é o possível desprendimento do trombo ou de parte dele que pode migrar para os vasos pulmonares e provocar uma embolia pulmonar (EP) [Maffei *et al.*, 2004].

A trombofilia é caracterizada como uma tendência à trombose, decorrente de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos. Os fatores de risco adquiridos já estabelecidos são: imobilização, gravidez, puerpério, câncer, uso de estrógeno/progesterona, trauma, cirurgia, presença de anticorpo antifosfolípido (SAAF), dentre outros [Rosendaal, 1999; Robetorye & Rodgers, 2001]. A trombofilia hereditária decorre de defeitos genéticos que comprometem os mecanismos de anticoagulação, como a deficiência de proteína C, de

proteína S, da antitrombina, a mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden), a mutação G20210A no gene da protrombina, e níveis elevados de FVIII [Rosendaal, 1999; Robertorye & Rodgers, 2001].

O TEV é uma doença multifatorial onde se faz necessária uma interação dinâmica entre fatores de risco genéticos e adquiridos. A trombofilia hereditária é também multigênica, sendo que o risco trombótico é maior em pessoas com coexistência de trombofilias [Rosendaal *et al.*, 1999]. É importante ressaltar que em aproximadamente 30% dos pacientes com TEV não se identifica nenhum fator adquirido ou hereditário, fato que sugere a presença de mecanismos adicionais ainda desconhecidos na etiologia da doença [Heijboer *et al.*, 1990; Rosendaal *et al.*, 1995 ; Poort *et al.*, 1996].

Da mesma forma, ocorre interação entre fatores de risco adquiridos e genéticos, onde há aumento do potencial de trombose quando portadores de trombofilia hereditária são expostos a fatores de risco adquiridos [Vandenbroucke *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*, 1996].

1.2- Fator VIII

O sistema hemostático é responsável não apenas por interromper sangramentos pós-lesão vascular, mas também manter o sangue fluido dentro dos vasos. O ponto central do sistema hemostático é a cascata da coagulação que consiste em uma série de reações enzimáticas, onde zimogênios dos fatores de coagulação são ativados em seqüência, culminando na formação do coágulo de fibrina [Franco, 2004].

A coagulação é iniciada com a exposição do fator tecidual (FT) e conseqüente formação do complexo FT-FVIIa, que irá ativar o FIX e FX. Logo após a geração das primeiras moléculas de FX ativado (FXa), este é inibido pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI - *tissue factor pathway inhibitor*). Apesar desta rápida inibição, as poucas moléculas de trombina geradas pela ação do complexo FT-FVIIa são capazes de ativar o fator FXI. O FXI ativado (FXIa) ativa o FIX que, por sua vez forma um complexo com o fator VIII ativado (FVIIIa), para em seguida ativar o FX. O FXa, tendo o fator V ativado

(FVa) como cofator, converte a protrombina (FII) em trombina. A trombina por sua vez atua sobre o fibrinogênio, convertendo-o em monômeros de fibrina, que serão polimerizados para formar o coágulo de fibrina. [Franco, 2004].

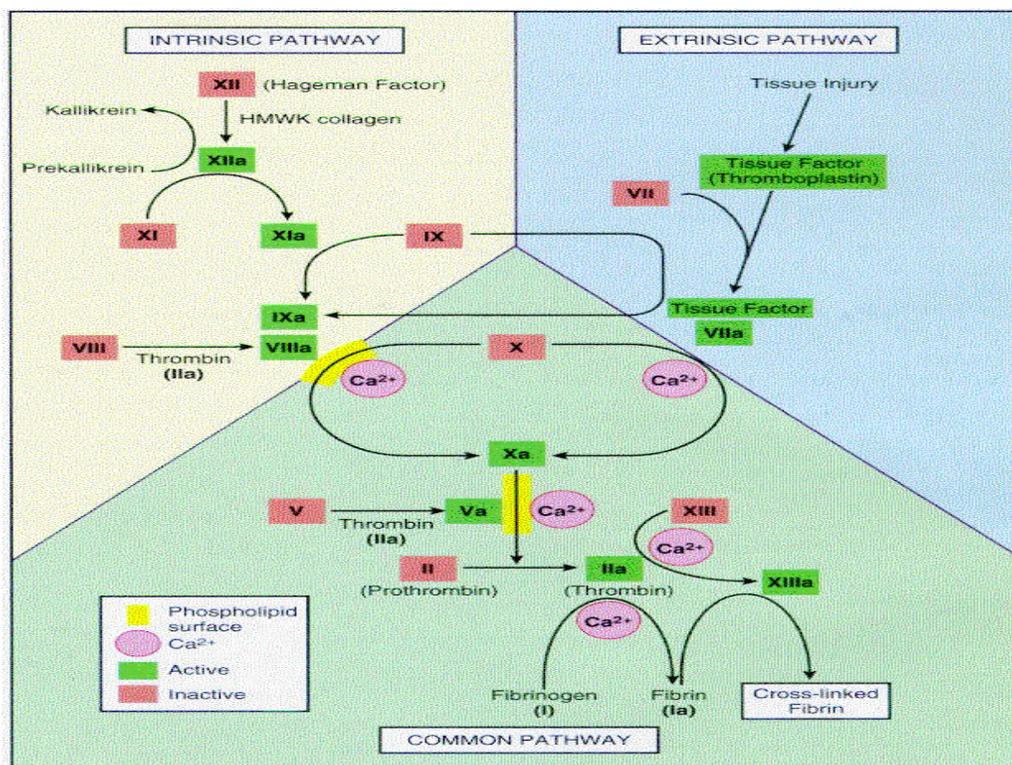


Figura 1- Vias de ativação da cascata da coagulação(<http://bioinvestigation.org/saude>).

O FVIII é sintetizado principalmente no fígado, mas seu RNAm já foi detectado no baço, linfonodos e rins. A observação de que humanos e cães com hemofilia A (deficiência de FVIII) poderiam ser curados com um transplante de fígado sugere que este é o principal sítio de síntese do FVIII [Vlot *et al*, 1998].

Apesar de inúmeros estudos, ainda não estão totalmente estabelecidos os diversos mecanismos que interferem com a concentração plasmática do FVIII. De qualquer forma, sabe-se que o fator de von Willebrand (vWF), o tipo sanguíneo ABO, fatores genéticos, o LRP (receptor de LDL), idade e sexo tem influência sobre o nível plasmático de FVIII [Saenko *et al*, 1999 ; Sousa *et al*, 2007].

A maior parte do FVIII circula no plasma associado ao fator de von Willebrand (FvW), sendo que apenas uma pequena fração permanece livre na circulação. A proporção normal entre FVIII e FvW é de aproximadamente 1:50. A ligação entre eles é essencial para a sobrevivência do FVIII *in vivo* e para evitar sua ativação inapropriada. Portanto, o nível plasmático de FVIII é influenciado pelo nível do FvW [Schambeck *et al.*, 2004].

Também está bem estabelecido que indivíduos do grupo sanguíneo O possuem níveis diminuídos de FVIII, quando comparados àqueles dos grupos não-O [Bertina, 2004].

A concentração do FVIII e de outros fatores da coagulação é controlada por vários genes reguladores, e estes genes parecem ser expressos de forma diferente nos diversos grupos étnicos [Souto *et al.*, 2000 ; Patel *et al.*, 2004].

O LRP interfere com o catabolismo do FVIII e, portanto, a ligação dessas duas proteínas é um fator determinante da concentração plasmática de FVIII. Morange *et al.* (2004) analisaram três regiões do gene do FVIII que codificam as regiões de ligação entre o FVIII e o LRP, em cerca de 100 famílias saudáveis voluntárias (total de 524 indivíduos), contudo não se identificou nenhuma alteração correlacionada ao nível plasmático do FVIII.

O aumento do nível plasmático de FVIII é um fator de risco independente e prevalente para o TEV [Kraaijenhagen *et al.*, 2000]. Um estudo realizado pelo nosso grupo confirmou esse resultado em uma população brasileira [Mello, 2006].

Indivíduos com FVIII plasmático acima 150 UI/dL têm um risco 4,8 vezes maior de desenvolver TVP quando comparados àqueles com FVIII abaixo de 100 IU/dL. Também foi demonstrado que o risco de uma retrombose em pacientes com FVIII aumentado, após episódio único ou múltiplo de trombose foi de 5,4 e 22%, respectivamente. Observou-se também que para cada elevação de 10 UI/dl na dosagem do FVIII no plasma, o risco de episódios recorrentes aumenta em 24%. Portanto, o nível elevado do FVIII é também um fator de risco dose-dependente para TEV [Kraaijenhagen *et al.*, 2000].

Kyrle *et al.* (2000) analisaram 360 pacientes após o primeiro episódio de TEV, por um período de 30 meses. A probabilidade de recorrência em 2 anos entre indivíduos com FVIII acima do percentil 90 foi de 37%, comparada a 5% dentre aqueles com níveis abaixo desse percentil, correspondendo a um risco relativo de recorrência de 5,5. Após o ajuste por variáveis como idade, sexo, e trombofilia hereditária, este risco permaneceu significativo, demonstrando tratar-se de um risco independente e dose-dependente [Kyrle *et al.*, 2000 ; Legnani *et al.*, 2004].

Como o FVIII é uma proteína de fase aguda, uma das hipóteses para o seu aumento seria a resposta ao processo inflamatório trombótico. Logo após o episódio de trombose há um aumento do FVIII e da proteína C reativa, também um marcador de fase aguda. Contudo, na evolução desses pacientes, após o período agudo, ocorre normalização dos níveis de proteína C reativa, sem que paralelamente ocorra o mesmo com o FVIII, descartando essa hipótese [O'Donnel *et al.*, 1997 ; Kamphuisen *et al.*, 1999; O'Donnel *et al.*, 2000].

Os estudos que incluíram pacientes com TEV e aumento de FVIII sugerem um padrão de herança genética. Contudo, a análise do gene do FVIII, demonstrou inúmeros polimorfismos, mas sem qualquer correlação com os níveis elevados de FVIII [Kamphuisen *et al.*, 2001 ; Endler *et al.*, 2003 ; Viel *et al.*, 2007]. Mesmo a análise da região promotora e da região terminal 3' do gene do FVIII não conseguiu identificar nenhuma alteração relacionada à concentração do FVIII [Mansvelt *et al.*, 1998].

O receptor hepático LRP (“LDL receptor related protein”), também conhecido como α 2-macroglobulina, é uma glicoproteína de membrana, membro da família dos receptores endocíticos de LDL, e está presente em abundância em vários tecidos, sendo predominante no fígado [Neels *et al.*, 2000].

O LRP está envolvido na endocitose de seus ligantes para que estes sejam então degradados nos lisossomos. Este receptor possui um amplo espectro de ligantes, sendo que os principais são: lipoproteínas, lipoproteínas de baixíssimo peso molecular (VLDLs), lipases, serino-proteases e proteínas de matriz. [Bovenschen *et al.*, 2004; Ananyeva *et al.*, 2001].

Bovenschen *et al* (2003) utilizando um modelo animal transgênico deficiente de LRP e controles normais, mostrou que os animais deficientes apresentam aumento de FVIII na circulação, devido ao catabolismo diminuído do FVIII [Bovenschen *et al.*, 2003].

Estudos recentes utilizando cultura de fibroblastos demonstraram que o FVIII se liga especificamente ao LRP e que este receptor medeia a internalização e subsequente degradação do FVIII, indicando que o LRP desempenha um importante papel no ajuste do FVIII plasmático *in vivo* [Saenko *et al.*, 1999].

Estudos estruturais demonstraram que o FVIII possui dois sítios de alta afinidade pelo LRP, localizados nos domínios A2 e A3, e também um sítio de baixa afinidade no domínio C2. As mutações que envolvem os nucleotídeos que codificam o domínio A2 do FVIII podem alterar a ligação e internalização do FVIII pelo receptor LRP, provocando um aumento da meia-vida do FVIII plasmático. Essas mutações podem acarretar aumento do FVIII plasmático em graus variáveis, desde muito acentuado a praticamente insignificante [Sarafanov *et al.*, 2006].

Alguns estudos de ligação *in vitro* mostraram que o LRP apresenta 4 variantes, sendo que a maioria dos seus ligantes tem maior afinidade pelas variantes II (principal) e IV [Willnow *et al.*, 1994 ; Mikhailenko *et al.*, 2001].

Estudos demonstraram que tanto a cadeia pesada (domínio A2) como a leve (particularmente os domínios C2 e A3) do FVIII, possuem afinidade de ligação com as variantes II e IV do LRP [Horn *et al.*, 1997 ; Neels *et al.*, 1999 ; Lenting *et al.*, 1999; Bovenschen *et al.*, 2003 ; Sarafanov *et al.*, 2007]. Assim sendo, o estudo da região do gene que codifica essas duas regiões seria de grande relevância.

Alguns estudos já procuraram correlacionar as alterações genéticas do LRP com níveis plasmáticos de FVIII ou com trombose venosa. Marchetti *et. al* (2006) relataram que a presença dos polimorfismos -25CG ou D1241E correlacionam-se com níveis mais baixo de atividade e antígeno do FVIII, sugerindo que estes alelos mutados promovem uma maior expressão do LRP, acarretando maior catabolismo do FVIII.

1.3- Fator de von Willebrand

O FvW é sintetizado por células endoteliais e megacariócitos, e circula no plasma na forma de multímeros, com peso molecular que variam de 500 a 20.000 KDa. Como já citado anteriormente, o FvW é um carreador plasmático do FVIII, impedindo que este seja lisado prematuramente [Mannucci *et al.*, 2004].

O produto primário do gene do FvW é um polipeptídeo precursor, e dentro das células endoteliais e/ou megacariócitos é clivado e transformado numa subunidade madura. A partir daí, as extremidades carboxila das subunidades maduras interagem entre si formando dímeros e, posteriormente, as extremidades amino destes dímeros também irão interagir dando origem a um multímero. A última etapa consiste numa intensa glicosilação das subunidades do multímero, sendo este estocado nas células para posteriormente ser secretado no plasma [Vlot *et al.*, 1998 ; Bowen & Collins, 2006].

A figura a seguir mostra a seqüência dos domínios da proteína do FvW e seus éxons correspondentes no gene. O gene do FvW está localizado no cromossomo 12, e possui aproximadamente 178 kb distribuídos em 52 éxons e íntrons [Mancuso *et al.*, 1989].

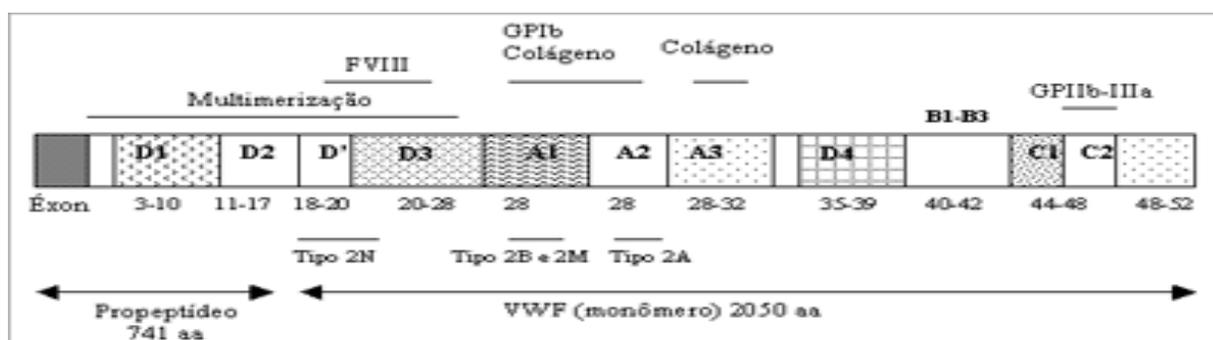


Figura 2- Estrutura do polipeptídeo precursor do Fator de von Willebrand (<http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/PublishingImages/figura1a>)

O nível plasmático do FvW depende de fatores genéticos individuais, condições crônicas e eventos transitórios. Como fatores genéticos individuais, podemos citar o grupo sanguíneo ABO, sexo e etnia [Ginsburg *et al.*, 2005 ; Sousa *et al.*, 2007].

Condições crônicas que elevam o FvW plasmático são idade, obesidade, diabetes, inflamação crônica, câncer, doença hepática ou renal. Já como condições transitórias, podemos citar a gravidez, cirurgia, exercício físico, e agentes farmacológicos como epinefrina, vasopressina e desmopressina [Franchini & Lippi, 2006].

O domínio de ligação entre o FVIII e o FvW está localizado na extremidade amino-terminal (272aa) do FvW maduro, e é codificado pelos éxons 18 ao 23. Apesar da influência do FvW sobre o nível plasmático de FVIII, não há nenhuma alteração nessa região do gene do FvW que tenha sido correlacionada ao aumento do FVIII ou a um aumento no risco de eventos trombóticos [Bowen *et al.*, 2001 ; Kamphuisen *et al.*, 2001; Lenting *et al.*, 2004].

A análise do gene do FvW revelou que o polimorfismo A4751G (Tyr1584Cys) no éxon 28 está relacionado a uma maior suscetibilidade desse fator à proteólise pela ADAMTS-13 [Bowen *et al.*, 2005 ; Keeney *et al.*, 2007].

Davies *et al.* (2007) ao analisar a frequência do polimorfismo A4751G em 5052 controles verificou que 1% dos voluntários eram heterozigotos para este polimorfismo. Além disso, também foi observado que os indivíduos heterozigotos tinham níveis plasmáticos de FvW significativamente menores quando comparados com homozigotos normais (82 ± 35 UI/dL vs 111 ± 37 UI/dL).

A frequência do polimorfismo A4751G já foi analisada em algumas doenças. Um estudo realizado com 76 indivíduos com doença de von Willebrand tipo 1 mostrou uma frequência de 25% de heterozigose [Bowen *et al.*, 2005].

Bongers *et al.* (2007) ao avaliar a frequência do polimorfismo A4751G em 374 pacientes com trombose arterial e 332 controles, observaram que a frequência do genótipo AG foi de 0,5% e 0,6%, respectivamente, não estando portanto, relacionado a um fator protetor para a doença.

Outras mutações encontradas no gene do FvW parecem estar relacionadas a uma menor sobrevivência do FvW na circulação, independente da proteólise pela ADAMTS-13 [Van Schooten *et al.*, 2005].

1.4- ADAMTS-13

A ADAMTS-13 é uma metaloprotease plasmática responsável pela modulação do tamanho molecular do FvW plasmático. Ela se liga ao domínio A2 do FvW, entre os aminoácidos 1480 a 1682, promovendo a clivagem da ligação peptídica Tyr1605-Met1606 [Wu et al., 2006], transformando os multímeros de altíssimo peso molecular em multímeros menores [Bowen & Collins, 2006].

A relação entre o FvW e a ADAMTS-13 foi demonstrada inicialmente pela observação de que em pacientes com púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), a deficiência congênita (mutação no gene da ADAMTS-13) ou adquirida (presença de auto-anticorpos contra a ADAMTS-13) da enzima prejudicava o processo fisiológico de clivagem dos multímeros de alto peso molecular do FvW. Estes multímeros de alto peso molecular são capazes de promover agregação plaquetária intravascular espontânea levando à formação de trombos plaquetários. [Rieger *et al.*, 2006].

Shenkman *et al.* (2006) demonstraram que a ADAMTS-13 também possui um papel fundamental na regulação da adesão plaquetária em condições de fluxo, prevenindo assim uma propagação excessiva do trombo.

Lam *et al.* (2007) demonstraram que a ADAMTS-13 é suscetível à inativação proteolítica pela trombina *in vitro*. Foram identificados seis ou sete sítios de clivagem, sendo que os principais estão localizados nas extremidades carboxila e amino terminais. Mesmo após a clivagem pela trombina, a ADAMTS-13 ainda é capaz de se ligar ao FvW, mas com uma afinidade 8 vezes menor.

A ADAMTS-13 é sintetizada predominantemente no fígado, entretanto sua expressão gênica também foi detectada em outros tecidos e células, tais como plaquetas e células endoteliais [Levy *et al.*, 2005 ; Turner *et al.*, 2006 ; Santos-Martinez *et al.*, 2007]. Liu *et al.* (2005) demonstraram, por citometria de fluxo, que a ADAMTS-13 está expressa na superfície das plaquetas, e que esta expressão aumenta significativamente após a ativação pela trombina.

O esforço físico diminui o nível de ADAMTS-13, e indivíduos do grupo sanguíneo O possuem maior concentração plasmática de ADAMTS-13 quando comparados a indivíduos do grupo não-O [Mannucci *et al.*, 2004 ; Claus *et al.*, 2006]. Além disso, Feys *et al.* (2007) demonstraram que tanto a atividade como o antígeno da ADAMTS-13 estão diminuídos na cirrose hepática, em doenças inflamatórias, na cirurgia cardíaca e em gestantes; e que esta diminuição foi acompanhada por um aumento do nível antigênico do FvW.

O gene da ADAMTS-13 está localizado no cromossomo 9, compreendendo 29 éxons e íntrons, e uma seqüência genômica de aproximadamente 37 kb [Zheng *et al.*,2001].

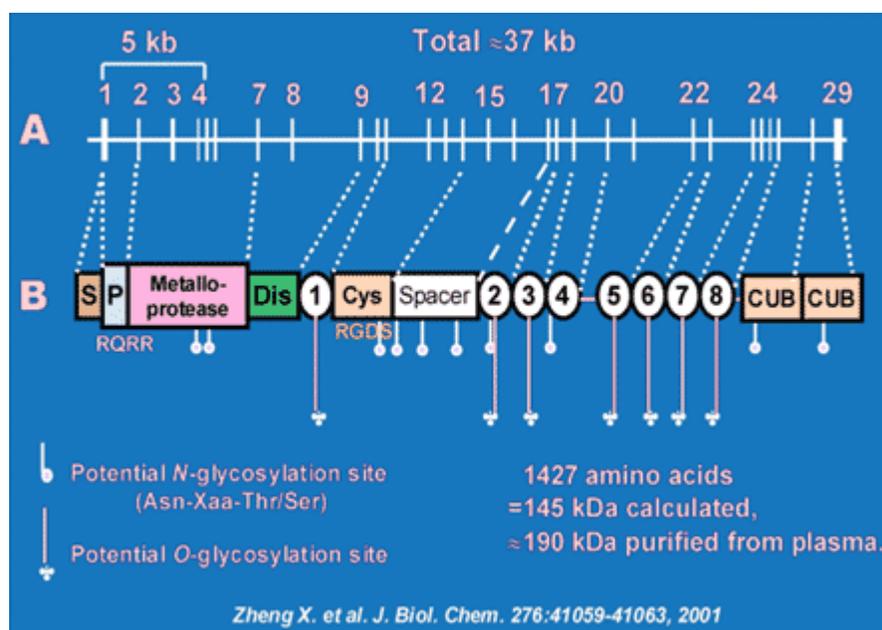


Figura 3- Estrutura primária do gene e da proteína da ADAMTS13.

Mais de 80 alterações genéticas, incluindo polimorfismos, mutações *missense*, *nonsense*, e em sítios de *splice*, bem como deleções e inserções já foram descritas no gene da ADAMTS-13, e algumas delas associadas ao fenótipo pró-coagulante [Levy *et al.*, 2001 ; Kokame *et al.*, 2002 ; Veyradier *et al.*, 2004 ; Schneppenheim *et al.*, 2006 ; Kokame, 2008]. Um estudo realizado com crianças com demonstrou que todos

aqueles com PTT congênita carregavam mutações gênicas em ambos os alelos do gene da ADAMTS-13 [Schneppenheim *et al.*, 2003].

Vários estudos têm demonstrado que diversas mutações pontuais no gene da ADAMTS-13, identificadas em pacientes com PTT, podem promover alterações na síntese, secreção e/ou atividade da ADAMTS-13 [Uchida *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2006; Pimanda *et al.*, 2004; Donadelli *et al.*, 2006].

1.4.1- O polimorfismo C1852G (Pro618Ala)

O polimorfismo C1852G está localizado no éxon 16 do gene da ADAMTS13, e resulta na mudança do aminoácido prolina por uma alanina no “*spacer domain*” da proteína. Este polimorfismo foi associado a níveis diminuídos tanto da secreção como atividade da ADAMTS13. Plaimauer *et al.* (2006) demonstraram que a presença de homozigose mutante para esse polimorfismo estava associada a uma diminuição da secreção da enzima para 27% e de sua atividade para 14%.

Antoine *et al.* (2003) ao avaliar a frequência do polimorfismo C1852G em 120 alelos de indivíduos-controle, observaram que a frequência do alelo mutado foi de 9,2%, confirmando portanto, que esta alteração molecular tratava-se de um polimorfismo.

1.4.2- A mutação C4006T (Arg1336Trp)

A mutação C4006T está localizada no éxon 28 do gene da ADAMTS13, e resulta na mudança do aminoácido arginina por um triptofano no “*cub 2 domain*” da proteína. Esta mutação também foi associada a níveis diminuídos tanto da secreção como da atividade da ADAMTS13. Plaimauer *et al.* (2006) demonstraram que a presença de homozigose mutante para essa alteração estava associada a uma diminuição da secreção da enzima para 23% e de sua atividade para 12%.

Antoine *et al.* (2003) ao avaliar a frequência da mutação C4006T em 230 alelos de indivíduos-controle, não identificaram nenhum alelo mutado, concluindo portanto, que esta alteração molecular tratava-se de uma mutação.

2- JUSTIFICATIVA

O TEV é considerado um importante problema de Saúde Pública devido à expressiva incidência e taxa de mortalidade desta doença. Os mecanismos etiológicos envolvidos no TEV ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo que fatores de risco pró-trombóticos não são identificados em uma parcela dos pacientes.

Nos últimos anos, vários estudos, incluindo os realizados pela nossa Instituição, demonstraram uma relação entre os níveis de FVIII e o risco de TEV. No entanto, a maioria destes estudos foram realizados em populações de origem caucasóide.

Apesar da identificação de alguns fatores associados aos níveis de FVIII, tais como influência genética e grupo sanguíneo ABO, ainda não foram totalmente esclarecidos todos os mecanismos e fatores envolvidos na variação deste fator no plasma.

Tendo em vista que:

- Existe uma variação nos níveis de FVIII e FvW, que parece ser multifatorial, mas ainda não totalmente esclarecida;
- A análise de alterações moleculares nos genes do FvW e da ADAMTS-13 podem indicar possíveis influências genéticas nos níveis plasmáticos do FVIII em humanos

3- OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

Avaliar em pacientes com TVP e em controles normais:

- A prevalência do polimorfismo A4751G no gene do FvW e sua relação com os níveis de FVIII e FvW no plasma, e com o risco de TVP;
- A prevalência do polimorfismo C1852G e da mutação C4006T no gene da ADAMTS-13 e suas relações com níveis de FVIII e FvW no plasma, e com o risco de TVP.

4- CASUÍSTICA

Os pacientes e controles foram convidados a participar do estudo e então assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

4.1- Grupo de pacientes com TVP

De um grupo de pacientes com diagnóstico de TVP e acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, no período de janeiro de 1990 a setembro de 2007, foram selecionados aqueles que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir:

Critérios de inclusão - idade entre 18 e 70 anos, um tempo mínimo de 3 meses após a suspensão do uso de anticoagulantes, diagnóstico de TVP estabelecido por ultrassom com Doppler;

Critérios de exclusão - presença de neoplasia, gravidez ou puerpério, doença renal, hepática ou tireoideana, doença inflamatória ou infecciosa, Síndrome do Anticorpo Antifosfolípídico, uso de drogas como corticóide, anticoncepcional hormonal (ACH) e terapia de reposição hormonal (TRH) no momento da coleta de sangue.

Todos os pacientes foram previamente investigados quanto à presença de trombofilia hereditária (proteína C, proteína S, antitrombina, fator V de Leiden e mutação G20210A no gene da protrombina), e de anticorpos antifosfolípidios.

4.2- Grupo controle

O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis, doadores de sangue ou funcionários do Hemocentro da Unicamp, provenientes da mesma área geográfica dos pacientes. O critério de inclusão foi idade entre 18 e 70 anos. Os critérios de exclusão foram os mesmos utilizados para os pacientes, acrescido do histórico pessoal ou familiar de TVP.

Os indivíduos foram emparelhados por sexo, grupo étnico e idade aproximada (diferença de até 5 anos) dos pacientes. Para a classificação da etnia foi considerada a ascendência até a terceira geração e aspectos físicos do indivíduo, tais como: cor de pele, textura dos cabelos e formato nasal. Os indivíduos de ambos os grupos foram divididos em 3 grupos étnicos: caucasóides, negróides, e miscigenados (pardos e brancos não-caucasóides).

Todos os voluntários participantes do estudo responderam a um questionário para avaliar os critérios de inclusão e exclusão, conforme o Anexo2.

5- METODOLOGIA

5.1- Coleta de sangue

O sangue para a dosagem dos parâmetros de coagulação foi coletado de veia periférica em tubo Vacutainer, contendo citrato de sódio 3,2%, na proporção de 9:1. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1550g por 15 minutos. Foram feitas alíquotas de 400µL de plasma que então foram congeladas e armazenadas a -80°C até a sua análise.

O sangue para preparo do DNA foi coletado em tubo Vacutainer com EDTA.

5.2- Dosagem dos fatores da coagulação

5.2.1- Fator VIII:C

Para a determinação da atividade do FVIII foi empregado o método coagulométrico de um estágio, utilizando-se plasma deficiente de FVIII (DiaMed, Cressier, Suíça) e reagentes para a determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), em coagulômetro de leitura foto-óptica Koagulab 32-S (Ortho Diagnostics Systems). Inicialmente foi executada uma curva-padrão (tempo de coagulação em segundos versus diluição), obtida por diluições seriadas de um controle comercial normal (DiaMed, Cressier, Suíça) em tampão veronal, com concentração inicial previamente determinada pelo fabricante.

Após a diluição da amostra em tampão veronal (volume final = 50µL), são adicionados 50 µL de plasma deficiente de FVIII, e então realizado o TTPa. Os resultados foram obtidos por interpolação na curva-padrão. A curva foi previamente testada com controle normal e patológico. Os resultados foram expressos em UI/dl. O valor de normalidade do laboratório, estabelecido em plasma de 50 indivíduos normais, foi de 60-150 UI/dl.

5.2.2- Fator VIII:Ag

A dosagem do FVIII antigênico (FVIII:Ag) foi determinada por método cromogênico de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kit comercial (Affinity Biologicals INC., Canada).

Inicialmente, preparou-se a placa de ELISA onde foram colocados em cada orifício da placa, 100µL de anticorpo capturante de ovelha anti-FVIII diluído em tampão de sensibilização na proporção 1/100. A placa foi incubada a 22°C por 2 horas, e posteriormente, lavada 3 vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween).

As amostras de plasma foram diluídas em três concentrações diferentes (1:4, 1:8 e 1:16) com tampão de diluição. Em cada poço da placa foram pipetados 100µL de plasma diluído. Após um período de incubação de 2 horas a 22°C, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de tampão de lavagem (PBS-Tween, na proporção 1 L para 10 mL).

O próximo passo foi adicionar em cada poço da placa 100µL de anticorpo de ovelha anti-FVIII conjugado com peroxidase, pré-diluído em tampão do conjugado. A placa foi então colocada em agitação por 60 minutos a 22°C, e depois lavada 3 vezes com 200µL de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 100µL de substrato OPD (diluído em tampão de substrato). A placa foi então colocada em agitação por 15 minutos, com uma cobertura de papel alumínio.

Após a agitação, foram adicionados em cada poço 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5 M, para o bloqueio da reação e, então realizada a leitura por espectrofotometria num comprimento de onda de 490nm. Os resultados foram expressos em UI/dl.

5.2.3- Fator de von Willebrand

O método utilizado para a dosagem do FvW plasmático foi o ensaio imunoenzimático (ELISA). Inicialmente, preparou-se a placa de ELISA onde foram colocados 125µL de anticorpo capturante de coelho anti-von Willebrand diluído em tampão de sensibilização em cada poço da placa. A concentração desse anticorpo foi de 7µL/ml (17µL de anticorpo + 14 ml de tampão). A placa foi deixada a 4°C por 24 horas. Então a mesma foi lavada 4 vezes com 200µL de tampão de lavagem. Em seguida, foram pipetados 170µL de tampão de cobertura, seguida de uma hora de incubação sob agitação à temperatura ambiente. Passada uma hora, a placa foi lavada 4 vezes com 200µL de tampão de lavagem.

As amostras de plasma dos pacientes bem como os controles foram preparados através de diluições 1:50 com tampão de diluição (50µL de plasma + 2450µL de tampão de diluição). Em cada poço da placa foram pipetados 100µL de plasma diluído, que então ficaram em incubação por 3 horas à temperatura ambiente. Passada esta incubação, a placa foi lavada 4 vezes com 200µL de tampão de lavagem. O próximo passo foi adicionar em cada poço da placa 100µL de anticorpo de coelho anti-von Willebrand conjugado com peroxidase, diluído em tampão do conjugado (3,8µL de anticorpo + 30ml de tampão).

A placa foi então colocada em agitação por 60 minutos à temperatura ambiente, e depois lavada 4 vezes com 200µL de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 100µL de substrato OPD (diluído em tampão de substrato). A placa foi então colocada em agitação por 15 minutos, com uma cobertura de papel alumínio. Após a agitação, foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico em cada poço da placa, para bloqueio da reação e, então realizada a leitura por espectrofotometria num comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em UI/dl.

5.3- Análise dos polimorfismos/mutações

5.3.1- Extração de DNA de sangue periférico

O DNA foi extraído de 8ml de sangue coletado com EDTA. Após centrifugação por 15 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foram adicionados 5 volumes de NH₄Cl 144mM e ½ volume de NH₄HCO₃ 10mM, sendo misturado por inversão, para lise das hemácias. As amostras foram centrifugadas a 2200 rpm durante 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o procedimento foi repetido.

O sobrenadante foi descartado e ao sedimento obtido adicionou-se 5mL de tampão TKM1 (Tris-HCl 10mM, pH 7,6 KCl 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 0,2mM) e 125µL de Triton X10 (Sigma Chemical, CO, Steinheim, Alemanha). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 5mL TKM1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspensão com 400µL de TKM2 (NaCl 400mM, KCl 10mM, pH 7.6 MgCl₂ 10mM) e 25µL de SDS 10 (dodecil sulfato de sódio), para a lise dos leucócitos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante 30 minutos. Após

este período, foram acrescentados 180µL de NaCl 5M e homogeneizados com a própria ponteira. Esperou-se o tempo de 20 minutos em temperatura ambiente com a finalidade de precipitar as proteínas. Após este tempo, centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga.

O sobrenadante contendo o DNA foi submetido à extração através da adição de 450µL de clorofórmio/álcool isoamílico e 450µL de fenol bidestilado saturado com Tris-HCl pH 8.0, seguida de centrifugação à 12000 rpm por 5 minutos. Este processo foi repetido após a adição de 1mL de clorofórmio/álcool-isoamílico. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de fundo cônico de 1500µL. Acrescentou-se 10% do volume do sobrenadante com acetato de sódio 3M pH 5.2 e 1mL de etanol absoluto gelado, e agitou-se por inversão para precipitação do DNA.

Em seguida, centrifugou-se por 3 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70% gelado, e uma nova centrifugação foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente para secar. Depois de seco, o DNA foi ressuspensão em aproximadamente 300µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5 EDTA 1mM) que permaneceu durante 16 horas sob refrigeração (4°C) para sua total dissolução.

5.3.2- Determinação das alterações nos genes da ADAMTS13 e do FvW

As regiões gênicas de interesse foram amplificadas a partir de amostras de DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos para as regiões de interesse, segundo procedimento descrito por Saiki *et al* (1988). Para a realização das reações foi utilizado um termociclador automático (PTC 100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc MA, E.U.A).

5.3.2.1- Polimorfismo C1852G (Pro618Ala)

Para a detecção do polimorfismo C1852G, localizado no éxon 16 do gene da ADAMTS13, foi realizada uma reação de amplificação para um volume final de 30µL contendo 0,5µg de DNA genômico, 1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato

(dntps: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3 μ L de tampão da enzima polimerase (10 mM Tris pH 8.5), 1,2 mM $MgCl_2$, 0,3 μ M de cada *primer* (sense: 5'-CTGTGGCTCCTTAGAGGAGGGCTGGGG-3') (anti-sense: 5'-CGCTGAATGAATAAATGAACGAATCAGGG-3') e 2U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram submetidas a condições de ciclos pré-determinadas: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos de 40 segundos a 96°C, 40 segundos para anelamento a 55°C, e 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72°C..

Após a amplificação, o fragmento foi submetido á técnica de SSCP (*single strand conformation polymorphism*). Inicialmente, o fragmento amplificado foi submetido á uma incubação a 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial do fragmento de DNA amplificado, e em seguida, mantido em banho de gelo.

Depois de posicionar dois géis *PhastGelTM Homogeneous 12,5* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden*) na unidade eletroforética do *PhastSystem* (*Pharmacia Biotech*), as amostras amplificadas foram diluídas na proporção 1:6 com o corante *Loading Dye solution* (*Fermentas Life Sciences, Canada*), as amostras foram submetidas a 96°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA. Em seguida foram mantidas em gelo para manter a desnaturação. Depois de aplicadas nos géis de poliacrilamida a 12,5%, foram posicionados os tampões *PhastGelTM Native Buffer Strips* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden*), e então as amostras foram submetidas á corrida eletroforética até 800 aVh. Após a eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata.

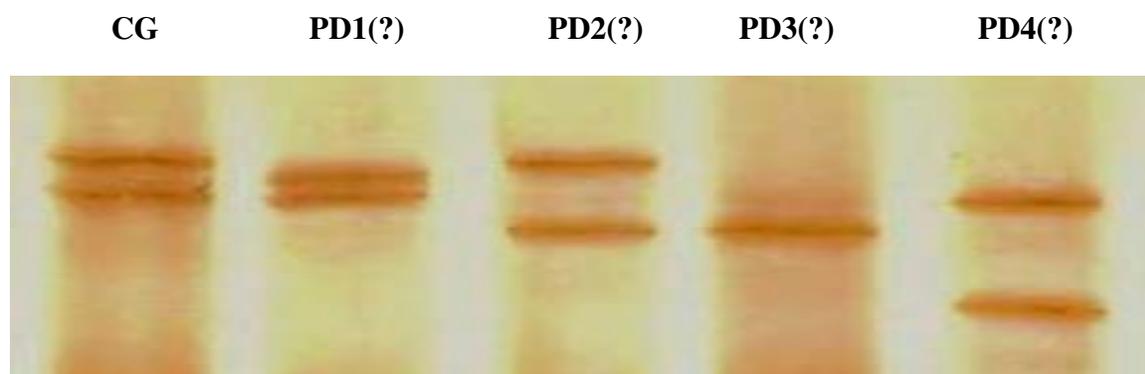


Figura 4- SSCP do polimorfismo C1852G no gene da ADAMTS13. “PD” significa “padrão desconhecido”.

Através desse procedimento foram detectados seis padrões na eletroforese, e para a identificação das alterações moleculares relacionadas a esses padrões foi utilizado o método de seqüenciamento automático direto. Após a amplificação das regiões específicas do DNA pela técnica de PCR, 50 µl do produto amplificado foi purificado, utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, England, UK), para eliminar produtos não incorporados durante a reação. A concentração do produto purificado foi quantificada em gel de agarose 2% com marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*, California, EUA).

Em seguida, foi realizada a reação de seqüenciamento utilizando o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystem, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante, para posterior eletroforese em seqüenciador automático (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer) e análise das seqüências.

Para o seqüenciamento automático direto das regiões gênicas amplificadas, foi utilizado 20-30 ng do produto de PCR purificado; 1 µl de oligonucleotídeo 1,6 µM (sense e antisense em reações distintas); 1 µl da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *Big Dye*, 1 µl de solução tampão Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl₂ 5 mM e água destilada estéril qsp 10 µl. Em um termociclador automático as amostras foram submetidas a 25 ciclos de denaturação inicial a 96°C por 10 segundos, temperatura de anelamento do *primer* por 15 segundos, e 60°C por 4 minutos para a síntese. O produto da reação de seqüenciamento foi submetido à purificação com 8µl de água destilada estéril, 32 µl de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000g, o sobrenadante foi descartado e em seguida colocado 100 µl de etanol 70%. A placa foi centrifugada novamente por 20 minutos a 4000g e o sobrenadante descartado, sendo submetida à centrifugação invertida por 7 segundos a 200g e aquecida no termociclador a 65°C por 5 minutos para completa remoção do etanol residual.

Para a eletroforese, adicionou-se 10 µl de formamida deionizada, as amostras foram então denaturadas a 96°C por 5 minutos, e incubadas em gelo para em seguida serem aplicadas no seqüenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer.

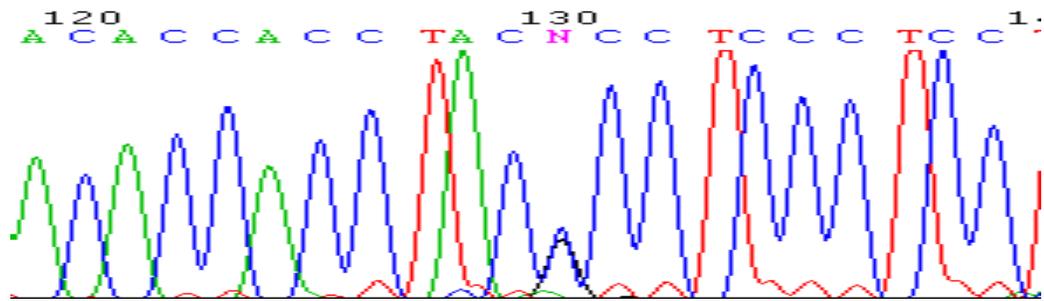


Figura 5- Sequenciamento do polimorfismo C1852G no gene da ADAMTS13. A heterozigose CG está representada pela letra “N”.

O sequenciamento direto de um dos padrões observados no SSCP (Figura 6) revelou que um dos padrões de banda desconhecidos tratava-se da alteração C1797T (Ile 599 Thr) ainda não descrita na literatura (Figura 7).

CT

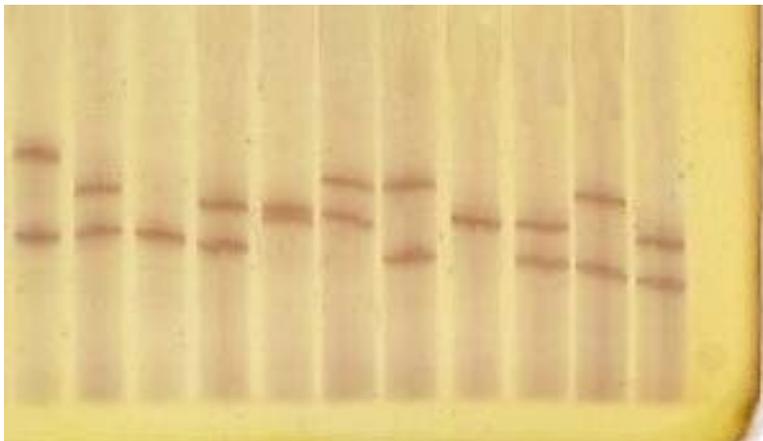


Figura 6- SSCP do polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13.

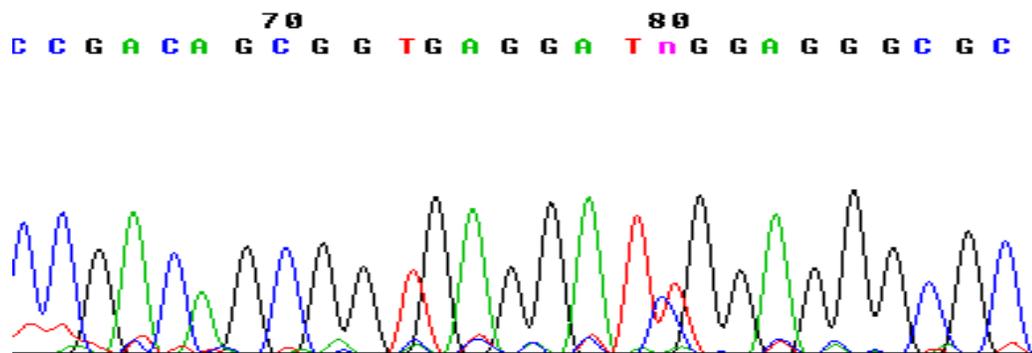


Figura 7- Sequenciamento do polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13. A heterozigose CT está representada pela letra “n”.

Como o sítio deste polimorfismo é reconhecido pela enzima *A₁wI* (MBI Fermentas, Lituânia), optou-se por utilizar esse método na genotipagem de todos os pacientes e controles incluídos no estudo. Foi realizada uma reação para um volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 408pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), e 3U da endonuclease de restrição *A₁wI* (MBI Fermentas, Lituânia). Essa reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C. Após a digestão, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3%, e depois de coloração com brometo de etídeo visualizado sob luz ultravioleta.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo normal (C), a endonuclease de restrição reconhece dois sítios de clivagem, apresentando três fragmentos de tamanhos de 147pb, 132pb e 129pb. Na presença do alelo mutado (T) houve a perda de um sítio de clivagem para a endonuclease de restrição, sendo visualizados apenas 2 fragmentos: um de 279pb e outro de 129pb. Assim, amostras heterozigotas (CT) apresentam 4 fragmentos de tamanhos de 279pb, 147pb, 132pb e 129pb (Figura 8).

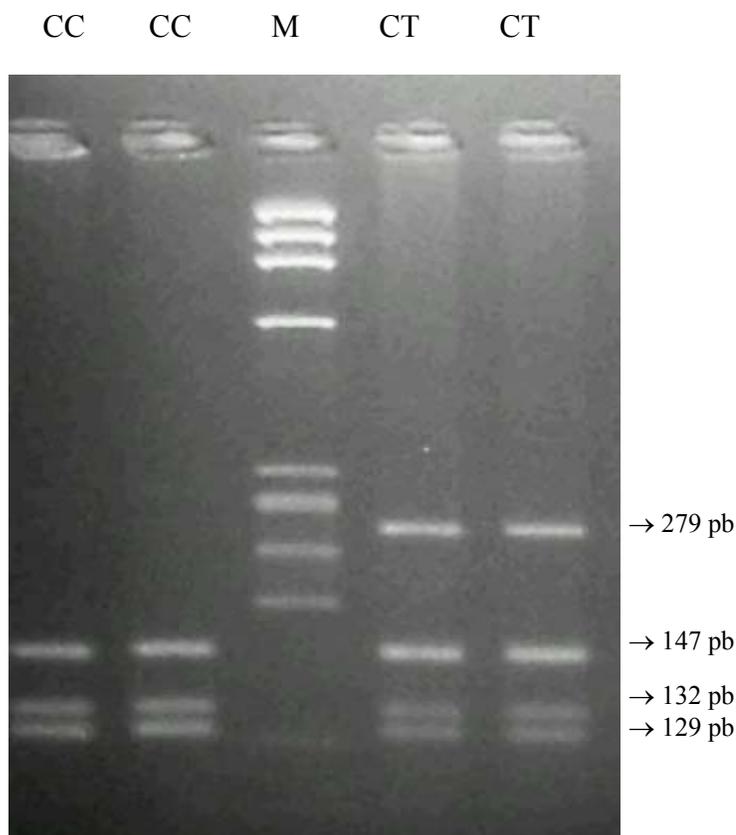


Figura 8 Análise de restrição para polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13 (M=marcador).

5.3.2.2- Mutação 4006C/T (Arg1336Trp)

Para a identificação da mutação C4006T, localizada no éxon 28 do gene da ADAMTS13, foi realizada uma reação de amplificação para um volume final de 30µL contendo 0,5µg de DNA genômico, 1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dntps: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3 µL de tampão da enzima polimerase (10 mM Tris pH 8.5), 1,2 mM MgCl₂, 0,3 µM de cada “primer” (sense: 5'-ACGGCTCCCTGGCTGTGAGTTGTCC -3') e anti-sense: (5'-GGGTCCCCTAGCCCTGCACGCC -3') e 2 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram submetidas à condições de ciclos pré-determinadas: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos com 40 segundos a 96°C, 40 segundos para anelamento dos “primers” a 55°C, e 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72°C.

Em seguida, foi realizada uma reação para um volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 340pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), 0,2µL de BSA, e 3U da endonuclease de restrição *Nla III* (MBI Fermentas, Lituânia). Esta reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C. Da mesma forma, em seguida à digestão, o produto digerido é observado através de eletroforese em gel de agarose a 4%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo normal (C), a endonuclease de restrição reconhece três sítios de clivagem, apresentando quatro fragmentos de tamanhos 135pb, 93pb e 58pb e 54pb. Na presença do alelo mutado (T) houve o ganho de um sítio de clivagem para a endonuclease de restrição, sendo visualizados cinco fragmentos, de 104pb, 93pb, 58pb, 54pb e 31pb. Assim, amostras heterozigotas (CT) apresentam seis fragmentos de tamanhos 135pb, 104pb, 93pb, 58pb, 54pb e 31pb (Figura 9).

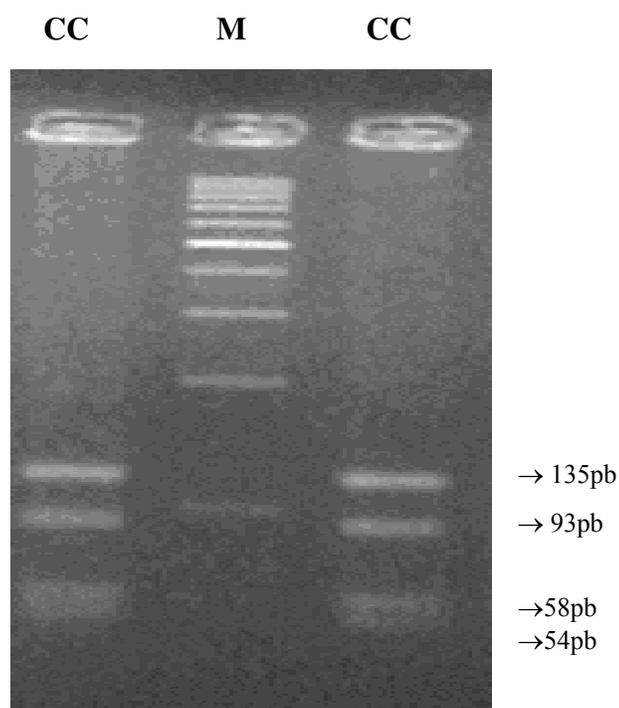


Figura 9- Análise de restrição para mutação C4006T no gene da ADAMTS13 (M=marcador).

5.3.2.3- Polimorfismo A4751G (Tyr1584Cys)

Para a identificação do polimorfismo A4751G, localizado no éxon 28 do gene do FvW foi realizada metodologia conforme descrita por Bowen&Collins, (2004). Uma reação de amplificação para um volume final de 30µL contendo 0,5µg de DNA genômico, 1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dntps: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3 µL de tampão da enzima polimerase (10 mM Tris pH 8.5), 1,2 mM MgCl₂, 0,3 µM de cada “primer” (sense: 5'-AACTCCATGGTTCTGGATGTGGCGTTC -3') e (anti-sense: 5'-AAGCCAGGATTAGAACCCGAGTCG -3') e 2 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitogen). As reações foram submetidas a condições de ciclos pré-determinadas: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos com 40 segundos a 96°C, 40 segundos para anelamento dos “primers” a 55°C, e 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72°C.

Em seguida, foi realizada uma reação para um volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 682pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), 0,2µL de BSA, e 3U da endonuclease de restrição *KpN I* (MBI Fermentas, Lituânia). Esta reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C. Após a digestão enzimática, o produto digerido é observado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo normal (A), a endonuclease de restrição reconhece um sítio de clivagem, apresentando dois fragmentos de tamanhos 406pb e 276pb. Na presença do alelo mutado (G) houve a perda do sítio de clivagem para a endonuclease de restrição, sendo visualizado apenas um fragmento de 682pb. Assim, amostras heterozigotas (AG) apresentam três fragmentos de tamanhos 682pb, 406pb e 276pb (Figura 10).

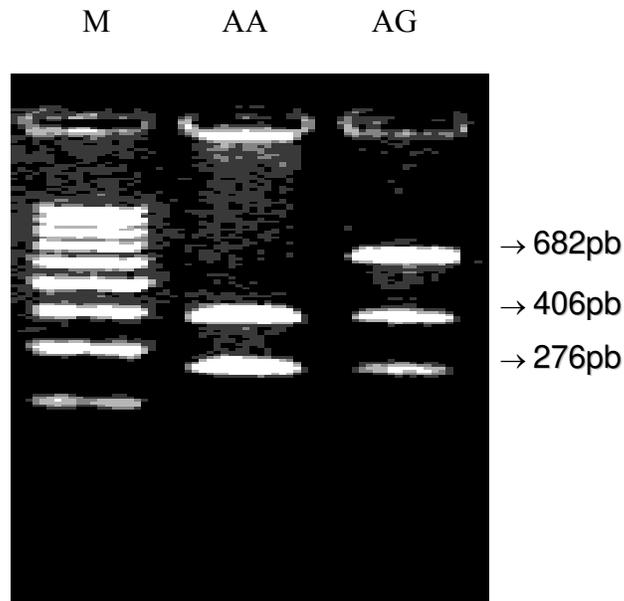


Figura 10- Análise de restrição para o polimorfismo A4751G no gene do FvW (M=marcador).

5.4- Análise estatística

Para descrever o perfil dos grupos estudados foram feitas tabelas das frequências das variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram descritas como mediana, valores máximo e mínimo.

Para comparar as variáveis contínuas foi usado o teste de *Mann Whitney*. As variáveis fatoriais foram comparadas pelo teste exato de Fisher.

Para estudo da distribuição genotípica dos polimorfismos foi utilizado o equilíbrio de Hardy-Weinberg e realizado o cálculo do tamanho amostral.

O cálculo do risco de TVP associado aos polimorfismos foi determinado através do *odds ratio* (OR).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional *R Development Core Team* (2007), versão 2.7.0.

6- RESULTADOS

6.1- Características clínicas

Foram incluídos 174 pacientes com TVP, sendo 53 (30,5%) do sexo masculino e 121 (69,5%) do sexo feminino. O grupo controle foi composto por 173 indivíduos, 52 (30,1%) do sexo masculino e 121 (69,9%) do sexo feminino.

A tabela 1 apresenta os dados relativos à mediana da idade, sexo e etnia dos pacientes e grupo controle.

Tabela 1- Características clínicas dos pacientes com TVP e do grupo controle.

	Pacientes N = 174	Controles N = 173	p*
Sexo			
Masculino/Feminino	53/121	52/121	1
Idade			
Mediana (mínimo-máximo)	36 (18 – 68)	35 (18 – 68)	0,56
Etnia			
Caucasóide	100 (57,5%)	99 (57,2%)	
Miscigenado	41 (23,5%)	44 (25,4%)	0,88
Negróide	33 (19%)	30 (17,4%)	

*Teste exato de *Fisher* foi usado para variáveis fatoriais e o teste de *Mann-Whitney* para variáveis contínuas na comparação entre os grupos de pacientes com TVP e controles.

Analisando a variável sexo nos pacientes e controles estudados, observamos um predomínio de indivíduos do sexo feminino. Com relação à etnia, notamos um predomínio de indivíduos caucasóides. Como os grupos foram emparelhados quanto a sexo, idade e etnia, não houve diferença significativa nesses parâmetros na comparação entre paciente e controles.

6.2- Dosagens plasmáticas

A tabela 2 mostra os resultados da mediana, mínimo e máximo de FVIII:C, FVIII:Ag e FvW:Ag, nos pacientes e controles.

Tabela 2- Comparação das dosagens plasmáticas de fatores da coagulação entre o grupo controle e o grupo de pacientes com TVP.

	Pacientes (n =174)	Controles (n =173)	p*
FVIII:C			< 0,001
Mediana (mínimo-máximo)	203,7 (69,5 – 510,1)	127 (50 – 324,9)	
FVIII:Ag			< 0,001
Mediana (mínimo-máximo)	109,6 (45,6 – 332,5)	82,4 (32,2 – 338,5)	
FvW:Ag			< 0,001
Mediana (mínimo-máximo)	154,2 (40,7 – 400)	108 (46,5 – 219)	

* Teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparação das variáveis entre os grupos de controles e pacientes.

A análise dos fatores de coagulação mostrou que o grupo de pacientes apresentou níveis plasmáticos significativamente maiores dos 3 fatores estudados, quando comparados com o grupo controle.

6.3- Análise das alterações moleculares

Neste estudo foram determinados um polimorfismo (C1852G) e uma mutação (C4006T) no gene da ADAMTS13, que alguns pesquisadores demonstraram estar relacionados com secreção e atividade reduzidas da ADAMTS13. Também foi incluída a análise do polimorfismo C1797T, ainda não descrito na literatura, identificado durante a análise do polimorfismo C1852G pela técnica de SSCP.

No gene do FvW foi avaliado o polimorfismo A4751G, que alguns pesquisadores demonstraram estar relacionado com níveis plasmáticos diminuídos de FvW.

Posteriormente, a casuística para o polimorfismo A4751G no gene do FvW e para o polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13 foi estendida em ambos os grupos, seguindo os mesmos critérios de inclusão e exclusão. A tabela 3 mostra o número de indivíduos analisados em cada um dos grupos para cada alteração molecular.

Tabela 3- Participantes do estudo molecular.

Alteração molecular	Pacientes com TVP	Controles
ADAMTS13 - C1852G	173	170
ADAMTS13 - C1797T	435	580
ADAMTS13 - C4006T	173	170
FvW – A4751G	435	580

A distribuição dos genótipos para os três polimorfismos analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O cálculo do tamanho amostral revelou que o número de indivíduos incluídos não foi adequado. O número mínimo necessário com poder estatístico de determinar uma diferença entre os grupos analisados, com um erro de 20% para os polimorfismos A4751G e C1797T era de 18471 indivíduos, e para o polimorfismo C1852G era de 4569 indivíduos.

A tabela 4 mostra as características clínicas dos grupos de pacientes e controles, em que foram incluídos um maior número de indivíduos, para análise do polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13 e do polimorfismo A4751G no gene do FvW.

Tabela 4- Características dos pacientes e controles analisados quanto aos polimorfismos C1797T no gene da ADAMTS13 e A4751G no gene do FvW.

	Pacientes N = 435	Controles N = 580
Sexo		
Masculino/Feminino	35,8% / 64,2%	29,3% / 70,7%
Idade		
Mediana (mínimo-máximo)	37 (18 – 70)	35 (18 – 70)
Etnia		
Caucasóide	61,7%	73,2%
Miscigenado	18%	14,1%
Negróide	20,3%	12,7%

A tabela 5 apresenta a prevalência dos genótipos para cada polimorfismo nos grupos de pacientes e controles.

Tabela 5- Prevalência dos polimorfismos/mutação no grupo controle e no grupo TVP.

	Pacientes	Controles	p*	OR (IC95%)
FvW A4751G				
AA	433 (99,5%)	574 (99%)	0,478	0,44 (0,04 – 2,49)
AG	2 (0,5%)	6 (1%)		
GG	0 (0%)	0 (0%)		
AD13 – C1852G				
CC	165 (95,38%)	163 (95,86%)	1	1,12 (0,35 – 3,73)
CG	8 (4,62%)	7 (4,14%)		
GG	0 (0%)	0 (0%)		
AD13 – C1797T				
CC	429 (98,6%)	574 (99%)	0,771	1,34 (0,35 – 5,04)
CT	6 (1,4%)	6 (1%)		
TT	0 (0%)	0 (0%)		
AD13 – C4006T				
CC	173 (100%)	170 (100%)		
CT	0 (0%)	0 (0%)		
TT	0 (0%)	0 (0%)		

*Análise estatística pelo teste exato de *Fisher*.

Como pode ser observado, não houve diferença significativa da prevalência das alterações moleculares estudadas entre os grupos. Além disso, nenhuma associou-se ao risco de trombose.

Como foi descrito que o polimorfismo A4751G está relacionado a níveis diminuídos de FvW, avaliamos a correlação dos genótipos com os níveis plasmáticos de FvW, FVIII:Ag e FVIII:C. No grupo de pacientes e controles que fizeram as dosagens, identificamos apenas 3 indivíduos heterozigotos, sendo estes todos do grupo controle. Portanto, foi feita a comparação das medianas dos fatores da coagulação avaliados entre estes 3 indivíduos e os outros 167 controles homozigotos normais. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6- Comparação dos genótipos para polimorfismo FvW A4751G em relação às dosagens plasmáticas do FvW, FVIII:Ag e FVIII:C no grupo controle.

Fatores	Controles AA (n = 167) Mediana (Min – Máx)	Controles AG (n = 3) Mediana (Min – Máx)	P
FvW:Ag	108,1 (46,5 – 219)	75,3 (59,4 – 85,4)	0,07
FVIII:Ag	84,6 (32,3 – 338,5)	58 (56,2 – 63,2)	0,08
FVIII:C	127 (50 – 324,9)	81,4 (63,8 – 102,8)	0,04

*Análise estatística pelo teste *de Mann-Whitney*.

Os resultados mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre o genótipo AG e atividade plasmática diminuída de FVIII:C. Embora não estatisticamente significativa, observou-se uma tendência de associação entre o genótipo AG e níveis plasmáticos diminuídos de FVIII:Ag e FvW:Ag.

Como foi descrito que o polimorfismo C1852G está relacionado a níveis diminuídos de ADAMTS13, avaliamos a correlação dos genótipos com os níveis plasmáticos de FvW, FVIII:Ag e FVIII:C em ambos os grupos estudados. Os resultados estão apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7- Comparação entre os genótipos para o polimorfismo ADAMTS13 C1852G em relação às dosagens plasmáticas no grupo TVP.

Fatores	TVP CC (n = 165) Mediana (Min – Máx)	TVP CG (n = 8) Mediana (Min – Máx)	P
FvW:Ag	149,5 (40,7 – 400)	162,7 (89,1 – 346,3)	0,27
FVIII:Ag	109,6 (45,6 – 332,5)	113,6 (85 – 141,4)	0,92
FVIII:C	202,1 (69,5 – 510,1)	214,8 (108,4 – 441,4)	0,69

*Análise estatística pelo teste *de Mann-Whitney*.

A análise estatística não mostrou qualquer influência do polimorfismo C1852G sobre os níveis plasmáticos de FvW:Ag, FVIII:Ag e FVIII:C nos indivíduos do grupo TVP.

Tabela 8- Comparação entre os genótipos para o polimorfismo ADAMTS13 C1852G em relação às dosagens plasmáticas no grupo controle.

Fatores	Controles CC (n = 163)	Controles CG (n =7)	P
	Mediana (Min – Máx)	Mediana (Min – Máx)	
FvW:Ag	106,2 (46,5 – 219)	144,6 (73,3 – 192)	0,07
FVIII:Ag	82 (32,3 – 338,5)	141,6 (76,2 – 163,2)	0,07
FVIII:C	126,9 (50 – 324,9)	119 (77,1 – 184,7)	0,95

*Análise estatística pelo teste *de Mann-Whitney*.

A análise estatística não mostrou influência significativa do polimorfismo C1852G sobre os níveis plasmáticos de FvW:Ag, FVIII:Ag e FVIII:C nos indivíduos do grupo controle. No entanto, podemos observar que os controles com genótipo CG mostraram uma tendência a níveis plasmáticos aumentados de FvW:Ag e FVIII:Ag.

No entanto, como o número de indivíduos heterozigotos foi muito pequeno em ambos os grupos, fizemos uma análise comparando as variáveis plasmáticas entre os 15 indivíduos heterozigotos (pacientes + controles) e os 328 indivíduos homozigotos normais (pacientes + controles). Os resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9- Comparação entre os genótipos para o polimorfismo ADAMTS13 C1852G em relação às dosagens plasmáticas (avaliação dos 2 grupos juntos).

Fatores	Controles CC (n = 328)	Controles CG (n =15)	P
	Mediana (Min – Máx)	Mediana (Min – Máx)	
FvW:Ag	122,3 (40,7 – 400)	160,5 (73,3 – 346,3)	0,01
FVIII:Ag	98 (32,3 – 338,5)	116,6 (76,2 – 163,2)	0,05
FVIII:C	157 (50 – 510,1)	179,3 (77,1 – 441,4)	0,40

*Análise estatística pelo teste *de Mann-Whitney*.

Os resultados mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre o genótipo CG e níveis plasmáticos antigênicos elevados de FVIII e FvW, reforçando a hipótese de que na análise no grupo controle, as variáveis plasmáticas FVIII:Ag e FvW:Ag não alcançaram um valor estatisticamente significativo devido ao número limitado de indivíduos heterozigotos.

Com relação ao polimorfismo C1797T no gene da ADAMTS13, dos 12 indivíduos do grupo de pacientes com TVP e controles que eram heterozigotos, apenas um paciente tinha dosagem plasmática dos fatores de coagulação. Portanto, não foi possível fazer uma análise da relação entre os genótipos deste polimorfismo e a mediana das dosagens plasmáticas dos fatores.

7- DISCUSSÃO

O TEV é uma doença multifatorial decorrente da interação dinâmica entre fatores de risco genéticos e adquiridos. No entanto, em aproximadamente 30% dos pacientes com TEV não se identifica nenhum fator desencadeante, fato que sugere a presença de mecanismos adicionais ainda desconhecidos na etiologia da doença.

Vários estudos já demonstraram que o aumento do nível plasmático de FVIII é um fator de risco independente e prevalente para o TEV [Kraaijenhagen *et al.*, 2000; Mello, 2006]. Isso faz do FVIII e de outros componentes do sistema hemostático a ele associado, candidatos interessantes a serem investigados em pacientes com TEV.

7.1- Características clínicas

A análise deste estudo requer que se ressalte a seleção dos pacientes incluídos. Para que se obtivesse uma casuística que permitisse uma análise comparativa entre os grupos, foram revisados os atendimentos no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro pelo período dos últimos 17 anos, pois os critérios de seleção eram muito excludentes. Por outro lado, um grupo tão selecionado pode favorecer a identificação de fatores de risco para TVP ainda desconhecidos.

Nesta casuística houve um predomínio de mulheres, talvez pelo fato destas estarem expostas a fatores de risco adicionais quando comparadas aos homens, tais como gestação, puerpério, uso de ACH e TRH. Apesar da idade avançada ser um fator de risco bem estabelecido para TVP, a casuística deste estudo foi constituída principalmente por indivíduos jovens, onde 70% apresentavam menos de 40 anos. Esses dados sugerem que outros fatores de risco, hereditários ou adquiridos, devem ter maior relevância como fator desencadeante dos episódios trombóticos nessa faixa etária.

Com relação à etnia, observamos um predomínio de indivíduos Caucasóides em relação aos Afro-descendentes. No entanto, devido ao perfil miscigenado da população brasileira, isto pode não corresponder à verdade absoluta. Um estudo genético com brasileiros demonstrou que 30% daqueles considerados como Caucasóides, pela cor da pele apresentavam contribuição africana no total de DNA mitocondrial [Alves *et at.*, 2000].

7.2- Dosagens plasmáticas

A dosagem antigênica foi a única forma de avaliação do FvW. Para o FVIII foram realizadas as quantificações antigênica e funcional. Os métodos coagulométrico e cromogênico são os dois métodos de aferição funcional do FVIII. Alguns estudos que confrontaram os métodos para a dosagem do FVIII observaram que estes mostraram alta correlação entre si [O'Donnell *et al.*, 1997 ; Chandler *et al.*, 2003].

De qualquer forma, o risco de evento trombótico associado a níveis elevados de FVIII já está bem estabelecido, independente do método de mensuração utilizado.

Os resultados obtidos com a análise do FVIII e FvW revelaram que ambos estavam significativamente aumentados neste grupo de pacientes com TVP. Este achado reforça a importância destes fatores da coagulação na fisiopatologia do TEV.

Conforme descrito por outros autores, o aumento das concentrações de FVIII não foi secundário a uma reação de fase aguda, uma vez que todos os indivíduos participantes deste estudo apresentavam valores normais de proteína C reativa, um marcador importante para descartar um processo agudo [O'Donnell *et al.*, 2000].

Além disso, o aumento de FVIII e FvW não parece ser decorrente de um processo pós-trombótico, uma vez que para a realização da coleta de sangue foi respeitado um tempo mínimo de seis meses após a trombose.

7.3- Avaliação de polimorfismos e mutações

Durante os últimos anos, um grande número de estudos tem investigado alterações moleculares no gene do FVIII em pacientes com níveis plasmáticos elevados deste fator. Apesar de terem sido descritos diversos polimorfismos e mutações neste gene, nenhum deles se correlacionou com os níveis aumentados de FVIII [Viel *et al.*, 2007].

Assim, neste estudo foram avaliados os genes do FvW e da ADAMTS13, uma vez que alterações nos níveis plasmáticos destas duas proteínas, poderiam resultar, de forma indireta, na alteração da concentração plasmática do FVIII.

7.3.1- Polimorfismo no gene do FvW

O presente estudo foi o primeiro a analisar o polimorfismo A4751G no gene do FvW em pacientes com TVP. Este polimorfismo foi escolhido para o estudo por estar associado a níveis plasmáticos diminuídos de FvW, e portanto, poderia ter relação com níveis diminuídos de FVIII e, conseqüentemente, ter um efeito protetor para TVP.

Inicialmente, avaliamos a prevalência deste polimorfismo nos grupos de pacientes e controles que haviam realizado a dosagem plasmática do FVIII e FvW, totalizando 343 indivíduos. Nesta casuística, foi verificado que o genótipo AG correlacionou-se apenas com concentrações diminuídas de FVIII:C plasmático. No entanto, não podemos descartar a possibilidade da associação deste polimorfismo com níveis reduzidos de FVIII:Ag e FvW:Ag, uma vez que apenas 3 indivíduos apresentavam esse polimorfismo, e em heterozigose.

Posteriormente, com o objetivo de identificar um maior número de indivíduos que apresentavam essa alteração, e que permitisse analisar alguma associação com o risco de TVP, a casuística foi aumentada em ambos os grupos estudados. Como esses novos indivíduos não tinham as análises plasmáticas de FVIII e FvW disponíveis, não foi possível avaliar uma associação com o FVIII:Ag e FvW:Ag. A prevalência de indivíduos heterozigotos no grupo controle foi de 1%, concordante com o descrito por Davies *et al.* (2007).

O polimorfismo A4751G já foi investigado em pacientes hemorrágicos, tal como indivíduos portadores da doença de von Willebrand tipo 1, onde a prevalência de indivíduos heterozigotos é muito maior àquela encontrada em controles normais, variando entre 7 – 25% [O'Brien *et al.*, 2003 ; Bowen *et al.*, 2005 ; Hasemi *et al.*, 2005]. A análise deste polimorfismo em 374 pacientes com doença trombótica arterial e 332 controles saudáveis, mostrou uma prevalência de heterozigose semelhante entre os 2 grupos, de 0,5% e 0,6%, respectivamente [Bongers *et al.*, 2007].

Neste estudo, não foi observada diferença na prevalência do polimorfismo A4751G entre os grupos de pacientes e controles, mesmo com uma casuística superior a todos os estudos anteriores. Assim não foi possível atribuir a ele um papel protetor para

TVP. Mesmo assim o tamanho amostral é inferior ao necessário para uma conclusão definitiva. Por outro lado, considerando a alta prevalência desse polimorfismo em pacientes com doença hemorrágica, caso houvesse um efeito protetor para TVP, um estudo piloto como o nosso poderia demonstrar essa tendência, fato que não foi confirmado.

7.3.2- Polimorfismos no gene da ADAMTS13

Durante os últimos anos, um grande número de estudos tem investigado o papel de polimorfismos e mutações no gene da ADAMTS13 na fisiopatologia da púrpura trombocitopênica trombótica. Atualmente, já está bem definido que mutações no gene da ADAMTS13 são responsáveis pela púrpura trombocitopênica trombótica hereditária [Schneppenheim *et al.*, 2003 ; Veyradier *et al.*, 2004 ; Rieger *et al.*, 2006 ; Kokame, 2008].

Até o momento mais de 80 alterações genéticas, incluindo polimorfismos e mutações foram identificadas no gene da ADAMTS13, e algumas destas têm sido associadas à redução na concentração antigênica e atividade da ADAMTS13 no plasma, levando a um estado pró-trombótico [Kokame *et al.*, 2002 ; Veyradier *et al.*, 2004; Schneppenheim *et al.*, 2006]. A nossa hipótese inicial era de que a presença destas alterações moleculares poderia estar associada a níveis aumentados de FvW e FVIII, aumentando assim o risco de TVP.

A proposta inicial do nosso estudo era a análise do polimorfismo C1852G localizado no éxon 16 e da mutação C4006T localizada no éxon 28, do gene da ADAMTS13. Durante a determinação do polimorfismo C1852G pelo método de SSCP, foi observada em uma das amostras analisadas a presença de outro padrão. O sequenciamento mostrou que esse outro padrão correspondia à alteração molecular C1797 T, ainda não descrita na literatura, sendo a mesma incluída nesta análise. Este é o primeiro estudo que avaliou estas alterações moleculares em pacientes com TVP.

O polimorfismo C1852G e a mutação C4006T foram selecionados pelo fato de ambos estarem relacionados a níveis reduzidos de ADAMTS13. O estudo de Plaimauer *et al.*, (2006) utilizando técnicas de mutagênese e expressão em cultura de células, demonstrou que a presença do polimorfismo C1852G em homozigose provocava

uma redução dos níveis antigênicos e de atividade para 27% e 14% dos níveis normais, respectivamente. A mutação C4006T revelou valores ainda menores, de 23% e 12%, respectivamente.

Inicialmente avaliamos a prevalência dessas alterações moleculares nos grupos de pacientes e controles que também tinham realizado as dosagens plasmáticas do FVIII e FvW. Nesta casuística, a mutação C4006T não foi detectada em nenhum dos pacientes e controles. Este achado é concordante com a literatura, pois até o presente momento nenhum estudo detectou esta mutação em indivíduos normais. Antoine *et al.* (2003) ao avaliarem a prevalência dessa mutação em 115 controles normais, não identificaram nenhum alelo mutado.

Também nosso estudo não mostrou diferença na prevalência dos genótipos do polimorfismo C1852G entre os grupos estudados. A prevalência deste polimorfismo no grupo controle foi de 4,11%, um valor muito abaixo do relatado no estudo de Antoine *et al.* (2003). Um fato que pode explicar esta discrepância é que as alterações moleculares relacionadas a alguns padrões diferentes observados no SSCP, ainda não foram definidas por seqüenciamento. Uma delas (PD2), parece corresponder à combinação de um alelo mutado para o polimorfismo C1852G e a outra (PD3) a uma das alterações ainda não definidas (ver figura 4). Assim, ainda estamos realizando o sequenciamento destas amostras para confirmar essa hipótese.

Neste estudo também verificamos que não houve correlação entre os genótipos do polimorfismo C1852G e as concentrações plasmáticas dos fatores avaliados, tanto no grupo de pacientes como no grupo controle. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de uma associação com níveis aumentados de FVIII:Ag e FvW:Ag, pois houve uma tendência ($p = 0.07$) de correlação no grupo controle. Talvez a inclusão de um maior número de indivíduos pudesse evidenciar essa associação, pois neste estudo apenas foram identificados 7 indivíduos heterozigotos, fato que é corroborado pela análise conjunta de todos os indivíduos heterozigotos (pacientes + controles).

Outro ponto a ser considerado é que a população de pacientes não parece ser o grupo mais adequado para se demonstrar a influência do polimorfismo C1852G nas dosagens antigênicas de FVIII e FvW. Estes indivíduos por serem portadores de uma

doença multifatorial, podem ser carreadores de outras alterações moleculares mais relevantes que acabam mascarando o efeito do polimorfismo C1852G nas dosagens plasmáticas. Por outro lado, no grupo controle, considerado saudável, a presença do polimorfismo C1852G pode evidenciar mais adequadamente suas conseqüências sobre os níveis plasmáticos de FVIII e FvW.

A alteração molecular C1797T foi definida como um polimorfismo, pois estava presente em 1% dos controles e em 1,4% dos pacientes, e o mesmo ainda não foi descrito na literatura.

Como no grupo de pacientes e controles que tinham a dosagem do FVIII e FvW, apenas um paciente apresentou o polimorfismo C1797T em heterozigose, não foi possível avaliar a correlação entre essas variáveis. No entanto, não podemos descartar a possibilidade deste polimorfismo alterar os níveis plasmáticos destes fatores da coagulação, e somente a inclusão de um maior número de indivíduos possibilitaria uma conclusão.

Quanto à relação entre esse polimorfismo e o risco de TVP, a mesma não foi demonstrada, pois não houve diferença na sua prevalência entre os grupos de pacientes e controles.

O fato da alteração dos níveis plasmáticos de fator VIII ser multigênica reforça a necessidade de estudos adicionais envolvendo não só o gene do FVIII, mas também outros genes relacionados, com o intuito de elucidar a origem dos níveis aumentados desse fator na TVP. Apesar de não termos encontrado nenhuma relação estatisticamente significativa entre as alterações moleculares e o FVIII e o FvW, este dado contribuiu para o conhecimento nessa área. Além disso, indícios de uma relação entre o polimorfismo C1852G e as concentrações plasmáticas dos fatores avaliados sugere que a inclusão de um maior número de indivíduos pode ser interessante para uma conclusão definitiva.

Também não demonstramos nenhum risco de TVP relacionado às alterações moleculares nos genes do FvW e da ADAMTS13 incluídas neste estudo, sugerindo que as mesmas não devem estar relacionadas à alterações fenotípicas que pudessem agravar ou proteger o TEV.

8- CONCLUSÕES

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

- Níveis plasmáticos aumentados de FVIII:C e FvW:Ag estão associados ao risco de TVP;
- Apesar do polimorfismo A4751G no gene do FvW, estar associado à diminuição do FVIII:C, não mostrou um efeito protetor para TVP;
- Apesar da tendência de associação entre o polimorfismo C1852G no gene da ADAMTS13 e aumento do FVIII:Ag e FvW:Ag, esta hipótese somente poderá ser confirmada com a inclusão de um maior número de indivíduos no estudo;
- Os polimorfismos C1852G e C1797T e a mutação C4006T no gene da ADAMTS13 não são fatores de risco para TVP.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves SJ, da Silva SMS, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SDJ, *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet** 2000; 67(3):775.

Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Shima M, Saenko EL. Catabolism of the coagulation factor VIII. **Trends Cardiovasc Med** 2001; 11(6):251-7.

Antonie G, Zimmermann K, Plaimauer B, Grillowitzer M, Studt JD, Lämmle B, *et al.* ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. **Br J Haematol** 2003; 120:821-4.

Bertina RM. Elevated clotting factors levels and venous thrombosis. **Pathophysiol Haemost Thromb** 2004; 33:395-400.

Blajcham MA, Austin RC, Fernandez-Rachubinski F, Sheffield WP. Molecular basis of inherited human antithrombin deficiency. **Blood** 1992; 80(9):2159-71.

Bongers TN, De Maat MPM, Deckers JW, Dippel DWJ, Leebeek FWG. Frequency of the von Willebrand factor Tyr1584Cys polymorphism in arterial thrombosis. **Br J Haematol** 2007; 140:578-92.

Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, *et al.* Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related deficiency. **Blood** 2003; 101(10):3933-9.

Bovenschen N, Van Dijk KW, Havekes LM, Mertens K, Van Vlijmen BJM. Clearance of coagulation factor VIII in very low-density lipoprotein receptor knockout mice. **Br J Haematol** 2004; 126:722-5.

Bovenschen N, Boertjes RC, Van Stempvoort G, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB, *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. **J Biol Chem** 2003; 278(11):9370-7.

Bowen DJ, Maclean RM, Pellard S, Collins PW. High concentrations of coagulation factor VIII and thrombosis: is the factor VIII-binding domain of von Willebrand factor implicated? **Br J Haematol** 2001; 113:655-7.

Bowen DJ, Collins PW, Lester W, Cumming AM, Keeney S, Grundy P, *et al.* The prevalence of the cysteine 1584 variant of von Willebrand factor is increased in type 1 von Willebrand disease: co-segregation with increased susceptibility to ADAMTS-13 proteolysis but not clinical phenotype. **Br J Haematol** 2005; 128:830-6.

Bowen DJ and Collins PW. Insights into von Willebrand factor proteolysis: clinical implications. **Br J Haematol** 2006; 133:457-67.

Chandler WL, Ferrel C, Lee J, Tun T, Kha H. Comparison of three methods for measuring factor VIII levels in plasma. **Am J Clin Pathol** 2003; 120(1):34-9.

Claus RA , Bockmeyer CL , Sossdorf M , Lösche W , Hilberg T. Physical stress as a model to study variations in ADAMTS-13 activity, von Willebrand factor level and platelet activation. **J Thromb Haemost** 2006; 4:902-5.

Dahlbäck B. The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis. **Thromb Res** 1995; 77(1):43.

Davies JA, Collins PW, Hathaway LS, Bowen DJ. Effect of von Willebrand factor Y/C1584 on in vivo protein level and function and interaction with ABO blood group. **Blood** 2007; 109(7):2840-6.

Donadelli R, Banterla F, Galbusera M, Capoferri C, Bucchioni S, Gastoldi S, *et al.* In-vitro and in-vivo consequences of mutations in the Von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura. **Thromb Haemost** 2006; 96: 454-64.

Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. **Clinica Chimica Acta** 2003; 330:31-55.

Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM. ADAMTS-13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. **Br J Haematol** 2007; 138:534-40.

Fowkes FJI, Price JF, Fowkes FGR. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: Systematic review. **Eur J Endovasc Surg** 2003; 25:1-5.

Franchini M & Lippi G. Von Willebrand factor and thrombosis. **Ann Hematol** 2006; 85:415-23.

Franco RF. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2004. p.739-48.

Friederich PW, Sanson BJ, Simiono P. Frequency of pregnancy related venous thromboembolism in anticoagulant factor deficient women: implications for prophylaxis. **Ann Intern Med** 1996; 125:955-60.

Ginsburg D. Identifying novel genetic determinants of hemostatic balance. **J Thromb Haemost** 2005; 3:1561-8.

Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. **N Engl J Med** 1990; 323:1512-6.

Horn IR, Van den Berg BMM, Van den Meijden PZ, Pannekoek H, Van Zonneveld AJ. Molecular analysis of ligand binding to the second cluster of complement-type repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein. **J Biol Chem** 1997; 272(21): 13608-13.

Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Vos HL, Pablo R, Sturk A, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. **Thromb Haemost** 1999; 81(5):680-3.

Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Koster T, Blann AD, Vos HL, *et al.* High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. **Br J Haematol** 2001; 115:156-8.

Keeney S, Grundy P, Collins PW, Bowen DJ. C1584 in von Willebrand factor is necessary for enhanced proteolysis by ADAMTS13 in vitro. **Haemophilia** 2007; 13:405-8.

Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, *et al.* Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. **PNAS** 2002; 99(18):11902-7.

Kokame K. Genetic polymorphism of von Willebrand factor (VWF)-cleaving protease, ADAMTS13. **Brain Nerve** 2008; 60(11):1325-32.

Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbrouke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. **Lancet** 1995a; 345:152-5.

Kraaijenhagen RA, Anker PS, Koopman MMW, Reitsma PH, Prins MH, Van den Ende A, *et al.* High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk for venous thromboembolism. **Thromb Haemost** 2000; 83:5-9.

Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, *et al.* High plasma levels of factor VIII and risk of recurrent venous thromboembolism. **N Engl J Med** 2000; 343(7):457-62.

Lam JK, Chion CK, Zanardelli S, Lane DA, Crawley JTB. Further characterization of ADAMTS-13 inactivation by thrombin. **J Thromb Haemost** 2007; 5:1010-8.

Legnani C, Cosmi B, Cini M, Frascaro M, Guazzaloca G, Palareti G. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. **Br J Haematol** 2004; 124:504-10.

Lenting PJ, Neels JG, Van den Berg BMM, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek H, *et al.* The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. **J Biol Chemist** 1999; 274(34):23734-9.

Lenting PJ, Westein E, Terraube V, Ribba AS, Huizinga EG, Meyer D, *et al.* An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. **J Biol Chemist** 2004; 279(13):12102-9.

Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, *et al.* Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. **Nature** 2001; 413: 488-994.

Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS13 Turns 3. **Blood** 2005; 106(1):11-7. A5

Liu L, Choi H, Bernardo A, Bergeron AL, Nolasco L, Ruan C, *et al.* Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 2536-44.

Loscalzo J. Pathogenesis of thrombosis. In: Williams WJ. Hematology. 5th Edition. New York: McGraw-Hill; 1995. p.1525-31.

Maffei FH, Rollo HÁ, Lastória S. Tromboses venosas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2004. p.855-78.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, *et al.* Structure of the gene for human von Willebrand factor. **J Biol Chemist** 1989; 264(33):19514-27.

Mannucci PM, Capoferri C, Canciani T. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. **Br J Haematol** 2004; 126:213-8.

Mansvelt EPG, Laffan M, McVey JH, Tuddenham EGD. Analysis of the F8 gene in individuals with with plasma factor VIII:C levels and associated venous thrombosis. **Thromb Haemost** 1998; 80:561-5.

Marchetti G, Lunghi B, Legnani C, Cini M, Pinotti M, Mascoti F, *et al.* Contribution of low density lipoprotein receptor-related protein genotypes to coagulation factor VIII levels in thrombotic women. **Haematologica** 2006; 91:1261-3.

Mello TB, Siqueira LH, Montavão SA, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Low density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms are not risk factors for venous thromboembolism. **Thromb Res** 2008;121(5):625-9.

Mello TB. Fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX e FXI como fatores de risco para tromboembolismo venoso em pacientes de uma população brasileira [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Mikhailenko I, Battey FD, Migliorini M, Ruiz JF, Argraves K, Moayeri M, *et al.* Recognition of alfa2-macroglobulin by the low density lipoprotein receptor-related protein requires the cooperation of two ligand binding cluster regions. **J Biol Chemist** 2001; 276(42):39484-91.

Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Saut N, Pellegrina L, Alessi MC, *et al.* Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. **Br J Haematol** 2004; 128:91-9.

Neels JG, Van den Berg BMM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, Van Zonneveld AJ. The second and forth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. **J Biol Chemist** 1999; 274(44):31305-11.

Neels JG, Bovenschen N, Van Zonneveld A-J, Lenting PJ. Interaction between factor VIII and LDL receptor-related protein: Modulation of coagulation? **Trends Cardiovasc Med** 2000; 10:8-14.

O'Donnell J, Tuddenham EGD, Manning RA, Kembell-Cook G, Johnson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. **Thromb Haemost** 1997; 77(5):825-8.

O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of VIIIc in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. **Thromb Haemost** 2000; 83:10-3.

Patel RK, Ford E, Thumpston J, Arya R. Coagulation factor levels and venous thrombosis in the black population. **Thromb Haemost** 2004; 91:828-30.

Pereira AC, Lourenço DM, Maffei FH, Morelli VM, Rollo HA, Zago MA, *et al.* A transcobalamin gene polymorphism and the risk of venous thrombosis. The BRATROS (Brazilian Thrombosis Study). **Thrombosis Research** 2007; 119:183-8.

Pimanda JE, Maekawa A, Wind T, Paxton J, Chesterman CN, Hogg PJ. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13. **Blood** 2004; 103(2):627-9.

Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G, Wernhart W, Bruno K, Ferrari S, *et al.* Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. **Blood** 2006; 107(1):118-25.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood** 1996; 88:3698-703.

Price GC, Thompson SA, Kam PCA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. **Anaesthesia** 2004; 53(5): 483.

Rieger M , Ferrari S , Hovinga JAK , Konetschny C , Herzog A , Koller L , *et al.* Relation between ADAMTS-13 activity and ADAMTS-13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). **Thromb Haemost** 2006; 95:212-20.

Robertorye RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. **Am J Hematol** 2001; 68:256-68.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood** 1995; 85:1504-8.

Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors, a focus on venous thrombosis. **Thromb Haemost** 1997; 78:1-6.

Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. **Thromb Haemost** 1999; 82(2):610-9.

Saenko EL, Yakhyayev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. **J Biol Chemist** 1999; 274(53):37685-92.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 1988 ; 239:487-91.

Santos-Martínez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. **Thromb Res** 2007; doi:10.1016/j.thromres.2007.06.002.

Sarafanov AG, Makogonenko EM, Pechik IV, Radtke KP, Khrenov AV, Ananyeva NM, *et al.* Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. **Biochemistry** 2006; 45: 1829-40.

Sarafanov AG, Makogonenko EM, Andersen OM, Mikhailenko IA, Ananyeva NM, Khrenov AV, *et al.* Localization of the low-density lipoprotein receptor-related protein regions involved in binding to the A2 domain of coagulation factor VIII. **Thromb Haemost** 2007; 98(6):1170-81.

Schambeck CM, Grossmann R, Zonnur S, Berger M, Teuchert K, Spahn A, *et al.* High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. **Thromb Haemost** 2004; 92:42-6.

Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, Angerhaus D, Aumann V, Drewke E, *et al.* Von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. **Blood** 2003; 101(5):1845-50.

Schneppenheim R, Hovinga JAK, Becker T, Budde U, Karpman D, Brockhaus W, *et al.* A common origin of the 4143 insA ADAMTS13 mutation. **Thromb Haemost** 2006; 96:3-6.

Shenkman B, Budde U, Angerhaus D, Lubetsky A, Savion N, Seligsohn U, *et al.* ADAMTS-13 regulates platelet adhesion under flow. **Thromb Haemost** 2006; 96:160-6.

Sousa NC, Annichino-Bizzacchi JM, Locatelli MF, Castro V, Barjas-Castro ML. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. **Haematologica** 2007; 92:236-9.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, *et al.* Genetic susceptibility and its relationship to physiological risk factors: The GAIT study. **Am J Hum Genet** 2000; 67:1452-9.

Tao Z, Anthony K, Peng Y, Choi H, Nolasco L, Rice L, *et al.* Novel ADAMTS-13 mutations in an adult with delayed onset thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Thromb Haemost** 2006; 4:1931-5.

Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. **J Thromb Haemost** 2006; 4:1396-404.

Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, *et al.* Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood** 2004; 104(7):2081-3.

Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet** 1994; 344:1453-7.

Van Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, Terraube V, Castaman G, Van Mourik JA, *et al.* Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance, **J Thromb Haemost** 2005; 3:2228-37.

Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, *et. al.* Ten candidate ADAMTS-13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic púrpura (Upshaw-Schulman syndrome). **J Thromb Haemost** 2004; 2:424-9.

Viel KR, Machiah DK, Warren DM, Khachidze M, Buil A, Fernstrom K, *et. al.* A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels. **Blood** 2007; 109(9):3713-24.

Vlot AJ , Koppelman SJ , Meijers JC, Damas C, Van den Berg HM, Bouma BN , *et al.* Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. **Blood** 1996; 87:1809-16.

Vlot AJ , Koppelman SJ , Bouma BN , Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand factor. **Thromb Haemost** 1998; 79: 456-65.

White RH, Zhou H, Romanos PS. Incidence of idiopathic deep venous thrombosis an secondary thromboembolism among ethnic groups in California. **Ann Intern Med** 1998; 128:737-40.

Willnow TE, Orth K, Herz J. Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. **J Biol Chemist** 1994; 269(22):15827-32.

Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, Chung DW. Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. **PNAS** 2006; 103(49):18470-4.

Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic pupura. **J Biol Chemist** 2001; 276(44):41059-63.

10- ANEXOS

ANEXO 1

Questionário:

Nome do Voluntário: _____ ,

HC: _____, Data de nascimento: _____

Idade: _____ , Sexo: _____,

Endereço: _____

_____ ,

Telefone: _____

Sofre de algumas destas doenças:

Hipertensão arterial: _____,

Diabetes: _____,

Hipo/Hipertireoidismo: _____,

Doença Renal: _____,

Neoplasia: _____,

Doença Hepática: _____,

Doença arterial coronariana: _____,

Doença infecciosa: _____,

Doença inflamatória: _____,

Síndrome do anticorpo antifosfolípido: _____,

Outras _____,

História de trombose venosa profunda na família: **Sim** **Não**

Grau de parentesco: _____

Está fazendo uso de algum medicamento: **Sim** **Não** **Qual (is)?** _____

É tabagista? _____, **É etilista?** _____.

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: “*AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NOS GENES DO FVW E DA ADAMTS13 E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FVIII E FVW EM PACIENTES COM TROMBOSE VENOSA PROFUNDA*”

Responsáveis pelo projeto: LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER

Profa. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

Eu, _____,

idade: _____, Data de Nascimento: _____,

RG: _____, HC: _____,

Residente Rua/Av.: _____

Telefone: _____.

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

Trata-se de um estudo que pretende avaliar parâmetros da coagulação sanguínea (fator VIII e fator de von Willebrand) e alterações genéticas que podem influenciar estes parâmetros da coagulação sanguínea.

Deveremos coletar 9 mL de sangue periférico para as análises laboratoriais necessárias. É essencial que o senhor (a) tenha feito jejum de 8 horas antes de cada coleta para melhor realização dos exames.

Eventualmente, o senhor(a) poderá ser reconvocato a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame.

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da coleta do sangue.

Este estudo não oferecerá ao voluntário, outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em conseqüência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
2. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
5. A sua discordância em participar do estudo não lhe trará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: (19) 3521.8936).

Campinas, ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Luis Fernando Sckayer

Tel: (19) 3521 – 8755

Prof. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Tel: (19) 3521 – 8755

Gostaríamos de saber se o senhor(a) concorda que o seu sangue possa ser armazenado, para que em estudos futuros aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, ele possa ser utilizado novamente para continuarmos a fazer pesquisas relacionadas a distúrbios de coagulação: _____.

Assinatura do Voluntário

